



(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)



1-0050012

(51)^{2022.01} C07K 16/28; A61K 47/68; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2023-00956

(22) 27/07/2021

(86) PCT/CN2021/108666 27/07/2021

(87) WO/2022/022508 03/02/2022

(30) 202010730899.8 27/07/2020 CN; 202010735910.X 28/07/2020 CN

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/05/2023 422A

(73) TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD. (CN)

Room 103, No. 14 Building, No. 3728 Jinke Road, Free Trade Pilot Zone, Pudong
New Area, Shanghai 201203, China

(72) REN, Wenming (CN); LIANG, Jindong (CN); XU, Jianyan (CN); HUANG, Jian
(CN); YANG, Changyong (CN); LIAO, Cheng (CN).

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

(54) THẺ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B-DƯỢC CHẤT, PHƯƠNG PHÁP
ĐIỀU CHẾ NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(21) 1-2023-00956

(57) Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp kháng thể kháng CD79B-dược chất, và phương pháp điều chế nó và sử dụng chúng trong y học. Cụ thể là, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) chứa kháng thể kháng CD79B được tiếp hợp với MMAE hoặc dẫn xuất của nó, exatecan hoặc dẫn xuất của nó, hoặc Eribulin hoặc dẫn xuất của nó, dược phẩm chứa ADC, và sử dụng nó trong bào chế dược chất để điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian CD79B, đặc biệt là sử dụng nó trong bào chế dược chất chống bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79B và đoạn gắn kết kháng nguyên, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống người chứa các vùng CDR của kháng thể kháng CD79B, và dược phẩm chứa kháng thể kháng CD79B người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, và sử dụng nó làm dược phẩm chống ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các khối u ác tính (bệnh ung thư) là nguyên nhân gây tử vong đứng thứ hai trên toàn thế giới và chỉ xếp sau bệnh tim. Trong số đó, u lympho là khối u ác tính có nguồn gốc từ hệ thống bạch huyết cầu và là khối u máu phổ biến nhất trên toàn thế giới. U lympho được chia thành hai lớp: u lympho không Hodgkin (NHL) và u lympho Hodgkin (HL). U lympho không Hodgkin là thuật ngữ chung cho nhóm các bệnh tế bào lympho tăng sinh bất thường có tính không đồng nhất tương đối mạnh, và tỷ lệ mắc của nó cao hơn nhiều so với tỷ lệ mắc u lympho Hodgkin, chiếm khoảng 80% hoặc nhiều hơn trong số các u lympho. U lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL) là loại u lympho thông thường nhất ở người lớn, chiếm khoảng 32,5% trong số các u lympho không-Hodgkin. Trong dân số châu Á, phần trăm là cao hơn, gần 40%. Nó phổ biến hơn ở những bệnh nhân lớn tuổi, với độ tuổi trung bình khởi phát là từ 60-64 tuổi, và với bệnh nhân nam nhiều hơn một chút so với bệnh nhân nữ.

Phác đồ chuẩn bậc nhất hiện nay cho u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL) là rituximab kết hợp với hóa liệu pháp CHOP (R-CHOP). Trước khi đưa ra thị trường rituximab, phác đồ CHOP dựa trên anthracyclin (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, và prednison) là phác đồ điều trị chuẩn bậc nhất cho DLBCL. Phác đồ điều trị R-CHOP đã dẫn đến sự cải thiện đáng kể về thời gian sống lâu dài của bệnh nhân DLBCL. Kết quả thử nghiệm lâm sàng cho thấy rằng so với phác đồ CHOP truyền thống, phác đồ R-CHOP cho DLBCL có thể kéo dài đáng kể thời gian sống thêm trung bình đến 4,9 năm, cho phép thời gian sống không bệnh trung bình vượt quá 6,6 năm, và gia tăng tỷ lệ sống thêm không tiến triển bệnh 5 năm từ 30% đến 54% người bệnh. Tuy nhiên, vẫn có từ 10% đến 15% bệnh nhân kháng thuốc những người bệnh không đáp ứng và từ 20% đến 30% người bệnh người bệnh bị tái phát. Hơn nữa, không phải tất cả người bệnh DLBCL là các ứng viên cho phác đồ R-CHOP, như người bệnh già tuổi trên 80 tuổi, những người không có khả năng trải qua phác đồ R-CHOP chuẩn do thể chất. Phác đồ R-CHOP có thể không hiệu quả trong nhiều loại u lympho xâm lấn, cũng như u lympho tái phát.

DLBCL được phân loại là u lympho tế bào B theo nguồn gốc tế bào lympho. Phức hợp thụ thể kháng nguyên tế bào (B cell antigen receptor-BCR) là phân tử nổi trội nhất trên bề mặt của tế bào B. Phức hệ BCR bao gồm globulin miễn dịch màng (membrane immunoglobulin-mIg) nhận biết và liên kết với kháng nguyên và dị dime của Ig α (CD79a) và Ig β (CD79B) phân phối các tín hiệu kích thích kháng nguyên. Ig α và Ig β là các glycoprotein tương ứng là khoảng 47kDa và khoảng 37kDa, và là các thành viên của siêu họ globulin miễn dịch. Các gen mã hóa Ig α và Ig β được đề cập đến tương ứng là mb-1 và B29. Cả hai Ig α và Ig β có khu vực giống Ig ở đầu tận cùng amino trong vùng ngoại bào. Cả hai Ig α và Ig β có thể được sử dụng là các cơ chất của protein tyrosin kinaza và tham gia vào sự truyền tải tín hiệu BCR.

BCR được biểu hiện rộng rãi trên u lympho tế bào B cũng như trên tế bào B bình thường. Được đưa ra thành công lâm sàng và độ an toàn đáng tin cậy của rituximab đích CD20, sự phát triển của liệu pháp đích BCR cũng nên có hiệu quả tốt và an toàn. Kháng thể chữa trị hướng đến kháng lại kháng nguyên CD79B có lợi ở chỗ chúng tạo ra tính kháng nguyên giảm thiểu hoặc không có tính kháng nguyên khi được dùng cho người bệnh (đặc biệt là trong khoảng thời gian điều trị dài). Có nhu cầu cần thiết trong ngành để phát triển kháng thể CD79B hiệu quả và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất của nó để sử dụng trong liệu pháp ung thư hoặc làm chậm tiến triển bệnh ung thư. WO2020156439A bộc lộ kháng thể kháng CD79B và sử dụng nó để điều trị khối u, hàm lượng của kháng thể này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nội dung của nó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD69B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (thể tiếp hợp kháng thể-dược chất-ADC), và sử dụng chúng trong y học, trong đó dược chất ADC chứa kháng thể kháng CD69B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được tiếp hợp với chất gây độc tế bào (MMAE hoặc dẫn xuất của nó, exatecan hoặc dẫn xuất của nó, và eribulin hoặc dẫn xuất của nó) được đề xuất.

Kháng thể kháng CD79B và đoạn liên kết kháng nguyên của nó

WO2020156439A bộc lộ kháng thể kháng CD79B và sử dụng nó trong điều trị khối u, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nó.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79B và đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

chuỗi nặng HCDR1 chứa trình tự được nêu trong GX₁X₂FX₃X₄Y (SEQ ID NO: 24), trong đó X₁ là S hoặc Y, X₂ là S hoặc T, X₃ là T hoặc S, và X₄ là S hoặc T;

chuỗi nặng HCDR2 chứa trình tự được nêu trong X₅PRSGN (SEQ ID NO: 25),

trong đó X_5 là F hoặc Y;

chuỗi nặng HCDR3 chứa $X_6X_7X_8X_9X_{10}GDFX_{11}Y$ (SEQ ID NO: 26), trong đó X_6 không có hoặc G, X_7 không có hoặc S, X_8 là G hoặc D, X_9 là D hoặc Y, X_{10} là L hoặc D, và X_{11} là D hoặc A;

chuỗi nhẹ LCDR1 chứa $RSSQSIVHX_{12}GNTYX_{13}E$ (SEQ ID NO: 27), trong đó X_{12} là S hoặc H, và X_{13} là F hoặc L;

chuỗi nhẹ LCDR2 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc 17; và

chuỗi nhẹ LCDR3 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể chứa ít nhất 1 HCDR được nêu trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm trong số sau: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15; và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể chứa ít nhất 1 LCDR được nêu trong trình tự được chọn từ nhóm bao gồm trong số sau: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa:

(a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 23, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12;

(b) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12; hoặc

(c) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 13, 14 và 15, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 16, 17 và 18.

Theo một số phương án cụ thể, trong sơ đồ trên (a) (cụ thể là, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 23, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12), kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa VH được nêu trong SEQ ID NO: 19 và VL được nêu trong SEQ ID NO: 20, hoặc kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng chiều dài hoàn chỉnh được nêu trong SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ chiều dài hoàn chỉnh được nêu trong SEQ ID NO: 29 không được bao gồm.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên

của nó được mô tả trên đây là kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể người, hoặc đoạn của nó, ví dụ, kháng thể được làm giống người hoặc đoạn của nó.

Theo một số phương án, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa:

trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc 5 hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống với SEQ ID NO: 3 hoặc 5;

và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa:

trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 4 hoặc 6 hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống với SEQ ID NO: 4 hoặc 6.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa VH chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 3 và VL chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 4; hoặc VH chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 5 và VL chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 6.

Trong một số phương án khác, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa:

VH chứa:

trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 19 hoặc 21 hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống với SEQ ID NO: 19 hoặc 21;

và/hoặc VL chứa:

trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 20 hoặc 22 hoặc có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống với SEQ ID NO: 20 hoặc 22.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa VH chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 19 và VL chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 20; hoặc VH chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 21 và VL chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây chứa và vùng hằng định chuỗi nhẹ, trong đó ưu tiên là, vùng hằng định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 người và các biến thể thông thường của chúng và vùng hằng định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định của chuỗi κ và λ kháng thể người và các biến thể thông thường của chúng.

Theo một số phương án cụ thể, vùng hằng định chuỗi nặng là IgG1 hoặc IgG2 người.

Theo một số phương án, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn của

nó, chứa:

chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 hoặc trình tự biến thể của nó, trong đó trình tự biến thể chứa từ 0 đến 10 sự thay đổi axit amin trong chuỗi nặng; và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29 hoặc trình tự biến thể của nó, trong đó trình tự biến thể chứa từ 0 đến 10 sự thay đổi axit amin trong chuỗi nhẹ.

Theo một số phương án, được đề xuất là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn của nó, chứa:

chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 hoặc trình tự biến thể của nó, trong đó trình tự biến thể chứa từ 0 đến 10 sự thay đổi axit amin trong chuỗi nặng; và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc trình tự biến thể của nó, trong đó trình tự biến thể chứa từ 0 đến 10 sự thay đổi axit amin trong chuỗi nhẹ.

Theo một số phương án cụ thể, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn của nó được mô tả trên đây có thể là biến thể có từ 0 đến 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10) sự thay đổi axit amin trong VL và/hoặc từ 0 đến 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10) sự thay đổi axit amin trong VH.

Theo một số phương án cụ thể, biến thể được mô tả trên đây có chức năng hoặc hiệu quả sinh học giống hoặc tương tự với kháng thể kháng CD79B ban đầu hoặc đoạn của nó.

Theo một số phương án, đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng CD79B được mô tả trên đây bao gồm Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, kháng thể thẳng, kháng thể chuỗi đơn, scFv, sdAb, sdFv, thể nano, peptibody, kháng thể khu vực, và kháng thể đa đặc hiệu (kháng thể đặc hiệu kép, diabody, triabody, và tetrabody, di-scFv nối tiếp, tri-scFv nối tiếp).

Theo một số phương án, được đề xuất là polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây, ví dụ, ADN hoặc ARN.

Theo một số phương án, được đề xuất là vector biểu hiện chứa polynucleotit được mô tả trên đây, ví dụ, vector biểu hiện nhân chuẩn, vector biểu hiện tiền nhân hoặc vector virus.

Theo một số phương án, được đề xuất là tế bào chủ, ví dụ, tế bào nhân chuẩn hoặc tế bào tiền nhân, được biến nạp các vector biểu hiện này được mô tả trên đây. Theo một số phương án cụ thể, tế bào chủ là vi khuẩn (ví dụ, *Escherichia coli*), nấm men (*Pichia pastoris*), hoặc tế bào động vật có vú (tế bào trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO) hoặc tế bào thận phôi người (human embryonic kidney-HEK) 293).

Theo một số phương án, được đề xuất là phương pháp điều chế kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây, bao gồm: biểu hiện kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trong tế bào chủ được

mô tả trên đây, và phân tách kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ này.

Theo một số phương án, được đề xuất là phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh hoặc trì hoãn sự tiến triển bệnh tăng sinh, chứa:

dùng cho đối tượng kháng thể kháng CD79B người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, polynucleotit mã hóa của nó, hoặc được phẩm được mô tả trên đây với khối lượng hữu hiệu để điều trị hoặc làm chậm bệnh, trong đó bệnh tăng sinh là bệnh ung thư hoặc khối u.

Theo một số phương án cụ thể, bệnh ung thư hoặc khối u là u lympho hoặc bệnh bạch cầu;

u lympho được chọn từ nhóm bao gồm: u lympho tế bào B lớn khuếch tán, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào lympho nhỏ, và u lympho tế bào vôi;

u lympho không Hodgkin được chọn từ nhóm bao gồm: NHL xâm lấn, NHL xâm lấn và tái phát, NHL mạn tính và tái phát, NHL kháng thuốc, và NHL kháng thuốc và mạn tính; và

bệnh bạch cầu được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, và bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính.

Thể tiếp hợp phối tử-dược chất

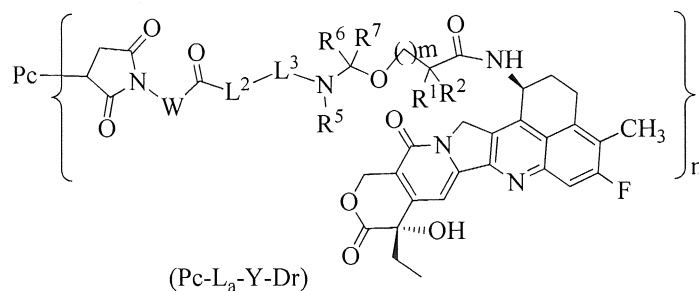
Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó:

dược chất được chọn từ nhóm bao gồm MMAE hoặc dẫn xuất của nó, exatecan hoặc dẫn xuất của nó, và eribulin hoặc dẫn xuất của nó; và

phối tử là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó là một bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79B hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây theo sáng chế.

Thể tiếp hợp phối tử-dược chất (Exatecan hoặc Dẫn xuất của nó)

Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, là thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) có công thức (I) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó:



công thức (I)

trong đó:

W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-cycloalkyl và heteroalkyl thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl này chứa từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó C₁₋₈ alkyl, cycloalkyl và heteroalkyl thẳng này là độc lập và tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơtori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

L² được chọn từ nhóm bao gồm -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-, -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-, -S(CH₂)^{p¹}C(O)- và liên kết hóa học, trong đó p¹ là số nguyên từ 1 đến 20;

L³ là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin, trong đó các axit amin này tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơtori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

R¹ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, cycloalkylalkyl, alkyl được đơtori hóa, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; và

R² được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, haloalkyl, alkyl được đơtori hóa, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl;

hoặc, R¹ và R², cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành cycloalkyl hoặc heterocyclyl;

R⁴ và R⁵ là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đơtori hóa và hydroxyalkyl;

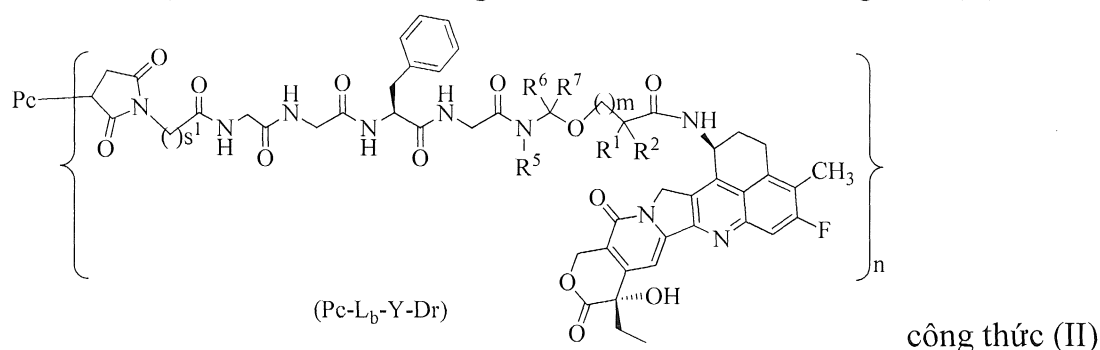
R⁶ và R⁷ là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đơtori hóa và hydroxyalkyl;

m là số nguyên từ 0 đến 4;

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thế tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dung hoặc solvat của nó có công thức (II):

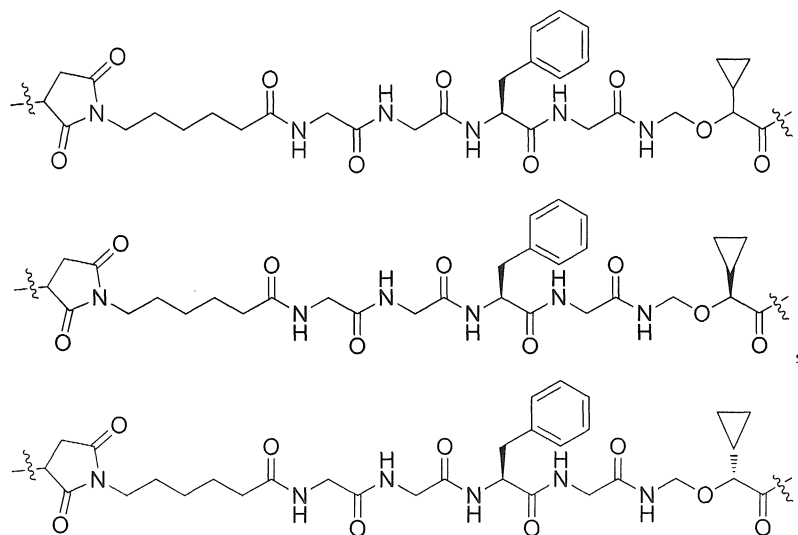


trong đó:

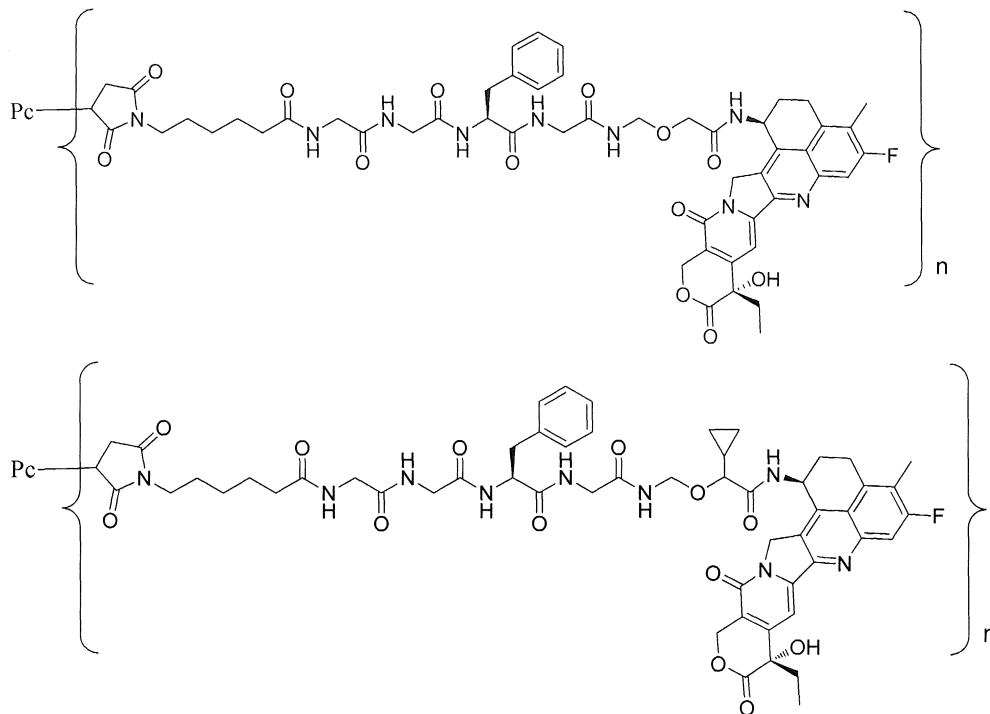
s¹ là số nguyên từ 2 đến 8, ưu tiên là 5; và

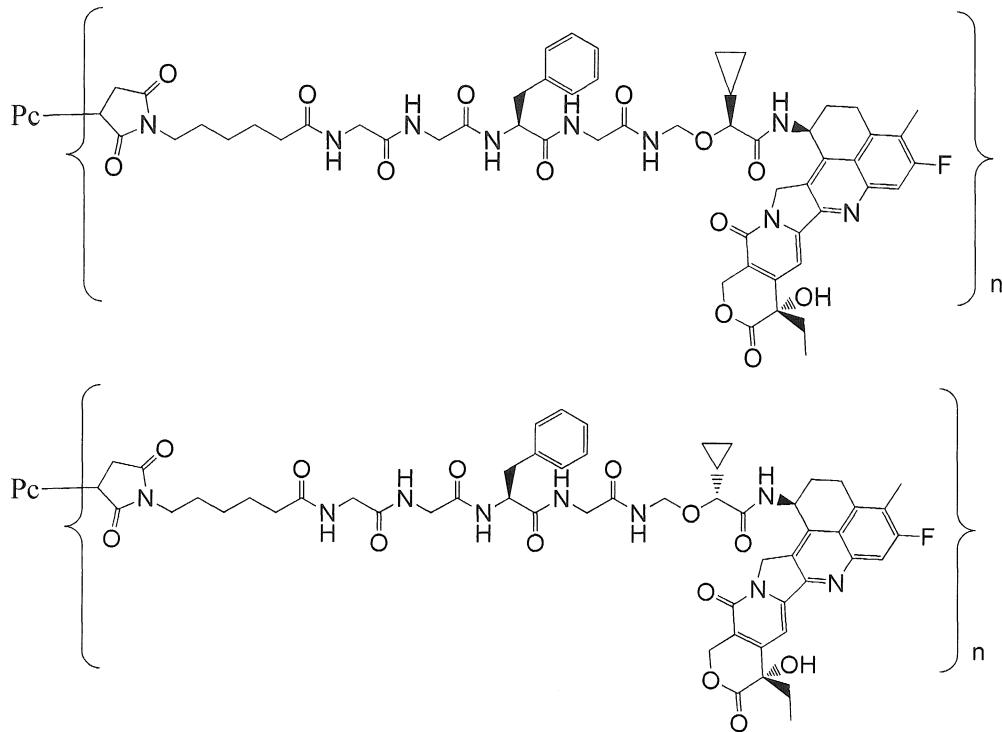
Pc, R¹, R², R⁵-R⁷, m và n là như được xác định trong công thức (I).

Theo một số phương án, thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) theo sáng chế chứa đơn vị đoạn nối -L-Y-, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến:



Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó), hoặc muối dược dụng của nó hoặc solvat của nó, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến:



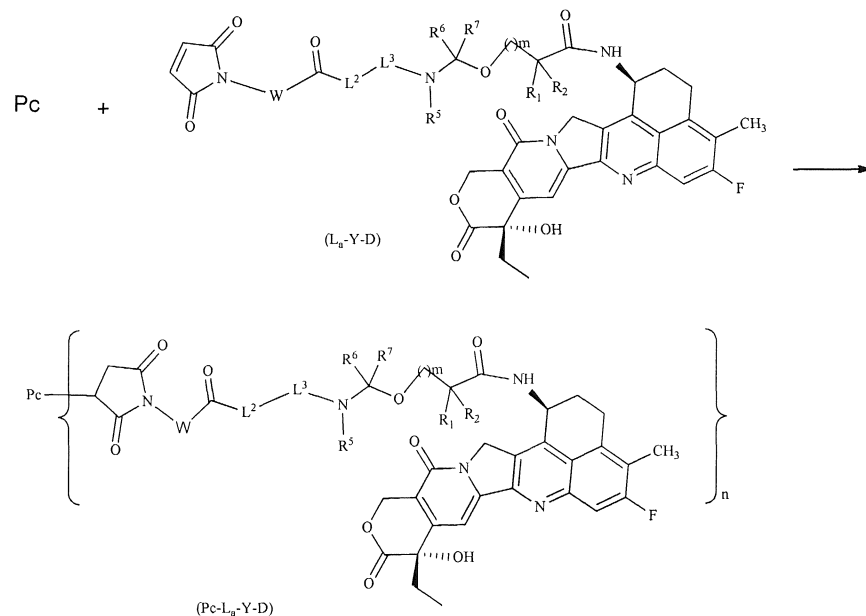


trong đó:

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây theo sáng chế.

Theo một số phương án, được đề xuất là phương pháp điều chế thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) có công thức chung (Pc-L_a-Y-D) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, bao gồm các bước sau:



đưa Pc khử vào phản ứng nối với công thức chung (L_a-Y-D) để thu được hợp chất có công thức chung (Pc-L_a-Y-D);

trong đó Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó

theo sáng chế; và W , L^2 , L^3 , R^1 , R^2 , R^5 - R^7 , m và n là như được xác định trong công thức (I).

Trong các phương án trên, Pc là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79B hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; ưu tiên là kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31.

Theo một số phương án cụ thể, thể tiếp hợp phối tử-exatecan (hoặc dẫn xuất của nó) theo sáng chế bao gồm tautome, mesome, raxemat, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang hoặc đơterit hydrua của nó hoặc hỗn hợp của nó. Hợp chất và phương pháp điều chế nó được mô tả trong WO2020063673 được đưa vào đây toàn bộ nội dung của nó.

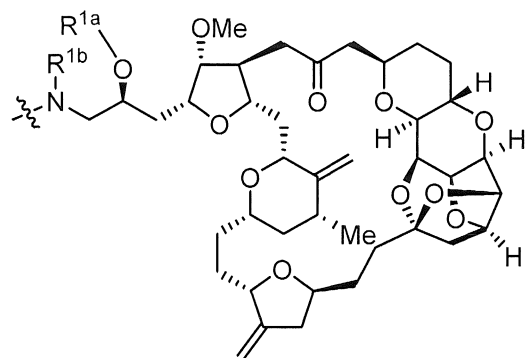
Thể tiếp hợp phối tử-được chất (Eribulin hoặc Dẫn xuất của nó)

Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phối tử-eribulin (hoặc dẫn xuất của nó) có công thức $Pc-(L-D)_k$ hoặc muối được dung hoặc solvat của nó:

trong đó phối tử là Pc , và Pc là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79B hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế;

L là đoạn nối gắn kết đồng hóa trị Pc với D , và k là từ 1 đến 20 (bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc giá trị bất kỳ giữa hai giá trị bất kỳ này); và

D là như được thể hiện trong công thức (III) dưới đây:



công thức (III),

trong đó R^{1a} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl), cycloalkyl (ví dụ, C_{3-8} cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl này độc lập và tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thể được chọn từ nhóm bao gồm alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C_{1-6} alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đơteri,

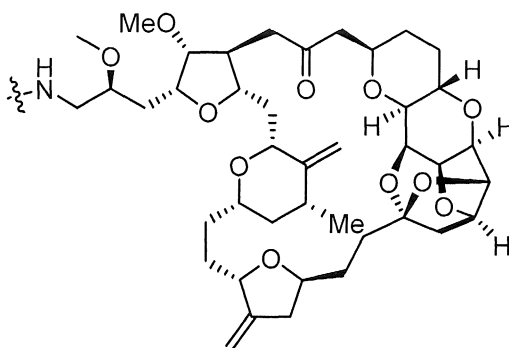
amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1a} là metyl;

R^{1b} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy, cycloalkyl (ví dụ, C_{3-8} cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl này độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C_{1-6} alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1b} là hydro; hoặc

R^{1a} và R^{1b} , cùng với nguyên tử mà chúng được gắn vào, tạo thành C_{5-8} heterocycloalkyl, trong đó heterocycloalkyl này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế trong số alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C_{1-6} alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl (ví dụ, C_{3-8} cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), heterocyclyl, aryl và heteroaryl; và R^{1a} và R^{1b} cả hai không phải là hydro.

Theo một số phương án, trong thể tiếp hợp phối tử-eribulin (hoặc dẫn xuất của nó), R^{1a} trong D là metyl.

Theo một số phương án, trong thể tiếp hợp phối tử-eribulin (hoặc dẫn xuất của nó), D là như được thể hiện trong công thức dưới đây:



Theo một số phương án, trong thể tiếp hợp phối tử-eribulin (hoặc dẫn xuất của nó) là $Pc-(L-D)_k$, k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

Theo một số phương án, đoạn nối này là ổn định ngoại bào, sao cho thể tiếp hợp phối tử-eribulin (hoặc dẫn xuất của nó) vẫn nguyên vẹn trong môi trường ngoại

bào, nhưng có thể phân cắt ví dụ, khi nội hóa trong tế bào ung thư.

Theo một số phương án, khi thể tiếp hợp phổi tử-được chất xâm nhập vào tế bào biểu hiện kháng nguyên, gốc được chất trong thể tiếp hợp này được cắt từ gốc phổi tử, và được chất (ví dụ, eribulin hoặc dẫn xuất của nó) được giải phóng nhờ sự phân cắt.

Theo một số phương án, đoạn nối này chứa gốc có thể phân cắt; trong đó gốc có thể phân cắt này được đặt sao cho không có đoạn nối và Pc vẫn còn trong được chất (ví dụ, dẫn xuất eribulin) sau khi phân cắt.

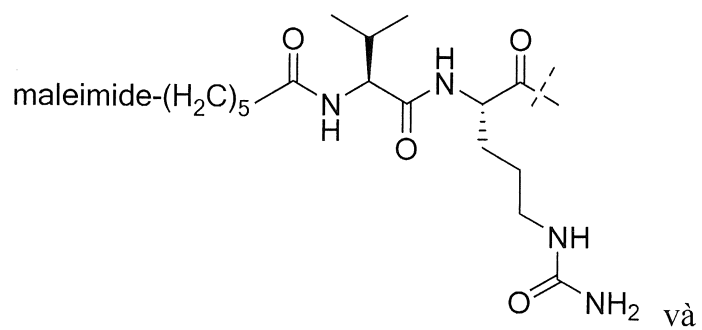
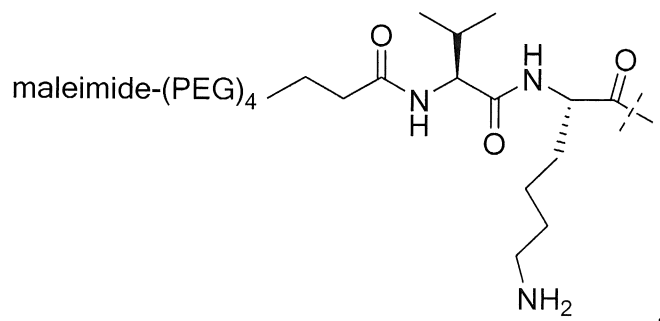
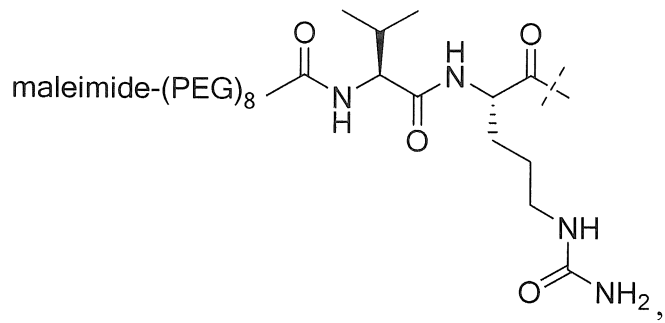
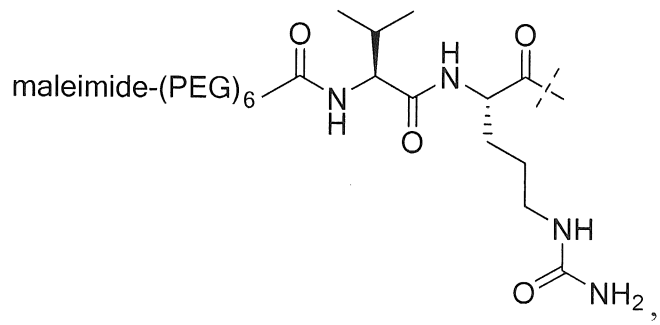
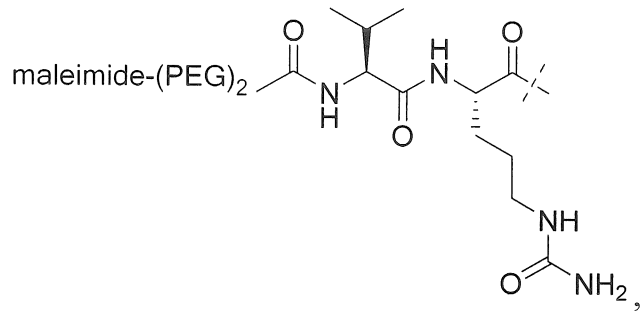
Theo một số phương án, gốc có thể phân cắt trong đoạn nối này là gốc peptit có thể phân cắt.

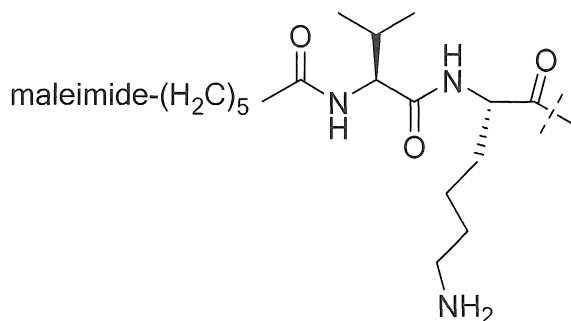
Theo một số phương án, thể tiếp hợp phổi tử-được chất chứa gốc peptit có thể phân cắt này thể hiện mức kết tụ thấp hơn, tỷ lệ kháng thể với được chất được cải thiện, tăng tiêu diệt các tế bào ung thư đích, giảm tiêu diệt các tế bào không phải ung thư không phải đích, và/hoặc tải nạp được chất cao hơn (p).

Theo một số phương án, việc bổ sung gốc có thể phân cắt giảm tính gây độc tế bào và/hoặc tiềm năng liên quan đến đoạn nối không thể phân tách. Theo một số phương án, tiềm năng và/hoặc tính gây độc tế bào được gia tăng trong các bệnh ung thư biểu hiện mức kháng nguyên vừa phải (ví dụ, CD79B). Theo một số phương án, gốc peptit có thể phân cắt này có thể cắt bằng enzym, và đoạn nối này là đoạn nối mà có thể cắt bằng enzym. Theo một số phương án, đoạn nối này là đoạn nối có thể phân cắt bằng cathepsin. Trong các phương án nhất định, đoạn nối mà có thể cắt bằng enzym (ví dụ, đoạn nối mà có thể cắt bằng cathepsin) thể hiện một hoặc nhiều đặc tính cải thiện được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, đoạn nối này chứa đơn vị axit amin (nghĩa là, gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin), trong đó ưu tiên là, các axit amin này được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glycin, valin, lysin, citrullin, serin, axit glutamic và axit aspartic, và ưu tiên hơn là valin-citrullin (Val-Cit), alanin-alanin-asparagin (Ala-Ala-Asn), glycin-glycin-lysin (Gly-Gly-lys), valin-lysin (Val-lys), valin-alanin (Val-Ala), valin-phenylalanin (Val-Phe) và glycin-glycin-phenylalanin-glycin (Gly-Gly-Phe-Gly).

Theo một số phương án, đoạn nối trong thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm:





Theo một số phương án, đơn vị axit amin này chứa valin-citrullin (Val-Cit).

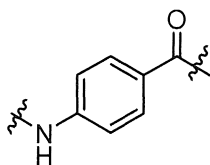
Theo một số phương án, ADC này chứa Val-Cit thể hiện độ ổn định gia tăng, giảm tiêu diệt tế bào không phải đích, gia tăng tiêu diệt tế bào đích, mức kết tụ thấp hơn, và/hoặc tải nạp được chất cao hơn.

Theo khía cạnh khác, đoạn nối được cung cấp bởi một số phương án chứa gốc sulfonamid có thể phân cắt, và đoạn nối này có thể phân cắt dưới điều kiện khử.

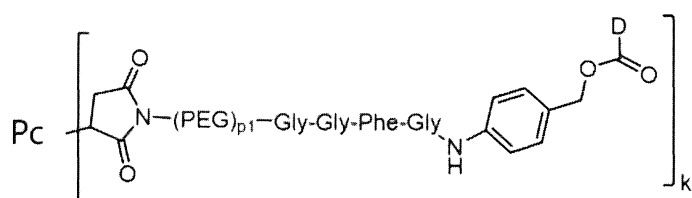
Theo một số phương án, đoạn nối này chứa gốc disulfua có thể phân cắt, và đoạn nối có thể phân cắt dưới điều kiện khử.

Theo khía cạnh khác, đoạn nối theo sáng chế chứa ít nhất một đơn vị đoạn đệm để gắn D (ví dụ, dẫn xuất eribulin) với gốc có thể phân cắt.

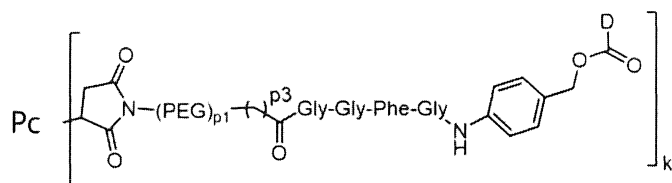
Theo một số phương án, đơn vị đệm chứa *p*-aminobenzyloxycarbonyl (PAB) và



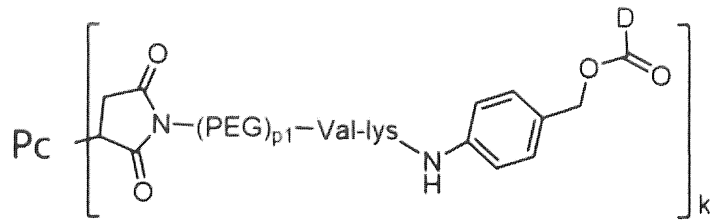
Theo khía cạnh khác, thể tiếp hợp được cung cấp bởi một số phương án là như được thể hiện trong công thức dưới đây:



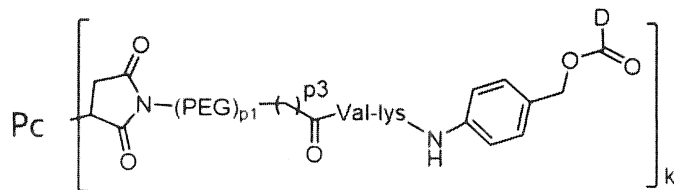
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



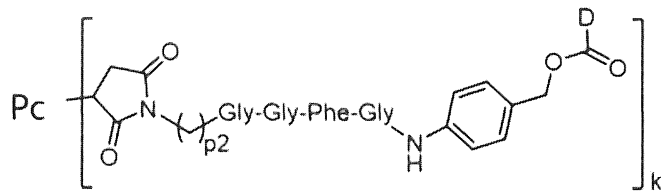
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



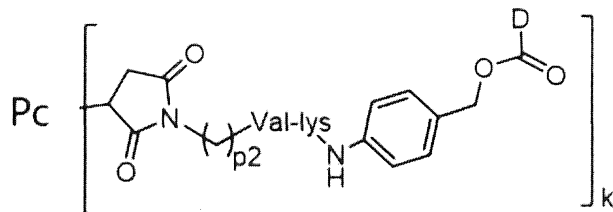
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



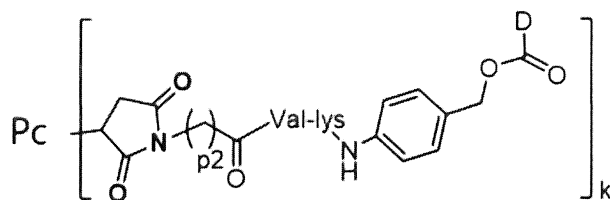
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



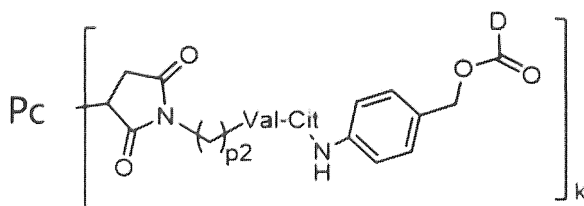
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



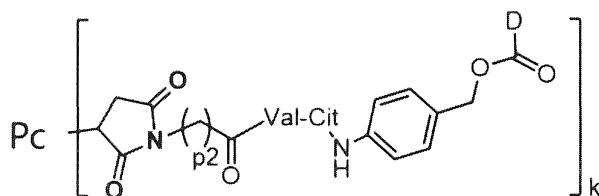
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



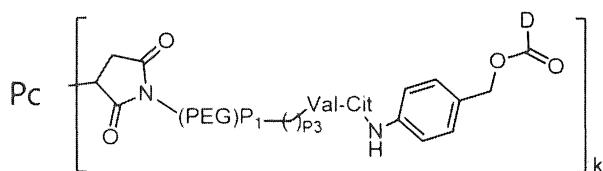
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



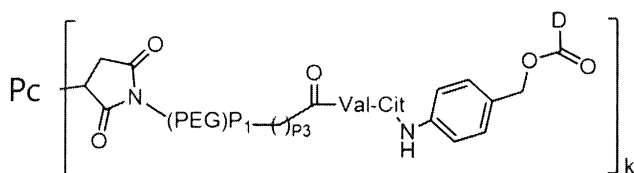
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;

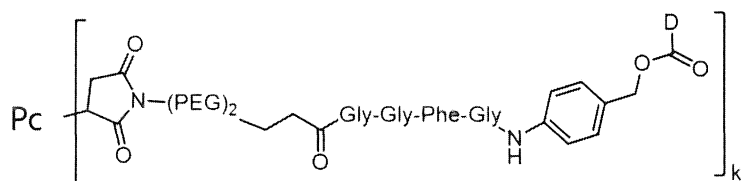
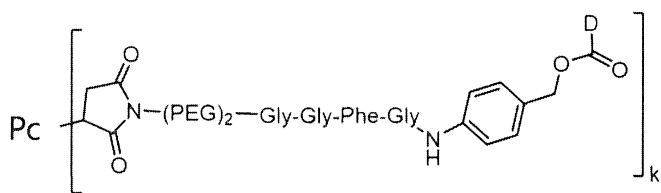


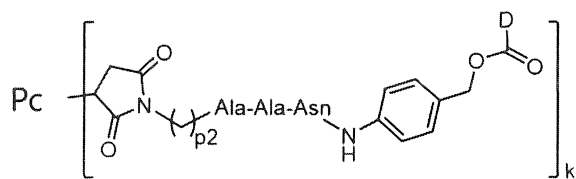
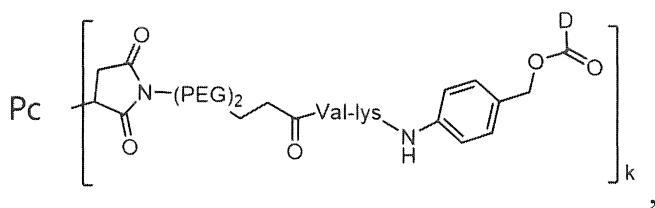
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; P1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



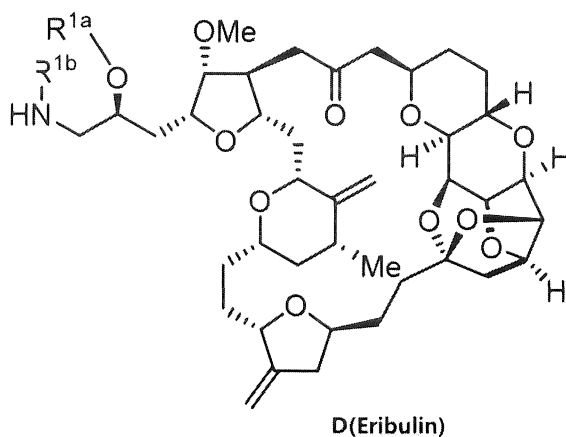
, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; P1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp là như được thể hiện trong các công thức sau:





và , trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; hơn nữa, R^{1a} trong D ưu tiên là được chọn từ metyl, và R^{1b} trong D ưu tiên là được chọn từ hydro. Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức D (eribulin),



, hoặc muối được dụng của nó,

trong đó,

R^{1a} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), cycloalkyl (ví dụ, C₃₋₈ cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl này độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C₁₋₆ alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1a} là metyl;

R^{1b} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy, cycloalkyl (ví dụ, C₃₋₈ cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl này độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm

bao gồm alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C₁₋₆ alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methoxy, ethoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1b} là hydro hoặc methyl; hoặc

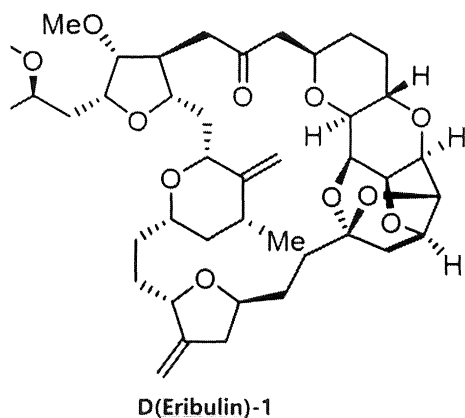
R^{1a} và R^{1b}, cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành C₅₋₈ heterocycloalkyl, trong đó heterocycloalkyl này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế của alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C₁₋₆ alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methoxy, ethoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl (ví dụ, C₃₋₈ cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), heterocyclyl, aryl và heteroaryl; và R^{1a} và R^{1b} cả hai không phải là hydro.

Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức D (eribulin), mỗi R^{1a} và R^{1b} độc lập được chọn từ C₁₋₆ alkyl, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl.

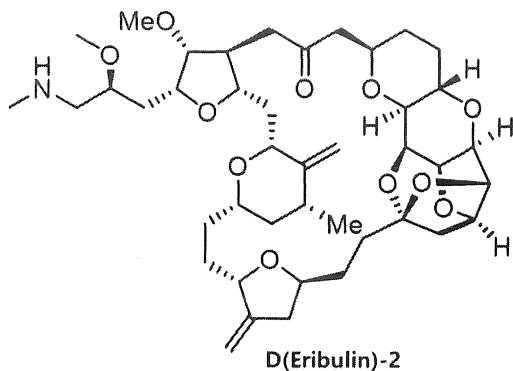
Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức D (eribulin), R^{1a} được chọn từ C₁₋₆ alkyl, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến methyl, ethyl và isopropyl; và R^{1b} được chọn từ hydro.

Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức D (eribulin), R^{1a} và R^{1b}, cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành C₆₋₈ heterocycloalkyl.

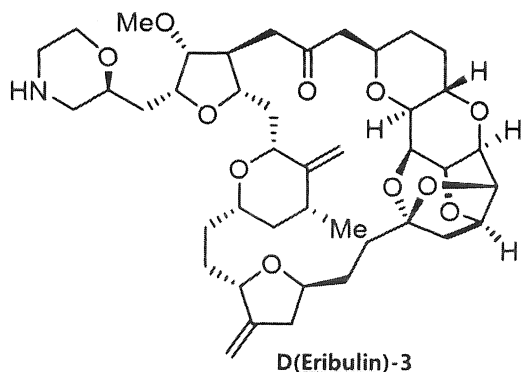
Theo một số phương án, hợp chất có công thức D (eribulin) là:



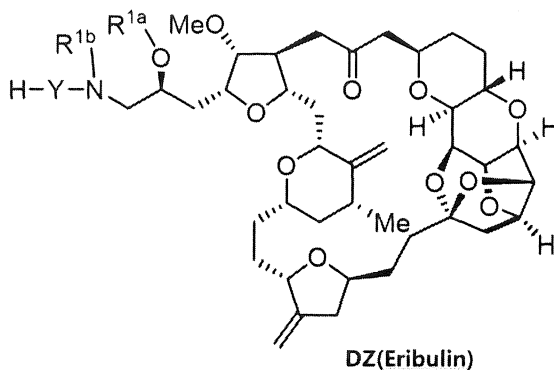
Theo một số phương án, hợp chất có công thức D (eribulin) là:



Theo một số phương án, hợp chất có công thức D (eribulin) là:



Sáng chế cũng đề xuất hợp chất có công thức DZ (eribulin),



, hoặc muối được dựng của nó,

trong đó R^{1a} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), cycloalkyl (ví dụ, C_{3-8} cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C_{1-6} alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đơtori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1a} là metyl;

R^{1b} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl (ví dụ, C_{1-6} alkyl bao gồm nhưng

không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), cycloalkyl (ví dụ, C₃₋₈ cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), alkoxy, aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C₁₋₆ alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1b} là hydro;

Hoặc R^{1a} và R^{1b}, cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành C₅₋₈ heterocycloalkyl, trong đó heterocycloalkyl này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế trong số alkyl (ví dụ, C₁₋₆ alkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl), alkoxy (ví dụ, C₁₋₆ alkoxy bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metoxy, etoxy, propoxy và isopropoxy), halogen (ví dụ, flo, clo và brom), đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl (ví dụ, C₃₋₈ cycloalkyl bao gồm nhưng không bị giới hạn đến cyclopropyl, cyclopentyl hoặc cyclohexyl), heterocyclyl, aryl và heteroaryl; và R^{1a} và R^{1b} cả hai không phải là hydro; và

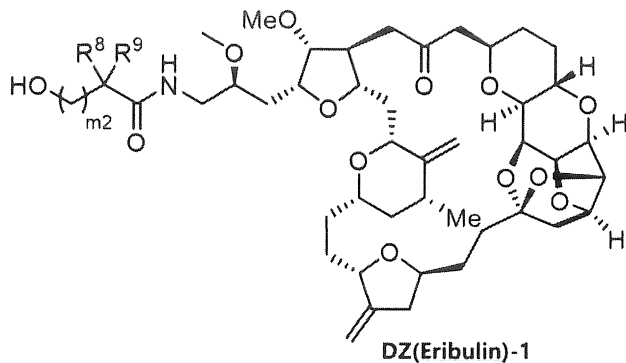
Y được chọn từ nhóm bao gồm -O(CR^aR^b)_{m2}-CR⁸R⁹-C(O)-, -NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR⁸R⁹-C(O)-, -O-CR⁸R⁹(CR^aR^b)_{m2}-, -OCR⁸R⁹-C(O)-, -O(CR^aR^b)_{m2}C(O)- và -S-(CR^aR^b)_{m2}-CR⁸R⁹-C(O)-, trong đó R^a và R^b là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, đotori, halogen và alkyl; R⁸ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C₃₋₆ cycloalkylalkyl và C₃₋₆ cycloalkyl; R⁹ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và C₃₋₆ cycloalkyl, ưu tiên là hydro; hoặc R⁸ và R⁹, cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành C₃₋₆ cycloalkyl; và m₂ được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1, 2 và 3.

Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức DZ (eribulin), mỗi R^{1a} và R^{1b} độc lập được chọn từ C₁₋₆ alkyl, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl.

Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức DZ (eribulin), R^{1a} được chọn từ C₁₋₆ alkyl, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến metyl, etyl và isopropyl; và R^{1b} được chọn từ hydro.

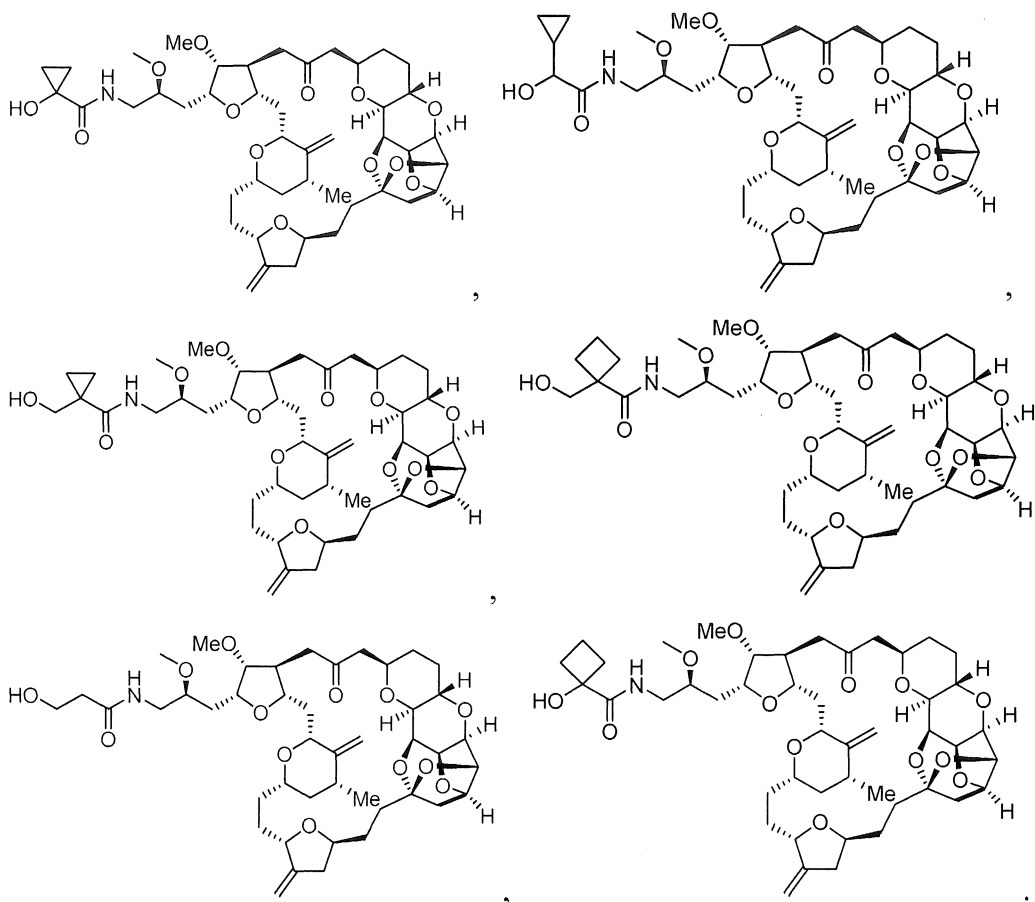
Theo một số phương án, trong hợp chất có công thức DZ (eribulin), R^{1a} và R^{1b}, cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành C₆₋₈ heterocycloalkyl.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức DZ (eribulin) là:

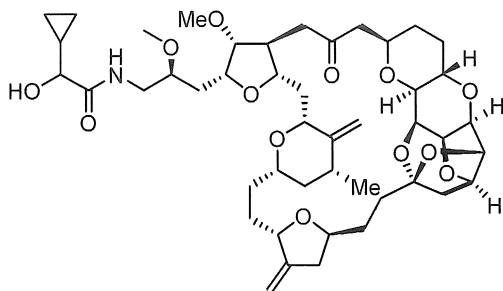


, hoặc muối được dụng của nó,

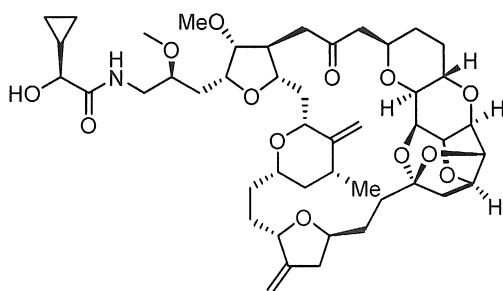
trong đó: R^8 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C_{3-6} cycloalkylalkyl và C_{3-6} cycloalkyl; R^9 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, haloalkyl và C_{3-6} cycloalkyl, ưu tiên là hydro; hoặc R^8 và R^9 , cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được liên kết với, tạo thành C_{3-6} cycloalkyl; và $m2$ được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1, 2 và 3. Theo một số phương án, hợp chất có công thức DZ (eribulin) được chọn từ nhóm bao gồm:



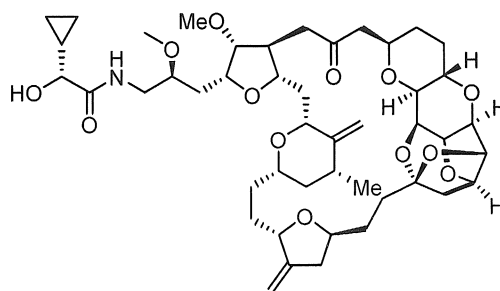
Theo khía cạnh khác, hợp chất có công thức DZ (eribulin) được cung cấp bởi một số phương án có thể chứa một hoặc nhiều tâm bất đối xứng, ví dụ,



có thể là



hoặc



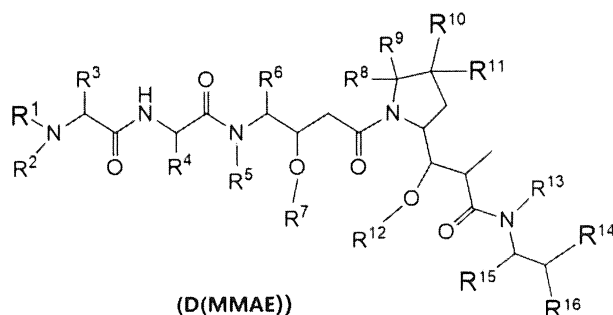
Trong các phương án trên, Pc là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79B hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; ưu tiên là kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31.

Theo một số phương án cụ thể, thể tiếp hợp theo sáng chế bao gồm tautome, mesome, raxemat, chất đồng phân đối ảnh, chất đồng phân không đối quang hoặc đơterit hydrua của nó hoặc hỗn hợp của nó.

Hợp chất và phương pháp điều chế nó được mô tả trong CN202010073671.6 được đưa vào đây toàn bộ nội dung của nó.

Thể tiếp hợp phối tử-dược chất (MMAE hoặc Dẫn xuất của nó)

Sáng chế đề xuất chất tương tự/dẫn xuất MMAE, là hợp chất có công thức chung (D(MMAE)):



, hoặc muối dược dụng của nó, trong đó:

R^1 - R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, hydroxy, cyano, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

R^7 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

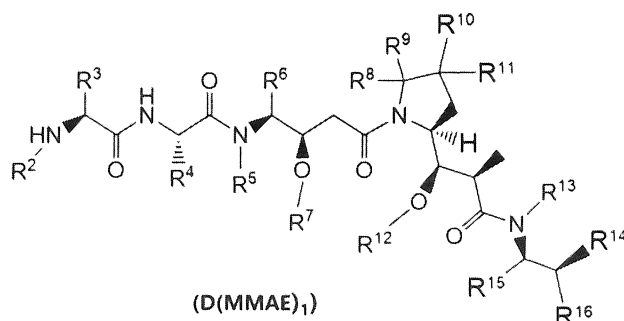
hai bất kỳ trong số R^8 - R^{11} tạo thành cycloalkyl, và hai nhóm còn lại được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl và cycloalkyl;

R^{12} được chọn từ nhóm bao gồm hydro và alkyl;

R^{13} - R^{15} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, hydroxy, alkyl, alkoxy và halogen; và

R^{16} được chọn từ nhóm bao gồm aryl và heteroaryl, trong đó aryl và heteroaryl này tùy ý được thế tiếp bằng phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, hydroxy, alkyl, alkoxy và cycloalkyl.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là hợp chất có công thức chung (D(MMAE)), là hợp chất có công thức chung (D(MMAE))₁:



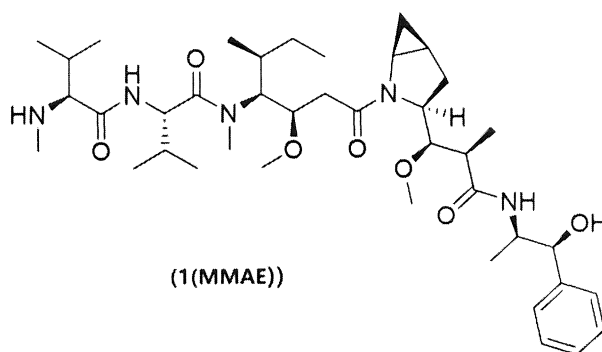
, hoặc muối được dụng của

nó,

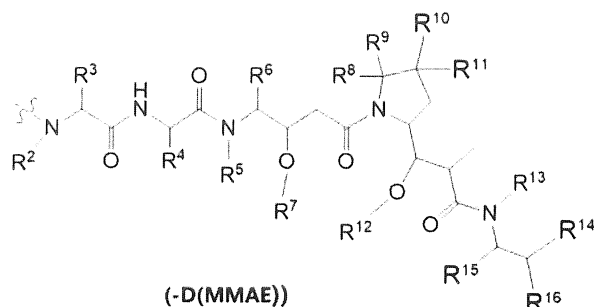
trong đó R^9 và R^{10} tạo thành cycloalkyl; và

R^2 - R^8 và R^{11} - R^{16} là như được xác định trong công thức chung (D).

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là hợp chất có công thức chung (D(MMAE)), là:



Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó thể tiếp hợp phối tử-dược chất chứa cấu trúc có công thức (-D(MMAE)):



, hoặc muối được dụng của nó,

trong đó:

R^2 - R^6 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, hydroxy, cyano, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

R^7 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

hai bất kỳ trong số R^8 - R^{11} tạo thành cycloalkyl, và hai nhóm còn lại được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl và cycloalkyl;

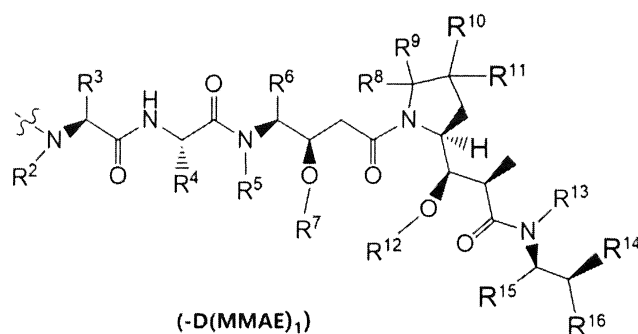
R^{12} được chọn từ nhóm bao gồm hydro và alkyl;

R^{13} - R^{15} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, hydroxy, alkyl, alkoxy và halogen;

R^{16} được chọn từ nhóm bao gồm aryl và heteroaryl, trong đó aryl và heteroaryl này tùy ý được thế tiếp bằng phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm hydro, halogen, hydroxy, alkyl, alkoxy và cycloalkyl; và

đường lượn sóng biểu thị hydro hoặc gắn kết cộng hóa trị với đoạn nối hoặc với kháng thể.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, chứa cấu trúc có công thức (-D(MMAE))₁:

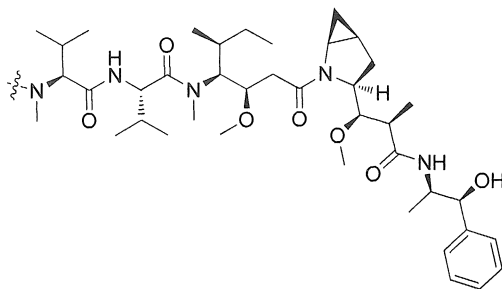


trong đó:

R^9 và R^{10} tạo thành cycloalkyl; và

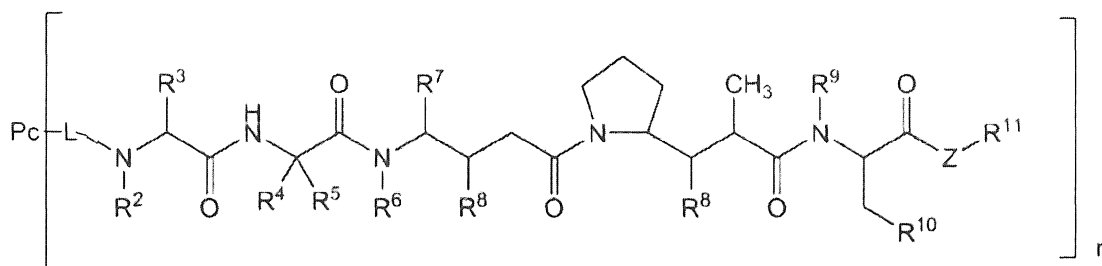
đường lượn sóng, R^2 - R^8 , và R^{11} - R^{16} là như được xác định trong công thức chung (D(MMAE)).

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) chứa cấu trúc có công thức sau:



trong đó đường lượn sóng biểu thị hydro hoặc gắn kết cộng hóa trị với đoạn nối hoặc với kháng thể.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, là như được thể hiện trong công thức chung (IV):



công thức (IV)

trong đó, R^2 là C_1 - C_8 alkyl;

R^3 là C_1 - C_8 alkyl;

R^4 là C_1 - C_8 alkyl;

R^5 là H;

R^6 là C_1 - C_8 alkyl;

R^7 là C_1 - C_8 alkyl;

mỗi R^8 độc lập là O- $(C_1$ - C_8 alkyl);

R^9 là H;

R^{10} là phenyl;

Z là O hoặc NH;

R^{11} được chọn từ nhóm bao gồm H, C_1 - C_{20} alkyl và $-(R^{13}O)_m-R^{14}$;

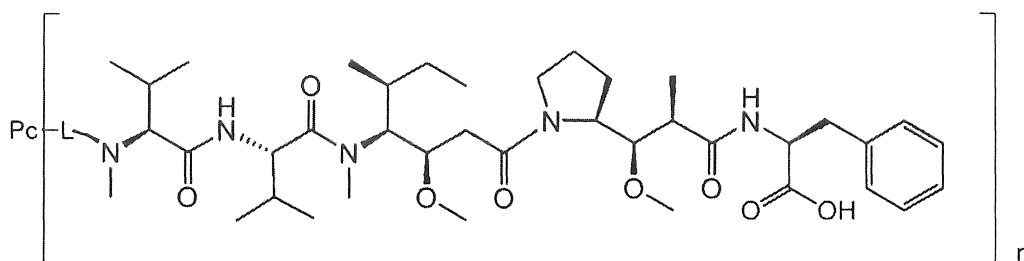
m là 3;

R^{13} là C_2 - C_8 alkyl;

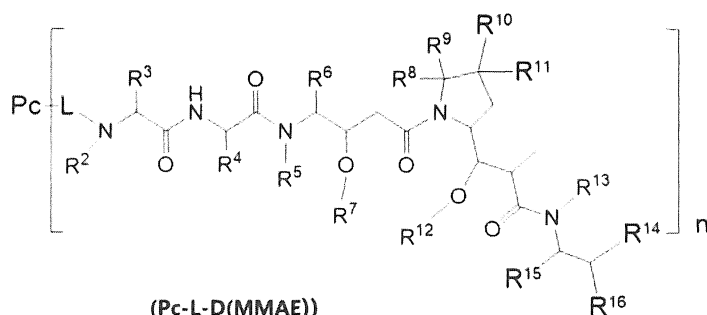
R^{14} là C_1 - C_8 alkyl;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; L là đoạn nối; và n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

Theo một số phương án cụ thể, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, chứa cấu trúc như được thể hiện dưới đây:



Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, là như được thể hiện trong công thức chung (Pc-L-D(MMAE)):



công thức (V)

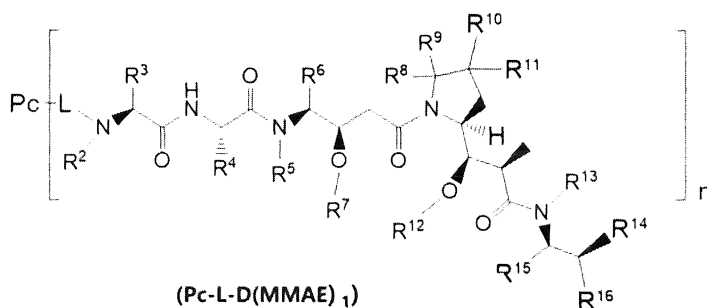
trong đó:

R^2 - R^{16} là như được xác định trong công thức chung (D(MMAE));

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; và L là đoạn nối.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) có công thức chung (Pc-L-D1) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó:



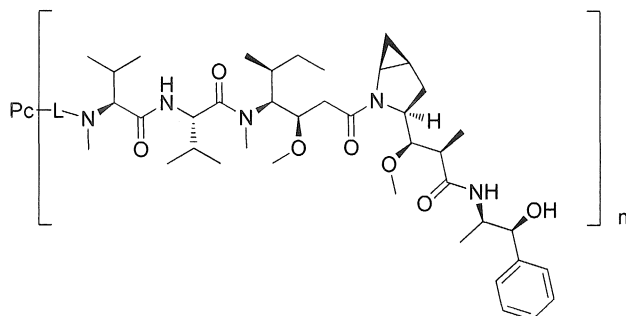
công thức (VI)

trong đó:

R^2 - R^{16} là như được xác định trong công thức chung (-D(MMAE)); và

Pc, L và n là như được xác định trong công thức chung (Pc-L-D(MMAE)).

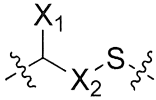
Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, là như được thể hiện trong công thức chung dưới đây:



công thức (VII),

trong đó Pc, L và n là như được xác định trong công thức chung (Pc-L-D(MMAE)). Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó n là từ 1 đến 8, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; ưu tiên là n là từ 1 đến 6, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thể tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó đoạn nối này là -Y-L¹-L²-L³-L⁴, trong đó:

Y là một đơn vị đỡ được chọn từ nhóm bao gồm  và liên kết hóa học, trong đó X₁ được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, alkoxy, aryl và halogen, và X₂ được chọn từ alkylen, alkylen này tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơtori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

L¹ là một đơn vị đỡ được chọn từ nhóm bao gồm -(succinimid-3-yl-N)-W-C(O)-, -CH₂-C(O)-NR¹⁷-W-C(O)- và -C(O)-W-C(O)-, trong đó W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-cycloalkyl và heteroalkyl thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl này chứa từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó mỗi C₁₋₈ alkyl, cycloalkyl và heteroalkyl thẳng này độc lập và tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơtori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

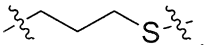
L² được chọn từ nhóm bao gồm -NR¹⁸(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-, -NR¹⁸(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-, -S(CH₂)^{p¹}C(O)- và liên kết hóa học, trong đó p¹ là số nguyên từ 1 đến 20; ưu tiên là, liên kết hóa học;

L³ là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin ưu tiên là được chọn từ nhóm bao gồm

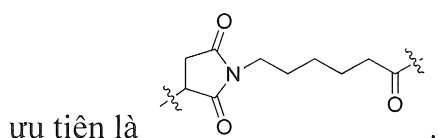
valin, citrullin và metyl valin; trong đó các axit amin này tùy ý được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đơtori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

R^{17} và R^{18} là giống nhau hoặc khác nhau và mỗi gốc độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đơtori hóa và hydroxyalkyl; và

L^4 là đơn vị kéo dài, ưu tiên là PAB.

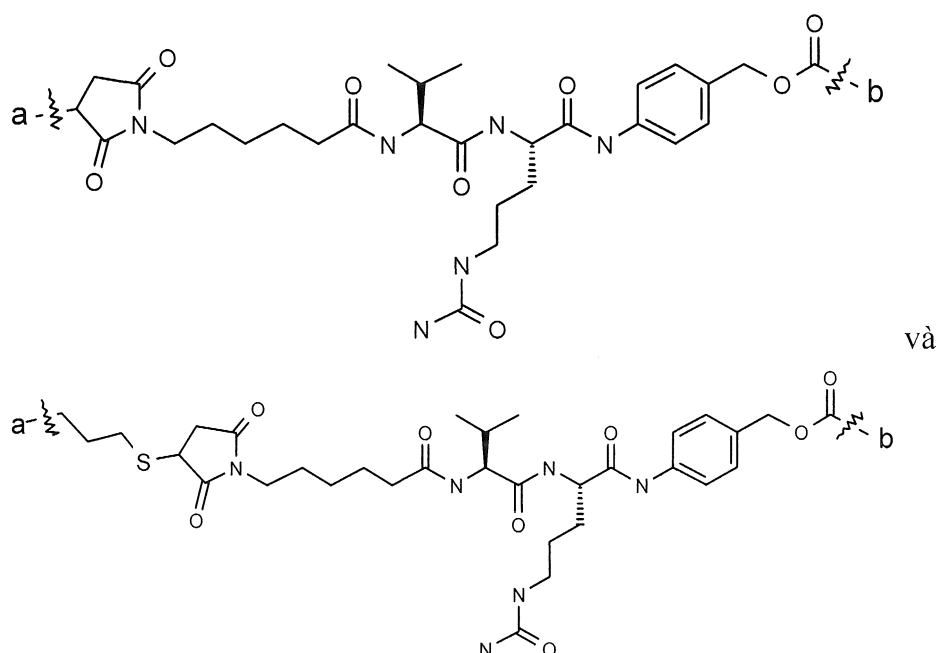
Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thế tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó Y được chọn từ .

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thế tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó L^1 được chọn từ $-(\text{succinimid-3-yl-N})-(\text{CH}_2)^{s^1}-\text{C(O)}-$, trong đó s^1 là số nguyên từ 2 đến 8;



Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thế tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó L^3 là đơn vị axit amin dipeptit, ưu tiên là được chọn từ valin-citrullin.

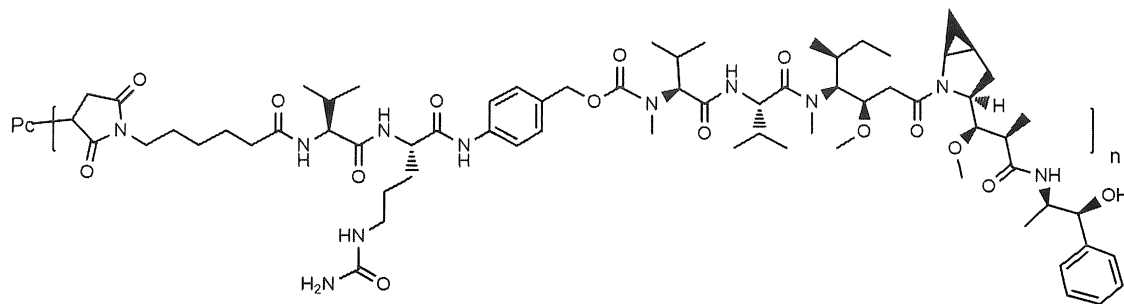
Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó đoạn nối này được chọn từ nhóm bao gồm:



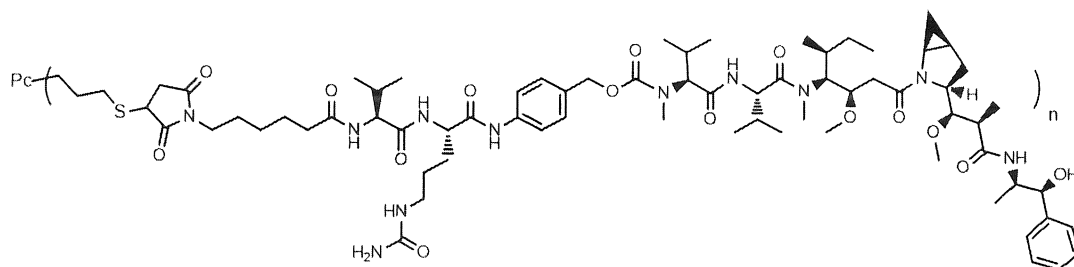
trong đó a kết thúc được nối với phối tử, và b kết thúc được nối với dược chất.

Theo một số phương án theo sáng chế, được đề xuất là thế tiếp hợp phối tử-MMAE (hoặc dẫn xuất của nó) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, được chọn từ

nhóm bao gồm công thức sau:



và

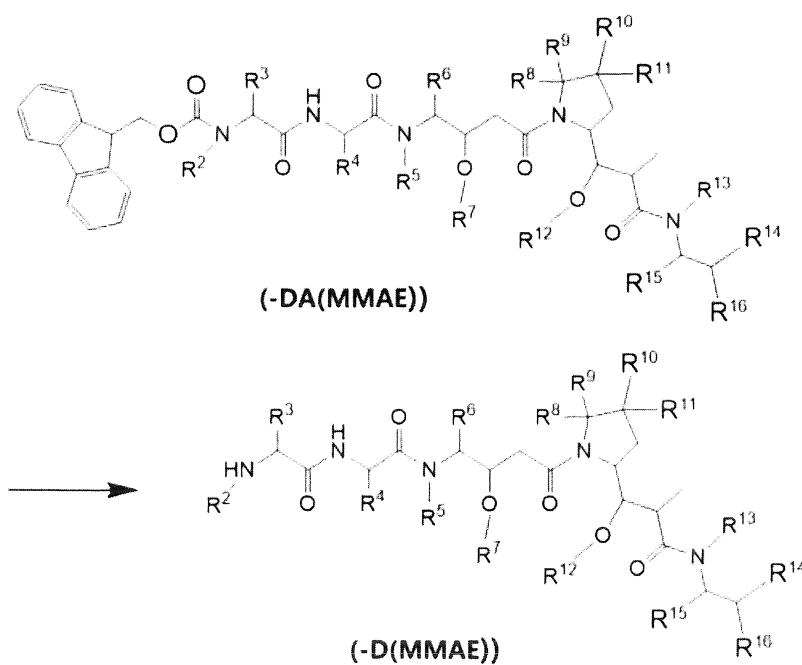


trong đó:

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; ưu tiên là kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31.

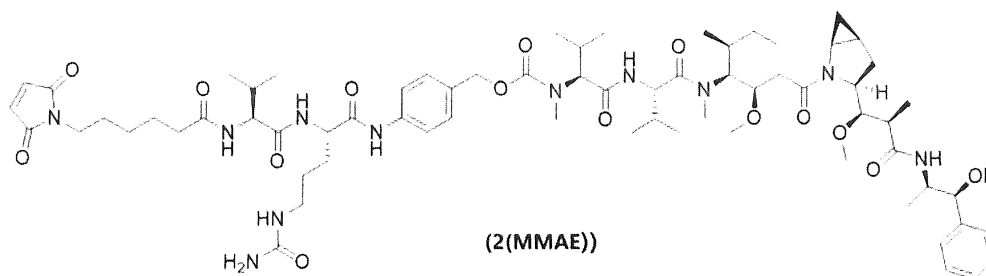
Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất có công thức chung (D(MMAE)) hoặc muối được dụng của nó, bao gồm các bước sau:



đưa công thức chung (-DA(MMAE)) vào phản ứng loại bỏ bảo vệ thu được hợp chất có công thức chung (-D(MMAE)),

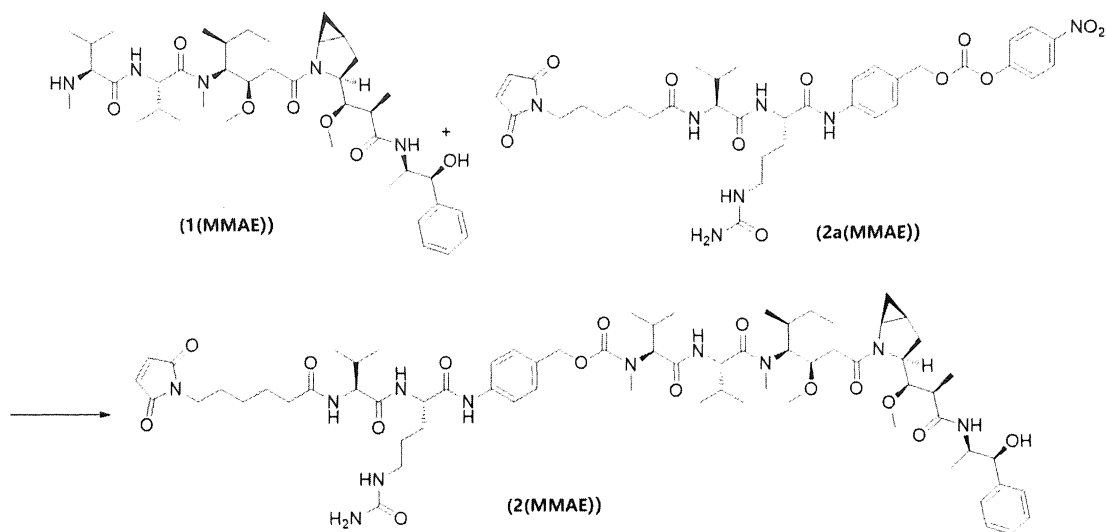
trong đó: R^2-R^{16} là như được xác định trong công thức chung (D).

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến hợp chất như được thể hiện dưới đây:



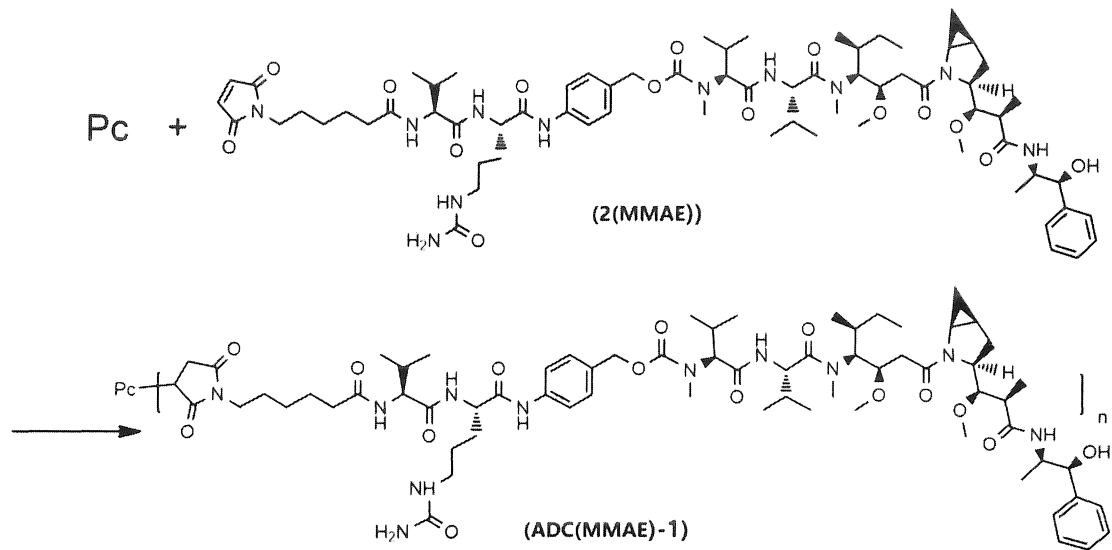
, hoặc muối được dụng của nó, có thể được sử dụng làm chất trung gian trong điều chế tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất 2(MMAE) hoặc muối được dụng của nó, bao gồm các bước sau:



đưa hợp chất 1(MMAE) vào phản ứng ngưng tụ với hợp chất 2a(MMAE) thu được hợp chất 2(MMAE).

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức chung (Pc-L-D(MMAE)) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, bao gồm các bước sau:

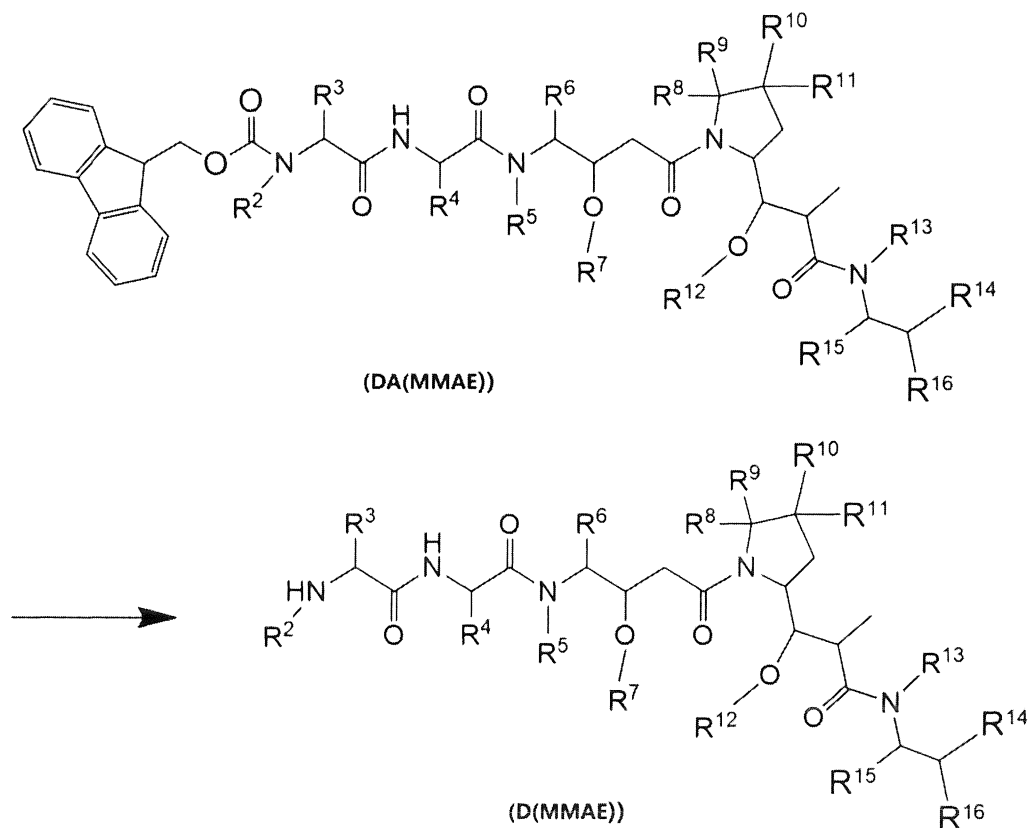


đưa Pc khử vào phản ứng nối với hợp chất 2(MMAE) thu được hợp chất có công thức chung (ADC(MMAE)-1);

trong đó Pc và n là như được xác định trong công thức chung (Pc-L-D(MMAE)). Để đạt được mục đích tổng hợp MMAE và dẫn xuất của nó theo sáng chế, các sơ đồ kỹ thuật tổng hợp sau được đưa vào trong sáng chế này:

Sơ đồ 1:

Được đề xuất là phương pháp điều chế hợp chất có công thức chung (D(MMAE)) hoặc muối được dụng của nó theo sáng chế, bao gồm các bước sau:



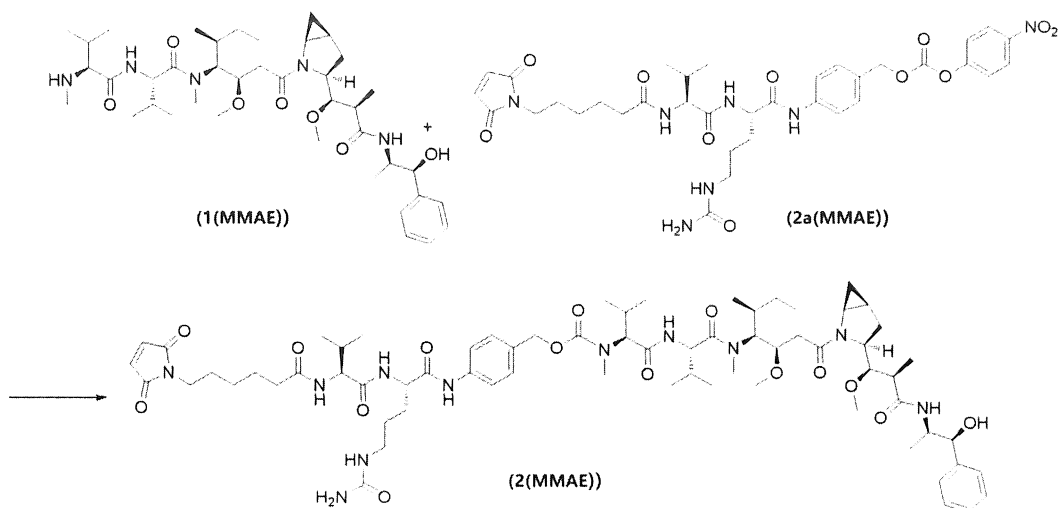
đưa công thức chung (DA(MMAE)) đến phản ứng loại bỏ bảo vệ dưới điều kiện kiềm để thu được hợp chất có công thức chung (D(MMAE)),

trong đó: R^2-R^{16} là như được xác định trong công thức chung (D(MMAE)).

Các chất phản ứng cung cấp điều kiện kiềm bao gồm các bazơ hữu cơ và vô cơ, trong đó các bazơ hữu cơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, triethylamin, diethylamin, *N*-metylmorpholin, pyridin, piperidin, *N,N*-diisopropyletylamin, *n*-butyllithi, lithi diisopropylamit, kali axetat, natri *tert*-butoxit hoặc kali *tert*-butoxit, và các bazơ vô cơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, natri hydrua, kali phosphat, natri carbonat, kali carbonat, cesi carbonat, natri hydroxit, và lithi hydroxit, ưu tiên là diethylamin.

Sơ đồ 2:

Được đề xuất là phương pháp điều chế hợp chất 2(MMAE) hoặc muối được dung hoặc solvat của nó theo sáng chế, chứa:



cho hợp chất (1(MMAE)) vào phản ứng ngưng tụ với hợp chất (2a(MMAE)) bằng cách bổ sung tác nhân ngưng tụ dưới điều kiện kiềm thu được hợp chất 2.

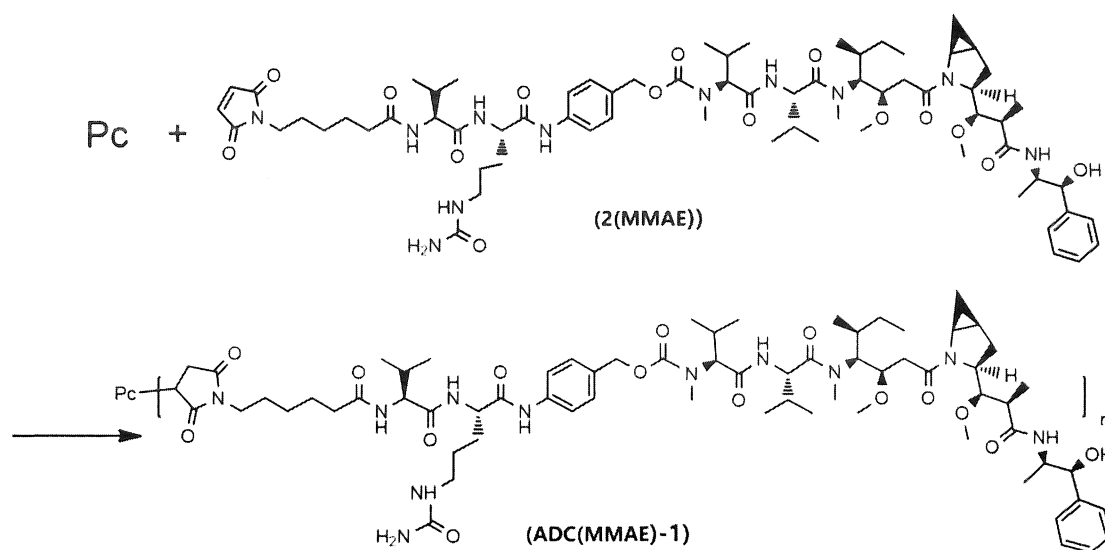
Các chất phản ứng cung cấp điều kiện kiềm bao gồm các bazơ hữu cơ và vô cơ, trong đó các bazơ hữu cơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, triethylamin, diethylamin, *N*-metylmorpholin, pyridin, piperidin, *N,N*-diisopropyletylamin, *n*-butyllithi, lithi diisopropylamit, kali axetat, natri *tert*-butoxit hoặc kali *tert*-butoxit, và các bazơ vô cơ bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, natri hydrua, kali phosphat, natri carbonat, kali carbonat, cesi carbonat, natri hydroxit, và lithi hydroxit, ưu tiên là *N,N*-diisopropyletylamin.

Tác nhân ngưng tụ được chọn từ nhóm bao gồm 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholinium clorua, 1-hydroxybenzotriazol, 1-(3-dimetylaminoethyl)-3-etylcarbodiimide hydroclorua, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide, O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium tetraflorolat, 1-hydroxybenzotriazol, 1-hydroxy-7-

azobenzotriazol, O-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium hexaflophosphat, 2-(7-azobenzotriazol)-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium hexaflophosphat, benzotriazol-1-yloxytris(dimetylaminophosphonium hexaflophosphat và benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexaflophosphat, ưu tiên là 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholinium clorua hoặc 1-hydroxybenzotriazol hoặc 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua, ưu tiên là 1-hydroxybenzotriazol.

Sơ đồ 3:

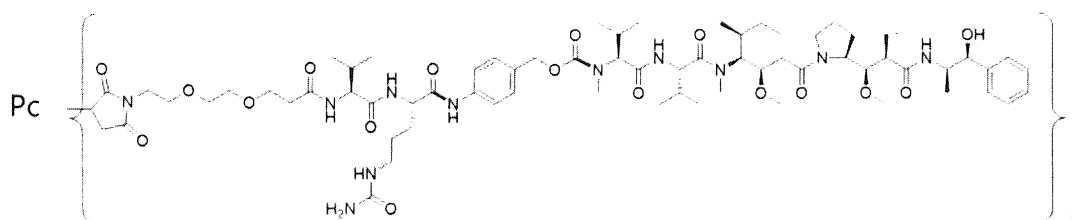
Được đề xuất là phương pháp điều chế thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức chung (Pc-L-D) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo sáng chế, bao gồm các bước sau:



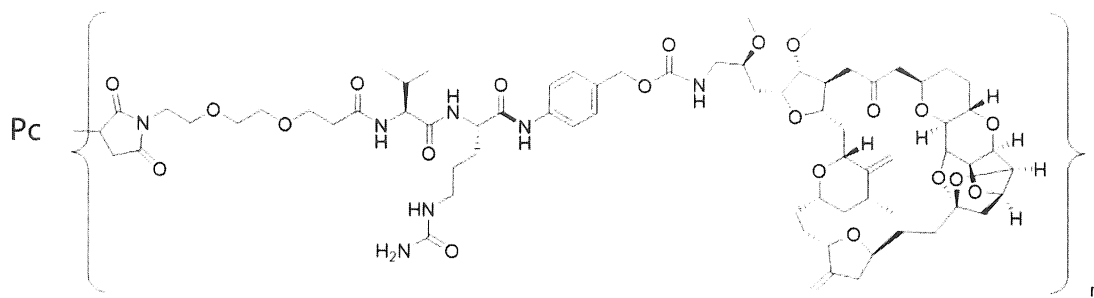
cho Pc khử vào phản ứng nối với hợp chất $2(MMAE)$ thu được hợp chất có công thức chung $(ADC(MMAE)-1)$; trong đó chất khử ưu tiên là TCEP, cụ thể là, các liên kết disulfua trên kháng thể ưu tiên là được khử; trong đó Pc và n là như được xác định trong công thức chung $(Pc-L-D(MMAE))$.

Các hợp chất ví dụ

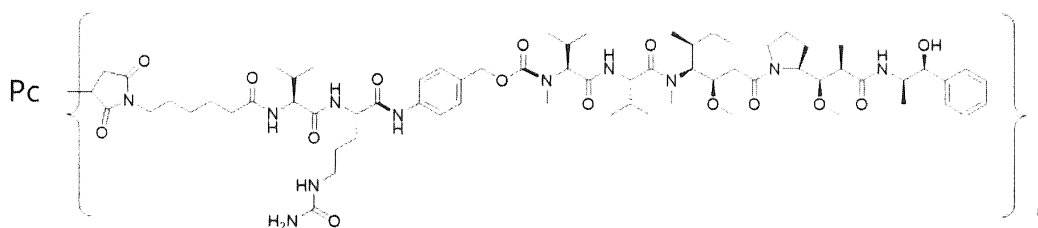
Sáng chế đề xuất thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, được chọn từ nhóm bao gồm:



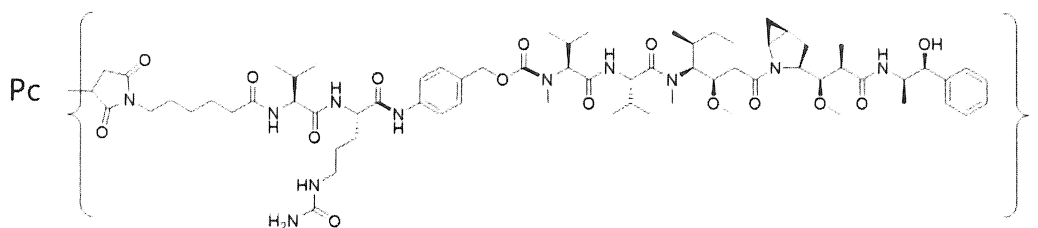
ADC-2



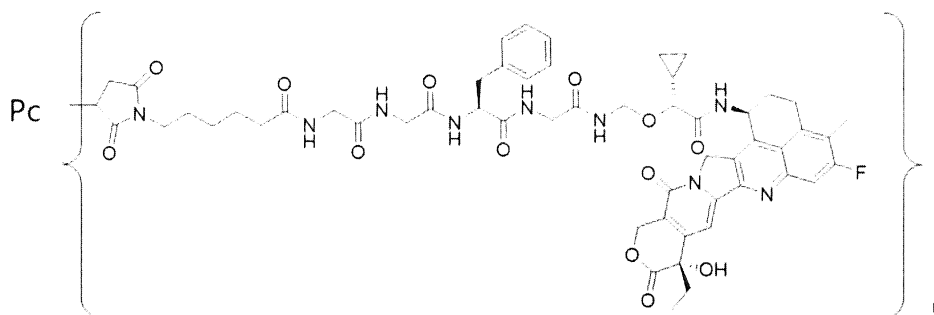
ADC-1



ADC-3



ADC-4



ADC-5

trong đó Pc là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79B hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, và n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

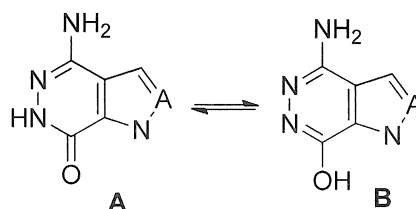
Theo một số phương án cụ thể, Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế; ví dụ, kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31; và n là số nguyên hoặc số thập phân từ 1 đến 6.

Theo một số phương án cụ thể, thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế có giá trị DAR trung bình, có thể là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 1-10, ví dụ, 2-

8, hoặc 2-6, hoặc 1-6, hoặc 4-6.

Mặc dù tất cả các công thức cấu trúc trên được thể hiện là dạng đồng phân cụ thể vì đơn giản, sáng chế có thể bao gồm tất cả các chất đồng phân, như tautome, rotamer, chất đồng phân hình học, chất đồng phân không đối quang, raxemat và chất đồng phân đối ảnh.

Tautome là các chất đồng phân cấu trúc mà chuyển đổi cho nhau dễ dàng bằng phản ứng hóa học được đề cập đến là sự tautome hóa. Phản ứng này thường dẫn đến sự di chuyển của các nguyên tử hydro hoặc proton được đi kèm bởi sự chuyển đổi của liên kết đơn thành liên kết đôi liên kề. Một số cặp tautome thông thường bao gồm: keto-enol và lactam-lactim. Ví dụ về sự cân bằng lactam-lactim có mặt giữa A và B như được thể hiện dưới đây.



Tất cả các hợp chất theo sáng chế có thể được thể hiện là dạng A hoặc dạng B. Tất cả các dạng tautomer là trong phạm vi của sáng chế. Danh pháp của các hợp chất này không loại trừ tautomer bất kỳ.

Dược phẩm

Sáng chế đề xuất tiếp dược phẩm chứa thể tiếp hợp như được mô tả trên đây, và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Sử dụng

Sáng chế đề xuất tiếp việc sử dụng một bất kỳ hoặc hỗn hợp được chọn từ nhóm gồm các chất sau để điều chế dược phẩm: kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, thể tiếp hợp theo sáng chế, và dược phẩm theo sáng chế; trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc dược chất-thể tiếp hợp của nó được sử dụng để điều trị bệnh tăng sinh hoặc làm chậm tiến triển bệnh tăng sinh; rối loạn tăng sinh có thể là bệnh ung thư hoặc khối u; bệnh ung thư hoặc khối u được chọn từ nhóm bao gồm u lympho, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL xâm lấn và tái phát, NHL mạn tính và tái phát, NHL kháng thuốc, NHL kháng thuốc và mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), u lympho tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào lông (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và/hoặc u lympho tế bào vảy.

Phương pháp điều trị

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh hoặc làm chậm tiến triển bệnh tăng sinh, chứa dùng cho đối tượng kháng thể kháng CD79B

hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế, hoặc thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế với khối lượng hữu hiệu để điều trị hoặc làm chậm bệnh; trong đó rối loạn tăng sinh là bệnh ung thư hoặc khối u.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tăng sinh tế bào B hoặc rối loạn tự miễn hoặc làm chậm tiến triển rối loạn tăng sinh tế bào B hoặc bệnh tự miễn trong đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tế bào B là bệnh ung thư hoặc khối u.

Sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường chức năng miễn dịch trong đối tượng bị rối loạn tăng sinh tế bào hoặc rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư hoặc khối u.

Bệnh ung thư hoặc khối u trong sơ đồ trên có thể được chọn từ nhóm bao gồm u lympho, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL xâm lấn và tái phát, NHL mạn tính và tái phát, NHL kháng thuốc, NHL kháng thuốc và mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), u lympho tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào lông (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và/hoặc u lympho tế bào vò.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột Balb/c được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-hFc bằng ELISA.

FIG. 2: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột Balb/c được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-hFc bởi FACS.

FIG. 3: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-hFc bằng ELISA.

FIG. 4: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-hFc bởi FACS.

FIG. 5: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-his bằng ELISA.

FIG. 6: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-his bởi FACS.

FIG. 7: các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của chuột SJL được gây miễn dịch bởi protein CD79B người ECD-his bằng ELISA.

FIG. 8: các kết quả thử nghiệm của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bằng ELISA.

FIG. 9A thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS.

FIG. 9B thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS, trong đó hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng âm.

FIG. 10: các kết quả thử nghiệm của tính phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS.

FIG. 11: các kết quả thử nghiệm của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi bằng ELISA.

FIG. 12A-12G: thử nghiệm trên liên kết của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS. FIG. 12A thể hiện các kết quả thử nghiệm của liên kết của tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi với đối chứng trống bởi FACS; FIG. 12B thể hiện các kết quả thử nghiệm của liên kết của tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi với kháng thể đối chứng âm bởi FACS; FIG. 12C thể hiện các kết quả thử nghiệm của liên kết của kháng thể đối chứng âm với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS; FIG. 12D thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể kháng CD79B mAb018 với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS; FIG. 12E thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể kháng CD79B mAb019 với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS; FIG. 12F thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể kháng CD79B mAb020 với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS; và FIG. 12G thể hiện các kết quả thử nghiệm của kháng thể kháng CD79B mAb021 với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS. Đối chứng dương được sử dụng là SN8 từ Genentech.

FIG. 13A-13C thể hiện hiệu quả của các ADC khác nhau trên khối u ghép dưới da chuột trụ lông gây ra u lympho tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2.

FIG. 14: hiệu quả của các ADC khác nhau lên trọng lượng cơ thể của chuột trụ lông mang khối u.

FIG. 15: hiệu quả của các ADC khác nhau trên khối u ghép dưới da chuột trụ lông gây ra u lympho tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2.

FIG. 16: hiệu quả của các ADC khác nhau lên trọng lượng cơ thể của chuột trụ lông mang khối u WSU-DLCL2.

FIG. 17: hình ảnh khối u cho thấy hiệu quả của các ADC khác nhau trên khối u ghép dưới da chuột trụ lông gây ra u lympho tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2.

FIG. 18: hiệu quả của các ADC khác nhau trên khối u ghép dưới da chuột trụ lông gây ra u lympho thể nang người DOHH-2.

FIG. 19: hiệu quả của các ADC khác nhau lên trọng lượng cơ thể của chuột trụ lông mang khối u DOHH-2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ

Để dễ dàng hiểu sáng chế, một số thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa cụ thể khác ở đây, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng ở đây có nghĩa được hiểu chung bởi chuyên gia trong ngành thuộc lĩnh vực của sáng chế.

Mã ba chữ cái và một chữ cái cho các axit amin được sử dụng trong sáng chế được mô tả như trong *J. Biol. Chem*, 243, p3558 (1968).

“Kháng thể” được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm nhiều loại cấu trúc kháng thể, bao gồm nhưng không bị giới hạn đến kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng; kháng thể đặc hiệu đơn, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép); và kháng thể chiều dài hoàn chỉnh, và các đoạn kháng thể (hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên, hoặc các phần gắn kết kháng nguyên) miễn là chúng thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn. Kháng thể có thể đề cập đến globulin miễn dịch, là cấu trúc chuỗi tetrapeptit được tạo thành bởi hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ được liên kết bởi các liên kết disulfua liên kết chuỗi. Vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch khác về thành phần axit amin và sự sắp xếp của chúng. Theo đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm nhóm, hoặc các isotyp của các globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, với các chuỗi nặng tương ứng của chúng tương ứng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ . Ig của cùng nhóm có thể được chia tiếp thành các nhóm phụ khác nhau theo các sự khác biệt về thành phần axit amin của vùng khớp và số lượng và vị trí của các liên kết disulfua của các chuỗi nặng; ví dụ, IgG có thể được chia thành các typ phụ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các chuỗi nhẹ được phân loại thành chuỗi κ hoặc λ theo sự khác biệt trong các vùng hằng định. Mỗi nhóm Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Trong các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể, các trình tự gồm khoảng 110 axit amin gần với đầu tận cùng N thay đổi đáng kể và do đó được đề cập đến là các vùng biến đổi (các vùng V); trình tự axit amin còn lại gần đầu tận cùng C là tương đối ổn định và do vậy được đề cập đến là các vùng hằng định (các vùng C). Các vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến (CDR) và 4 vùng khung (framework region-FRs) với các trình tự tương đối bảo thủ. 3 vùng siêu biến xác định tính đặc hiệu của kháng thể và do đó còn được biết là các vùng xác định bổ sung (CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm 3 vùng CDR và 4 vùng FR được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. 3 vùng CDR của chuỗi nhẹ đề cập đến LCDR1, LCDR2, và LCDR3; và 3 vùng CDR của chuỗi nặng đề cập đến HCDR1, HCDR2, và HCDR3.

Trong sáng chế này, vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể được mô tả ở đây có thể

chứa thêm vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa chuỗi κ và λ người hoặc chuột hoặc các biến thể của nó.

Trong sáng chế này, vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể được mô tả ở đây có thể chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 người hoặc chuột hoặc các biến thể của nó.

Thuật ngữ “kháng thể chuột” trong sáng chế này đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng lại CD79B người hoặc epitop của nó được điều chế theo kiến thức và kỹ năng trong ngành. Trong khi điều chế, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên CD79B, và sau đó khối tế bào lai kháng thể biểu hiện trình tự mong muốn hoặc các đặc điểm chức năng được phân tách. Theo phương án cụ thể theo sáng chế, kháng thể kháng CD79B người của chuột hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể chứa thêm vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi κ hoặc λ chuột hoặc biến thể của nó, hoặc chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 chuột hoặc biến thể của nó.

Thuật ngữ “kháng thể người hoàn chỉnh” bao gồm các kháng thể có các vùng hằng định và biến đổi có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Kháng thể người hoàn chỉnh theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bởi sự phát sinh đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng các đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể người hoàn chỉnh” không bao gồm các kháng thể được làm giống người.

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống người”, cũng được biết là kháng thể được ghép CDR, đề cập đến kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR không phải của người vào trong khung của các vùng biến đổi của kháng thể người. Kháng thể này có thể khắc phục đáp ứng miễn dịch mạnh gây ra bởi kháng thể khảm do mang khối lượng lớn các thành phần protein không phải người. Để tránh sự suy giảm hoạt tính gây ra bởi giảm tính sinh miễn dịch, các vùng biến đổi của kháng thể người hoàn chỉnh có thể được đưa đến sự đột biến ngược tối thiểu để duy trì hoạt tính.

Thuật ngữ “kháng thể khảm” đề cập đến kháng thể thu được bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của loài thứ nhất với vùng hằng định của kháng thể của loài thứ hai, có thể giảm đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể của loài thứ nhất. Làm ví dụ, kháng thể khảm được thiết lập bằng cách trước hết thiết lập tổ tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu tổ, phân tách kháng thể, sau đó tách dòng đơn tính gen vùng hằng định của kháng thể người hoàn chỉnh như yêu cầu, nối gen vùng biến đổi tổ này và gen vùng hằng định người thành gen khảm, cài gen khảm này vào trong vectơ người, và cuối cùng biểu hiện các phân tử kháng thể khảm trong hệ thống công nghiệp sinh vật nhân chuẩn hoặc hệ thống công nghiệp sinh

vật nhân sơ. Vùng hằng định của kháng thể người hoàn chỉnh có thể được chọn từ nhóm bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 người hoặc các biến thể của nó, ưu tiên là chứa các vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 hoặc IgG4 người, hoặc IgG1 được đột biến ở axit amin không gây độc tế bào ADCC (sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể).

Thuật ngữ “đoạn gắn kết kháng nguyên” bao gồm kháng thể chuỗi đơn (nghĩa là, các chuỗi nhẹ và nặng chiều dài hoàn chỉnh); Fab, Fab cải biến, Fab', Fab' cải biến, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, kháng thể khu vực đơn (ví dụ, VH hoặc VL hoặc VHH), scFv, kháng thể hóa trị hai hoặc hóa trị ba hoặc hóa trị bốn, Bis-scFv, thể diabody, thể tribody, thể triabody, thể tetrabody và đoạn gắn kết epitop của các loại bất kỳ nêu trên (xem, ví dụ, Holliger và Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9): 1126-1136; Adair và Lawson, 2005, *Drug Design Reviews-Online* 2 (3), 209-217). Phương pháp sản xuất và điều chế các đoạn kháng thể này được biết nhiều trong ngành (xem, ví dụ, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Fab-Fv được bộc lộ đầu tiên trong WO2009/040562, và dạng ổn định disulfua Fab-dsFv của nó được bộc lộ đầu tiên trong WO2010/035012. Đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế cũng bao gồm đoạn Fab và Fab' được mô tả trong WO2005/003169, WO2005/003170 và WO2005/003171. Các kháng thể đa hóa trị có thể bao gồm đa tính đặc hiệu (ví dụ, tính đặc hiệu kép) hoặc có thể là đặc hiệu đơn (xem, ví dụ, WO92/22583 và WO05/113605), và ví dụ về đặc hiệu đơn là Tri-Fab (hoặc TFM) được mô tả trong WO92/22583.

Thuật ngữ “kháng thể chuỗi đơn”, “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” đề cập đến phân tử chứa khu vực biến đổi chuỗi nặng kháng thể (hoặc vùng; VH) và khu vực biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc vùng; VL) được liên kết bằng đoạn nối. Các phân tử scFv này có thể có cấu trúc chung: NH₂-VL-đoạn nối-VH-COOH hoặc NH₂-VH-đoạn nối-VL-COOH. Các đoạn nối thích hợp trong kỹ thuật trước đây bao gồm các trình tự axit amin GGGS lặp lại hoặc các biến thể của nó, ví dụ, 1-4 biến thể lặp lại (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Các đoạn nối khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56; và Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

Thuật ngữ “CDR” đề cập đến một trong số 6 vùng siêu biến trong khu vực biến đổi của kháng thể mà trước hết đóng góp vào gắn kết kháng nguyên. Nhìn chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và ba CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Một trong số định nghĩa chung nhất cho 6 CDR được cung cấp trong Kabat E.A. et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242.

Như được sử dụng ở đây, định nghĩa Kabat về các CDR áp dụng chỉ cho CDR1, CDR2 và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nhẹ, và cho CDR2 và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nặng.

Các ranh giới trình tự axit amin của các CDR có thể được xác định bằng cách sử dụng một sơ đồ bất kỳ trong số các sơ đồ khác nhau đã biết nhiều, bao gồm sơ đồ đánh số “Kabat” (xem Kabat et al. (1991), *“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), sơ đồ đánh số “Chothia” (see Al-Lazikani et al. (1997) JMB 273: 927-948) và sơ đồ đánh số ImMunoGenTics (IMGT) (see Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)), và sơ đồ đánh số tương tự. Ví dụ, đối với dạng truyền thống, theo sơ đồ Kabat, các gốc axit amin CDR trong khu vực biến đổi chuỗi nặng (VH) được đánh số 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); các gốc axit amin CDR trong khu vực biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được đánh số 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-97 (LCDR3). Theo sơ đồ Chothia, axit amin CDR trong VH được đánh số 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); và các gốc axit amin trong VL được đánh số 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) và 91-96 (LCDR3). Theo định nghĩa CDR bằng cách kết hợp cả hai sơ đồ Kabat và sơ đồ Chothia, CDR này bao gồm các gốc axit amin 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3) trong VH người và các gốc axit amin 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-97 (LCDR3) trong VL người. Theo sơ đồ IMGT, các gốc axit amin CDR trong VH được đánh số phỏng chừng 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) và 93-102 (CDR3), và các gốc axit amin CDR trong VL được đánh số phỏng chừng 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) và 89-97 (CDR3). Theo sơ đồ IMGT, CDR của kháng thể này có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình IMGT/DomainGap Align.

Thuật ngữ “khung kháng thể” đề cập đến một phần của khu vực biến đổi VL hoặc VH, hoạt động làm khung cho các vòng liên kết kháng nguyên (CDR) của khu vực biến đổi. Nó thực chất là khu vực biến đổi không có các CDR.

Thuật ngữ “liên kết với CD79B” ở đây đề cập đến khả năng tương tác với CD79B hoặc epitop của nó, trong đó CD79B hoặc epitop của nó có thể có nguồn gốc từ người.

Thuật ngữ “kháng nguyên” đề cập đến phân tử được sử dụng để gây miễn dịch của phân tử có khả năng miễn dịch có nguồn gốc từ động vật có xương sống để sản sinh kháng thể mà nhận biết kháng nguyên này hoặc để sàng lọc thư viện biểu hiện (ví dụ, cụ thể là thể thực khuẩn, nấm men hoặc thư viện biểu hiện ribosom). Ở đây, kháng nguyên được xác định rộng hơn và thường bao gồm các phân tử đích mà được nhận biết đặc hiệu bởi kháng thể này, và do vậy bao gồm một phần hoặc bất

chức phân tử được sử dụng trong quy trình gây miễn dịch để sản xuất kháng thể hoặc để sàng lọc thư viện để chọn lọc kháng thể này. CD79B người theo sáng chế và các biến thể được cắt bớt và biến thể khác của CD79B người được đề cập đến là các kháng nguyên.

Thuật ngữ “epitop” đề cập đến vị trí trên kháng nguyên mà liên kết với globulin miễn dịch hoặc kháng thể. Epitop có thể được tạo thành từ các axit amin liên tục, hoặc các axit amin không liên tục được đặt cạnh bằng sự gấp nếp bậc ba của protein này. Epitop được tạo thành từ các axit amin liên tiếp thường được giữ lại sau khi tiếp xúc với dung môi biến tính, trong khi epitop được tạo thành bằng sự gấp nếp bậc ba thường bị mất sau khi xử lý dung môi biến tính. Epitop thường chứa, ví dụ, ít nhất 3-15 axit amin trong cấu trúc không gian duy nhất. Phương pháp xác định epitop gì được liên kết bởi kháng thể xác định được biết nhiều trong ngành và bao gồm thử nghiệm thâm miễn dịch, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, và thử nghiệm tương tự. Phương pháp xác định cấu hình không gian của epitop bao gồm các kỹ thuật trong ngành và các kỹ thuật được mô tả ở đây, như tinh thể học tia X và cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết chọn lọc” đề cập đến liên kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên được xác định trước. Nhìn chung, kháng thể liên kết với kháng nguyên được xác định trước hoặc epitop của nó với hằng số phân ly cân bằng (KD) là khoảng ít hơn 10^{-7} M hoặc thậm chí ít hơn và với ái lực mà là ít nhất cao hơn hai lần ái lực của nó liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, v.v...) không phải là kháng nguyên được xác định trước (hoặc epitop của nó) hoặc kháng nguyên liên quan gần gũi, khi được xác định bởi các kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance-SPR) trong thiết bị sử dụng CD79B người tái tổ hợp hoặc epitop của nó làm chất phân tích và kháng thể làm phối tử. Thuật ngữ “kháng thể nhận biết kháng nguyên” được sử dụng thay đổi lẫn nhau ở đây với thuật ngữ “kháng thể liên kết đặc hiệu”.

Thuật ngữ “phân tử axit nucleic” đề cập đến phân tử ADN và phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể sợi đơn hoặc sợi đôi, và ưu tiên là ADN sợi đôi.

Thuật ngữ “vector” đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà đã được liên kết với nó. Theo một phương án, vector này là “plasmid” đề cập đến vòng ADN sợi đôi tròn đã được cài trong đó các đoạn ADN bổ sung. Theo phương án khác, vector này là vector virus. Các vector được bộc lộ ở đây có khả năng tự động sao chép trong tế bào chủ (ví dụ, các vector vi khuẩn có điểm khởi đầu sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú episom) hoặc có khả năng xen gài vào trong hệ gen của tế bào chủ và do vậy sao chép cùng với hệ gen của tế bào chủ (ví dụ, vector động vật có vú không phải episom).

Thuật ngữ “tế bào chủ” đề cập đến tế bào đã được đưa vào trong đó vector biểu

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

Kháng thể cải biến di truyền hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được điều chế và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, trình tự cADN mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ có thể được tách dòng đơn tính và tái tổ hợp vào trong vector biểu hiện GS. Vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được chuyển nhiễm ổn định vào trong các tế bào CHO. Như tình trạng kỹ thuật được đưa ra nhiều hơn, hệ thống biểu hiện động vật có vú sẽ dẫn đến glycosyl hóa kháng thể này. Các dòng đơn tính dương tính được mở rộng trong môi trường không huyết thanh của bình phản ứng sinh học để sản sinh kháng thể. Dịch nuôi cấy có kháng thể tiết ra có thể được tinh chế bằng kỹ thuật thông thường, ví dụ, sử dụng cột FF Sepharose A hoặc G. Các đoạn được liên kết không đặc hiệu được rửa bỏ. Kháng thể liên kết được rửa giải sử dụng phương pháp gradient pH, và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE và được thu lại. Kháng thể này có thể được lọc và được cô đặc bằng phương pháp thông thường. Các hỗn hợp và polyme hòa tan có thể cũng được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, như sàng phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được làm lạnh ngay lập tức, ví dụ, ở -70 °C, hoặc đông khô.

Trình tự axit amin “giống” đề cập đến phần trăm các gốc axit amin trong trình tự thứ nhất mà là giống với các gốc axit amin trong trình tự thứ hai, trong đó khi duỗi thẳng để so sánh các trình tự axit amin và khi cần, các khoảng cách được đưa vào để thu được phần trăm trình tự giống tối đa (và không có sự thay thế bảo toàn được xem là một phần của trình tự giống). Để xác định phần trăm trình tự axit amin giống, các sự duỗi thẳng so sánh có thể thu được theo nhiều cách khác nhau mà nằm trong kỹ năng trong ngành, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc Megalign (DNASTAR). Chuyên gia trong ngành có thể xác định các thông số thích hợp để đo sự duỗi thẳng so sánh, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để thu được sự duỗi thẳng so sánh tối đa có chiều dài hoàn chỉnh của các trình tự được duỗi thẳng so sánh.

Thuật ngữ “tính phản ứng chéo” đề cập đến khả năng của kháng thể theo sáng chế liên kết với CD79B của các loài khác nhau. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế liên kết với CD79B người có thể cũng liên kết với CD79B của các loài khác. Tính phản ứng chéo được xác định bằng cách phát hiện tính phản ứng đặc hiệu với kháng

nguyên tinh khiết trong thử nghiệm liên kết (ví dụ, SPR và ELISA) hoặc liên kết hoặc các tương tác nhóm chức với các tế bào biểu hiện CD79B. Phương pháp xác định tính phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm liên kết chuẩn như được mô tả ở đây, ví dụ, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc đo dòng tế bào.

Các thuật ngữ “ức chế” và “phong bế” được sử dụng thay đổi cho nhau và bao hàm cả hai ức chế/phong bế hoàn toàn và một phần. Ức chế/phong bế CD79B ưu tiên là giảm hoặc thay đổi mức bình thường hoặc kiểu hoạt tính xảy ra khi liên kết CD79B xảy ra không ức chế hoặc phong bế. Ức chế và phong bế cũng nhằm bao gồm độ giảm ái lực liên kết CD79B có thể đo được bất kỳ khi tiếp xúc với kháng thể kháng CD79B khi được so sánh với CD79B không tiếp xúc với kháng thể kháng CD79B.

Thuật ngữ “ức chế sinh trưởng” (ví dụ, liên quan đến các tế bào) nhằm để bao gồm độ giảm sinh trưởng tế bào có thể đo được bất kỳ.

Thuật ngữ “gây ra đáp ứng miễn dịch” và “tăng cường đáp ứng miễn dịch” được sử dụng thay đổi cho nhau và đề cập đến đáp ứng miễn dịch để kích thích (tức là, thụ động hoặc thích ứng) bằng kháng nguyên cụ thể.

“ADCC”, nghĩa là, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, được mô tả ở đây nghĩa là tế bào biểu hiện thụ thể Fc trực tiếp giết tế bào đích được phủ kháng thể bằng cách nhận biết đoạn Fc của kháng thể này. Chức năng hiệu ứng ADCC của kháng thể có thể bị giảm hoặc bị loại bỏ bằng cách thay đổi đoạn Fc của IgG. Thay đổi đề cập đến sự đột biến trong vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể này, như đột biến được chọn từ nhóm bao gồm N297A, L234A và L235A of IgG1; thể khả IgG2/4, F235E của IgG4, và đột biến L234A/E235A.

Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các đoạn gắn kết kháng nguyên được biết nhiều trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được tìm thấy trong, ví dụ, “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Press (chapters 5-8 và 15). Ví dụ, các con vật có thể được gây miễn dịch bằng CD79B người hoặc đoạn của nó, và các kháng thể thu được có thể được biến tính và tinh chế, và phân tích trình tự axit amin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Tương tự, các đoạn gắn kết kháng nguyên có thể được điều chế bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được cải biến di truyền để chứa một hoặc nhiều FR người bổ sung trong các CDR có nguồn gốc không phải người. Các trình tự dòng mầm FR người có thể thu được từ ImMunoGeneTics (IMGT) hoặc từ Immunoglobulin Journal, 2001ISBN012441351.

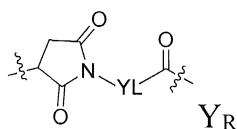
Thuật ngữ “dược chất” đề cập đến dược chất gây độc tế bào hoặc chất điều biến miễn dịch. Dược chất gây độc tế bào có thể có phân tử hóa học trong tế bào này nghĩa là đủ mạnh để phá vỡ sự sinh trưởng bình thường của nó. Dược chất gây độc

tế bào có thể giết tế bào theo nguyên tắc ở nồng độ cao thích hợp; tuy nhiên, do thiếu tính đặc hiệu, dược chất gây độc tế bào có thể gây ra sự chết rụng tế bào tế bào bình thường trong khi giết tế bào khối u, dẫn đến các tác dụng phụ nghiêm trọng. Thuật ngữ này bao gồm các độc tố (như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố hoạt tính enzyme có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật), các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² và đồng vị phóng xạ của Lu), dược chất hóa trị liệu, các chất kháng sinh và enzym phân giải nhân. Chất điều biến miễn dịch là chất ức chế của các phân tử điểm kiểm soát miễn dịch.

Thuật ngữ “đoạn nối” đề cập đến đoạn hoặc liên kết, được nối với phối tử ở một đầu và được liên kết với dược chất ở đầu kia, và cũng có thể được liên kết với các đoạn nối khác và sau đó được liên kết với dược chất.

Đoạn nối này có thể chứa một hoặc nhiều thành phần đoạn nối. Các thành phần đoạn nối điển hình bao gồm 6-maleimidocaproyl (“MC”), maleimidopropionyl (“MP”), valin-citrullin (“val-cit” hoặc “vc”), alanin-phenylalanin (“ala-phe”), *p*-aminobenzyloxycarbonyl (“PAB”), và các đoạn nối này có nguồn gốc từ nối với chất phản ứng đoạn nối: *N*-succinimidyl 4-(2-pyridylthio)pentanoat (“SPP”), *N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1 carboxylat (“SMCC”, cũng được đề cập đến ở đây là “MCC”), và *N*-succinimidyl(4-iodo-acetyl)aminobenzoat (“SIAB”). Đoạn nối này có thể bao gồm đơn vị kéo căng, đơn vị đệm, đơn vị axit amin và đơn vị kéo dài, và có thể được tổng hợp bằng các phương pháp đã biết trong ngành, như các phương pháp được mô tả trong US2005-0238649A1. Đoạn nối này có thể là “đoạn nối có thể phân cắt” thích hợp để giải phóng các dược chất trong tế bào. Ví dụ, các đoạn nối không bền axit (ví dụ, hydrazon), các đoạn nối nhạy với proteaza (ví dụ, nhạy với peptidaza), các đoạn nối không bền với ánh sáng, các đoạn nối dimethyl hoặc các đoạn nối chứa disulfua có thể được sử dụng (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992); U.S. Patent No. 5,208,020).

Thuật ngữ “đơn vị axit amin” đề cập đến axit amin mà có thể gắn nhóm carbonyl trong công thức cấu trúc sau Y_R với đơn vị kéo dài khi có mặt đơn vị kéo dài này, hoặc gắn trực tiếp Y_R với dược chất khi không có đơn vị kéo dài. Trong các phương án theo sáng chế, đơn vị axit amin được thể hiện là -K_k-:



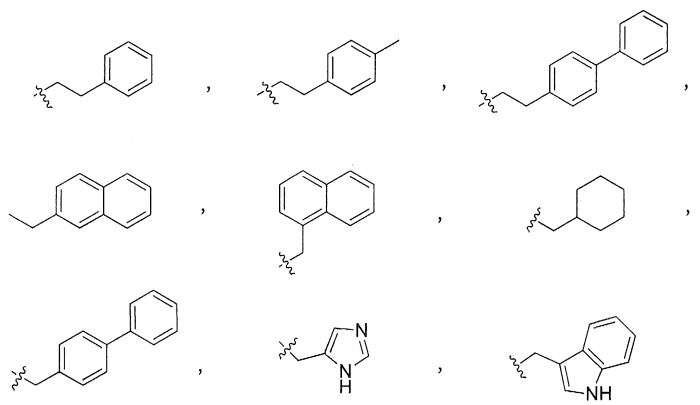
-K_k- là dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit hoặc decapeptit-, trong đó mỗi đơn vị -K- độc lập có công thức cấu trúc sau K_a hoặc K_b, và k là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 10:



trong đó:

R_{23} trong đơn vị axit amin trên là -H hoặc metyl;

R_{24} là H, metyl, isopropyl, isobutyl, *sec*-butyl, benzyl, *p*-hydroxybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, phenyl-, cyclohexyl,



R_{25} là -aryl-, -alkyl-aryl-, -cycloalkyl-, -alkyl-cycloalkyl-, -cycloalkyl-alkyl-, -alkyl-cycloalkyl-alkyl-, -heterocyclyl-, -alkyl-heterocyclyl-, -heterocyclyl-alkyl-, -alkyl-heterocyclyl-alkyl-, -aryl-, -alkyl-aryl-, -aryl-alkyl-, -alkyl-aryl-alkyl-, -heteroaryl-, -alkyl-heteroaryl-, -heteroaryl-alkyl-, hoặc -alkyl-heteroaryl-alkyl-.

Theo một phương án, -K_k- là dipeptit, ưu tiên là -valin-citrullin-, -phenylalanin-lysin- hoặc -N-metylvalin-citrullin-, ưu tiên nữa là -valin-citrullin-.

Thuật ngữ “đơn vị kéo căng” đề cập đến đoạn cấu trúc hóa học mà được liên kết đồng hóa trị với phối tử thông qua nguyên tử cacbon ở một đầu và với dược chất (trực tiếp hoặc gián tiếp) thông qua nguyên tử lưu huỳnh ở đầu kia.

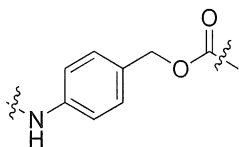
Thuật ngữ “đơn vị đệm” là đoạn cấu trúc hợp chất hai chức năng mà có thể được sử dụng để nối đoạn nối với với dược chất để cuối cùng để cuối cùng tạo thành thể tiếp hợp phối tử-dược chất, theo cách mà dược chất có thể được liên kết chọn lọc với đoạn nối này.

Thuật ngữ “axit amin” đề cập đến hợp chất hữu cơ chứa amino và carboxyl trong cấu trúc phân tử và trong đó cả hai amino và carboxyl được liên kết trực tiếp với cấu trúc -CH-. Công thức chung là H₂NCHRCOOH. Axit amin được phân loại là α, β, γ, δ, ε...-axit amin theo vị trí của nguyên tử cacbon mà amino được liên kết

với trong axit carboxylic này. Trong thế giới sinh vật, các axit amin này tạo nên các protein cấu trúc có đặc điểm cấu trúc cụ thể của chúng, nghĩa là, các nhóm amino của chúng được liên kết trực tiếp với nguyên tử α -carbon, nghĩa là, tạo thành α -axit amin.

Thuật ngữ “đơn vị kéo dài” đề cập đến cấu trúc hóa học mà có thể nối đơn vị axit amin với dược chất khi có mặt đơn vị axit amin hoặc với dược chất thông qua nhóm carbonyl trên YR khi không có đơn vị axit amin.

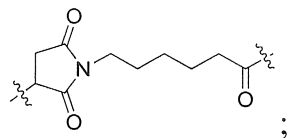
Trong sáng chế này, đơn vị kéo dài là PAB với cấu trúc của đoạn 4-iminobenzylcarbamoyl được thể hiện là công thức sau, và được nối với D,



Các chữ viết tắt

Các thành phần đoạn nối bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến:

MC = 6-maleimidocaproyl, có cấu trúc được thể hiện như sau:



Val-Cit hoặc “vc” = valin-citrullin (dipeptit ví dụ trong đoạn nối có thể phân cắt proteaza);

citrullin = 2-amino-5-axit ureidopentanoic;

PAB = *p*-aminobenzylloxycarbonyl (ví dụ về các thành phần đoạn nối “tự bất động”);

Me-Val-Cit = *N*-metyl-valin-citrullin (trong đó liên kết peptit đoạn nối đã được thay đổi để ngăn không bị phân cắt bởi cathepsin B);

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproyl-polyetylen glycol (có thể gắn với cystein kháng thể);

SPP = *N*-succinimidyl 4-(2-pyridylthio)valerat;

SPDP = *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat;

SMCC = succinimidyl 4-(*N*-maleimidometyl)cyclohexan-1-carboxylat;

IT = iminothiolan; và

PBS = nước muối đệm phosphat.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp kháng thể-dược chất” (ADC) nghĩa là kháng thể được nối với dược chất thông qua đoạn nối (hoặc đơn vị đoạn nối). Trong sáng chế này, “thể tiếp hợp kháng thể-dược chất” nghĩa là kháng thể đơn dòng (hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên) được nối với dược chất gây độc thông qua đơn vị đoạn nối.

Thuật ngữ “tỷ lệ dược chất với kháng thể” (drug-to-antibody ratio-DAR) đề cập

đến số trung bình các dược chất được tiếp hợp với mỗi kháng thể trong quần thể tiếp hợp kháng thể-dược chất, và cũng có thể được thể hiện là tỷ lệ của số dược chất với số kháng thể. Tải nạp dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20, ưu tiên là từ 1 đến 10 các dược chất gây độc tế bào (D) được liên kết với mỗi kháng thể (Ab). Trong các phương án theo sáng chế, tải nạp dược chất được thể hiện là k hoặc n, và có thể minh họa là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc trung bình của hai giá trị bất kỳ; ưu tiên là trung bình của từ 1 đến 10, và ưu tiên hơn là trung bình của từ 1 đến 8, hoặc từ 2 đến 8, hoặc từ 2 đến 7, hoặc từ 3 đến 8, hoặc từ 3 đến 7, hoặc từ 3 đến 6, hoặc từ 4 đến 7, hoặc từ 4 đến 6, hoặc từ 4 đến 5. Tải nạp dược chất có thể được xác định bởi các phương pháp thông thường như quang phổ có thể nhìn thấy/UV, phép đo phổ khối, thử nghiệm ELISA, thử nghiệm biến thể kích thước phân tử kháng thể đơn dòng (CE-SDS) và mô tả đặc điểm HPLC.

Thử nghiệm biến thể kích thước phân tử kháng thể đơn dòng (CE-SDS) theo sáng chế có thể được sử dụng để xác định định lượng độ tinh khiết của sản phẩm kháng thể đơn dòng tái tổ hợp bằng cách qua thử nghiệm cực tím điện di-natri dodecyl sulfat (CE-SDS) mao dẫn dựa trên trọng lượng phân tử dưới các điều kiện khử và không khử và theo phương pháp điện di mao quản (*Chinese Pharmacopoeia* 0542, 2015 Edition).

Theo một phương án theo sáng chế, dược chất được nối với amino đầu tận cùng N của chuỗi và/hoặc ϵ -amino của gốc lysin thông qua đơn vị đoạn nối, và thường là, số phân tử dược chất mà có thể được nối với kháng thể trong phản ứng nối sẽ nhỏ hơn mức tối đa theo lý thuyết.

Tải nạp của thể tiếp hợp kháng thể-dược chất có thể được kiểm soát bằng các phương pháp không giới hạn sau đây, bao gồm:

- (1) kiểm soát tỷ lệ mol của tác nhân phản ứng nối với kháng thể đơn dòng,
- (2) kiểm soát thời gian phản ứng và nhiệt độ, và
- (3) chọn lọc các tác nhân phản ứng khác nhau.

Mặc dù tỷ lệ dược chất-với-kháng thể có giá trị chính xác (ví dụ n trong công thức (I)) cho phân tử tiếp hợp cụ thể, sẽ được hiểu rằng khi dùng để mô tả mẫu chứa nhiều phân tử, giá trị này thường sẽ là giá trị trung bình, được quy cho mức độ không đồng nhất nhất định thường liên quan đến bước tiếp hợp. Tải nạp dược chất trung bình của thể tiếp hợp được đề cập đến ở đây là tỷ lệ dược chất-với-kháng thể hoặc "DAR". Theo một số phương án, DAR nằm trong khoảng từ 1 đến 6, và thường là khoảng 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5 hoặc 8,0. Theo một số phương án, ít nhất 50% trọng lượng mẫu này là hợp chất có DAR trung bình ± 2 , và ưu tiên là ít nhất 50% mẫu này là thể tiếp hợp chứa DAR trung bình ± 1 . Các phương án bao gồm các thể tiếp hợp có DAR là khoảng 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,

1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,4, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 hoặc 7,0. Theo một số phương án, DAR là ‘khoảng x’ nghĩa là giá trị đo của DAR là trong khoảng 20% x.

DAR này được xác định ví dụ bằng cách ngoại suy các giá trị DAR từ dữ liệu LC-MS của mẫu khử và deglycosyl hóa. LC/MS cho phép định lượng số trung bình của các phân tử gói tải nạp (gốc dược chất) được liên kết với kháng thể trong ADC. HPLC tách kháng thể thành nhẹ và nặng, và cũng tách các chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC) theo số nhóm đoạn nối-gói tải nạp trong mỗi chuỗi. Dữ liệu phép đo phổ khối cho phép xác định kiểu của các thành phần trong hỗn hợp, ví dụ, LC+1, LC+2, HC+1, HC+2, v.v... Từ lượng tải trung bình của các chuỗi LC và HC, DAR trung bình cho ADC có thể được tính toán. DAR cho mẫu thể tiếp hợp miễn dịch xác định thể hiện số trung bình của các phân tử dược chất (gói tải nạp) được liên kết với kháng thể tetrame chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng. Ví dụ là phương pháp xác định cho DAR được mô tả trong WO2018142322.

Thuật ngữ “alkyl” đề cập đến nhóm hydrocarbon béo bão hòa là nhóm thẳng hoặc phân nhánh chứa từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, ưu tiên là alkyl chứa từ 1 đến 12 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 và 12) nguyên tử cacbon, ưu tiên hơn alkyl chứa từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, và ưu tiên nhất alkyl chứa từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ không giới hạn bao gồm methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimethylpropyl, 1,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1-ethylpropyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, *n*-hexyl, 1-ethyl-2-methylpropyl, 1,1,2-trimethylpropyl, 1,1-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 2-ethylbutyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 2,3-dimethylbutyl, *n*-heptyl, 2-methylhexyl, 3-methylhexyl, 4-methylhexyl, 5-methylhexyl, 2,3-dimethylpentyl, 2,4-dimethylpentyl, 2,2-dimethylpentyl, 3,3-dimethylpentyl, 2-ethylpentyl, 3-ethylpentyl, *n*-octyl, 2,3-dimethylhexyl, 2,4-dimethylhexyl, 2,5-dimethylhexyl, 2,2-dimethylhexyl, 3,3-dimethylhexyl, 4,4-dimethylhexyl, 2-ethylhexyl, 3-ethylhexyl, 4-ethylhexyl, 2-methyl-2-ethylpentyl, 2-methyl-3-ethylpentyl, *n*-nonyl, 2-methyl-2-ethylhexyl, 2-methyl-3-ethylhexyl, 2,2-diethylpentyl, *n*-decyl, 3,3-diethylhexyl, 2,2-diethylhexyl, và các chất đồng phân chuỗi bên khác nhau của nó, và tương tự. Ưu tiên hơn là, alkyl này là alkyl thấp có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon, và các ví dụ không giới hạn bao gồm methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *sec*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimethylpropyl, 1,2-dimethylpropyl, 2,2-dimethylpropyl, 1-ethylpropyl, 2-methylbutyl, 3-methylbutyl, *n*-hexyl, 1-ethyl-2-methylpropyl, 1,1,2-trimethylpropyl, 1,1-dimethylbutyl, 1,2-dimethylbutyl, 2,2-dimethylbutyl, 1,3-dimethylbutyl, 2-

ethylbutyl, 2-methylpentyl, 3-methylpentyl, 4-methylpentyl, 2,3-dimethylbutyl và tương tự. Alkyl này có thể được thế hoặc không được thế. Khi nó được thế, sự thế bằng nhóm thế có thể được thực hiện ở vị trí kết nối có thể tiếp cận bất kỳ, trong đó phần tử thế này ưu tiên là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio, heterocycloalkylthio và oxo.

Thuật ngữ “heteroalkyl” đề cập đến alkyl chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó alkyl này là như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “alkylen” đề cập đến nhóm hydrocarbon béo phân nhánh hoặc thẳng bão hòa, có gốc được xuất phát từ việc loại bỏ hai nguyên tử hydro từ cùng một nguyên tử cacbon hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alkan ban đầu. Nó là nhóm mạch thẳng hoặc phân nhánh chứa từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, ưu tiên là alkylen chứa từ 1 đến 12 (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 và 12) nguyên tử cacbon, và ưu tiên hơn là alkylen chứa từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ không giới hạn về alkylen bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, metylen ($-\text{CH}_2-$), 1,1-etyliden ($-\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,2-etyliden ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,1-propyliden ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$), 1,2-propyliden ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), 1,3-propyliden ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butylen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,5-butylen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), và tương tự. Alkylen có thể được thế hoặc không được thế, và khi nó được thế, sự thế bằng nhóm thế có thể được thực hiện ở vị trí kết nối có thể tiếp cận bất kỳ, trong đó phần tử thế này ưu tiên là độc lập và tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio, heterocycloalkylthio và oxo.

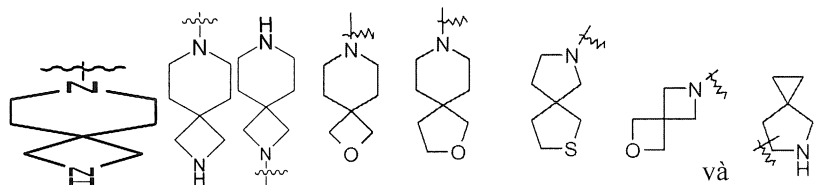
Thuật ngữ “alkoxy” đề cập đến $-\text{O}-(\text{alkyl})$ và $-\text{O}-(\text{cycloalkyl})$, trong đó alkyl hoặc cycloalkyl là như được xác định trên đây. Các ví dụ không giới hạn về alkoxy bao gồm: metoxy, etoxy, propoxy, butoxy, cyclopropyloxy, cyclobutoxy, cyclopentyloxy và cyclohexyloxy. Alkoxy có thể tùy ý được thế hoặc không được thế, và khi nó được thế, phần tử thế này ưu tiên là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio và heterocycloalkylthio.

Thuật ngữ “cycloalkyl” đề cập đến phần tử thế hydrocarbon đa vòng hoặc đơn vòng không bão hòa một phần hoặc bão hòa. Vòng cycloalkyl này chứa từ 3 đến 20 nguyên tử cacbon, ưu tiên là từ 3 đến 12 nguyên tử cacbon, ưu tiên hơn từ 3

đến 10 nguyên tử cacbon, và ưu tiên nhất 3 đến 8 nguyên tử cacbon. Các ví dụ không giới hạn về cycloalkyl đơn vòng bao gồm cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclopentenyl, cyclohexyl, cyclohexenyl, cyclohexadienyl, cycloheptyl, cycloheptatrienyl, cyclooctyl, và tương tự. Cycloalkyl đa vòng bao gồm spiro cycloalkyl, cycloalkyl ngưng tụ, hoặc cycloalkyl bắc cầu.

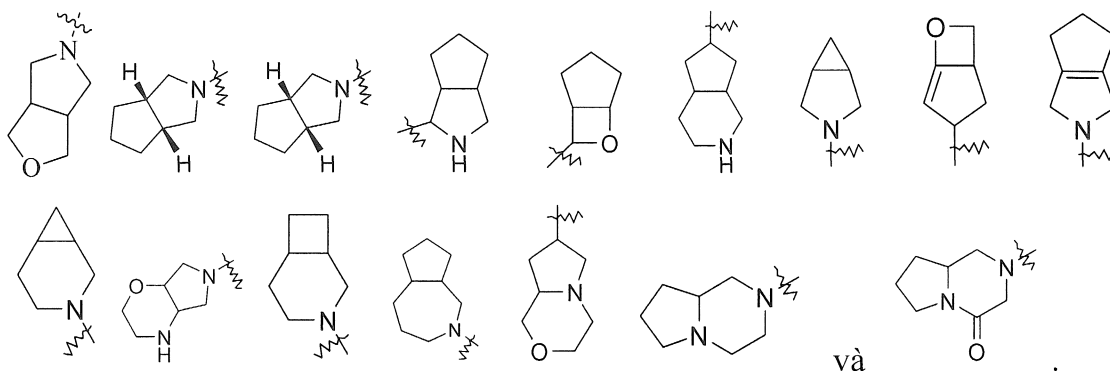
Thuật ngữ “heterocyclyl” đề cập đến phần tử thể hydrocarbon đa vòng hoặc đơn vòng không bão hòa một phần hoặc bão hòa chứa từ 3 đến 20 nguyên tử vòng, trong đó một hoặc nhiều trong số các nguyên tử vòng này là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm nitơ, oxy và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên từ 0 đến 2), không bao gồm phần vòng của -O-O-, -O-S- hoặc -S-S-, và các nguyên tử vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Heterocycloalkyl ưu tiên hơn chứa từ 3 đến 12 nguyên tử vòng, trong số đó có từ 1 đến 4 là nguyên tử khác loại; và ưu tiên hơn là chứa từ 3 đến 10 nguyên tử vòng. Các ví dụ không giới hạn về heterocyclyl đơn vòng bao gồm pyrrolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, morpholinyl, thiomorpholinyl, homopiperazinyl, và tương tự. Heterocyclyl đa vòng bao gồm spiro heterocyclyl, heterocyclyl ngưng tụ, hoặc heterocyclyl bắc cầu.

Thuật ngữ “spiro heterocyclyl” đề cập đến nhóm heterocyclyl đa vòng có từ 5- đến 20- cạnh trong đó các vòng có chung một nguyên tử (được đề cập đến là nguyên tử spiro), trong đó một hoặc nhiều nguyên tử vòng là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm nitơ, oxy và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên từ 0 đến 2), và các nguyên tử vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Các vòng này có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không có vòng nào trong số đó có hệ thống π -electron được liên hợp hoàn toàn. Ví dụ, spiro heterocyclyl này có từ 6- đến 14- cạnh, và ví dụ khác, từ 7- đến 10- cạnh. Theo số nguyên tử spiro cùng có chung trong số các vòng này, spiro heterocyclyl này có thể là monospiro heterocyclyl, bispiro heterocyclyl hoặc polyspiro heterocyclyl, ưu tiên là monospiro heterocyclyl hoặc bispiro heterocyclyl, ví dụ, monospiro heterocyclyl 4-cạnh/4-cạnh, 4-cạnh/5-cạnh, 4-cạnh/6-cạnh, 5-cạnh/5-cạnh hoặc 5-cạnh/6-cạnh. Các ví dụ không giới hạn về spiro heterocyclyl bao gồm:

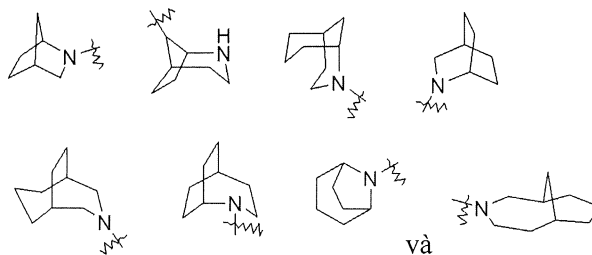


Thuật ngữ “heterocyclyl ngưng tụ” đề cập đến nhóm heterocyclyl đa vòng có từ 5 đến 20 cạnh trong đó mỗi vòng có chung một cặp nguyên tử liền kề với các vòng khác trong hệ thống này, trong đó một hoặc nhiều vòng này có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không một vòng nào trong số các vòng này có

hệ thống π -electron liên hợp hoàn toàn, trong đó một hoặc nhiều trong số các nguyên tử vòng này là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm nitơ, oxy và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên từ 0 đến 2), và các nguyên tử vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Ví dụ, spiro heterocyclyl là từ 6- đến 14-cạnh, và ví dụ khác, từ 7- đến 10-cạnh. Theo số vòng được tạo thành, heterocyclyl ngưng tụ này có thể là heterocyclyl ngưng tụ một vòng, hai vòng, ba vòng, bốn vòng hoặc đa vòng, ví dụ, heterocyclyl ngưng tụ hai vòng hoặc ba vòng, và ví dụ khác, heterocyclyl ngưng tụ hai vòng 5-cạnh/5-cạnh hoặc 5-cạnh/6-cạnh. Các ví dụ không giới hạn về heterocyclyl ngưng tụ bao gồm:

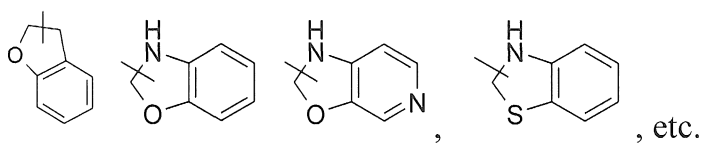


Thuật ngữ “heterocyclyl bắc cầu” đề cập đến nhóm heterocyclyl đa vòng có từ 5 đến 14 cạnh trong đó hai vòng bất kỳ có chung hai nguyên tử mà không được liên kết trực tiếp với nhau, trong đó các vòng này có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi, nhưng không vòng nào trong số các vòng này có hệ thống π -electron liên hợp hoàn toàn, trong đó một hoặc nhiều trong số các nguyên tử vòng này là nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm nitơ, oxy và $S(O)_m$ (trong đó m là số nguyên từ 0 đến 2), và các nguyên tử vòng còn lại là nguyên tử cacbon. Ví dụ, spiro heterocyclyl là có từ 6- đến 14-cạnh, và ví dụ khác, từ 7- đến 10-cạnh. Theo số vòng được tạo thành, heterocyclyl bắc cầu có thể là hai vòng, ba vòng, bốn vòng hoặc đa vòng, ví dụ, hai vòng, ba vòng, hoặc bốn vòng, và ưu tiên hơn là hai vòng hoặc ba vòng. Các ví dụ không giới hạn về heterocyclyl bắc cầu bao gồm:



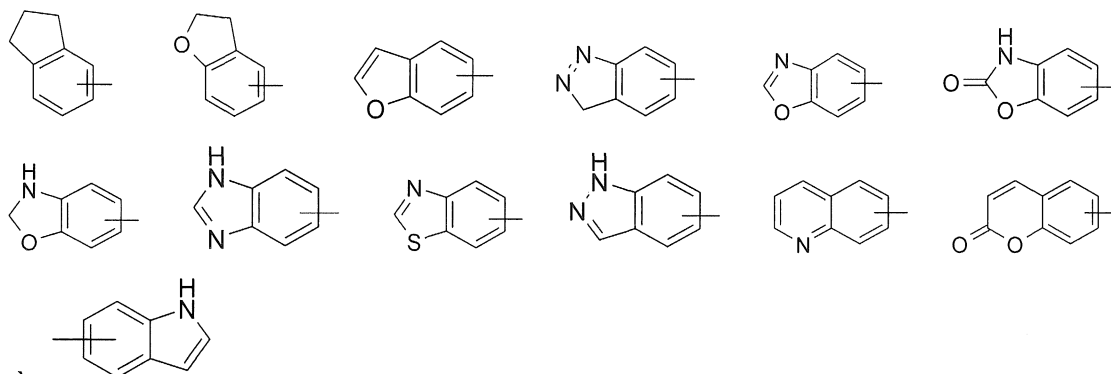
Vòng heterocyclyl có thể được ngưng tụ với vòng aryl, heteroaryl hoặc cycloalkyl, trong đó vòng này được gắn với cấu trúc gốc là heterocyclyl; các ví dụ không giới

hạn bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến:



Heterocyclyl có thể tùy ý được thế hoặc không được thế, và khi nó được thế, phần tử thế này ưu tiên là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio, heterocycloalkylthio và oxo.

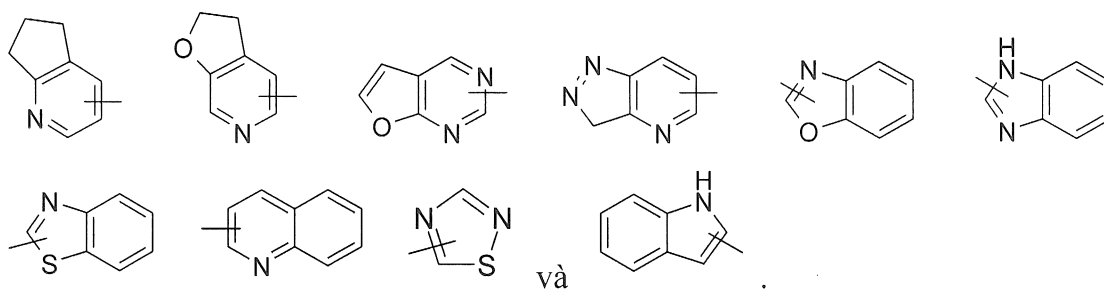
Thuật ngữ “aryl” đề cập đến nhóm đa vòng ngưng tụ (nghĩa là, các vòng có chung cặp nguyên tử cacbon liên kề) hoặc đơn vòng cacbon có từ 6- đến 14-cạnh, ví dụ, từ 6- đến 10-cạnh, có hệ thống π -electron liên hợp, như phenyl và naphthyl, cụ thể là phenyl. Vòng aryl có thể được ngưng tụ với vòng heteroaryl, heterocyclyl hoặc cycloalkyl, trong đó vòng này được gắn với cấu trúc gốc là vòng aryl; các ví dụ không giới hạn bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến:



và

Aryl có thể được thế hoặc không được thế, và khi nó được thế, phần tử thế này ưu tiên là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio và heterocycloalkylthio.

Thuật ngữ “heteroaryl” đề cập đến hệ thống dị thơm chứa từ 1 đến 4 nguyên tử khác loại và từ 5 đến 14 nguyên tử vòng, trong đó nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm oxy, lưu huỳnh và nitơ. Heteroaryl ưu tiên là có từ 5- đến 10-cạnh, ưu tiên hơn là 5- hoặc 6-cạnh, như furanyl, thienyl, pyridyl, pyrrolyl, *N*-alkylpyrrolyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, imidazolyl và tetrazolyl. Vòng heteroaryl này có thể được ngưng tụ với vòng aryl, heterocyclyl hoặc cycloalkyl, trong đó vòng này được gắn với cấu trúc gốc là heteroaryl; các ví dụ không giới hạn bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến:



Heteroaryl có thể tùy ý được thế hoặc không được thế, và khi nó được thế, phần tử thế này ưu tiên là một hoặc nhiều nhóm độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxy, alkylthio, alkylamino, halogen, mercapto, hydroxy, nitro, cyano, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkoxy, heterocycloalkoxy, cycloalkylthio và heterocycloalkylthio.

Thuật ngữ “cycloalkylalkyl” đề cập đến alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều nhóm cycloalkyl, ưu tiên là một nhóm cycloalkyl, trong đó alkyl này là như được xác định trên đây, và cycloalkyl này là như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “haloalkyl” đề cập đến alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều halogen, trong đó alkyl này là như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “alkyl được đotori hóa” đề cập đến alkyl trong đó hydro được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử đotori, trong đó alkyl này là như được xác định trên đây.

Thuật ngữ “hydroxy” đề cập đến nhóm -OH.

Thuật ngữ “halogen” đề cập đến flo, clo, brom hoặc iot.

Thuật ngữ “amino” đề cập đến -NH₂.

Thuật ngữ “nitro” đề cập đến -NO₂.

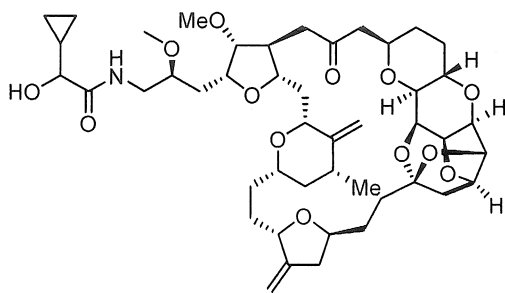
Trong công thức hóa học này, viết tắt “Me” đề cập đến metyl.

Thuật ngữ “một cách tùy ý” hoặc “tùy ý” nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể, nhưng không nhất thiết, xảy ra, và bản mô tả này bao gồm các trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình huống xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, “C₁-C₆ alkyl tùy ý được thế bằng halogen hoặc cyano” nghĩa là halogen hoặc cyano có thể, nhưng không nhất thiết, có mặt, và bản mô tả này bao gồm trường hợp trong đó alkyl được thế bằng halogen hoặc cyano và trường hợp trong đó alkyl không được thế bằng halogen và cyano.

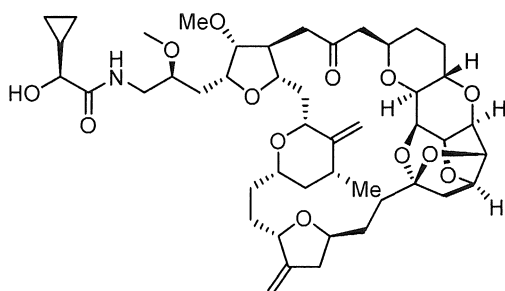
Hợp chất theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều tâm bất đối xứng và do đó các chất đồng phân đối ảnh và các chất đồng phân không đối quang có thể được tạo ra. Các chất đồng phân đối ảnh và các chất đồng phân không đối quang có thể được xác định về mặt hóa học lập thể thuần túy là (*R*)- hoặc (*S*)-, hoặc các dạng chất đồng phân lập thể khác (*D*)- hoặc (*L*)- cho axit amin. Sáng chế bao gồm tất cả các chất đồng phân có thể cũng như dạng raxemic và tinh khiết quang của nó. Chất đồng phân hoạt tính quang (+) và (-), (*R*)- và (*S*)-, hoặc (*D*)- và (*L*) có thể được

điều chế bằng cách sử dụng các synthon không đối ảnh hoặc các chất phản ứng không đối ảnh, hoặc có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường như sắc ký và kết tinh phân đoạn. Các phương pháp thông thường để điều chế/tách các chất đồng phân đối ảnh bao gồm sự tổng hợp không đối ảnh từ các tiền chất tinh khiết quang thích hợp hoặc phân giải raxemat (hoặc raxemat của muối hoặc dẫn xuất) bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký lỏng hiệu suất cao bất đối xứng (high performance liquid chromatography-HPLC). Khi hợp chất được mô tả ở đây chứa liên kết đôi olefin hoặc tâm bất đối xứng hình học khác, có nghĩa là hợp chất này bao gồm cả hai đồng phân hình học *E* và *Z*, trừ khi được chỉ định khác. Ngoài ra, tất cả các dạng tautome cũng được dự tính được đưa vào.

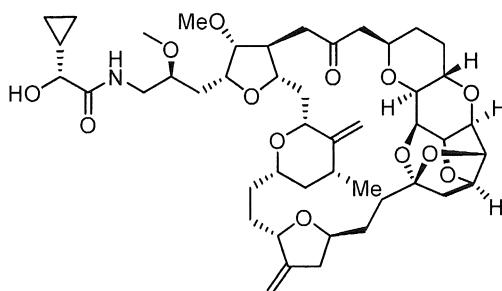
Trong cấu trúc hóa học này của hợp chất được mô tả ở đây, khi không có cấu hình nào được chỉ định, liên kết “/” có thể là “.....” hoặc “/”, hoặc bao gồm cả hai cấu hình “.....” và “/”. Trong cấu trúc hóa học này của hợp chất được mô tả ở đây, khi không có cấu hình nào được chỉ định, liên kết “//” có thể là trong cấu hình *Z* hoặc cấu hình *E*, hoặc bao gồm cả hai cấu hình. Ví dụ,



có thể là



hoặc



Thuật ngữ “chất đồng phân lập thể” đề cập đến các hợp chất bao gồm các nguyên tử giống nhau được liên kết bởi các liên kết giống nhau nhưng với cấu trúc ba chiều khác nhau, mà không thể hoán đổi cho nhau. Sáng chế dự tính các chất đồng phân lập thể khác nhau và các hỗn hợp của nó, bao gồm “các chất đồng phân đối ảnh” đề cập đến cặp các chất đồng phân lập thể là các hình ảnh gương không chồng lên nhau của chất đồng phân kia.

Dẫn xuất được đánh dấu đồng vị của hợp chất này bất kỳ hoặc muối được dùng hoặc chất đồng phân của nó được mô tả ở đây được bao hàm bởi sáng chế. Các nguyên tử mà có thể được đánh dấu đồng vị bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến, hydro, cacbon, nitơ, oxy, phospho, flo, clo, iot, v.v... Chúng có thể được thay

thể tách biệt bằng các chất đồng vị ^2H (D), ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl và ^{125}I , v.v... Trừ khi được nêu khác, khi vị trí được chỉ định cụ thể khác là đotori (D), vị trí đó sẽ được hiểu là đotori có sự dư thừa là lớn hơn gấp ít nhất 3000 lần so với sự dư thừa đotori tự nhiên (là 0,015%) (nghĩa là, kết hợp ít nhất 45% đotori).

Thuật ngữ “được thể” nghĩa là một hoặc nhiều, ưu tiên là lên đến 5, ưu tiên hơn từ 1 đến 3 nguyên tử hydro trong nhóm này độc lập được thể bằng phân tử thể. Phân tử thể chỉ là ở vị trí hóa học có thể của nó, và chuyên gia trong ngành sẽ có khả năng xác định (theo thực nghiệm hoặc lý thuyết) sự thể có thể hoặc không thể không cần nỗ lực quá mức. Ví dụ, nó có thể không ổn định khi amino hoặc hydroxy có hydro tự do được liên kết với nguyên tử cacbon có liên kết không bão hòa (ví dụ, olefin).

Thuật ngữ “được phẩm” đề cập đến hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất hoặc muối được dụng/dược lý hoặc các tiền được chất của nó được mô tả ở đây, và các thành phần hóa học khác, ví dụ, chất mang và tá được dụng/dược lý. Được phẩm nhằm mục đích thúc đẩy dùng cho sinh vật, để tạo điều kiện thuận lợi cho sự hấp thụ của các thành phần hoạt tính, nhờ đó tạo ra các hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ “muối được dụng” đề cập đến muối của thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế, hoặc muối của hợp chất được mô tả trong sáng chế. Các muối này là an toàn và hiệu quả khi được sử dụng trong đối tượng và có hoạt tính sinh học cần thiết. Thể tiếp hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế ít nhất chứa một nhóm amino và do vậy có thể tạo thành muối với axit. Các ví dụ không giới hạn về các muối được dụng bao gồm: hydroclorua, hydrobromua, hydriodat, sulphat, bisulfat, citrat, axetat, succinat, ascorbat, oxalat, nitrat, sorbat, hydrophosphat, dihydrophosphat, salicylat, hydroxitrat, tartrat, maleat, fumarat, format, benzoat, mesylat, etansulfonat, benzensulphonat và *p*-toluensulfonat.

Thuật ngữ “solvat” đề cập đến solvat được dụng được tạo thành bởi thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo sáng chế và một hoặc nhiều phân tử dung môi. Các ví dụ không giới hạn về các phân tử dung môi này bao gồm nước, etanol, axetonitril, isopropanol, DMSO và etyl axetat.

Sáng chế đề cập đến nhánh đoạn nối có thể phân cắt với cấu trúc cụ thể, hoạt chất có cấu trúc cụ thể, và thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (ADC) chứa nhánh đoạn nối, hoạt chất và kháng thể. ADC này là phức hợp được tạo thành bằng cách liên kết chất gây độc với kháng thể thông qua đơn vị đệm. ADC bị phân hủy *in vivo* để giải phóng phân tử hoạt tính, nhờ đó đóng vai trò chống khối u.

Thuật ngữ “chất mang”, khi được sử dụng cho được phẩm theo sáng chế, đề cập đến hệ thống có thể thay đổi cách trong đó được chất đưa vào trong đối tượng và phân bố được chất trong cơ thể, kiểm soát tốc độ giải phóng được chất, và đưa

được chất đến đích. Sự giải phóng chất mang được chất và hệ thống đích có thể giảm sự phân hủy và mất được chất, giảm tác dụng phụ và cải thiện sinh khả dụng. Ví dụ, chất hoạt động bề mặt polyme mà có thể được sử dụng làm chất mang có thể tự tập hợp do cấu trúc lưỡng tính duy nhất của chúng để tạo thành các dạng kết tụ khác nhau, như micell, vi nhũ tương, gel, tinh thể lỏng và các tiểu nang, là các ví dụ ưu tiên. Các sự kết tụ này có khả năng bao bọc phân tử được chất và có tính thấm tốt cho màng, và do đó có thể được sử dụng làm chất mang được chất tuyệt vời.

Thuật ngữ “tá được” là tác nhân bổ sung ngoài thành phần hoạt tính, vào chế phẩm được phẩm. Nó có thể cũng được đề cập đến là nguyên liệu phụ trợ. Ví dụ, chất gắn kết, chất độn, chất làm rắn, chất làm trơn trong viên nén; phần chất nền trong thuốc dạng mỡ bán rắn và chế phẩm kem; chất bảo quản, chất chống oxi hóa, nước thơm, nước hoa, các đồng dung môi, chất nhũ hóa, chất ổn định, tác nhân điều chỉnh trương lực, chất màu và tác nhân tương tự trong chế phẩm lỏng có thể tất cả được đề cập đến là các tá được.

Thuật ngữ “chất pha loãng”, also được đề cập đến là chất độn, được sử dụng trước hết để gia tăng trọng lượng và thể tích của viên nén. Sự bổ sung chất pha loãng này không chỉ đảm bảo thể tích nhất định, mà còn giảm độ lệch liều của các thành phần chính, và cải biến khả năng tạo khuôn nén của được chất và tương tự. Khi được chất ở dạng viên nén chứa các thành phần dầu, tác nhân hấp thụ cần thiết được bổ sung vào để hấp thụ các thành phần dầu để duy trì trạng thái “khô” và do đó dễ dàng bào chế viên nén. Các ví dụ bao gồm tinh bột, lactoza, các muối vô cơ của canxi, xenluloza vi tinh thể và tương tự.

“Đưa cho”, “dùng” và “điều trị”, khi được dùng cho động vật, người, đối tượng thí nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, đề cập đến sự tiếp xúc của an exogenous drug, tác nhân điều trị, tác nhân chẩn đoán hoặc chế phẩm với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học này. “Đưa cho”, “dùng” và “điều trị” có thể đề cập đến, ví dụ, phương pháp điều trị, được động học, chẩn đoán, nghiên cứu, và thí nghiệm. Điều trị các tế bào bao gồm làm cho tác nhân phản ứng tiếp xúc với tế bào này và làm cho tác nhân phản ứng tiếp xúc với dịch, trong đó dịch này tiếp xúc với tế bào này. “Đưa cho”, “dùng” và “điều trị” cũng đề cập đến điều trị, ví dụ, tế bào, bằng tác nhân phản ứng, chẩn đoán, chế phẩm liên kết, hoặc bằng tế bào khác *in vitro* và *ex vivo*. “Điều trị”, khi được dùng cho người, đối tượng thú y hoặc nghiên cứu, đề cập đến điều trị chữa trị, các biện pháp ngăn ngừa hoặc phòng bệnh, và các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

“Điều trị” đề cập đến dùng tác nhân điều trị, như chế phẩm chứa kháng thể bất kỳ hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của nó hoặc các thể tiếp hợp của nó theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cho đối tượng đã bị mắc, nghi ngờ mắc hoặc được

dự đoán là có một hoặc nhiều bệnh hoặc triệu chứng của nó mà tác nhân điều trị này được biết là có hiệu quả điều trị. Nhìn chung, tác nhân điều trị được dùng với khối lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh trong đối tượng hoặc quần thể được điều trị, dù bằng cách làm giảm sự tiến triển của các triệu chứng này hoặc ức chế sự tiến triển của các triệu chứng này thành mức có thể đo được về mặt lâm sàng. Khối lượng tác nhân điều trị hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh cụ thể (cũng được đề cập đến là “khối lượng hữu hiệu để điều trị”) có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi và trọng lượng của đối tượng, và khả năng của dược chất để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn trong đối tượng. Dù triệu chứng bệnh đã được thuyên giảm có thể được đánh giá bằng các phương pháp thử nghiệm lâm sàng bất kỳ thường được bác sĩ hoặc chuyên gia chăm sóc sức khỏe khác sử dụng để đánh giá độ nghiêm trọng hoặc tiến triển của triệu chứng này. Mặc dù các phương án của sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc vật phẩm sản xuất) có thể là không hữu hiệu để làm thuyên giảm các triệu chứng bệnh quan tâm trong đối tượng nhất định, chúng làm thuyên giảm các triệu chứng bệnh quan tâm này trong số lượng đối tượng có ý nghĩa thống kê như được xác định bằng phương pháp thử nghiệm thống kê bất kỳ được biết trong ngành, như thử nghiệm t Student, thử nghiệm Chi-bình phương, thử nghiệm U bởi Mann và Whitney, thử nghiệm Kruskal-Wallis (H-test), thử nghiệm Jonckheere-Terpstra và thử nghiệm Wilcoxon.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả tiếp dưới đây tham chiếu đến các ví dụ, tuy nhiên, không nhằm làm giới hạn đến phạm vi của sáng chế.

Các quy trình thí nghiệm không có các điều kiện cụ thể được chỉ ra trong các ví dụ hoặc các ví dụ thử nghiệm thường được tiến hành theo các điều kiện thông thường, hoặc theo các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất các nguyên liệu khởi đầu hoặc các sản phẩm thương mại, xem Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Reagents không có nguồn gốc cụ thể được chỉ định là chất phản ứng thông thường sẵn có trên thị trường.

1. Điều chế kháng thể

Ví dụ 1-1. Tách dòng và biểu hiện các kháng nguyên protein

Các kháng thể (chứa chuỗi nhẹ và nặng) và các kháng nguyên được xây dựng bằng cách kéo dài PCR chồng lên nhau được biết trong ngành, và các đoạn ADN thu được bằng cách kéo dài PCR chồng lên nhau được xen vào trong vector biểu hiện

pEE6.4 (Lonza Biologics) thông qua vị trí cắt enzym HindIII/BstBI, và được biểu hiện trong tế bào 293F (Invitrogen, Cat# R790-07) để thu được protein tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp thu được được sử dụng để gây miễn dịch hoặc sàng lọc. Trình tự axit amin của CD79B người có nguồn gốc từ NCBI (NP_000617.1), và vùng ngoại bào (ECD) của CD79B người chứa 159 axit amin (Met1-Asp159).

Trình tự axit amin của protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B người (ECD) và vùng Fc người (CD79B người ECD-hFc) được thể hiện trong SEQ ID NO: 1:

```
ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNASAGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEEPSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK
```

SEQ ID NO: 1.

Trình tự axit amin của protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B người (ECD) và đuôi His (CD79B người ECD-His) được thể hiện trong SEQ ID NO: 2:

```
ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMHCYMNASAGNVSWLWKQ
EMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEVYQ
GCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGM
EEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEHHHHHH
```

SEQ ID NO: 2.

Ví dụ 1-2. Điều chế kháng thể đơn dòng chuột

1. Gây miễn dịch chuột và xác định chuẩn độ huyết thanh

Protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B người (ECD) và vùng Fc người (CD79B người ECD-hFc) và protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B người (ECD) và đuôi His (CD79B người ECD-His) được lấy là các chất gây miễn dịch và được sử dụng để gây miễn dịch và chuột Balb/c và SJL bằng cách tiêm trong phúc mạc, tương ứng, để kích thích chuột để tạo ra kháng thể kháng lại vùng ngoại bào CD79B người (ECD). Ngoài ra, protein dung hợp của vùng ngoại bào CD79B khỉ xynomolgus (ECD) và đuôi His (cyno CD79B ECD-His) được lấy là chất gây miễn dịch để gây miễn dịch chuột SJL bằng cách tiêm trong phúc mạc, để kích thích chuột này sản sinh kháng thể kháng lại vùng ngoại bào CD79B khỉ (ECD).

Các quy trình thí nghiệm:

1) Gây miễn dịch tiêm trong phúc mạc Khối lượng kháng nguyên cần cho sự gây miễn dịch này được tính toán theo chương trình gây miễn dịch. Kháng nguyên

protein được pha loãng đến nồng độ tương ứng bằng PBS như được yêu cầu, và được nhũ hóa sau đó. Hỗn hợp kháng nguyên nhũ hóa và tá được chuyển sang xi lanh vô trùng 2,0mL và tiêm vào bên phải bụng chuột.

2) Thu thập huyết thanh chuột Ống huyết thanh tương ứng với từng con chuột được đánh dấu; khoảng 100 μ L máu tổng số được thu thập qua tĩnh mạch dưới hàm của chuột, và mẫu máu tổng số được thu thập được để đứng yên ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 2 giờ và sau đó ly tâm để thu huyết thanh. Huyết thanh được bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C để xác định chuẩn độ kháng thể và tương tự.

3) Xác định chuẩn độ huyết thanh của chuột gây miễn dịch bằng ELISA Đĩa 96 lỗ được phủ bằng 1 μ g/mL kháng nguyên ở 50 μ L/lỗ và được ủ trong tủ lạnh ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, đĩa được phủ này được rửa một lần (dung dịch rửa: 1 $\times$ PBST). Sau khi rửa, đĩa này được rửa bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong 1 $\times$ PBST ở 37 °C trong 1h. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1 $\times$ PBST, các mẫu huyết thanh thử nghiệm ở các nồng độ pha loãng khác nhau được bổ sung vào đĩa này, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1 $\times$ PBST, 100 μ L kháng thể thứ cấp kháng chuột của dê được pha loãng trong độ pha loãng 1:5000 được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 0,5 h. Sau khi rửa đĩa này, dung dịch phát triển màu TMB A và B được trộn trong tỷ lệ 1:1 để phát triển màu. 15 phút sau đó, phản ứng phát triển màu được ngừng bằng axit hydrocloric 1N. Giá trị huỳnh quang được đọc ở 450 nm trên máy đọc vi đĩa Spectra Max M5.

4) Xác định chuẩn độ huyết thanh của chuột gây miễn dịch bởi FACS Huyền phù chứa các tế bào DoHH2 hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi được ly tâm, tái tạo huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA, và đếm. Huyết thanh thử nghiệm của mỗi nhóm chuột gây miễn dịch được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút và được rửa ba lần. Sau đó kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (Fc đặc hiệu)-FITC được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút cách xa ánh sáng, được rửa ba lần, tái tạo huyền phù nhẹ nhàng trong PBS chứa 0,1% BSA, và nạp lên trên máy để thử nghiệm.

Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh của tất cả các nhóm chuột bằng ELISA và FACS được thể hiện trong FIGs. 1 đến 7.

Tổng số 5 con chuột Balb/c được gây miễn dịch tương ứng bằng protein CD79B người ECD-hFc, và được đánh số 5491, 5492, 5493, 5494 và 5495. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trong FIG. 1. Các kết quả này cho thấy rằng chuẩn độ huyết thanh của chuột sau khi gây miễn dịch đạt nhiều hơn 1:100 K. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh chuột bởi FACS được thể hiện trong FIG. 2. Có thể thấy rằng kháng thể được tạo ra trong huyết

thanh chuột có thể nhận biết đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của tế bào DoHH2.

Tổng số 5 con chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein CD79B người ECD-hFc, và được đánh số tương ứng 5496, 5497, 5498, 5499 và 5500. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trong FIG. 3. Các kết quả này cho thấy rằng chuẩn độ huyết thanh của chuột sau khi gây miễn dịch đạt nhiều hơn 1:100 K. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh chuột bởi FACS được thể hiện trong FIG. 4. Có thể thấy rằng kháng thể được tạo ra trong huyết thanh chuột có thể nhận biết đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của tế bào DoHH2.

Tổng số 5 con chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein CD79B người ECD-his, và được đánh số tương ứng 5726, 5727, 5728, 5729 và 5730. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trong FIG. 5. Các kết quả này cho thấy rằng chuẩn độ huyết thanh của chuột sau khi gây miễn dịch đạt nhiều hơn 1:10 K. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh chuột bởi FACS được thể hiện trong FIG. 6. Có thể thấy rằng kháng thể được tạo ra trong huyết thanh chuột có thể nhận biết đặc hiệu protein CD79B trên bề mặt của tế bào DoHH2.

Tổng số 5 con chuột SJL được gây miễn dịch bằng protein CD79B khi ECD-his, và được đánh số tương ứng 5501, 5502, 5503, 5504 và 5505. Các kết quả thử nghiệm chuẩn độ huyết thanh bằng ELISA được thể hiện trong FIG. 7. Các kết quả này cho thấy rằng chuẩn độ huyết thanh của chuột sau khi gây miễn dịch đạt nhiều hơn 1:10 K.

Từ các kết quả trên, có thể thấy rằng kháng thể đặc hiệu kháng lại CD79B được tạo ra ở chuột được gây miễn dịch. Các con chuột trên có thể được sử dụng để dung hợp tế bào để tạo ra dòng tế bào lai có khả năng tiết kháng thể đặc hiệu kháng lại CD79B.

2. Điều chế khối tế bào lai và sàng lọc kháng thể

Các lympho bào và các tế bào u tủy SP2/0 (ATCC, CCL-121TM) của chuột gây miễn dịch được dung hợp bằng dung hợp bằng điện để sàng lọc kháng thể sau đó.

1) Thí nghiệm dung hợp bằng điện Các tế bào SP2/0 được nhân lên trong môi trường 10% DMEM một tuần trước khi dung hợp. Lách và hạch bạch huyết của chuột được thu hoạch, rửa sạch và nghiền nhỏ để thu các lympho bào. SP2/0 và các lympho bào được trộn theo tỷ lệ, và được dung hợp sử dụng thiết bị dung hợp bằng điện. Sau khi dung hợp, các tế bào này được dàn trong đĩa 96 lỗ và được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C với 5% CO₂; tình trạng tế bào được quan sát hằng ngày, và tỷ lệ dung hợp tế bào được tính toán 5 ngày sau khi dung hợp. Tế bào lai dung hợp được sàng lọc 9-14 ngày sau khi dung hợp, và tế bào trong các lỗ dương tính được chọn để nuôi cấy khuếch đại trong đĩa 24 lỗ.

2) Tách dòng phụ bằng phương pháp pha loãng giới hạn Các dòng tế bào được

tách dòng phụ được tái tạo huyền phù trong các lỗ của đĩa nuôi cấy 24 lỗ và đếm. Nồng độ tế bào của mỗi dòng tế bào được pha loãng đến 5-10 tế bào/mL, huyền phù tế bào pha loãng được bổ sung vào đĩa nuôi cấy 96 lỗ với 0,2 mL/1-2 tế bào/lỗ. Đĩa 96 lỗ được ủ trong thiết bị ủ ở 37 °C với 5% CO₂. 7-10 ngày sau đó, các dòng dương tính được chọn và được bổ sung vào đĩa 24 lỗ để khẳng định thêm.

3) Sàng lọc ELISA Đĩa 96 lỗ được phủ bằng 1 µg/mL kháng nguyên ở 50 µL/lỗ và được ủ trong tủ lạnh ở 4 °C qua đêm. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên được phủ được rửa một lần (dung dịch rửa: 1× PBST). Sau khi rửa, đĩa này được rửa bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong 1× PBST ở 37 °C trong 1h. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1× PBST, 50 µL huyền phù tế bào thử nghiệm được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1× PBST, 100 µL kháng thể thứ cấp kháng chuột của dê được pha loãng trong độ pha loãng 1:5000 được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa này, dung dịch phát triển màu TMB A và B được trộn trong tỷ lệ 1:1 để phát triển màu. 15 phút sau đó, phản ứng phát triển màu được ngừng bằng axit hydrocloric 1N. Giá trị huỳnh quang được đọc ở 450 nm trên máy đọc vi đĩa Spectra Max M5.

4) Sàng lọc FACS Huyền phù chứa các tế bào DoHH2 được ly tâm, tái tạo huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA, và đếm. Huyết thanh thử nghiệm được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút và rửa. Sau đó kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (Fc đặc hiệu)-FITC được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút cách xa ánh sáng, được rửa ba lần, tái tạo huyền phù nhẹ nhàng trong PBS chứa 0,1% BSA, và nạp lên trên máy để thử nghiệm.

5) Xác định các dòng đơn tính dương tính tế bào lai Nhiều kháng thể đặc hiệu kháng lại kháng nguyên CD79B người thu được; và 17 chủng khối tế bào lai có lực liên kết mạnh nhất với ELISA và FACS trong các thử nghiệm được lấy để sản xuất và tinh chế kháng thể. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai kháng CD79B người bằng ELISA được thể hiện trong Bảng 1. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai kháng CD79B người bởi FACS được thể hiện trong bảng 2. Kháng thể đặc hiệu kháng lại kháng nguyên CD79B khi were also obtained; và 4 chủng khối tế bào lai có lực liên kết mạnh nhất với ELISA và FACS trong các thử nghiệm được lấy để sản xuất và tinh chế kháng thể. Các kết quả thử nghiệm của các tế bào dòng đơn tính dương tính tế bào lai kháng CD79B khi bởi FACS được thể hiện trong bảng 4. mIgG được sử dụng làm đối chứng âm tính trong cả hai thử nghiệm.

Bảng 1. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai
kháng CD79B người bằng ELISA

Kháng thể số	Dòng đơn tính số	Các kết quả (OD450)
Đối tính âm tính	mIgG	0,05
mAb001	12A11-1G1	3,26
mAb002	19F10-1D7	3,69
mAb003	51E5G6	3,02
mAb004	67B10C1	3,41
mAb005	78A9F4	3,73
mAb006	48F11D6	3,34
mAb007	61A11F1	3,40
mAb008	63G2A2	3,56
mAb009	75F1E2	3,57
mAb010	66G3E7	3,83
mAb011	66E12H3	3,41
mAb012	73A8F3	3,45
mAb013	74C4F3	3,31
mAb014	70B8B3	3,10
mAb015	83B2G2	3,41
mAb016	83C2D4	3,46
mAb017	86F11F6	3,80

Bảng 2. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai
kháng CD79B người bởi FACS

Kháng thể số	Dòng đơn tính số	Giá trị huỳnh quang trung bình
Đối tính âm tính	mIgG	58
mAb001	12A11-1G1	13032
mAb002	19F10-1D7	5943
mAb003	51E5G6	33918
mAb004	67B10C1	26000
mAb005	78A9F4	24454
mAb006	48F11D6	20120
mAb007	61A11F1	18039
mAb008	63G2A2	16453
mAb009	75F1E2	16001
mAb010	66G3E7	15897

mAb011	66E12H3	14688
mAb012	73A8F3	14073
mAb013	74C4F3	12894
mAb014	70B8B3	8776
mAb015	83B2G2	10036
mAb016	83C2D4	9990
mAb017	86F11F6	8132

Bảng 3. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai kháng CD79B khi bằng ELISA

Kháng thể số	Dòng đơn tính số	Các kết quả (OD450)
Đối tính âm tính	mIgG	0,08
mAb018	121H1E9	2,36
mAb019	152E5F6	2,80
mAb020	159E3E5	2,71
mAb021	134H2F5	2,95

Bảng 4. Các kết quả thử nghiệm của các dòng đơn tính dương tính tế bào lai kháng CD79B khi bởi FACS

Kháng thể số	Dòng đơn tính số	Giá trị huỳnh quang trung bình
Đối tính âm tính	mIgG	35
mAb018	121H1E9	1973
mAb019	152E5F6	1708
mAb020	159E3E5	1488
mAb021	134H2F5	1225

3. Sản xuất, tinh chế và xác định kháng thể đơn dòng chuột

1) Sản xuất và tinh chế kháng thể đơn dòng chuột Tế bào lai cần để sản xuất kháng thể được quan sát dưới kính hiển vi. Khi các tế bào này sinh trưởng đến $\geq 70\%$ hoặc nhiều hơn và có trạng thái tế bào tốt, thu thập các tế bào này và đếm sử dụng máy đếm tế bào kiểu Countstar IC1000. Nồng độ tế bào được điều chỉnh đến từ 1×10^5 đến 5×10^5 tế bào/mL và được chuyển đến Roller Bottle. Roller Bottle được đặt trong thiết bị ủ để nuôi cấy ở 37°C trong 10-15 ngày, và điều kiện sinh trưởng của các tế bào được quan sát hàng ngày. Tế bào được lấy ra để tinh chế khi dung dịch nuôi cấy chuyển sang màu cam và trong suốt. Phần nổi tế bào đã được

đưa đến tinh chế kháng thể sử dụng cột Protein A theo phương pháp thông thường.

2) Thử nghiệm trên kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bằng ELISA
Đĩa 96 lỗ được phủ bằng 1 $\mu\text{g/mL}$ kháng nguyên ở 50 $\mu\text{L/lỗ}$ và được ủ trong tủ lạnh ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên được phủ được rửa một lần (dung dịch rửa: 1× PBST). Sau khi rửa, đĩa này được rửa bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong 1× PBST ở 37 °C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1× PBST, 50 μL kháng thể được pha loãng theo tỷ lệ 1:10 từ 100 nM được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 1h. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng 1× PBST, 100 μL kháng thể thứ cấp kháng chuột của dê được pha loãng trong độ pha loãng 1:5000 được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37 °C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa này, dung dịch phát triển màu TMB A và B được trộn trong tỷ lệ 1:1 để phát triển màu. 15 phút sau đó, phản ứng phát triển màu được ngừng bằng axit hydrocloric 1N. Giá trị huỳnh quang được đọc ở 450 nm trên máy đọc vi đĩa Spectra Max M5. Bốn trong số các kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người thể hiện lực liên kết ELISA mạnh nhất (mAb008, mAb015, mAb016 và mAb017). Dữ liệu cụ thể được thể hiện trong FIG. 8.

3) Thử nghiệm trên kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS
Huyền phù tế bào của tế bào DoHH2 được ly tâm, tái tạo huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA, và đếm. 100 μL kháng thể được pha loãng theo tỷ lệ 1:10 từ 100 nM được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1h và được rửa ba lần. Sau đó kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (Fc đặc hiệu)-FITC được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút cách xa ánh sáng, được rửa ba lần, tái tạo huyền phù nhẹ nhàng trong PBS chứa 0,1% BSA, và nạp lên trên máy để thử nghiệm. Bốn trong số các kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người này thể hiện lực liên kết FACS mạnh nhất (mAb008, mAb015, mAb016 và mAb017). Dữ liệu cụ thể được thể hiện trong FIG. 9A và 9B, trong đó hIgG1 là kháng thể đối chứng âm và SN8 là kháng thể đối chứng âm. SN8 là kháng thể (nguồn trình tự tham chiếu: US20170362318A) được sử dụng trong thể tiếp hợp kháng thể-được chất polatuzumab vedotin được phát triển bởi Roche pharmaceutical. Polatuzumab vedotin đã được thông qua bởi FDA để đưa ra thị trường. Từ các kết quả này, có thể thấy rằng ba kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người ưu tiên này mAb015, mAb016 và mAb017 theo sáng chế tất cả đều có lực liên kết vượt trội với SN8 trong thử nghiệm FACS.

4) Thử nghiệm trên tính phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS các tế bào 293F-cynoCD79B thu được bằng cách chuyển nhiễm tạm thời, và huyền phù tế bào được ly tâm, tái tạo huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA, và đếm. Các kháng thể ở các nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ và 1 $\mu\text{g/mL}$ được bổ sung tách biệt, mỗi nồng độ kháng thể 100 μL . Các tế bào được ủ ở nhiệt

độ trong phòng trong 1h và được rửa ba lần. Sau đó kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (Fc đặc hiệu)-FITC được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút cách xa ánh sáng, được rửa ba lần, tái tạo huyền phù nhẹ nhàng trong PBS chứa 0,1% BSA, và nạp lên trên máy để thử nghiệm. Các kết quả thử nghiệm của tính phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi FACS được thể hiện trong FIG. 10.

5) Thử nghiệm trên kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi bằng ELISA. Đĩa được phủ bằng $\mu\text{g/mL}$ kháng nguyên ở $50 \mu\text{L/lỗ}$ và được ủ trong tủ lạnh ở 4°C qua đêm. Ngày tiếp theo, đĩa kháng nguyên được phủ được rửa một lần (dung dịch rửa: $1 \times \text{PBST}$). Sau khi rửa, đĩa này được rửa bằng dung dịch phong bế 1% BSA được điều chế trong $1 \times \text{PBST}$ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng $1 \times \text{PBST}$, $50 \mu\text{L}$ kháng thể được pha loãng theo tỷ lệ 1:10 từ 100 nM được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37°C trong 1h. Sau khi rửa đĩa này 3 lần bằng $1 \times \text{PBST}$, $100 \mu\text{L}$ kháng thể thứ cấp kháng chuột của dê được pha loãng trong độ pha loãng 1:5000 được bổ sung, và ủ đĩa này trong máy ủ ở 37°C trong 0,5 giờ. Sau khi rửa đĩa này, dung dịch phát triển màu TMB A và B được trộn trong tỷ lệ 1:1 để phát triển màu. 15 phút sau đó, phản ứng phát triển màu được ngừng bằng axit hydrochloric 1N. Giá trị huỳnh quang được đọc ở 450 nm trên máy đọc vi đĩa Spectra Max M5. Các kết quả được thể hiện trong FIG. 11.

6) Thử nghiệm trên liên kết của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi được chiết từ máu khi. Huyền phù tế bào được ly tâm, và các tế bào này được tái tạo huyền phù trong PBS chứa 0,1% BSA và đếm. Kháng thể kháng CD19 và kháng cynoCD79B được bổ sung. Các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1h và được rửa ba lần. Sau đó kháng thể thứ cấp IgG kháng chuột (Fc đặc hiệu)-FITC được bổ sung, và các tế bào được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút cách xa ánh sáng, được rửa ba lần, tái tạo huyền phù nhẹ nhàng trong PBS chứa 0,1% BSA, và nạp lên trên máy để thử nghiệm. Các kết quả thử nghiệm của liên kết của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi với tế bào đơn nhân máu ngoại vi khi bởi FACS được thể hiện trong FIGs. 12A đến 12G. CD19 là dấu chuẩn cho các tế bào B. Từ các kết quả, có thể thấy rằng 4 kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B khi tất cả có thể liên kết với tế bào B khi.

7) Thử nghiệm trên kháng thể đơn dòng chuột kháng CD79B người bởi SPR. Ái lực của kháng thể kháng CD79B người đối với kháng nguyên của nó CD79B người-His được thử nghiệm bằng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Kháng nguyên protein CD79B người-His được bất động trên chip CM5. Mức ghép được thiết lập ở 100 RU. Đệm chạy là HBS-EP + (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%). Kháng thể pha loãng được cho

chảy qua các kênh thử nghiệm và đối chứng với tốc độ dòng là 30 μL /phút trong 3 phút và phân ly trong 5 phút. Đệm tái sinh (10 mM Glycin, pH 1,5) sau đó được chạy với tốc độ dòng là 30 μL /phút trong 30 giây. Dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm Biacore 8K.

Ví dụ 1-3. Phân tích trình tự axit amin các vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng chuột

Dòng tế bào đơn dòng lai có ái lực cao thu được trong ví dụ 1-2 được đưa đến phân tích trình tự axit amin vùng biến đổi và được biểu hiện tái tổ hợp là kháng thể khảm người chuột (cAb) để xác định tiếp kháng thể. Các gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng PCR phiên mã ngược, và được liên kết với vector để phân tích trình tự thu được trình tự chuỗi nhẹ và trình tự chuỗi nặng. ARN tổng số của các dòng tế bào đơn có hoạt tính tốt trong ví dụ 1-2 được chiết đầu tiên sử dụng kit tinh chế ARN (Qiagen, Cat# 74134). Sau đó, sợi đơn cADN được điều chế sử dụng kit tổng hợp cADN (Cat# 18080-051) của Invitrogen. Với sợi đơn làm khuôn, các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được tổng hợp bằng PCR, và các sản phẩm PCR được tách dòng vào TA vector pMD-18T và được gửi để phân tích trình tự. Các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được được tách dòng tách biệt vào các vector biểu hiện để biểu hiện kháng thể đơn dòng tái tổ hợp. Sau khi xác minh hoạt tính, các kháng thể được làm cho giống người.

Các gốc axit amin của các CDR VH/VL của kháng thể kháng CD79B người được xác định và chú thích sử dụng sơ đồ đánh số Chothia.

Các trình tự của kháng thể đơn dòng mAb015 bằng tế bào lai chuột:

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGSSFTSYGINWVKQRTGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAKGDLDGDFDYW
QGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 3

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

DFLMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKL
EIK

SEQ ID NO: 4.

Các trình tự của kháng thể đơn dòng mAb017 bằng tế bào lai chuột:

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYGINWVKQRTGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSDYDGDFDA

YWGQGLTVSA

SEQ ID NO: 5

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTQ
LEIK

SEQ ID NO: 6.

Các trình tự CDR của các kháng thể chuột được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. các trình tự CDR của các kháng thể chuột kháng CD79B người

CDR kháng thể	mAb015	mAb017
CDR1 chuỗi nặng	GSSFTSY (SEQ ID NO: 7)	GYTFTTY (SEQ ID NO: 13)
CDR2 chuỗi nặng	FPRSGN (SEQ ID NO: 8)	YPRSGN (SEQ ID NO: 14)
CDR3 chuỗi nặng	GDLGDFDY (SEQ ID NO: 9)	GSDYDGDFA (SEQ ID NO: 15)
CDR1 chuỗi nhẹ	RSSQSIVHSDGNTYFE (SEQ ID NO: 10)	RSSQSIVHHDGNTYLE (SEQ ID NO: 16)
CDR2 chuỗi nhẹ	KVSNRFS (SEQ ID NO: 11)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 17)
CDR3 chuỗi nhẹ	FQGSHPWT (SEQ ID NO: 12)	FQGSHPWT (SEQ ID NO: 18)

Ví dụ 1-4. Làm cho giống người kháng thể kháng CD79B người

Trình tự chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể đơn dòng kháng CD79B chuột thu được trong ví dụ 1-3 được so sánh tương đồng trong cơ sở dữ liệu kháng thể, và mô hình kháng thể được làm giống người được thiết lập. Đột biến hồi phục được chọn lọc theo mô hình và kháng thể đơn dòng kháng CD79B được làm giống người tối ưu được lựa chọn. Cơ sở dữ liệu mô hình cấu trúc tinh thể Fab chuột (như cơ sở dữ liệu PDB) được nghiên cứu các cấu trúc tinh thể mà có tính tương đồng tương tự với phân tử ứng viên chuột thu được, và cấu trúc tinh thể Fab với độ phân giải cao (như $< 2,5\text{\AA}$) được chọn để thiết lập mô hình Fab chuột. Trình tự chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể chuột được đối chiếu so sánh với các trình tự trong mô hình này, và trình tự phù hợp với trình tự của kháng thể chuột được giữ lại để thu được mô hình cấu trúc kháng thể chuột. Axit amin không phù hợp có thể là các vị trí đột biến hồi phục. Mô hình cấu trúc kháng thể chuột được chạy bằng phần mềm Swiss-pdb viewer để tối ưu hóa năng lượng (giảm thiểu). Các vị trí axit amin khác nhau trong mô hình này khác với các CDR được đột biến hồi phục. Hoạt tính của kháng

thể đột biến thu được (được làm giống người) được so sánh với hoạt tính của kháng thể này trước khi làm giống người. Kháng thể được làm giống người với hoạt tính tốt được giữ lại. Các vùng CDR được tối ưu, bao gồm tránh glycosyl hóa, khử amit hóa, các vị trí oxi hóa, và tương tự.

Các kháng thể trên được tách dòng, biểu hiện và tinh chế, và các kháng thể được làm giống người hAb015-10 và hAb017-10 có hoạt tính tốt nhất được chọn bằng ELISA, FACS, SPR và các thử nghiệm khác. Dữ liệu được thể hiện trong FIG. 6. Các kháng thể được làm giống người hAb015-10 và hAb017-10 giữ được ái lực tương tự và các chức năng liên quan với kháng thể đơn dòng chuột.

Bảng 6. Xác định các kháng thể kháng CD79B được làm giống người

Phương pháp thử nghiệm	Protein/dòng tế bào	hAb015-10	hAb017-10
Thử nghiệm ELISA (EC_{50} , nM)	protein CD79B người-His	0,05	0,06
Thử nghiệm SPR (KD, nM)	protein CD79B người-His	1,5	4,3
Thử nghiệm FACS (EC_{50} , nM)	tế bào DoHH2	0,40	0,55
Thử nghiệm giết tế bào (IC_{50} , nM)	tế bào DoHH2	0,004	0,002
	tế bào WSU-DLCL2	0,013	0,049
	tế bào Raji	>100	>100
Tính phản ứng chéo giữa các loài	protein CD79B người-His	Có	Có
	protein CD79B khi-His	Không	Không
	protein CD79B khi-His	Không	Không
Thử nghiệm ổn định nhiệt	DSC (T_m , °C)	60	65
	DLS (Tagg, °C)	62	67

Trình tự của các kháng thể được làm giống người hAb015-10 và hAb017-10 được thể hiện dưới đây.

Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể được làm giống người hAb015-10: EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFPRSGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCAKGDLGDFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 19;

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm giống người hAb015-10: DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV

EIK

SEQ ID NO: 20;

Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể được làm giống người hAb017-10:
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYDGDFA
YWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 21;

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể được làm giống người hAb017-10:
DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO: 22;

Chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb015-10:
EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFPR
SGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSED TAVYYCAKGD LGDFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 28;

Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb015-10:
DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 29;

Chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb017-10:
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEIYP
RSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYDGDFA
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30;

Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb017-10:

DVVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 31.

mAb015 được làm giống người có đột biến T30S trong trình tự HCDR1, và HCDR1 đột biến là GSSFSSY (SEQ ID NO: 23). Các kháng thể kháng CD79B theo sáng chế có công thức chung được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7. Công thức chung của các CDR

Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
HCDR1	GX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ Y (SEQ ID NO: 24), trong đó X ₁ là S hoặc Y, X ₂ là S hoặc T, X ₃ là T hoặc S, và X ₄ là S hoặc T	LCDR1	RSSQSIVHX ₁₂ GNTYX ₁₃ E (SEQ ID NO: 27), trong đó X ₁₂ là S hoặc H, và X ₁₃ là F hoặc L
HCDR2	X ₅ PRSGN (SEQ ID NO: 25), trong đó X ₅ là F hoặc Y	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO: 11 hoặc 17)
HCDR3	X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ GDFX ₁₁ Y (SEQ ID NO: 26), trong đó X ₆ không có hoặc G, X ₇ không có hoặc S, X ₈ là G hoặc D, X ₉ là D hoặc Y, X ₁₀ là L hoặc D, và X ₁₁ là D hoặc A	LCDR3	FQGSHPVWT (SEQ ID NO: 12 hoặc 18)

Ví dụ 1-5. Nhập bào của kháng thể kháng CD79B

Để xác định liệu kháng thể CD79B theo sáng chế có thể được nhập bào vào trong tế bào với CD79B người sau khi liên kết với CD79B người, thí nghiệm nhập bào tế bào được thực hiện với tế bào DOHH-2 (DSMZ, ACC 47) biểu hiện cao protein CD79B người để đánh giá khả năng nhập bào của các kháng thể này.

Các tế bào DOHH-2 được nuôi cấy theo phương pháp thông thường để tạo huyền phù các tế bào trong môi trường hoàn chỉnh (môi trường RPMI 1640 (GIBCO, Cat No.: 11835-030), chứa 10% (v/v) huyết thanh thai bò (FBS) (GIBCO, Cat No.: 10099-141) và penicillin/streptomycin (GIBCO, Cat No.: 15070-063)).

Thu thập các tế bào này bằng ly tâm nhiệt độ thấp ở 4°C trong 5 phút ở 1000 vòng/phút trong thử nghiệm này. Các tế bào này được tái tạo huyền phù trong 10-15 mL đệm FACS được làm lạnh trước trên băng. Đệm FACS bao gồm nước muối đệm phosphat (PBS), pH 7,4, với 2% huyết thanh thai bò (FBS). Thông qua thử

nghiệm này, đệm FACS được làm lạnh trước trên băng. Tế bào được đếm và ly tâm, và được bổ sung vào đĩa 96 lỗ với 300.000 tế bào/lỗ. Sau khi ly tâm, phần nổi được loại bỏ, và 12,5 µg/mL dung dịch phong bế Fc (BD, Cat No.: 564220) được bổ sung với 100 µL/lỗ. Phong bế được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Sau đó, 20 µg/mL kháng thể CD79B thử nghiệm được bổ sung vào các lỗ tương ứng, và đĩa này được ủ ở 4°C trong 1 giờ cách xa ánh sáng. Đĩa được rửa hai lần bằng đệm PBS được làm lạnh trước để loại bỏ các kháng thể không liên kết. Môi trường nuôi cấy tế bào hoàn chỉnh (môi trường RPMI 1640 với 10% huyết thanh thai bò) được bổ sung, và ủ đĩa này ở 37°C với 5% CO₂ trong 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ và 4 giờ. Sau khi ly tâm, phần nổi được loại bỏ, dung dịch đệm PFA 2% được bổ sung với 100 µL/lỗ để tái tạo huyền phù các tế bào này, và để yên đĩa này trong 10 phút. Sau đó, rửa đĩa này 3 lần bằng đệm FACS, và 100 µL dung dịch kháng thể thứ hai (kháng thể thứ cấp kháng người của dê được đánh dấu huỳnh quang: được pha loãng theo tỷ lệ 1:250, 2 µg/mL, Biolegend, Cat# 409304) được bổ sung. Đĩa này được ủ ở 4°C trong nửa giờ cách xa ánh sáng. Đệm PBS được làm lạnh trước được bổ sung, và phần nổi được loại bỏ sau khi ly tâm ở 4°C, được lặp lại ba lần. Các tế bào này được tái tạo huyền phù trong đệm FACS với 200 µL/lỗ và được phát hiện bằng máy đếm tế bào dòng chảy (BD FACS Calibur).

Các kết quả này cho thấy rằng tất cả 3 kháng thể (SN8, hAb015 và hAb017) không thể được nhập bào bằng tế bào DOHH-2 trong khi ủ ở 4 °C. Ngược lại, trong khi ủ ở 37°C, hầu hết các kháng thể được nhập bào bởi các tế bào DOHH-2 sau 1 giờ, và nhập bào kháng thể chậm tối đa sau 4 giờ. Tất cả 3 kháng thể này có nhập bào tốt.

2. Điều chế hợp chất

Cấu trúc của hợp chất được xác định bằng quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance-NMR) và/hoặc phép đo phổ khối (MS). Sự thay đổi NMR (δ) được đưa ra theo đơn vị 10⁻⁶ (ppm).

Phổ NMR được xác định sử dụng thiết bị cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AVANCE-400, với dimetyl sulfoxit đơteri hóa (DMSO-*d*₆), cloform đơteri hóa (CDCl₃) và metanol đơteri hóa (CD₃OD) là các dung môi xác định và tetrametylsilan (TMS) là nội tiêu chuẩn.

Phổ khối (mass spectra-MS) được xác định sử dụng hệ thống sắc ký lỏng MS tứ cực Agilent 1200/1290 DAD-6110/6120-phép đo phổ khối (nhà sản xuất: Agilent; mô hình MS: MS tứ cực 6110/6120),

Waters ACQuity UPLC-QD/SQD (nhà sản xuất: waters, MS model: waters ACQuity Qda Detector/waters SQ Detector), và THERMO Ultimate 3000-Q Exactive (nhà sản xuất: THERMO, mô hình MS: THERMO Q Exactive).

Phân tích sắc ký lỏng hiệu suất cao (High performance liquid chromatography-HPLC) được thực hiện sử dụng thiết bị HPLC sau: Agilent HPLC 1200DAD, Agilent HPLC 1200VWD và Waters HPLC e2695-2489.

Phân tích HPLC bất đối xứng được thực hiện sử dụng sắc ký lỏng hiệu suất cao Agilent 1260 DAD.

Sắc ký điều chế lỏng hiệu suất cao được thực hiện sử dụng sắc ký điều chế Waters 2545-2767, Waters 2767-SQ Detecor2, Shimadzu LC-20AP và Gilson GX-281.

HPLC điều chế bất đối xứng được thực hiện sử dụng sắc ký điều chế Shimadzu LC-20AP.

Thiết bị điều chế nhanh CombiFlash được sử dụng là Combiflash Rf200 (TELEDYNE ISCO).

Các đĩa silicagel Huanghai HSGF254 hoặc Qingdao GF254 có thông số từ 0,15 mm đến 0,2 mm được sử dụng cho phân tích sắc ký lớp mỏng (sắc ký lớp mỏng-TLC) và từ 0,4 mm đến 0,5 mm cho tách TLC và tinh chế.

Silicagel Yantai Huanghai có cỡ sàng 200-300 thường được sử dụng là chất mang trong sắc ký cột silicagel.

Các nguyên liệu khởi đầu đã biết được mô tả ở đây có thể được tổng hợp sử dụng hoặc theo các phương pháp được biết trong ngành, hoặc có thể được mua từ ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Chembee Chemicals, và các công ty khác.

Trong các ví dụ này, các phản ứng có thể được thực hiện trong môi trường khí argon hoặc môi trường khí nitơ trừ khi được chỉ định khác. Môi trường khí hydro nghĩa là bình phản ứng được nối với khí cầu chứa khoảng 1 L hydro.

Hydroator Parr 3916EKX, hydroator Qinglan QL-500 hoặc hydroator HC2-SS được sử dụng trong các phản ứng hydro hóa có áp lực. Các phản ứng hydro hóa thường bao gồm 3 chu kỳ tạo chân không và thổi hydro.

Bình phản ứng vi sóng CEM Discover-S 908860 được sử dụng trong các phản ứng vi sóng này.

Trong các ví dụ này, dung dịch đề cập đến dung dịch chứa nước trừ khi được chỉ định khác.

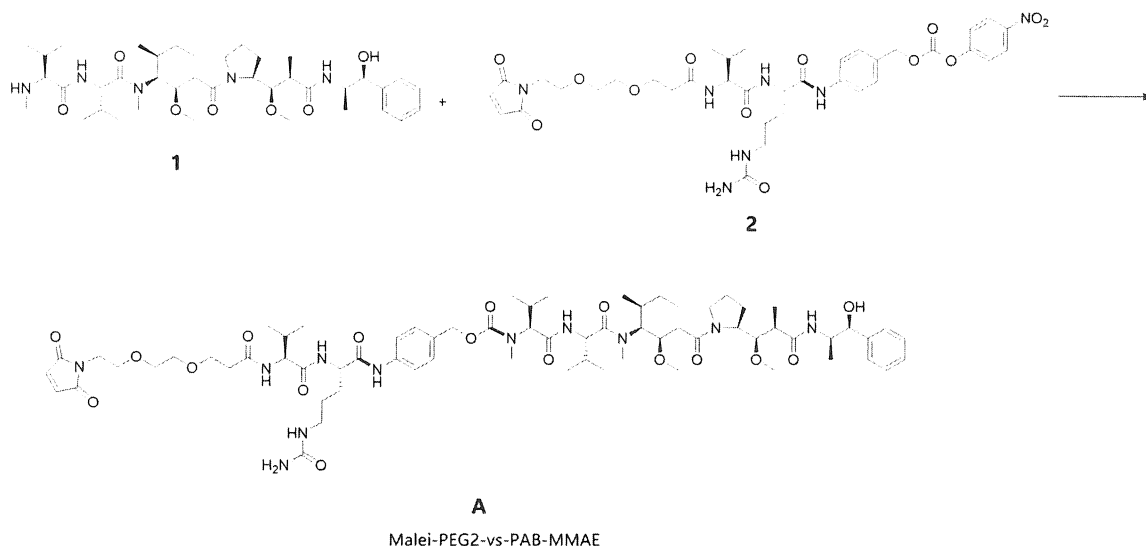
Trong các ví dụ này, nhiệt độ phản ứng là nhiệt độ trong phòng, nghĩa là, từ 20°C đến 30°C, trừ khi được chỉ định khác.

Hệ thống rửa giải cho tinh chế sắc ký cột và hệ thống dung môi phát triển cho sắc ký lớp mỏng bao gồm: A: hệ thống diclometan/metanol, B: hệ thống *n*-hexan/etyl axetat, và C: hệ thống ete dầu mỏ/etyl axetat. Tỷ lệ theo thể tích của các dung môi được điều chỉnh theo sự phân cực của hợp chất này, hoặc bằng cách bổ sung chất phản ứng bazơ hoặc axit như trietylamin và axit axetic.

Gốc được chất của ADC theo sáng chế được tìm thấy trong WO2020063676A,

US7098308, US6884869, CN202010073671.6 và CN201911390425.7, và tổng hợp và thử nghiệm của các hợp chất thích hợp được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ chúng. Các ví dụ không giới hạn về tổng hợp và thử nghiệm này được mô tả dưới đây.

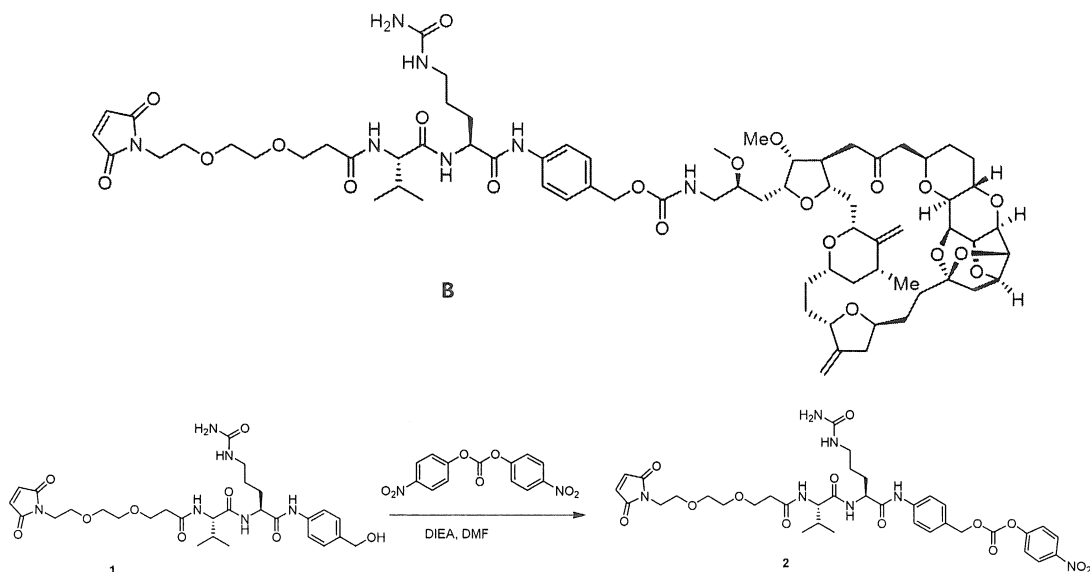
Ví dụ 2-1. Hợp chất A



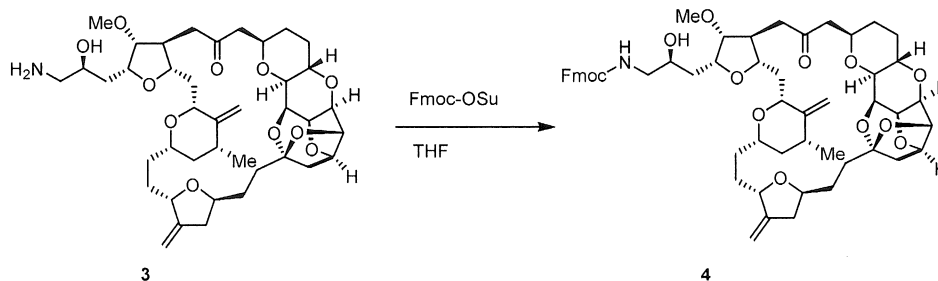
1 (10 mg, 0,014 mmol, 1,0 đương lượng) trong ví dụ này, **2** (21 mg, 0,021 mmol, 1,5 đương lượng) trong ví dụ này và khối lượng xúc tác HOBT (0,5 mg) được hòa tan trong DMF khan (2 mL), và khuấy hỗn hợp này dưới bầu khí argon. DIEA (2,71 mg) và pyridin (0,08 mL) được bổ sung, và gia nhiệt hỗn hợp thu được đến 40°C và khuấy trong 2 h. Tinh chế dung dịch phản ứng này bằng HPLC điều chế thu được **A** (12,4 mg, hiệu suất 65,4%), LC/MS (ESI): m/z 1363,4 $[M+1]^+$.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0,63-0,95 (m, 32H), 1,05-1,36 (m, 27H), 1,60-1,98 (m, 4H), 2,1-2,55 (m, 4H), 2,78-3,02 (m, 3H), 3,17-3,79 (m, 13H), 3,93-4,20 (m, 2H), 4,60-4,96 (m, 3H), 5,14-5,36 (m, 2H), 5,67 (bs, 1H), 6,31-6,50 (m, 2H), 6,64 (s, 2H), 6,91 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 7,19-7,30 (m, 7H), 7,55 (bs, 2H), 8,96 (bs, 1H), 9,13 (bs, 1H).

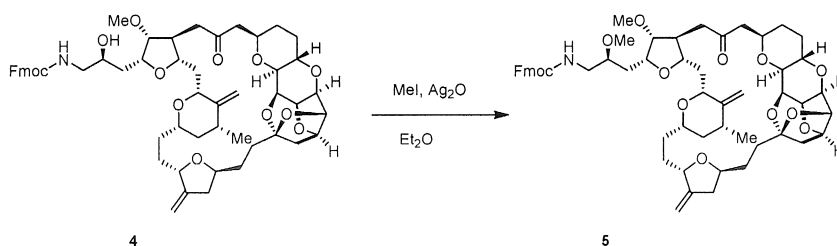
Ví dụ 2-2-1. Hợp chất B



1 (50 mg, 0,08 mmol) trong ví dụ này được hòa tan trong *N,N*-dimetylformamit (1,5 mL) dưới bề đá lạnh, sau đó bổ sung tuần tự DIPEA (18 mg, 0,14 mmol) và bis(*p*-nitrophenyl) carbonat (49 mg, 0,16 mmol), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 2-4 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành như được theo dõi bởi HPLC, 20 mL metyl *tert*-butyl ete được bổ sung, và khuấy hỗn hợp thu được và lọc. Thu chất rắn này và sấy khô thu được sản phẩm thô (36 mg), được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. LC/MS (ESI): m/z 784,1 $[M+H]^+$.

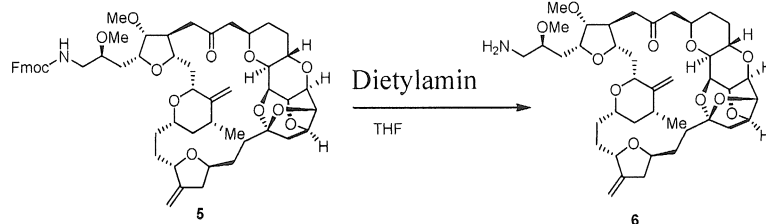


Hợp chất **3** (72,91 mg, 0,1 mmol) trong ví dụ này được hòa tan trong tetrahydrofuran (10 mL) dưới bề đá lạnh, sau khi bổ sung Fmoc-OSu (41 mg, 0,12 mmol), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 3-5 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành như được theo dõi bởi HPLC, dung dịch phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.

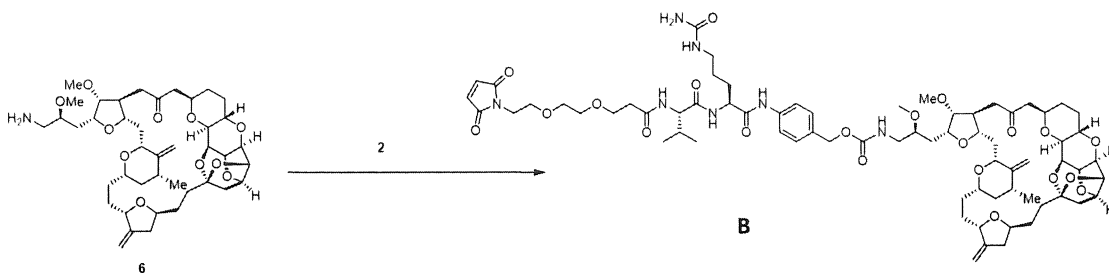


Sản phẩm thô trên **4** trong ví dụ này được hòa tan trong dietyl ete khan (10 mL), sau đó bổ sung tuần tự bạc oxit (34,8 mg, 0,15 mmol) và metyl iodua (28,4 mg,

0,2 mmol), và hỗn hợp này được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 10-16 giờ. Sau khi phản ứng này về cơ bản được hoàn thành như được theo dõi, dung dịch phản ứng này được lọc để loại bỏ chất rắn, và cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo.



Sản phẩm thô trên **5** trong ví dụ này được hòa tan trong tetrahydrofuran (10 mL), sau khi bổ sung diethylamin (2 mL), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 2-4 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành như được theo dõi bởi HPLC, dung dịch phản ứng này được cô đặc trực tiếp dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, mà sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (40 mg). LC/MS (ESI): m/z 744,2 $[M+H]^+$.



Hợp chất trên **6** (13,5 mg, 0,018 mmol) trong ví dụ này được hòa tan trong DMF (1,5 mL), DIPEA (7 mg, 0,054 mmol) được bổ sung, sau khi bổ sung hợp chất **2** (18 mg, 1,3 mmol) theo các phần, và khuấy hỗn hợp này trong khoảng 24-36 giờ. Dung dịch phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, được tách bằng HPLC điều chế thu được hợp chất B (12,5 mg, độ tinh khiết 96,95%). LC/MS (ESI): m/z 1388,3 $[M+H]^+$.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0,85-0,90 (m, 3H), 0,93-1,00 (m, 3H), 1,08-1,10 (m, 3H), 1,20-1,50 (m, 15H), 1,75-2,04 (m, 6H), 2,13-2,55 (m, 16H), 2,70-2,77 (m, 1H), 2,80-2,96 (m, 2H), 3,16-3,97 (m, 20H), 3,99-4,39 (m, 8H), 4,60-4,80 (m, 6H), 4,88-5,10 (m, 5H), 5,24-5,37 (m, 4H), 6,71 (s, 2H), 7,03 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,18-7,30 (m, 3H), 7,63 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,92 (bs, 1H).

Ví dụ thử nghiệm 1. Sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào *In Vitro*

1.1. Nguyên tắc và phương pháp

Trong thí nghiệm này, hàm lượng được xác định sử dụng CTG để phản ánh điều kiện sống sót của tế bào khối u. Điều kiện nuôi cấy cuối cùng đầu tiên được xác định nhân giống tế bào ở các mật độ khác nhau và nuôi cấy tế bào này trong 3 ngày

và 5 ngày dựa trên IC_{50} và tỷ lệ ức chế tối đa. Hiệu quả giết tế bào của phân tử độc tố này sau đó được thử nghiệm theo điều kiện này.

1.2. Chọn lọc các dòng tế bào

Theo mục đích thí nghiệm, ở trạng thái sớm, hai mô hình bệnh ung thư vú và NSCLC được chọn, và ba chủng SKBR3 (HER2+), MDA-MB-468 (HER2-) và A549 được chọn cho thí nghiệm sàng lọc tham chiếu đến các tài liệu báo cáo.

1.3. Xác định điều kiện nuôi cấy tế bào

1) Dàn tế bào: A549 được cắt bằng pancreatin, kết thúc bằng môi trường nuôi cấy và đếm, và $4,3 \times 10^5$, $7,2 \times 10^5$, và $11,5 \times 10^5$ tế bào được lấy và để đạt đến thể tích cuối cùng là 26 mL. 180 μ L huyền phù tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ trong các cột từ 2 đến 11 của đĩa 96 lỗ (3903) để thu được mật độ tế bào 3 K/lỗ, 5 K/lỗ và 8 K/lỗ. Các lỗ trong cột 12 được nạp 200 μ L môi trường nuôi cấy và các lỗ còn lại được nạp PBS. Các hoạt động trên được lặp lại trên các tế bào SKBR3 và MDA-MB-468. Mỗi mẫu được chạy theo hai mẫu.

2) Điều chế dược chất: đối chứng dương tính eribulin được điều chế trong đĩa 96 lỗ đáy tròn (3788). 2 mM dung dịch (độ pha loãng 10-lần dung dịch gốc trong DMSO) được điều chế trong cột 1 của đĩa 1, sau đó pha loãng gradient 10-lần trong DMSO được thực hiện trong các cột từ 2 đến 10. Các lỗ trong cột 11 được nạp DMSO. 95 μ L môi trường nuôi cấy tương ứng được bổ sung vào mỗi lỗ của các cột từ 2 đến 11 của đĩa 2, và 5 μ L dung dịch được hút bằng pipet từ các cột từ 2 đến 11 của đĩa 1 và được bổ sung vào đĩa 2. Sau khi dung dịch này được trộn kỹ, 20 μ L dung dịch được hút bằng pipet và được bổ sung vào các tế bào được dàn đĩa, và nuôi cấy liên tục các tế bào này trong 3 ngày và 5 ngày.

3) Thử nghiệm CTG: các đĩa được lấy vào ngày 3 và ngày 5, và để cân bằng đến nhiệt độ trong phòng. 90 μ L CTG được bổ sung vào mỗi lỗ và được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút cách xa ánh sáng. Giá trị huỳnh quang được đọc sử dụng máy đọc vi đĩa và IC_{50} được tính toán.

1.4. Thử nghiệm hiệu quả

1) Dàn tế bào: một trong số A549, SKBR3 và MDA-MB-468 được cắt bằng pancreatin, tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và đếm, và $6,33 \times 10^5$ tế bào được bổ sung vào môi trường này để tạo ra thể tích cuối cùng 38 mL. 180 μ L môi trường nuôi cấy được dàn trong đĩa 96 lỗ (3903) để thu được mật độ tế bào là 3 K/lỗ, và tế bào này được nuôi cấy ở 37 °C trong 24 h.

2) Điều chế dược chất: eribulin và hợp chất D-1 (hợp chất 6 trong ví dụ 2-2-1) được điều chế trong đĩa 96 lỗ đáy tròn (3788). 2 mM dung dịch (pha loãng 10-lần dung dịch gốc trong DMSO) được điều chế trong cột 1 của đĩa 1, sau đó pha loãng gradient 10-lần trong DMSO được thực hiện trong các cột từ 2 đến 10. Các lỗ trong cột 11 được nạp DMSO. 95 μ L môi trường nuôi cấy tương ứng được bổ sung vào

mỗi lỗ của các cột từ 2 đến 11 của đĩa 2, và 5 μL dung dịch được hút bằng pipet từ các cột từ 2 đến 11 của đĩa 1 và được bổ sung vào đĩa 2. Sau khi dung dịch này được trộn kỹ, 20 μL dung dịch được hút bằng pipet và được bổ sung vào các tế bào được dàn đĩa. Mỗi mẫu được chạy theo hai mẫu. Các tế bào này được nuôi cấy liên tục trong 5 ngày.

3) Thử nghiệm CTG: đĩa này được lấy ra và để cân bằng đến nhiệt độ trong phòng. 90 μL CTG được bổ sung vào mỗi lỗ và phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút cách xa ánh sáng. Giá trị huỳnh quang được đọc sử dụng máy đọc vi đĩa và IC_{50} được tính toán.

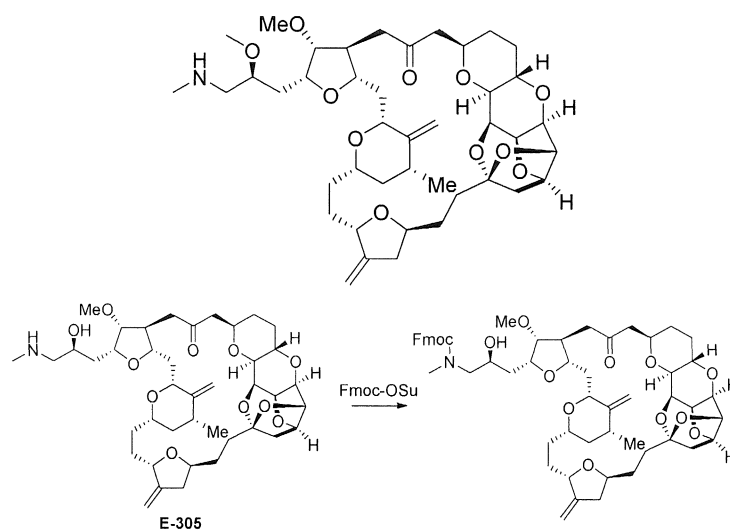
1.5. Các kết quả dữ liệu

Bảng 8

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
Hợp chất	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)
Eribulin	0,7147	94,90	0,4819	87,47	0,6609	81,50
D-1	0,2052	96,87	0,1827	88,01	0,5151	81,34

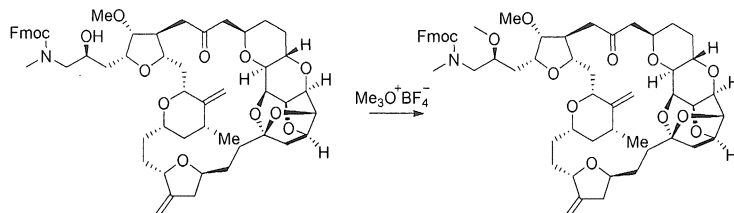
Kết luận: hợp chất **D-1** có hiệu quả giết tế bào tốt trong ba dòng tế bào khối u và cao hơn đáng kể so với dược chất eribulin dương tính.

Ví dụ 2-2-2.



1,4-dioxan (0,3 mL) và hợp chất chứa nước E-305 (0,3 mL, 31 mg, 0,042 mmol, được tổng hợp và thu được theo *Bioorg. Med. chem. Lett.* 14 (2004) 5551-5554) được đo ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung tuần tự fluorenylmetoxycarbonylsuccinimid (17 mg, 0,050 mmol) và natri carbonat rắn (18 mg, 0,168 mmol). Khuấy hỗn hợp này qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện, dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng etyl

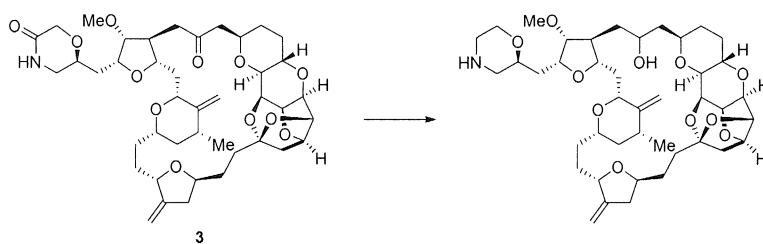
axetat và cô đặc dưới áp suất giảm. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (15 mg). LC/MS (ESI): m/z 965,64 $[M+H]^+$.



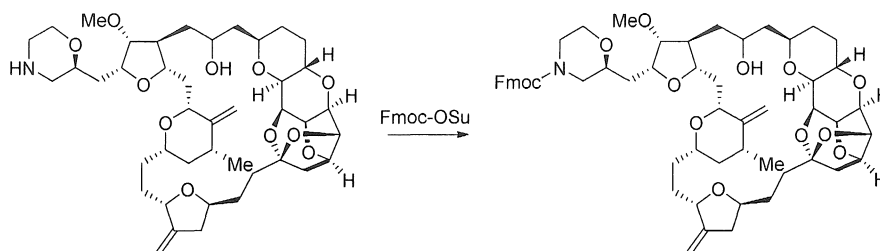
Khối lượng thích hợp diclometan được đo để hòa tan sản phẩm (7 mg, 0,007 mmol) thu được trong bước trước đó ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung tuần tự sàng phân tử 4A (10 mg), trimetyloxonium tetrafloroborat (11 mg, 0,07 mmol) và bột biển proton (16 mg, 0,07 mmol), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện, dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng methyl *tert*-butyl ete, rửa bằng axit hydrochloric loãng 1 N, và cô đặc dưới áp suất giảm. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (7 mg). LC/MS (ESI): m/z 979,68 $[M+H]^+$.

1 mL tetrahydrofuran được đo để hòa tan sản phẩm (10 mg, 0,01 mmol) thu được trong bước trước đó dưới bề đá lạnh, sau đó bổ sung nhỏ giọt DBU (6. μ L, 0,04 mmol), và khuấy hỗn hợp này cho tới khi phản ứng được hoàn thành. Dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng diclometan và cô đặc dưới áp suất giảm. Phần dư được tách bằng HPLC điều chế thu được sản phẩm **D-2** (5 mg). LC/MS (ESI): m/z 757,85 $[M+H]^+$.

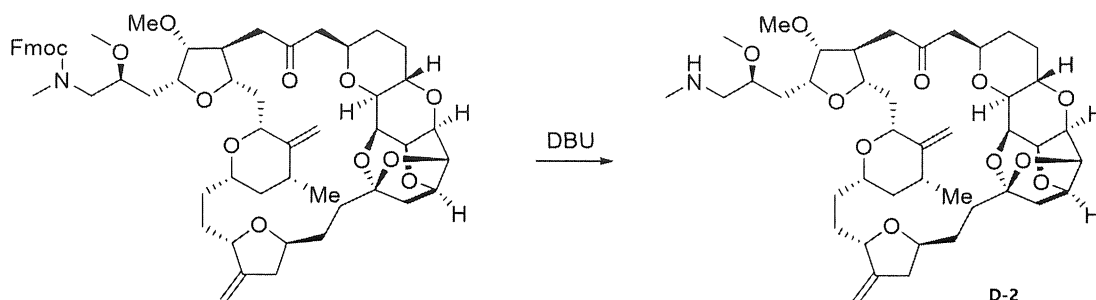
Ví dụ 2-2-3.



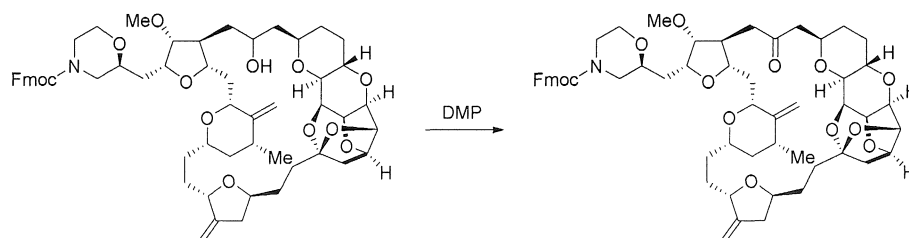
2 mL tetrahydrofuran được đo để hòa tan hợp chất 3 (6 mg, 0,008 mmol, được tổng hợp theo *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 1639-1643) trong ví dụ này dưới bề đá lạnh, sau đó bổ sung nhỏ giọt dung dịch lithi nhôm hydrua (80 μ L, 1 M trong THF, 0,08 mmol), và khuấy hỗn hợp này và gia nhiệt chậm đến 40°C. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện bằng LCMS, dừng phản ứng này bằng natri sulfat decahydrat, và khuấy dung dịch phản ứng này trong nửa giờ dưới bề đá lạnh và lọc. Dịch lọc được cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. LC/MS (ESI): m/z 758.4 $[M+H]^+$.



Khối lượng thích hợp diclometan được đo để hòa tan sản phẩm (7 mg, 0,007 mmol) thu được trong bước trước đó ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung tuần tự sàng phân tử 4A (10 mg), trimetyloxonium tetrafloroborat (11 mg, 0,07 mmol) và bột biển proton (16 mg, 0,07 mmol), và khuấy hỗn hợp này ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện, dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng methyl *tert*-butyl ete, rửa bằng axit hydrocloric loãng 1N, và cô đặc dưới áp suất giảm. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (7 mg). LC/MS (ESI): m/z 979,68 $[M+H]^+$.

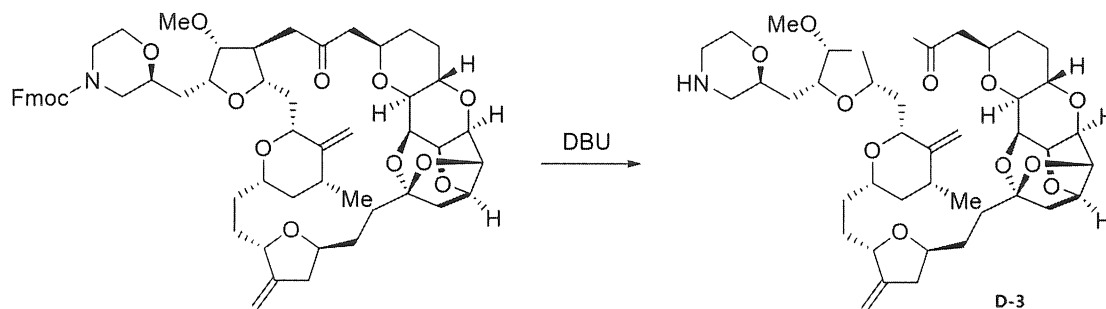


0,5 mL 1,4-dioxan và 0,5 mL nước được đo để hòa tan sản phẩm thu được trong bước trước đó ở nhiệt độ trong phòng, sau đó bổ sung tuần tự fluorenylmethoxycarbonylsuccinimide (6,5 mg, 0,019 mmol) và natri carbonat (6,8 mg, 0,064 mmol), và khuấy hỗn hợp này qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện, dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng etyl axetat và cô đặc dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô được tinh chế by sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (14 mg). LC/MS (ESI): m/z 980,4 $[M+H]^+$.



1 mL diclometan được đo để hòa tan sản phẩm (14 mg, 0,014 mmol) thu được

trong bước trước đó dưới bề đá lạnh, sau khi bổ sung Dess-Martin periodinan (18,2 mg, 0,042 mmol), và khuấy hỗn hợp này và gia nhiệt chậm đến nhiệt độ trong phòng. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện bằng LCMS, dừng phản ứng này bằng dung dịch nước natri bicarbonat, và chiết hỗn hợp này bằng diclometan và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel thu được sản phẩm (8 mg). LC/MS (ESI): m/z 978,4 $[M+H]^+$.



1 mL tetrahydrofuran được đo để hòa tan sản phẩm (8 mg, 0,008 mmol) thu được trong bước trước đó dưới bề đá lạnh, sau đó bổ sung nhỏ giọt DBU (6 μ L, 0,032 mmol), và khuấy hỗn hợp này trong 1 giờ. Sau khi chuyển hóa nguyên liệu khởi đầu này được cơ bản hoàn thành như được phát hiện bằng đối chứng trung tâm, dừng phản ứng này bằng nước, và chiết dung dịch phản ứng này bằng diclometan và cô đặc. Sản phẩm thô được tách bằng HPLC điều chế thu được sản phẩm đích **D-3** (1,3 mg). LC/MS (ESI): m/z 755,93 $[M+H]^+$.

Ví dụ thử nghiệm 2. Sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào *In Vitro*

2.1. Nguyên tắc và phương pháp

Trong thí nghiệm này, hàm lượng ATP được xác định sử dụng CTG để phản ánh điều kiện sống sót của tế bào khối u.

2.2. Xác định điều kiện nuôi cấy tế bào

1) Dàn tế bào:

Mỗi trong số A549, SKBR3 và MDA-MB-468 được cắt bằng pancreatin, tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy và đếm, và mật độ tế bào được điều chỉnh đến $2,2 \times 10^4$ tế bào/mL. 135 μ L huyền phù tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ trong các cột từ 2 đến 11 của đĩa 96 lỗ, và cột 12 được thiết lập là đối chứng trống. Các tế bào này được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37 °C với 5% CO₂ trong 24 giờ.

2) Điều chế dược chất:

a) Điều chế dung dịch gốc: dược chất được hòa tan trong DMSO để thu được dung dịch gốc ở nồng độ 5 mM.

b) Đĩa 1: dung dịch gốc trong cột 1 ban đầu được đưa đến sự pha loãng 40-lần, và sự pha loãng gradient 3-lần được thực hiện lần lượt trong cột từ 2 đến 11. Cột 12

được nạp DMSO.

c) Đĩa 2: 196 μL môi trường nuôi cấy tương ứng được bổ sung vào các cột từ 2 đến 11, và 4 μL môi trường nuôi cấy được hút bằng pipet từ các cột từ 3 đến 12 của đĩa 1 đến cột từ 2 đến 11 của đĩa 2. Môi trường nuôi cấy được trộn kỹ.

2.3. Xử lý tế bào

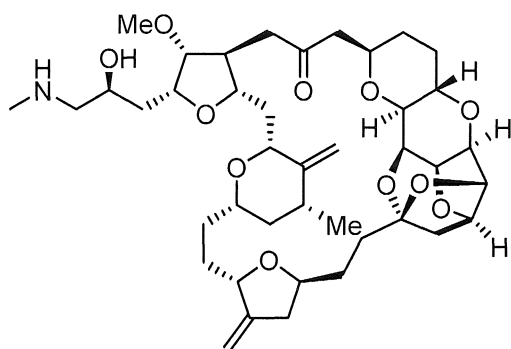
15 μL môi trường nuôi cấy được hút bằng pipet từ đĩa 2 và được bổ sung vào các tế bào này. Các tế bào này được nuôi cấy liên tục trong thiết bị ủ ở 37 °C với 5% CO_2 trong 5 ngày.

2.4. Thử nghiệm CTG: đĩa này được lấy và để cân bằng đến nhiệt độ trong phòng. 75 μL CTG được bổ sung vào mỗi lỗ và được phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút cách xa ánh sáng. Giá trị huỳnh quang được đọc sử dụng máy đọc vi đĩa và IC_{50} được tính toán.

2.5. Các kết quả dữ liệu

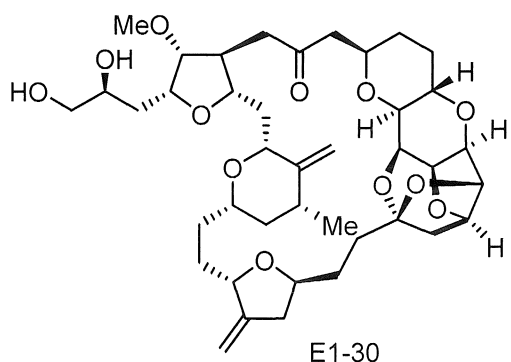
Bảng 9

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
Hợp chất	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)	IC_{50} (nM)	Ức chế tối đa (%)
D-2	1,086	96,85	1,881	89,43	3,076	62,09
D-3	1,176	96,36	1,983	90,94	2,171	63,03
E-305	0,571	96,42	1,168	88,53	2,102	61,27
E1-30	0,1659	96,15	0,3596	90,49	0,7813	62,46



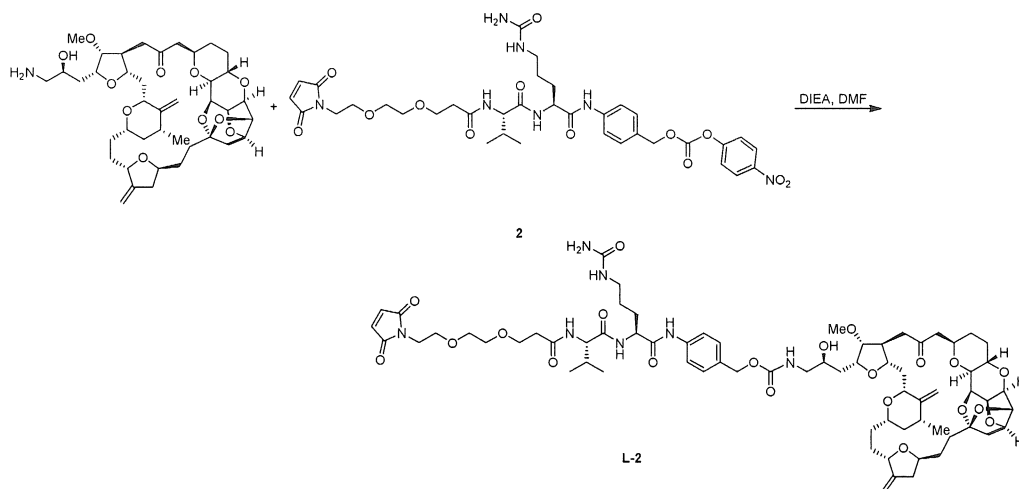
E-305:

;

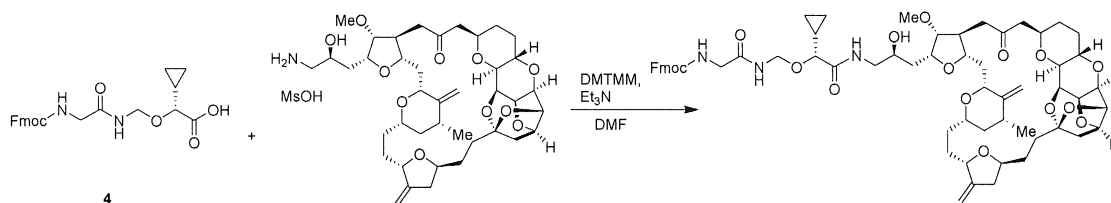


E1-30:

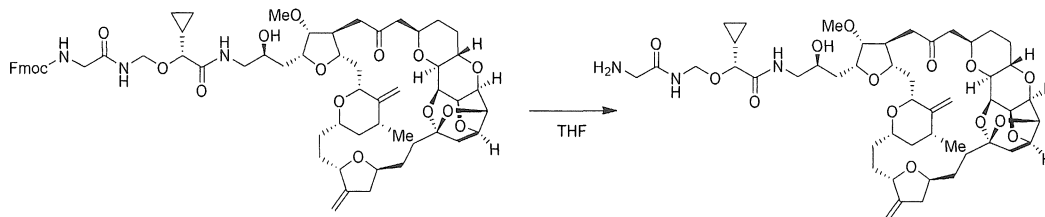
.

Ví dụ 2-2-4.

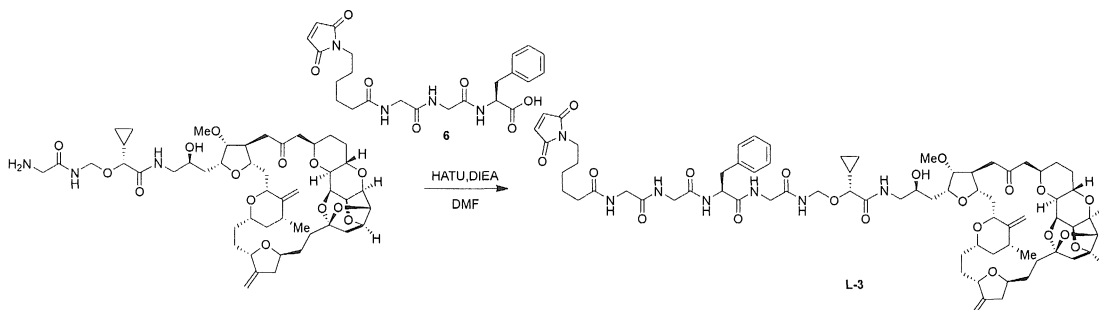
Eribulin (9 mg, 0,012 mmol) được hòa tan trong DMF (0,3 mL) dưới bề đá lạnh, DIPEA (3,5 mg, 0,028 mmol) được bổ sung, sau khi bổ sung hợp chất 2 (7,8 mg, 0,011 mmol) trong ví dụ này theo phần, và khuấy hỗn hợp này cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Dung dịch phản ứng được cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm thô, mà sau đó được tách bằng HPLC điều chế thu được hợp chất **L-2** (4,95 mg, độ tinh khiết 97%). LC/MS (ESI): m/z 1374,3 $[M+H]^+$.

Ví dụ 2-2-5.

Hợp chất 4 (13,4 mg, 0,0316 mmol, 1,7 đương lượng) trong ví dụ này và eribulin mesylat (15 mg, 0,0182 mmol, 1 đương lượng) được cân trọng lượng và được hòa tan trong DMF (0,5 mL), sau khi bổ sung triethylamin (10 mg, 0,0988 mmol, 5,4 đương lượng) và DMTMM (4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua, 9,8 mg, 0,0332 mmol, 1,8 đương lượng) dưới bề đá, và hỗn hợp này được làm ấm tự nhiên đến nhiệt độ trong phòng và khuấy cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Nước (2 mL) và etyl axetat (3 mL) được bổ sung để pha loãng và tách chất lỏng, và pha chứa nước được chiết bằng etyl axetat. Gom các pha hữu cơ, làm khô qua natri sulfat khan và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế sử dụng đĩa điều chế thu được sản phẩm (16 mg, hiệu suất 86,7%). LC/MS (ESI): m/z 1136,3 $[M+H]^+$.

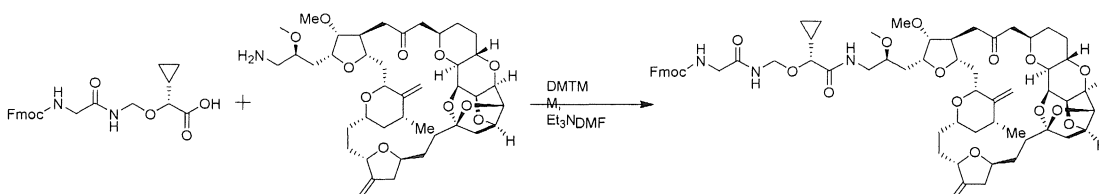


Hợp chất (16 mg, 0,0141 mmol, 1 đương lượng) thu được trong bước trước đó được cân trọng lượng và được hòa tan trong THF (0,4 mL) dưới bể đá, sau khi bổ sung triethylamin (4,2 mg, 0,057 mmol, 4 đương lượng), và khuấy hỗn hợp này dưới bể đá cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Pha loãng dung dịch phản ứng này bằng diclometan (5 mL) và rửa bằng nước (2 mL $\times$ 3 lần). Làm khô pha hữu cơ qua natri sulfat khan và cô đặc thu được sản phẩm thô, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. LC/MS (ESI): m/z 914,3 $[M+H]^+$.



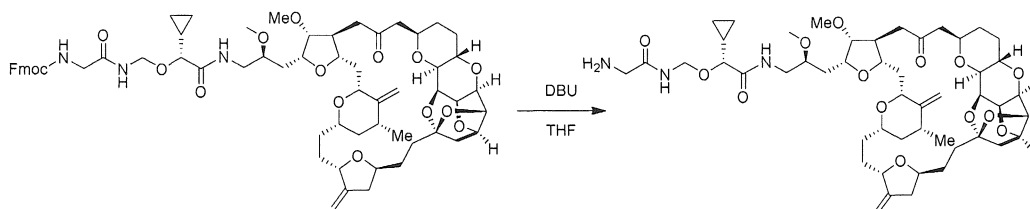
Sản phẩm (16 mg, 0,0175 mmol, 1 đương lượng) thu được trong bước trước đó và hợp chất **6** trong ví dụ này (11,6 mg, 0,0246 mmol, 1,4 đương lượng) được cân trọng lượng và được hòa tan trong DMF (0,5 mL), sau khi bổ sung o-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- N,N,N',N' -tetrametyluronium hexaflorophosphat (9,9 mg, 0,026 mmol, 1,5 đương lượng) và N,N -diisopropyletylamin (5,5 mg, 0,0426 mmol, 2,4 đương lượng), và khuấy hỗn hợp này dưới bể đá cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Nước (2 mL) và etyl axetat (3 mL) được bổ sung để pha loãng và tách chất lỏng, và pha chứa nước được chiết bằng etyl axetat. Gôm các pha hữu cơ, làm khô qua natri sulfat khan và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế thu được sản phẩm **L-3** (10 mg). LC/MS (ESI): m/z 1368,3 $[M+H]^+$.

Ví dụ 2-2-6.

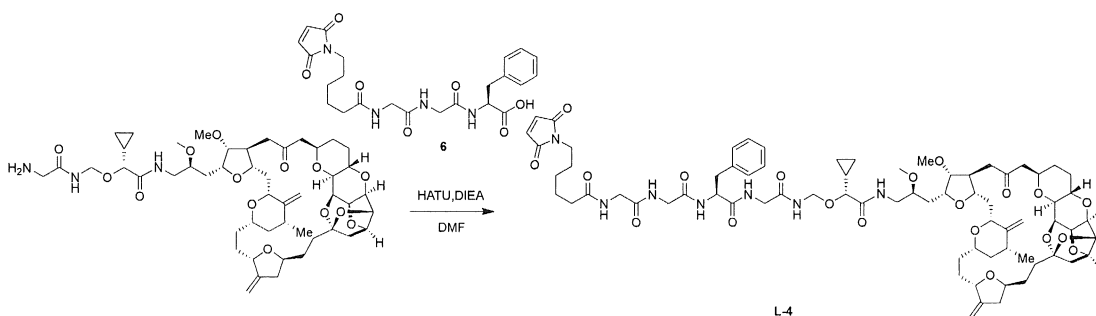


Hợp chất **4** (11,6 mg, 0,0273 mmol, 1,5 đương lượng) trong ví dụ này và hợp chất **D-1** (dẫn xuất eribulin, 13,5 mg, 0,0181 mmol, 1 đương lượng) trong ví dụ 2-2-1

được cân trọng lượng và được hòa tan trong *N,N*-dimetylformamit (0,5 mL), sau khi bổ sung DMTMM (10,1 mg, 0,0343 mmol, 1,3 đương lượng) dưới bề đá, và dung dịch phản ứng này được phản ứng cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Nước (2 mL) và etyl axetat (3 mL) được bổ sung để dừng và pha loãng, sau đó tách chất lỏng, và pha chứa nước được chiết bằng etyl axetat. Gom các pha hữu cơ, làm khô qua natri sulfat khan và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế sử dụng đĩa điều chế thu được sản phẩm (10 mg, hiệu suất 47,9%). LC/MS (ESI): m/z 1150,2 $[M+H]^+$.



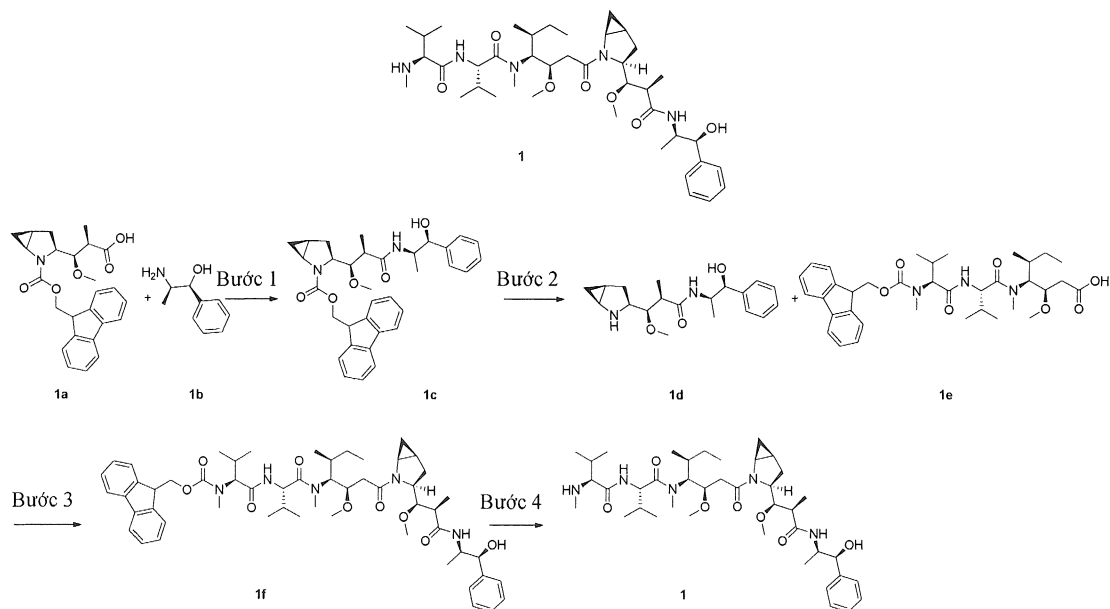
Sản phẩm (10 mg, 0,0087 mmol, 1 đương lượng) thu được trong bước trước đó được hòa tan trong THF (1 mL), sau khi bổ sung 1,8-diazabicycloundec-7-en (5,2 mg, 0,034 mmol, 4 đương lượng), và khuấy hỗn hợp này dưới bề đá cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Pha loãng dung dịch phản ứng này bằng diclometan (5 mL) và rửa bằng nước (2 mL $\times$ 3 lần). Làm khô pha hữu cơ qua natri sulfat khan và cô đặc thu được sản phẩm thô, được sử dụng trực tiếp trong bước tiếp theo. LC/MS (ESI): m/z 928,2 $[M+H]^+$.



Sản phẩm (16 mg, 0,0087 mmol, 1 đương lượng) thu được trong bước trước đó và hợp chất **6** (7,8 mg, 0,0165 mmol, 1,9 đương lượng) được hòa tan trong DMF (0,5 mL), sau khi bổ sung *o*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium hexaflorophosphat (6,2 mg, 0,0163 mmol, 1,9 đương lượng) và DIEA (5,7 mg, 0,0441 mmol, 5 đương lượng), và khuấy hỗn hợp này dưới bề đá cho tới khi phản ứng này hầu như được hoàn thành. Nước (2 mL) và etyl axetat (3 mL) được bổ sung để pha loãng và tách chất lỏng, và pha chứa nước được chiết bằng etyl axetat. Gom các pha hữu cơ, làm khô qua natri sulfat khan và cô đặc. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế thu được sản phẩm **L-4** (3,5 mg, hiệu suất 29,1% qua hai bước). LC/MS (ESI): m/z 1382,2 $[M+H]^+$.

Ví dụ 2-3.

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-yl)-3-metoxi-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*,3-dimetyl-2-((*S*)-3-metyl-2-(metylamino)butanamido)butanamit Hợp chất **1** trong ví dụ này



Bước 1

(9*H*-fluoren-9-yl)metyl (1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-carboxylat Hợp chất **1c** trong ví dụ này

Axit (2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)metoxi)carbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-3-yl)-3-metoxi-2-metylpropanoic (hợp chất **1a** trong ví dụ này, 1,05 g, 2,49 mmol, được điều chế bằng phương pháp được bộc lộ trong “bước 7 trên trang 20 của bản mô tả của đơn sáng chế US2019/55223”) và (1*S*,2*R*)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol (hợp chất **1b** trong ví dụ này, 0,42 g, 2,78 mmol, được điều chế bằng phương pháp đã biết “Journal of Organic Chemistry, 2012, vol. 77, # 12, p. 5454-5460”) được bổ sung vào bình phản ứng, sau khi bổ sung diclometan (10 mL) và *N,N*-dimetylformamit (2 mL), và thổi khí argon vào hỗn hợp này ba lần. *o*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium hexaflophosphat (1,14 g, 3,00 mmol) và *N,N*-diisopropyletylamin (0,97 g, 7,47 mmol) kèm khuấy, và khuấy hỗn hợp thu được này ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. 30 mL nước được bổ sung, và chiết dung dịch phản ứng này bằng diclometan (15 mL $\times$ 4 lần). Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch natri clorua bão hòa (30 mL), làm khô qua natri sulfat khan và lọc, và dịch lọc được cô đặc dưới áp suất giảm. Phần dư thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ thống dung môi phát triển A thu được sản phẩm tiêu đề, nghĩa là, hợp chất **1c** (1,38 g, hiệu suất 99,8%) trong ví dụ này.

MS m/z (ESI): 555,2 [M+1]

Bước 2

(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-3-yl)-*N*-((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)-3-metoxi-2-metylpropanamit hợp chất **1d** trong ví dụ này. Hợp chất **1c** (1,38 g, 2,49 mmol) trong ví dụ này được hòa tan trong diclometan (10 mL), sau khi bổ sung diethylamin (20 mL), và hỗn hợp này được thổi khí argon ba lần và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng được cô đặc. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ thống dung môi phát triển A thu được sản phẩm tiêu đề, nghĩa là, hợp chất **1d** (805 mg, hiệu suất 97,3%) trong ví dụ này.

MS m/z (ESI): 333,2 [M+1]

Bước 3

(9*H*-fluoren-9-yl)metyl ((*S*)-1-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-yl)-3-metoxi-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)(metyl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-3-metyl-1-oxobutan-2-yl)(metyl)carbamit hợp chất **1f** trong ví dụ này

Axit (5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-*sec*-butyl)-1-(9*H*-fluoren-9-yl)-5,8-diisopropyl-12-metoxi-4,10-dimetyl-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oic (hợp chất **1e** trong ví dụ này, 1,54 g, 2,41 mmol, được cung cấp bởi Haoyuan Chemexpress) được bổ sung vào trong bình phản ứng, sau khi bổ sung axetonitril (30 mL), và hỗn hợp này được thổi khí argon ba lần và được làm lạnh đến 0-5 °C dưới bể đá lạnh. o-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium hexafluorophosphat (1,10 g, 2,89 mmol) và *N,N*-diisopropyletylamin (0,94 g, 7,27 mmol) được bổ sung, và khuấy hỗn hợp thu được này trong 10 min dưới bể đá. Huyền phù chứa hợp chất **1d** (805 mg, 2,42 mmol) trong ví dụ này trong axetonitril (10 mL) được bổ sung, và khuấy hỗn hợp thu được này trong 40 phút dưới bể đá. 60 mL nước được bổ sung vào dung dịch phản ứng này, và chiết hỗn hợp này bằng etyl axetat (20 mL × 4 lần). Rửa pha hữu cơ bằng dung dịch natri clorua bão hòa (60 mL), làm khô qua natri sulfat khan, và lọc. Dịch lọc được cô đặc dưới áp suất giảm, và phần dư thu được được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ thống dung môi phát triển B thu được sản phẩm thô, nghĩa là, hợp chất **1f** (2,9 g) trong ví dụ này.

MS m/z (ESI): 952,3 [M+1]

Bước 4

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-metoxi-2-metyl-3-oxopropyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-yl)-3-metoxi-5-metyl-1-oxoheptan-4-yl)-*N*,3-dimetyl-2-((*S*)-3-metyl-2-(metylamino)butanamido)butanamit Hợp chất **1** trong ví dụ này

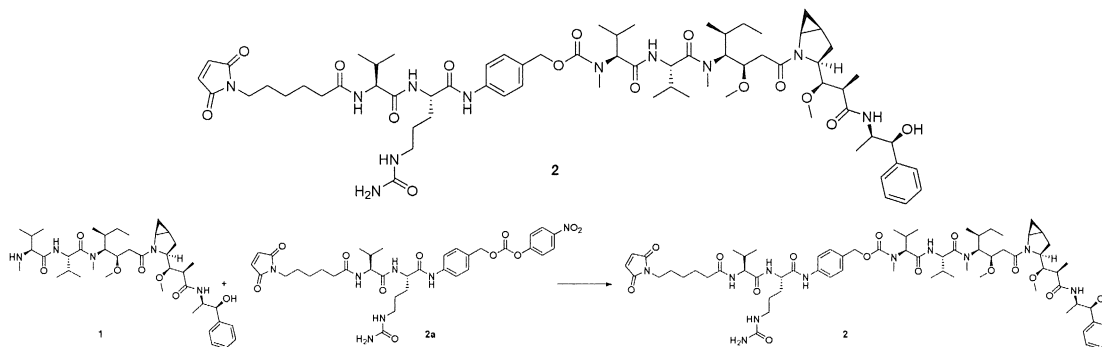
Hợp chất **1f** (chất thô, 510 mg, 0,53 mmol) trong ví dụ này được hòa tan trong diclometan (2 mL), sau khi bổ sung diethylamin (4 mL), và hỗn hợp này được thổi khí argon ba lần và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1h. Dung dịch phản ứng được cô đặc. Phần dư được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel với hệ thống dung môi phát triển A thu được sản phẩm tiêu đề, nghĩa là, hợp chất **1** (266 mg, hiệu suất 68,0%) trong ví dụ này.

MS m/z (ESI): 730,4 [M+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7,36-7,40 (m, 2H), 7,31 (t, 2H), 7,24 (d, 1H), 4,69 (d, 1H), 4,56 (d, 1H), 4,17-4,28 (m, 2H), 4,06-4,14 (m, 1H), 3,91 (d, 1H), 3,78 (t, 1H), 3,27-3,44 (m, 7H), 3,15 (s, 3H), 2,84-2,93 (m, 1H), 2,60-2,67 (m, 2H), 2,30-2,37 (m, 3H), 2,02-2,10 (m, 2H), 1,79-1,95 (m, 4H), 1,38-1,53 (m, 2H), 1,25-1,36 (m, 2H), 1,21 (d, 1H), 1,13-1,17 (m, 2H), 1,07-1,11 (m, 2H), 0,93-1,05 (m, 15H), 0,83-0,89 (m, 4H), 0,70-0,79 (m, 1H).

Ví dụ 2-4.

4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamido)-3-methylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl ((*S*)-1-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-hydroxy-1-phenylpropan-2-yl)amino)-1-methoxy-2-methyl-3-oxopropyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexan-2-yl)-3-methoxy-5-methyl-1-oxoheptan-4-yl)(methyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)(methyl)carbamate Hợp chất **2** trong ví dụ này



Hợp chất **1** (30 mg, 0,041 mmol) trong ví dụ này được bổ sung vào *N,N*-dimethylformamit (1 mL), sau đó bổ sung tuần tự 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanamit)-3-methylbutyrylamit)-5-ureidovaleramit)benzyl(4-nitrophenyl)carbonat (hợp chất **2a** trong ví dụ này, 45 mg, 0,061 mmol, được cung cấp bởi Ark) và pyridin (0,25 mL), và hỗn hợp này được thổi khí argon ba lần. 1-hydroxybenzotriazol (12 mg, 0,089 mmol) và *N,N*-diisopropyletylamin (16 mg, 0,123 mmol) được bổ sung, và khuấy hỗn hợp thu được này ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, bổ sung **2a** (45 mg, 0,061 mmol), và khuấy trong 16 giờ nữa. Tinh chế dung dịch phản ứng này bằng sắc ký lỏng hiệu

năng cao (các điều kiện tách: cột sắc ký: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19 $\times$ 250 mm; pha di động: A-nước (10 mmol NH_4OAc), B-axetonitril, rửa giải gradient, tốc độ dòng: 18 mL/phút). Các phần tương ứng được thu thập và cô đặc dưới áp suất giảm thu được sản phẩm tiêu đề, nghĩa là, hợp chất **2** (18 mg, hiệu suất 33.0%) trong ví dụ này.

MS m/z (ESI): 1329,3 $[\text{M}+1]$

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7,58 (d, 2H), 7,29-7,42 (m, 6H), 7,20-7,26 (m, 1H), 6,79 (s, 2H), 5,04-5,20 (m, 4H), 4,47-4,61 (m, 3H), 4,13-4,28 (m, 3H), 4,06-4,12 (m, 1H), 3,91 (d, 1H), 3,75-3,82 (m, 1H), 3,48 (t, 3H), 3,27-3,41 (m, 7H), 3,16-3,25 (m, 2H), 3,18 (s, 3H), 2,91-2,97 (m, 2H), 2,60-2,65 (m, 2H), 2,27 (t, 2H), 2,20 (t, 1H), 2,01-2,10 (m, 3H), 1,69-1,94 (m, 6H), 1,63-1,68 (m, 6H), 1,46-1,51 (m, 1H), 1,27-1,37 (m, 5H), 1,12-1,21 (m, 3H), 1,09 (d, 2H), 0,93-1,04 (m, 11H), 0,80-0,92 (m, 11H), 0,70-0,77 (m, 2H).

3. Điều chế thể tiếp hợp kháng thể kháng CD79B-dược chất

Mục đích thí nghiệm và nguyên tắc của phân tích tải nạp-dược chất ADC:

Tải nạp ADC được xác định bằng phép đo quang phổ tử ngoại (UV-Vis) (máy quang phổ tử ngoại Thermo nanodrop2000). Nguyên tắc này đó là tổng giá trị hấp thụ của ADC ở bước sóng nhất định là tương đương với tổng giá trị độ hấp thụ của dược chất và kháng thể ở bước sóng đó.

Các quy trình thí nghiệm

Cuvet chứa đệm natri succinat được đặt riêng vào ô tham chiếu và ô mẫu, và giá trị độ hấp thụ của ô trống dung môi đã được trừ đi. Sau đó, cuvet chứa dung dịch thử nghiệm được đặt vào trong ô mẫu, và giá trị độ hấp thụ ở 280 nm và 370 nm được xác định.

Tính toán cho các kết quả:

$$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{\text{mab-280}}bC_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{Dược chất-280}}bC_{\text{Dược chất}} \quad \text{Phương trình (1)}$$

$\epsilon_{\text{Dược chất-280}}$: hệ số cạn kiệt mol trung bình dược chất ở 280 nm là 5100;

$C_{\text{Dược chất}}$: nồng độ dược chất;

$\epsilon_{\text{mab-280}}$: hệ số cạn kiệt mol trung bình kháng thể đơn dòng ở 280 nm là 214.600;

C_{mab} : nồng độ kháng thể đơn dòng;

b: chiều dài đường quang 1 cm.

Tương tự, phương trình cho tổng giá trị hấp thụ của mẫu ở 370 nm có thể được xác định là:

$$A_{370\text{ nm}} = \epsilon_{\text{mab-370}}bC_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{Dược chất-370}}bC_{\text{Dược chất}} \quad \text{Phương trình (2)}$$

$\epsilon_{\text{Dược chất-370}}$: hệ số cạn kiệt mol trung bình dược chất ở 370 nm là 19.000;

$C_{\text{Dược chất}}$: nồng độ dược chất;

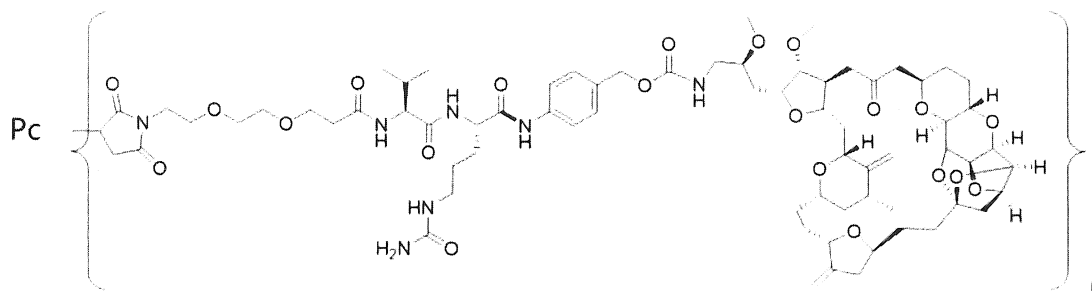
$\epsilon_{\text{mab-370}}$: hệ số cạn kiệt của kháng thể đơn dòng ở 370 nm là 0;

C_{mab} : nồng độ kháng thể đơn dòng;

b : chiều dài đường quang 1 cm.

Tải nạp dược chất của ADC có thể được tính toán sử dụng cả hai phương trình (1) và (2) cũng như các hệ số cạn kiệt của kháng thể đơn dòng và dược chất ở cả hai bước sóng và nồng độ của chúng: lượng tải nạp dược chất = $C_{\text{Dược chất}}/C_{\text{mab}}$.

Ví dụ 3-1. ADC-1



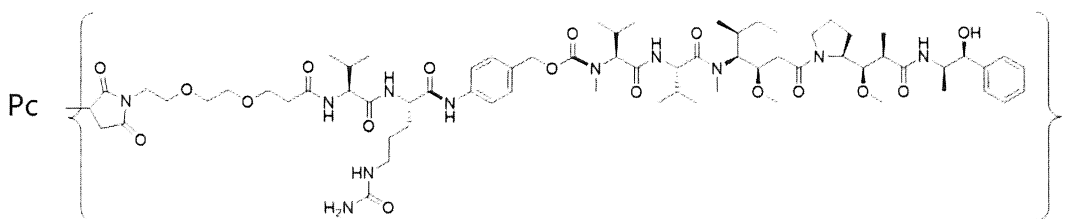
ADC-1

Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 1,5 mL, 0,101 μmol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 25,3 μL , 0,253 μmol) ở 37 °C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25 °C dưới bể nước.

Hợp chất B (1,41 mg, 1,015 μmol) trong ví dụ 2-2-1 được hòa tan trong dimethylsulfoxit (50 μL), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25 °C trong 3 giờ trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-1 (nghĩa là, hAb015-10-cys-B)** trong đệm PBS (0,84 mg/mL, 13,5 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4 °C.

Tính toán giá trị trung bình bằng HIC: $n = 3.06$.

Ví dụ 3-2. ADC-2



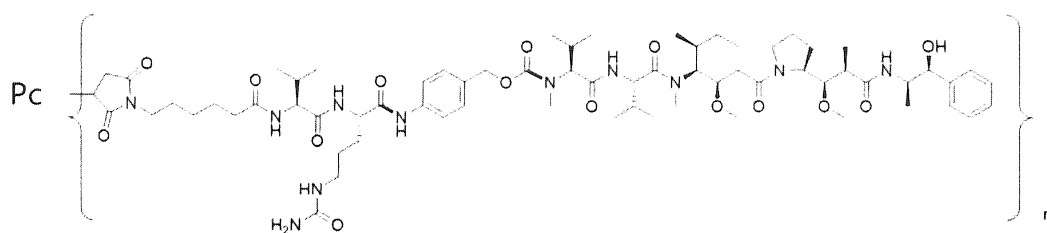
ADC-2

Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 3,5 mL, 0,236 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 59,1 μ L, 0,591 μ mol) ở 37 °C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25 °C dưới bể nước.

Hợp chất A (3,2 mg, 2,348 μ mol) được hòa tan trong dimethylsulfoxit (150 μ L), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-2** (nghĩa là, **hAb015-10-cys-Malei-PEG2-vc-PAB-MMAE**) trong đệm PBS (2,17 mg/mL, 16,4 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4 °C.

Số trung bình được tính toán bằng RP-HPLC: n = 3,68.

Ví dụ 3-3. ADC-3



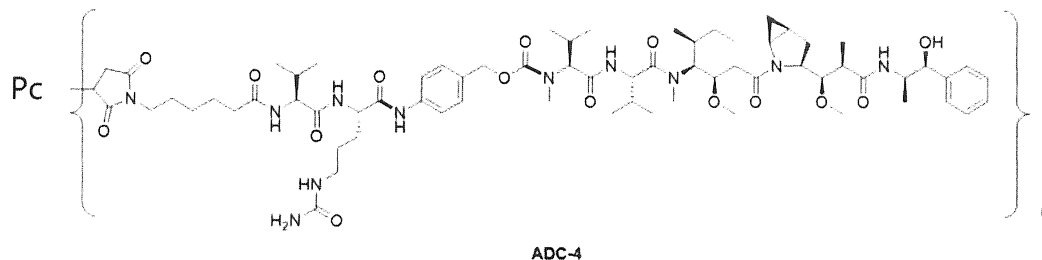
ADC-3

Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 5,0 mL, 0,338 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 85,0 μ L, 0,850 μ mol) ở 37°C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37°C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25°C dưới bể nước.

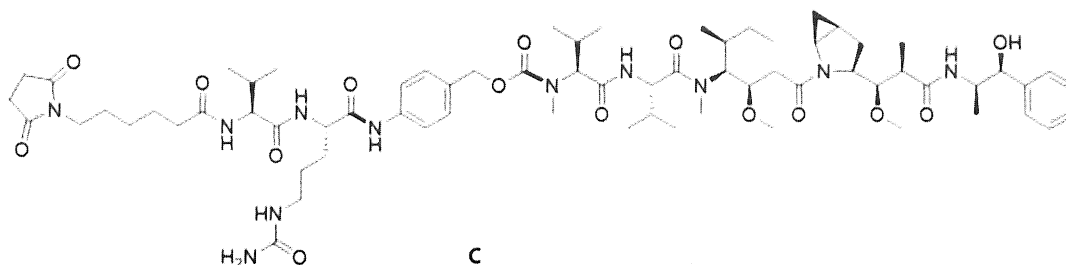
Hợp chất **MC-vc-PAB-MMAE** (4,45 mg, 3,380 μ mol) được hòa tan trong dimethylsulfoxit (250 μ L), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25°C trong 3 giờ trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-3** (nghĩa là, **hAb015-10-cys-MC-vc-PAB-MMAE**) trong đệm PBS (2,79 mg/mL, 17,4 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

Tính toán giá trị trung bình bằng CE-SDS: $n = 3,09$.

Ví dụ 3-4. ADC-4



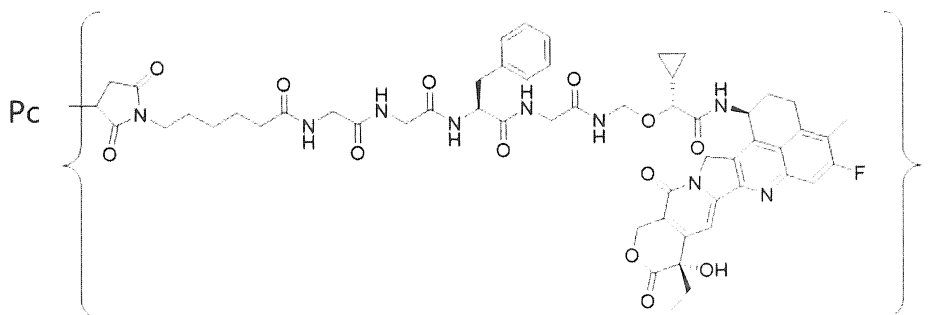
Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 1,8 mL, 0,122 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 30,4 μ L, 0,304 μ mol) ở 37°C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3 giờ trước khi dùng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25 °C dưới bể nước.



Hợp chất C (1,62 mg, 1,220 μ mol) trong ví dụ này được hòa tan trong dimetylsulfoxit (90 μ L), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25°C trong 3 giờ trước khi dùng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-4** (nghĩa là, **hAb015-10-cys-C**) trong đệm PBS (1,37 mg/mL, 12,0 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

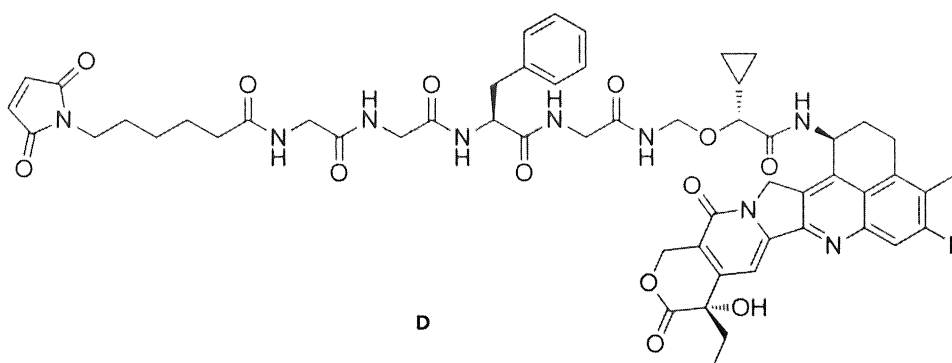
Tính toán giá trị trung bình bằng RP-HPLC: $n = 4,52$.

Ví dụ 3-5. ADC-5



ADC-5

Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 1,5 mL, 0,101 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 16,2 μ L, 0,162 μ mol) ở 37°C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3 giờ trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25 °C dưới bể nước.

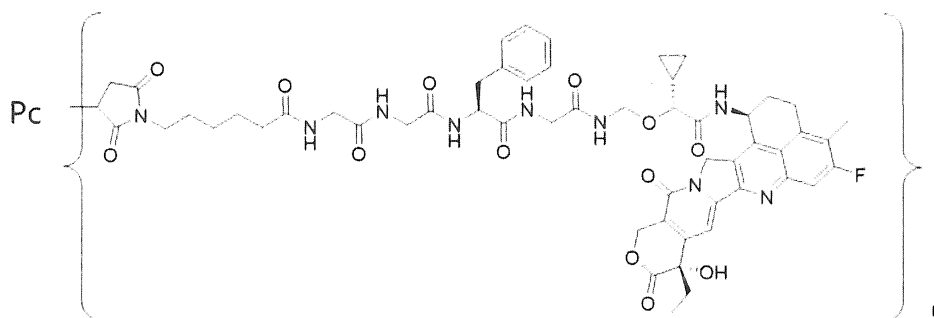


Hợp chất D (0,87 mg, 0,810 μ mol) trong ví dụ này được hòa tan trong dimetylsulfoxit (37 μ L), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-5** (nghĩa là, **HAB015-10-cys-D**, với giá trị **DAR** là khoảng **2**) trong đệm PBS (0,90mg/mL, 14,0 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

Hợp chất D được điều chế tham chiếu đến phương pháp được mô tả trong WO2020063676A, ví dụ, Ví dụ 9 ở đây.

Tính toán giá trị trung bình bằng RP-HPLC: $n = 1,81$.

Ví dụ 3-6. ADC-6



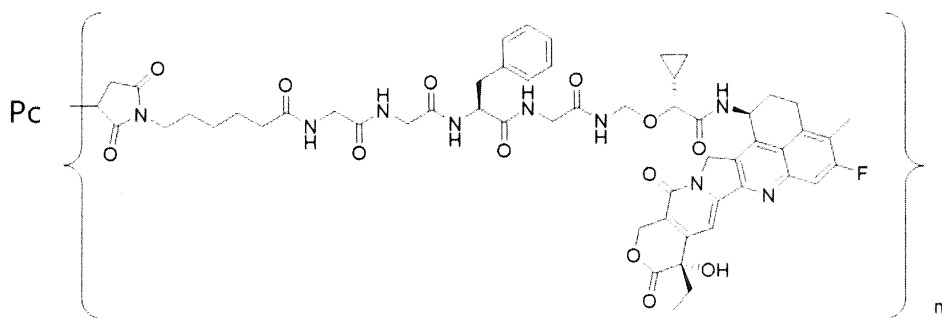
ADC-6

Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 1,5 mL, 0,101 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 25,3 μ L, 0,253 μ mol) ở 37°C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25°C dưới bể nước.

Hợp chất D (1,09 mg, 1,015 μ mol) trong ví dụ 3-5 được hòa tan trong dimetylsulfoxit (45 μ L), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bể nước ở 25°C trong 3 giờ trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-6** (nghĩa là, **hAb015-10-cys-D**, với giá trị **DAR đích là khoảng 4**) trong đệm PBS (0,71 mg/mL, 14,0 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

Tính toán giá trị trung bình bằng RP-HPLC: $n = 3,46$.

Ví dụ 3-7. ADC-7



ADC-7

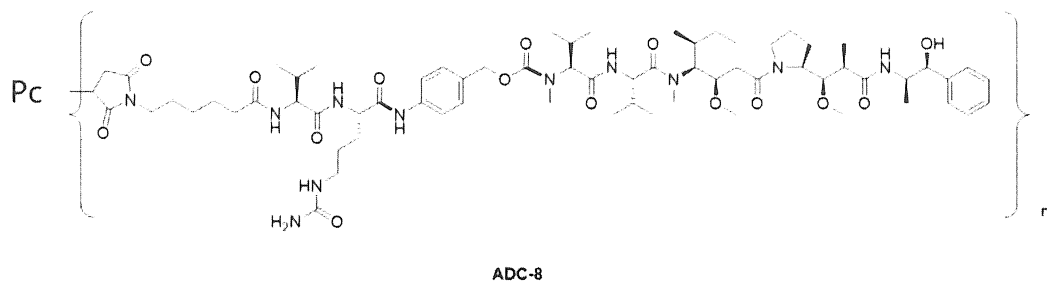
Kháng thể **hAb015-10** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 1,5 mL, 0,101 μ mol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 50,7 μ L, 0,507 μ mol) ở 37 °C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bể nước ở 37 °C trong 3 giờ trước

khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25°C dưới bề nước.

Hợp chất D (1,63 mg, 1,518 μmol) trong ví dụ 3-5 được hòa tan trong dimethylsulfoxit (68 μL), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bề nước ở 25 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa 0,001 M EDTA) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-7 (nghĩa là, hAb015-10-cys-D, với giá trị DAR là khoảng 6)** trong đệm PBS (0,81 mg/mL, 13,5 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

Tính toán giá trị trung bình bằng RP-HPLC: $n = 5,84$.

Ví dụ 3-8. ADC-8



Kháng thể **SN8** trong đệm PBS chứa nước (đệm PBS chứa nước 0,05 M ở pH 6,5, 10,0 mg/mL, 79 mL, 5,338 μmol) được bổ sung dung dịch tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) chứa nước được điều chế (10 mM, 1,388 mL, 13,88 μmol) ở 37 °C. Lắc hỗn hợp này trên máy lắc bề nước ở 37 °C trong 3h trước khi dừng phản ứng này. Dung dịch phản ứng này được làm mát đến 25 °C dưới bề nước.

Hợp chất **MC-VC-PAB-MMAE** (70,3 mg, 53,40 μmol) được hòa tan trong dimethylsulfoxit (3,5 mL), và dung dịch này được bổ sung vào dung dịch phản ứng trên. Lắc hỗn hợp thu được trên máy lắc bề nước ở 25 °C trong 3 giờ trước khi dừng phản ứng này. Khử muối hỗn hợp phản ứng này và tinh chế qua cột gel Sephadex G25 (pha rửa giải: đệm PBS 0,05 M ở pH 6,5, chứa EDTA 0,001 M) thu được sản phẩm tiêu đề **ADC-8 (nghĩa là, SN8-cys-MC-PAB-MMAE, với giá trị DAR là khoảng 4)** trong đệm PBS (5,83 mg/mL, 132 mL) trong ví dụ này, mà được làm lạnh và bảo quản ở 4°C.

Tính toán giá trị trung bình bằng CE-SDS: $n = 3,59$.

4. Đánh giá sinh học

Ví dụ 4-1. Thử nghiệm ái lực Biacore

Ví dụ này được thực hiện để xác định ái lực của các kháng thể CD79B (hAb015-10 và SN8) và ADC cho protein CD79B sử dụng Biacore.

Thiết bị thử nghiệm, nguyên liệu và chất phản ứng: Biacore T200 (GE); chip cảm biến sinh học CM5 (Cat.# BR-1005-30, GE); kit nối amino (Cat.# BR-1000-50, GE); kit bắt giữ kháng thể người (Cat.# BR-1008-39, GE); protein CD79B người-His (Cat.# 29750-H08H, Sino Biological); HBS-EP + 10× đệm (Cat.# BR-1006-69, GE) được pha loãng thành 1X (pH 7,4) bằng nước D. I. Water.

Các quy trình thí nghiệm: kháng thể bắt giữ kháng thể người được nối đồng hóa trị với biochip CM5 theo phương pháp được mô tả hướng dẫn của kit bắt giữ kháng thể người để bắt giữ ái lực khối lượng nhất định kháng thể CD79B.

Thông kê và phân tích dữ liệu: dữ liệu được điều chỉnh bằng BIAevaluation version 4.1, phần mềm GE sử dụng mô hình Langmuir (1:1) để thu các giá trị ái lực.

Các kết quả thí nghiệm và kết luận: các kết quả thử nghiệm của ái lực đối với liên kết của các kháng thể CD79B và ADC với protein CD79B được thể hiện trong bảng 10. Các kháng thể trần và các ADC khác nhau có lực liên kết tương tự như protein CD79B người, mà là cao hơn lực liên kết của Polivy được chất dương tính. Các trình tự của SN8 (nghĩa là, kháng thể trong Polivy):

> Trình tự axit amin chuỗi nặng của SN8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPG
GGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYW
GQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVME
ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32

> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SN8

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVQDYEGDSFLNWFYQQKPGKAPKLLIYAA
SNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 33.

Bảng 10. Lực liên kết của các kháng thể và các ADC khác nhau với protein CD79B người

ADC/kháng thể	CD79B người EC ₅₀ (nM)
---------------	-----------------------------------

hAb015-10	0,38
ADC-1	0,51
ADC-2	0,48
ADC-3	0,40
ADC-4	0,32
ADC-5	0,80
ADC-6	0,43
ADC-7	0,53
ADC-8	5,98

Ví dụ 4-2. Thử nghiệm nhập bào *In Vitro*

Thí nghiệm nhập bào tế bào được thực hiện với tế bào DOHH-2 (DSMZ, ACC 47) biểu hiện cao protein CD79B người để đánh giá khả năng nhập bào của ADC.

Các tế bào DOHH-2 được nuôi cấy theo phương pháp thông thường để tạo huyền phù tế bào trong môi trường hoàn chỉnh (môi trường RPMI 1640 (GIBCO, Cat No.: 11835-030), chứa 10% (v/v) huyết thanh thai bò (FBS) (GIBCO, Cat No.: 10099-141) và penicillin/streptomycin (GIBCO, Cat No.: 15070-063)). Thu thập các tế bào này bằng ly tâm nhiệt độ thấp ở 4°C trong 5 phút ở 1000 vòng/phút trong thử nghiệm này. Các tế bào này được tái tạo huyền phù trong 10-15 mL đệm FACS được làm lạnh trước trên băng. Đệm FACS bao gồm nước muối đệm phosphat (PBS), pH 7,4, có 2% huyết thanh thai bò (FBS). Thông qua thử nghiệm này, đệm FACS được làm lạnh trước trên băng. Tế bào được đếm và ly tâm, và được bổ sung vào đĩa 96 lỗ với 300.000 tế bào/lỗ. Sau khi ly tâm, phần nổi được loại bỏ, và 12,5 µg/mL dung dịch phong bế Fc (BD, Cat No.: 564220) được bổ sung với 100 µL/lỗ. Phong bế được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng trong 10 min. Sau đó, 20 µg/mL ADC thử nghiệm được bổ sung vào các lỗ tương ứng, và đĩa này được ủ ở 4°C trong 1h cách xa ánh sáng. Đĩa được rửa hai lần bằng đệm PBS được làm lạnh trước để loại bỏ ADC không liên kết. Môi trường nuôi cấy tế bào hoàn chỉnh (môi trường RPMI 1640 có 10% huyết thanh thai bò) được bổ sung, và ủ đĩa này ở 37°C với 5% CO₂ trong 0 giờ và 4 giờ. Sau khi ly tâm, phần nổi được loại bỏ, dung dịch đệm PFA 2% được bổ sung với 100 µL/lỗ để tái tạo huyền phù các tế bào này, và để yên đĩa này trong 10 min. Sau đó, rửa đĩa này 3 lần bằng đệm FACS, và 100 µL dung dịch kháng thể thứ hai (kháng thể thứ cấp kháng người của dê được đánh dấu huỳnh quang: được pha loãng trong tỷ lệ 1:250, 2 µg/mL, Biolegend, Cat# 409304) được bổ sung. Đĩa này được ủ ở 4°C trong nửa giờ cách xa ánh sáng. Đệm PBS được làm lạnh trước được bổ sung, và phần nổi được loại bỏ sau khi ly tâm ở 4°C, được lặp lại ba lần. Các tế bào này được tái tạo huyền phù trong đệm FACS với 200 µL/lỗ và được phát hiện bằng máy đếm tế bào dòng chảy

(BD FACS Calibur).

Các kết quả được thể hiện trong bảng 11. Các ADC khác nhau có tỷ lệ nhập bào nhiều hơn 65% sau khi ủ với tế bào DoHH2 trong 4 h, và do đó có khả năng nhập bào tốt. Tỷ lệ nhập bào của mỗi ADC được so sánh với tỷ lệ nhập bào của được chất Polivy dương tính.

Bảng 11. Nhập bào của các ADC khác nhau trong tế bào DoHH2

EC ₅₀	Tỷ lệ nhập bào (4 giờ)
ADC-1	73%
ADC-2	66%
ADC-3	70%
ADC-4	81%
ADC-5	76%
ADC-6	75%
ADC-7	68%
ADC-8	76%

Ví dụ 4-3. Thử nghiệm tăng sinh tế bào

Ví dụ này được thực hiện để đánh giá hiệu quả của các ADC khác nhau đối với sự tăng sinh của tế bào DoHH2, WSU-DLCL2 và Raji được nuôi cấy *in vitro*. Theo các tài liệu báo cáo gần đây (*Leukemia*. 2015 Jul; 29(7): 1578-1586; *Blood*. 2007 Jul 15; 110(2): 616-623), DoHH2 là tế bào biểu hiện CD79B cao, WSU-DLCL2 là tế bào biểu hiện CD79B thấp, và Raji là tế bào biểu hiện âm tính CD79B.

Các nguyên liệu thí nghiệm:

ADC-1: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 0,84 mg/mL và độ tinh khiết là 99,17%;

ADC-2: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 2,17 mg/mL và độ tinh khiết là 97,93%;

ADC-3: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 2,79 mg/mL và độ tinh khiết là 98,28%;

ADC-4: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 1,36 mg/mL và độ tinh khiết là 98,48%;

ADC-5: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 0,9 mg/mL và độ tinh khiết là 98,49%;

ADC-6: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 0,71 mg/mL và độ tinh khiết là 98,71%;

ADC-7: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 0,81 mg/mL và độ tinh khiết là 98,27%;

ADC-8: chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 5,83 mg/mL và độ tinh khiết là 97,07%.

Khi phát hiện thực tế, DAR = 3,06 cho ADC-1, DAR = 3,68 cho ADC-2; DAR = 3,09 cho ADC-3; DAR = 4,52 cho ADC-4; DAR = 1,81 cho ADC-5; DAR = 3,46 cho ADC-6; DAR = 5,84 cho ADC-7; và DAR = 3,59 cho ADC-8.

Các dược chất trên đều được bảo quản trong điều kiện kín, râm mát ở 4 °C.

Dòng tế bào: tế bào DoHH2 được mua từ DSMZ, tế bào WSU-DLCL-2 được mua từ American Type Culture Collection (ATCC), và tế bào Raji được mua từ American Type Culture Collection (ATCC).

Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS).

Tác nhân phản ứng và thiết bị: RPMI 1640 và FBS được mua từ Gibco; muối tetramethylazazol (3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromua, MTT) được mua từ Sangon Biotech. Máy đọc vi đĩa được mua từ BioTek.

Các quy trình thí nghiệm:

Số tế bào nhất định trong pha sinh trưởng loga được nhân lên trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ, và các dược chất ở các nồng độ khác nhau được bổ sung vào đĩa nuôi cấy để phản ứng trong 72 giờ. Sau khi phản ứng hoàn thành, dung dịch hoạt động MTT được bổ sung để phản ứng trong 4 giờ, sau đó formazan tinh thể xanh tím được hòa tan bằng ba dung dịch. các giá trị OD ở bước sóng 570 nm và 690 nm được đọc sử dụng máy đọc vi đĩa, và tốc độ ức chế sinh trưởng tế bào được tính toán bằng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ ức chế} = \frac{(\text{lỗ đối chứng}_{OD570\text{ nm}} - \text{lỗ phân liều}_{OD570\text{ nm}} - \text{lỗ đối chứng}_{OD690\text{ nm}} - \text{lỗ phân liều}_{OD690\text{ nm}})}{\text{lỗ đối chứng}_{OD570\text{ nm}} - \text{lỗ đối chứng}_{OD690\text{ nm}}} \times 100\%$$

Từ tỷ lệ ức chế ở mỗi nồng độ, nồng độ ức chế tối đa một nửa IC₅₀ được tính toán sử dụng PrismGraph 8.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 12.

Bảng 12. Hoạt tính ức chế của các ADC khác nhau với sự tăng sinh *in vitro*

Hợp chất	Độc tố	IC ₅₀ (ng/ml)		
		DoHH2	WSU-DLCL2	Raji
ADC-1	chất ức chế polyme hóa tubulin	2,1	3,2	>10000
ADC-2		1,1	1,3	>10000
ADC-3		3,3	5,9	>10000
ADC-4		1,7	3,7	>10000
ADC-5	Chất ức chế Topo I	8,5	68,3	>10000
ADC-6		3,3	54,2	>10000
ADC-7		2,0	53,4	~10000

ADC-8	chất ức chế polyme hóa tubulin	80,6	116,9	>10000
-------	--------------------------------------	------	-------	--------

Ví dụ 4-4. Hiệu quả của ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra u lymphô tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2

Ví dụ này được thực hiện để đánh giá và so sánh hiệu quả của dược chất ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông.

hIgG1(HRP00252): chất lỏng không màu và trong suốt, có nồng độ là 22,77 mg/mL và độ tinh khiết là 99,03%, được sản xuất vào 24.7.2018 và hết hạn trước 24.1.2020 (18 tháng thử nghiệm); bảo quản lạnh tại -70 °C.

1. Dược chất: ADC-1, ADC-2, ADC-3, ADC-4, ADC-6 và ADC-8 là giống như là các dược chất trong ví dụ 4-3.

2. Tế bào và chuột: tế bào u lymphô tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2 được mua từ American Type Culture Collection. WSU-DLCL2 các tế bào được nuôi cấy trong đĩa petri 10 cm có môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Gibco) chứa 10% huyết thanh thai bò, penicillin và streptomycin và được ủ trong thiết bị ủ ở 37°C có 5% CO₂. Nuôi cấy phụ được thực hiện 2-3 lần một tuần, và thu tế bào, đếm và nhân lên khi chúng trong pha sinh trưởng theo cấp số nhân.

Chuột trụi lông, BALB/c-nu, 35 ngày tuổi, cái, được mua từ Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd, với số lixăng sản xuất của SCXK (Beijing) 2019-0008, và số chứng nhận động vật 1103222011004014. Môi trường nuôi nhốt: cấp độ SPF.

3. Các bước thí nghiệm: mỗi con chuột trụi lông được cấy dưới da $2,1 \times 10^7$ tế bào WSU-DLCL2, và sau khi khối u đạt đến 100-150 mm³, các con vật được chia nhóm theo thể tích khối u (D0). Các con chuột được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV) với thể tích dùng là 10 mL/kg. Các liều dùng cụ thể và chế độ dùng được thể hiện trong bảng X. Thể tích khối u và trọng lượng cơ thể được đo hai lần một tuần và các kết quả được ghi lại.

4. Chỉ số thí nghiệm và phân tích thống kê:

Chỉ số thí nghiệm là nghiên cứu hiệu quả của dược chất đối với sự phát triển khối u, và chỉ số cụ thể là T/C% hoặc ức chế sự phát triển của khối u TGI(%).

Đường kính khối u được đo hai lần một tuần bằng thang đo vernier và thể tích khối u (V) được tính toán theo công thức sau:

$V = 1/2 \times a \times b^2$, trong đó a và b tương ứng là chiều dài và chiều rộng.

$T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, trong đó T và C thể hiện cho thể tích khối u của động vật vào cuối thí nghiệm tương ứng ở nhóm điều trị và nhóm đối chứng; T₀ và C₀ thể hiện thể tích khối u của động vật khi bắt đầu thí nghiệm tương ứng ở nhóm điều trị và nhóm đối chứng; trong đó T là thể tích khối u dùng ADC và C là

thể tích khối u dùng IgG1 như nhóm đối chứng.

Ước chế sự phát triển của khối u % (TGI%) = $100 - T/C$ (%);

Khi khối u bắt đầu thoái triển, ước chế sự phát triển của khối u % (TGI%) = $100 - (T - T_0)/T_0 \times 100$;

nếu khối u đã giảm thể tích so với thể tích ban đầu, nghĩa là, $T < T_0$ hoặc $C < C_0$, nó được xác định là thoái triển một phần (PR) khối u; nếu khối u biến mất hoàn toàn, nó được xác định là thoái triển hoàn toàn (CR) khối u.

Khi kết thúc thí nghiệm, ở điểm kết thúc thí nghiệm, hoặc khi thể tích khối u trung bình trong nhóm đối chứng đạt đến 1500 mm³, các con vật được giết êm ái bằng cách gây mê CO₂ và được giải phẫu thu được các khối u. Các khối u được chụp ảnh.

Trừ khi được chỉ định khác, so sánh giữa các thể tích khối u của hai nhóm được thực hiện bằng thử nghiệm ANOVA hai chiều, với $P < 0,05$ được xác định là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

5. Các kết quả:

ADC-1 (3 mg/kg và 10 mg/kg, IV, D0) ước chế sự sinh trưởng của khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra WSU-DLCL2 theo phương thức phụ thuộc liều, với tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u tương ứng là 75% và 137%, và với sự thoái triển một phần xảy ra trong tất cả các khối u trong nhóm liều dùng 10 mg/kg;

tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u của ADC-2 (3 mg/kg và 10 mg/kg, IV, D0) trên WSU-DLCL2 tương ứng là 76% và 123%, với sự thoái triển một phần xảy ra trong tất cả các khối u trong nhóm liều dùng 10 mg/kg;

tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u của ADC-3 (3 mg/kg, IV, D0) trên WSU-DLCL2 là 76%, với sự ước chế một phần xảy ra trong 1/6 khối u;

tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u của ADC-4 (3 mg/kg và 10 mg/kg, IV, D0) trên WSU-DLCL2 tương ứng là 95% và 129%, với sự ước chế một phần xảy ra trong 1/6 khối u trong nhóm liều dùng 3 mg/kg và trong 6/6 khối u trong nhóm liều dùng 10 mg/kg;

tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u của ADC-6 (3 mg/kg, IV, D0) trên WSU-DLCL2 là 86%, với sự ước chế một phần xảy ra trong 2/6 khối u;

tỷ lệ ước chế sinh trưởng khối u của ADC-8 (3 mg/kg và 10 mg/kg, IV, D0) trên WSU-DLCL2 tương ứng là 39% và 93%, với sự ước chế một phần xảy ra trong 4/6 khối u trong nhóm liều dùng 10 mg/kg.

Chuột mang khối u có khả năng dung nạp tốt tất cả các dược chất trên, và không có triệu chứng như giảm trọng lượng đáng kể được quan sát thấy. IgG1 được sử dụng làm đối chứng âm tính. Các kết quả được thể hiện trong bảng 13 và FIG. 13A-13C và 14.

Bảng 13. Hiệu quả của ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra WSU-DLCL2

Nhóm	Thời gian dùng	Đường dùng	Thể tích khối u trung bình (mm ³ ±SEM)		T/C (%) D21	Ức chế sinh trưởng khối u (%) D21	Giá trị P D21	Thoái triển một phần	Số con vật khi bắt đầu/kết thúc thí nghiệm
			D0	D21					
IgG1 (10 mg/kg)	D0	IV	115,3±2,8	821,3±85,1	-	-	-	-	10/10
ADC-1 (3 mg/kg)	D0	IV	113,6±3,8	291,8±71,6	25	75	<0,0001	0	6/6
ADC-1 (10 mg/kg)	D0	IV	116,7±4,6	74,0±3,3	-37	137	<0,0001	6	6/6
ADC-2 (3 mg/kg)	D0	IV	119,4±3,2	289,2±24,5	24	76	<0,0001	0	6/6
ADC-2 (10 mg/kg)	D0	IV	110,8±1,8	85,2±4,2	-23	123	<0,0001	6	6/6
ADC-3 (3 mg/kg)	D0	IV	114,4±2,9	284,8±50,0	24	76	<0,0001	1	6/6
ADC-4 (3 mg/kg)	D0	IV	114,8±3,8	151,5±18,7	5	95	<0,0001	1	6/6
ADC-4 (10 mg/kg)	D0	IV	115,4±4,9	82,5±3,0	-29	129	<0,0001	6	6/6
ADC-6 (3 mg/kg)	D0	IV	118,1±4,5	217,4±80,3	14	86	<0,0001	2	6/6
ADC-8 (3 mg/kg)	D0	IV	117,6±3,0	547,2±38,1	61	39	<0,0001	0	6/6
ADC-8 (10 mg/kg)	D0	IV	115,0±3,7	167,8±50,3	7	93	<0,0001	4	6/6

D0: thời gian dùng lần đầu; giá trị P: thu được bằng cách so sánh với dung môi; IV: tiêm tĩnh mạch; thoái triển một phần: thể tích khối u vào D21 là nhỏ hơn thể tích khối u vào D0.

6. Kết luận

ADC-1, ADC-2, ADC-3, ADC-4, ADC-6 và ADC-8 (3 mg/kg hoặc 10 mg/kg, tiêm tĩnh mạch một lần) tất cả có hiệu quả đáng kể lên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra WSU-DLCL2, và gây ra thoái triển một phần trong các khối u; các dược chất có sự phụ thuộc liều đáng kể, và hiệu quả của mỗi ADC là tốt hơn so với hiệu quả của dược chất dương tính ADC-8 (cụ thể là Polivy) ở liều dùng tương đương. Chuột mang khối u có thể dung nạp tốt tất cả các dược chất trên.

Ví dụ 4-5. Hiệu quả của ADC lên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra u lympho tế bào B lớn khuếch tán người WSU-DLCL2

Ví dụ này được thực hiện để đánh giá tiếp và so sánh hiệu quả của dược chất ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra WSU-DLCL2.

1. Dược chất: các dược chất ADC-5, ADC-6, ADC-7, ADC-1 và ADC-8 được pha loãng bằng nước muối bình thường đến nồng độ được mô tả tương ứng trong Ví dụ 4-3.

2. Tế bào và chuột: giống như tế bào và chuột trong ví dụ 4-4.

3. Các bước thí nghiệm: mỗi con chuột trụi lông được cấy dưới da 2×10^7 WSU-

DLCL2 tế bào, và sau khi khối u đạt đến 100-150 mm³, các con vật được chia nhóm theo thể tích khối u (D0). Các con chuột được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV) với thể tích dùng là 10 mL/kg. Các liều dùng cụ thể và chế độ dùng được thể hiện trong bảng 12. Thể tích khối u và trọng lượng cơ thể được đo hai lần một tuần và các kết quả được ghi lại.

4. Chỉ số thí nghiệm là giống như chỉ số trong ví dụ 4-4, và phân tích thống kê là như sau:

Trừ khi được chỉ định khác, so sánh giữa các thể tích khối u của hai nhóm này được thực hiện bằng thử nghiệm t Student, với $P < 0,05$ được xác định là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

5. Các kết quả:

Tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-5 (3 mg/kg, 6 mg/kg, và 12 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da chuột trại lông gây ra WSU-DLCL2 tương ứng là 69%, 86% và 88%, với sự ức chế một phần xảy ra trong 1/6 khối u trong nhóm liều dùng 6 mg/kg và trong 1/6 khối u trong nhóm liều dùng 12 mg/kg;

tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-6 (1,5 mg/kg, 3 mg/kg, và 6 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da gây ra WSU-DLCL2- tương ứng là 66%, 108% và 125%, với sự ức chế một phần xảy ra trong 5/6 khối u trong nhóm liều dùng 3 mg/kg và 6/6 khối u trong nhóm liều dùng 6 mg/kg;

tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-7 (1 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da gây ra WSU-DLCL2 là 91%, với sự ức chế một phần xảy ra trong 1/6 khối u;

tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-1 (3 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da gây ra WSU-DLCL2 là 44%;

tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-8 (3 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da gây ra WSU-DLCL2 là 10%.

Chuột mang khối u có khả năng dung nạp tốt tất cả các dược chất trên, và không có các triệu chứng như giảm trọng lượng được quan sát thấy.

Các kết quả cụ thể được thể hiện trong bảng 14 và FIG. 15-17.

Bảng 14. Chế độ dùng và các kết quả

Nhóm	Thời điểm dùng	Đường dùng	Thể tích khối u trung bình (mm ³) D0	Thể tích khối u trung bình (mm ³)				%T/C	%Ức chế sự phát triển của khối u	Giá trị P	Thoái triển một phần	Số con vật trong mỗi nhóm khi bắt đầu thí nghiệm	Số con vật trong mỗi nhóm khi kết thúc thí nghiệm
				SEM	D21	SEM	D21						
IgG1 đối tính âm tính (12 mg/kg)	D0	IV	111,9	± 2,2	872,1	± 70,0	-	-	-	-	0	10	10
ADC-5 (3mg/kg)	D0	IV	111,0	± 20	343,7	± 31,4	31	69	0,000	0	0	6	6

ADC-5 (6mg/kg)	D0	IV	110,8	±17	218,5	± 43,7	14	86	0,000	1	6	6
ADC-5 (12mg/kg)	D0	IV	111,3	± 3,0	203,6	± 68,3	12	88	0,000	1	6	6
ADC-6 (1,5mg/kg)	D0	IV	109,7	± 0,9	366,3	± 49,9	34	66	0,000	0	6	6
ADC-6 (3mg/kg)	D0	IV	108,6	± 2,5	99,4	± 9,3	-8	108	0,000	5	6	6
ADC-6 (6mg/kg)	D0	IV	108,7	± 1,5	81,2	± 3,4	-25	125	0,000	6	6	6
ADC-7 (1mg/kg)	D0	IV	107,0	± 0,8	178,1	± 25,7	9	91	0,000	1	6	6
ADC-1 (3mg/kg)	D0	IV	113,0	± 2,6	541,8	± 68,8	56	44	0,007	0	6	6
ADC-8 (3mg/kg)	D0	IV	105,0	± 1,4	792,6	± 75,9	90	10	0,505	0	6	6

D0: thời gian dùng lần đầu; giá trị P: thu được bằng cách so sánh với dung môi; IV: tiêm tĩnh mạch.

Ví dụ 4-6. Hiệu quả của ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra u lympho tế bào B người DoHH2

Ví dụ này được thực hiện để đánh giá tiếp và so sánh hiệu quả của dược chất ADC trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra DoHH2.

1. Dược chất: các dược chất ADC-1, ADC-6 và ADC-8 được pha loãng bằng nước muối bình thường đến nồng độ tương ứng được mô tả trong ví dụ 4-3.

2. Tế bào và chuột: tế bào DOHH-2 được mua từ DSMZ, Germany. Các tế bào DOHH-2 được nuôi cấy trong đĩa petri 10 cm có môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Gibco) containing 10% huyết thanh thai bò, penicillin và streptomycin và được ủ trong thiết bị ủ ở 37 °C với 5% CO₂. Nuôi cấy phụ được thực hiện 2-3 lần một tuần, và thu tế bào, đếm và nhân lên khi chúng trong pha sinh trưởng theo cấp số nhân.

Chuột trụi lông, BALB/c-nu, 4-5 tuần tuổi, cái, được mua từ Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd, với số lixăng sản xuất của SCXK (Shanghai) 2018-0003, và số chứng nhận động vật 20180003010222. Môi trường nuôi nhốt: cấp độ SPF.

3. Các bước thí nghiệm: mỗi con chuột trụi lông được cấy dưới da 3×10^7 tế bào DOHH-2, và sau khi khối u đạt đến 100-150 mm³, các con vật được chia nhóm theo thể tích khối u (D0). Các con chuột được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV) với thể tích dùng là 10 mL/kg. Các liều dùng cụ thể và chế độ dùng được thể hiện trong bảng 15. Thể tích khối u và trọng lượng cơ thể được đo hai lần một tuần và các kết quả được ghi lại.

4. Chỉ số thí nghiệm và phân tích thống kê:

Chỉ số thí nghiệm là nghiên cứu hiệu quả của dược chất đối với sự phát triển khối u, và chỉ số cụ thể là T/C% hoặc ức chế sự phát triển của khối u TGI (%).

Đường kính khối u được đo hai lần một tuần bằng thang đo vernier và thể tích khối u (V) được tính toán theo công thức sau:

$$V = 1/2 \times a \times b^2 \quad \text{trong đó } a \text{ và } b \text{ tương ứng là chiều dài và chiều rộng.}$$

$T/C(\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$ trong đó T và C thể hiện cho thể tích khối u của động vật vào cuối thí nghiệm tương ứng ở nhóm điều trị và nhóm đối chứng; T_0 và C_0 thể hiện thể tích khối u của động vật khi bắt đầu thí nghiệm tương ứng ở nhóm điều trị và nhóm đối chứng; trong đó T là thể tích khối u dùng ADC và C là thể tích khối u dùng IgG1 làm nhóm đối chứng.

Ức chế sự phát triển của khối u % (TGI%) = $100 - T/C(\%)$;

khi khối u bắt đầu thoái triển, ức chế sự phát triển của khối u % (TGI%) = $100 - (T - T_0)/T_0 \times 100$;

nếu khối u đã giảm thể tích so với thể tích ban đầu, nghĩa là, $T < T_0$ hoặc $C < C_0$, nó được xác định là thoái triển một phần (PR) khối u; nếu khối u biến mất hoàn toàn, nó được xác định là thoái triển hoàn toàn (CR) khối u.

Khi kết thúc thí nghiệm, ở điểm cuối thí nghiệm, hoặc khi thể tích khối u trung bình trong nhóm dung môi đạt đến 1500 mm³, các con vật được giết êm ái bằng cách gây mê CO₂ và phẫu thuật thu được các khối u. Các khối u được chụp ảnh.

Trừ khi được chỉ định khác, so sánh giữa các thể tích khối u của hai nhóm này được thử nghiệm bằng thử nghiệm ANOVA hai chiều, với $P < 0,05$ được xác định là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

5. Các kết quả:

Tỷ lệ ức chế sinh trưởng khối u của ADC-1, ADC-6 và ADC-8 (1 mg/kg, IV, D0) lên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra DOHH-2 tương ứng là 82% (1/6 PR), 127% (5/6 PR) và 41%; chuột mang khối u có khả năng dung nạp tốt với tất cả các dược chất trên, và không có các triệu chứng như giảm trọng lượng đáng kể được quan sát thấy.

Các kết quả được thể hiện trong bảng 15 và FIG. 18 và 19.

Bảng 15. Hiệu quả của các ADC khác nhau trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra u lympho thể nang người DOHH-2

Nhóm	Thời điểm dùng	Đường dùng	Thể tích khối u trung bình		Thể tích khối u trung bình		T/C		Giá trị P	Thoái triển một phần	Số con vật trong mỗi nhóm khi bắt đầu/ kết thúc thí nghiệm
			(mm ³)		(mm ³)		Uỷ chế phát triển khối u (%)				
			D0	SEM	D20	SEM	D20	D20			
IgG1 (1 mg/kg)	D0	IV	115,7	± 2,7	1385,4	± 162,1	-	-	-	0	10/10
ADC-1 (1 mg/kg)	D0	IV	113,7	± 3,3	345,0	± 122,5	18	82	0,000	1	6/6
ADC-6 (1 mg/kg)	D0	IV	112,9	± 3,5	82,4	± 6,3	-27	127	0,000	5	6/6
ADC-8 (1 mg/kg)	D0	IV	117,1	± 3,5	862,1	± 136,6	59	41	0,042	0	6/6

D0: thời gian dùng lần đầu; giá trị P: thu được bằng cách so sánh với dung môi; IV: tiêm

tĩnh mạch; thoái triển một phần: thể tích khối u vào D21 là nhỏ hơn thể tích khối u vào D0.

6. Kết luận

ADC-1 và ADC-6 (1 mg/kg, tiêm tĩnh mạch một lần) có hiệu quả đáng kể trên khối u ghép dưới da chuột trụi lông gây ra u lympho thể nang người DoHH2, và gây ra thoái triển một phần trong các khối u; hiệu quả của cả hai dược chất là tốt hơn hiệu quả của dược chất dương tính ADC-8 (cụ thể là Polivy). Chuột mang khối u có thể dung nạp tốt tất cả các dược chất.

Việc sử dụng và sự an toàn của các con vật thí nghiệm trong sáng chế này được thực hiện tuân theo quy định của Association for Assessment và Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC). Sức khỏe và chết của các con vật này được theo dõi hằng ngày, và các kiểm tra thông thường bao gồm quan sát hiệu quả của chất thử nghiệm và dược chất khi thực hiện hằng ngày trên các con vật này, như hoạt động hành vi, thay đổi cân nặng và ngoại hình.

YÊU CẦU BẢO HỘ:

1. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, trong đó:

dược chất được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế polyme hóa tubulin, chất ức chế Topo I, và MMAE hoặc dẫn xuất của nó; ưu tiên là, dược chất được chọn từ nhóm bao gồm MMAE hoặc dẫn xuất của nó, exatecan hoặc dẫn xuất của nó, và eribulin hoặc dẫn xuất của nó; và

phối tử là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa: chuỗi nặng HCDR1 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 24;

chuỗi nặng HCDR2 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 25;

chuỗi nặng HCDR3 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 26;

chuỗi nhẹ LCDR1 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 27;

chuỗi nhẹ LCDR2 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 17; và

chuỗi nhẹ LCDR3 chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 18.

2. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 23, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12;

b) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12; hoặc

c) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 13, 14 và 15, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 16, 17 và 18.

3. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-2, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể người, hoặc đoạn của nó;

ưu tiên là, kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể được làm giống người hoặc đoạn của nó.

4. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 4 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này;

hoặc,

vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 5 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này;

hoặc,

vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này;

hoặc,

vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 22 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này.

5. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng hằng định Fc, trong đó

ưu tiên là, Fc này là IgG1, IgG2 hoặc IgG4; và

ưu tiên hơn là, Fc là IgG1 hoặc IgG2.

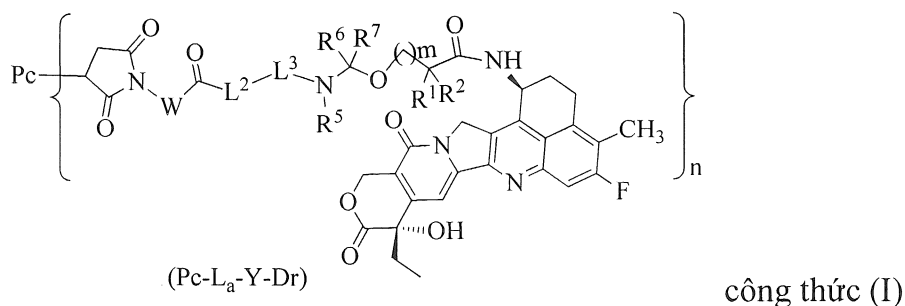
6. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó là scFv, Fv, Fab hoặc đoạn Fab'.

7. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể kháng CD79B chứa:

chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và

chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này;
 hoặc,
 chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này,
 và
 chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này.

8. Thể tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, là thể tiếp hợp phối tử-được chất có công thức (I) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó:



trong đó:

W được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₈ alkyl, C₁₋₈ alkyl-cycloalkyl và heteroalkyl thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl này chứa từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó C₁₋₈ alkyl, cycloalkyl và heteroalkyl thẳng này là độc lập và tùy ý được thể tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thể được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đotori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

L² được chọn từ nhóm bao gồm -NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂CH₂C(O)-, -NR⁴(CH₂CH₂O)^pCH₂C(O)-, -S(CH₂)^pC(O)- và liên kết hóa học, trong đó p¹ là số nguyên từ 1 đến 20;

L³ là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin, trong đó các axit amin này tùy ý được thể bằng một hoặc nhiều phần tử thể được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đotori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

R¹ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, cycloalkylalkyl, alkyl được đotori hóa, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl;

R² được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, haloalkyl, alkyl được đotori hóa, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl;

hoặc, R¹ và R², cùng với nguyên tử cacbon mà chúng được gắn vào, tạo thành cycloalkyl hoặc heterocyclyl;

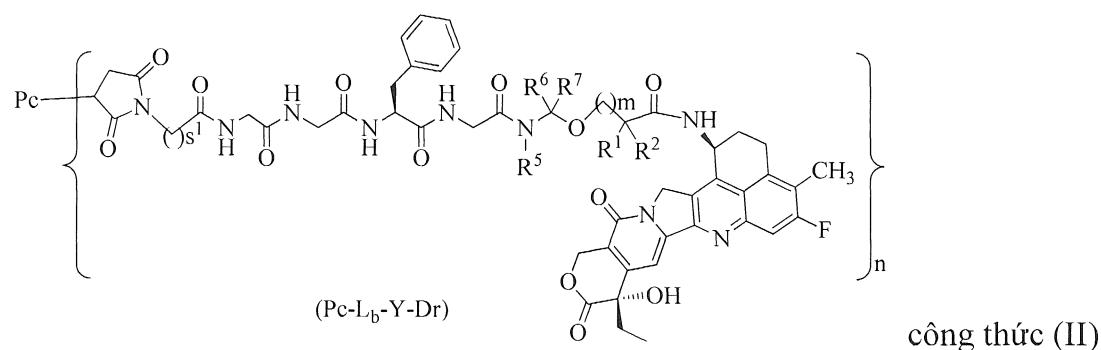
R⁴ và R⁵ là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đotori hóa và hydroxyalkyl;

R^6 và R^7 là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, alkyl, haloalkyl, alkyl được đotori hóa và hydroxyalkyl; m là số nguyên từ 0 đến 4;

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7.

9. Thở tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 8, là thở tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức (II) hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó:

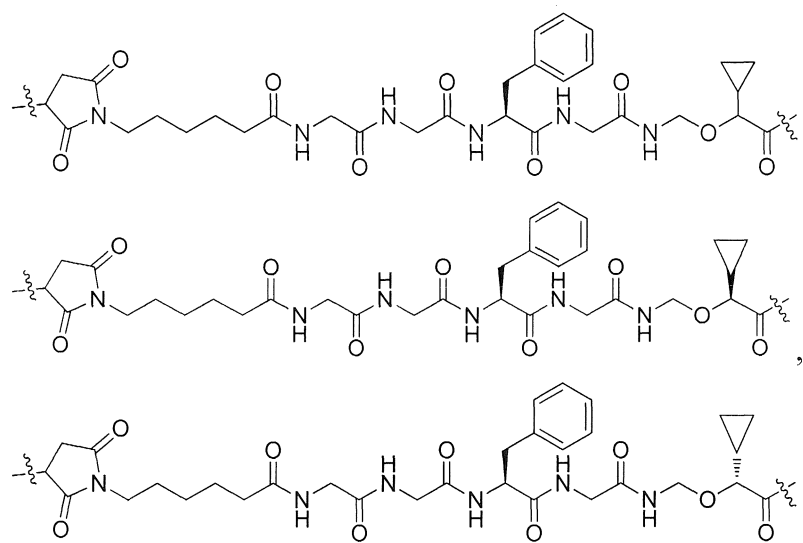


trong đó:

s^1 là số nguyên từ 2 đến 8, ưu tiên là 5; và

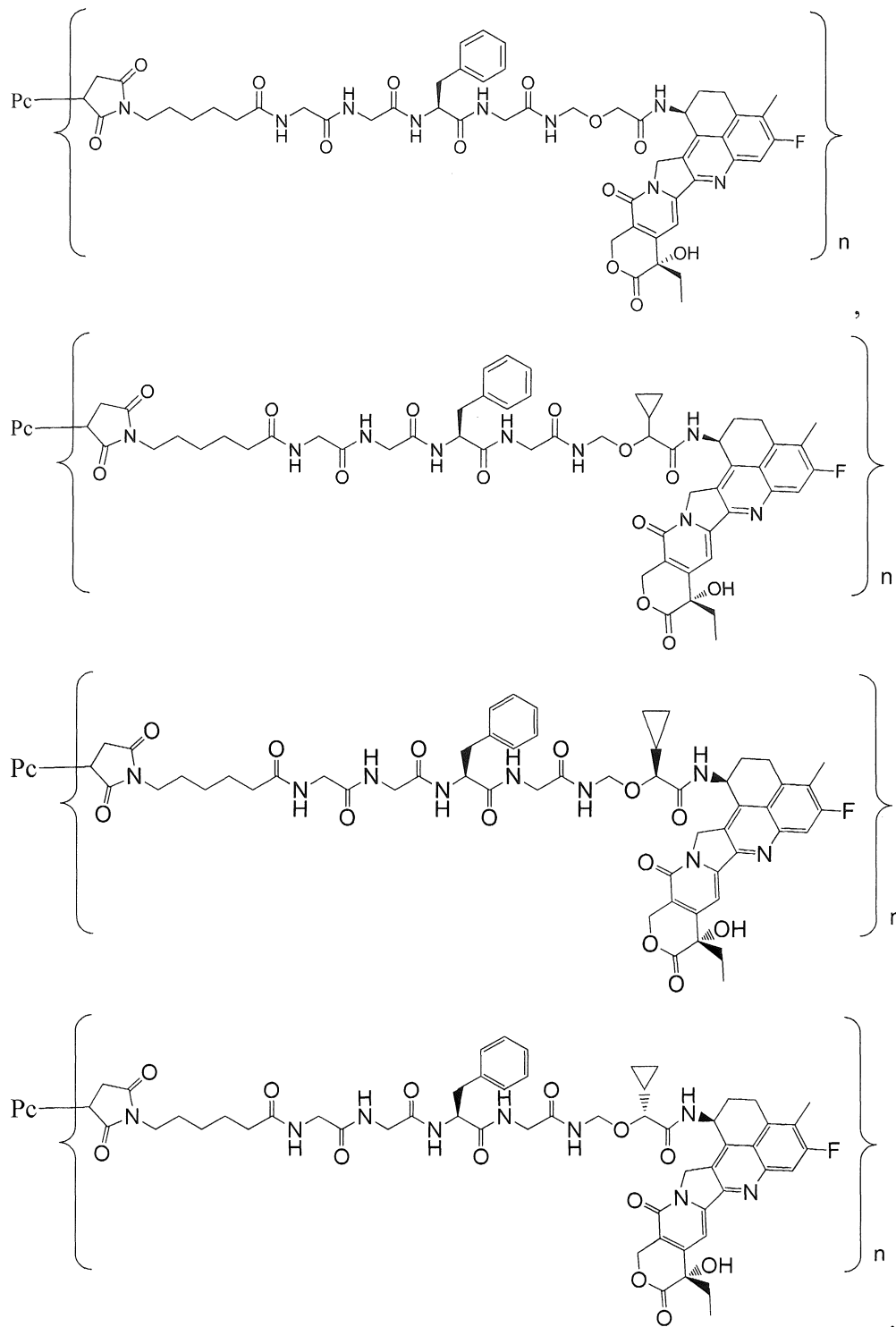
Pc, R^1 , R^2 , R^5 , R^6 , R^7 , m và n là như được xác định theo điểm 8.

10. Thở tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 8 hoặc 9, trong đó -L_a-Y- hoặc -L_b-Y- được chọn từ nhóm bao gồm:



11. Thở tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-10, như được thể hiện trong công thức cấu

trúc được chọn từ nhóm bao gồm công thức sau:

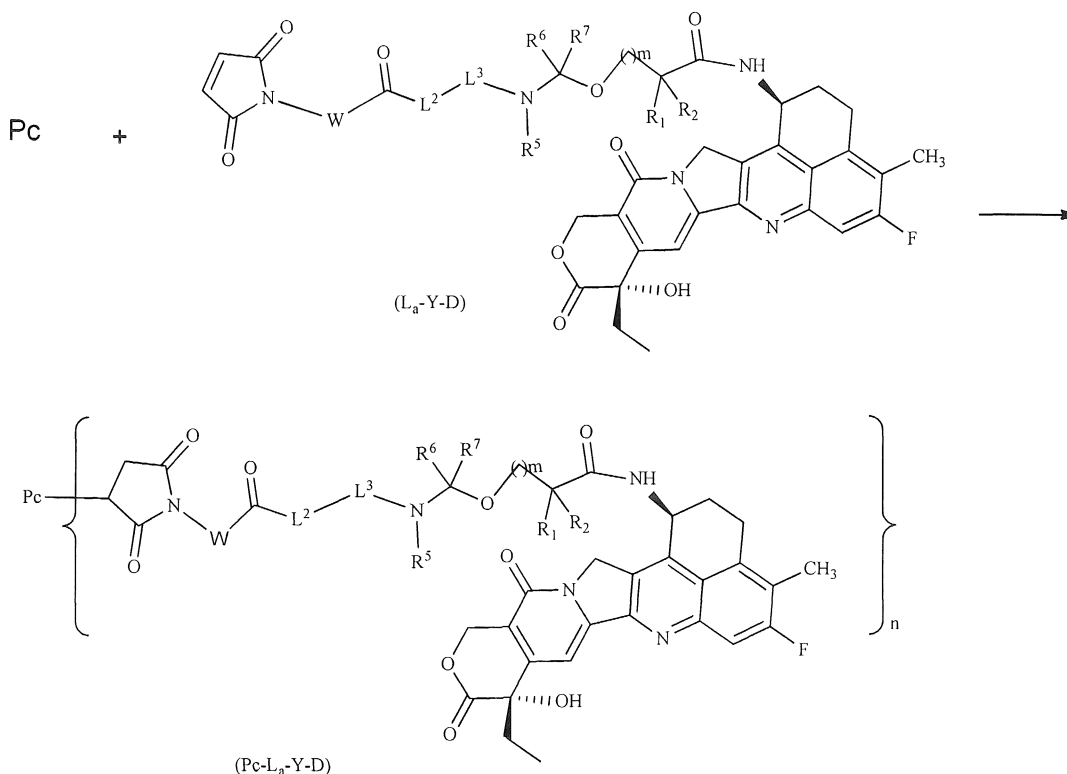


trong đó:

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân, ưu tiên là, n là số nguyên hoặc số thập phân từ 1 đến 6; và

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7.

12. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-11, bao gồm bước sau:



đưa Pc khử vào phản ứng nối với hợp chất có công thức chung L_a-Y-D thu được thể tiếp hợp phối tử-dược chất có công thức chung Pc-L_a-Y-D;

trong đó:

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7; và

W, L², L³, R¹, R², R⁵, R⁶, R⁷, m và n là như được xác định theo điểm 8.

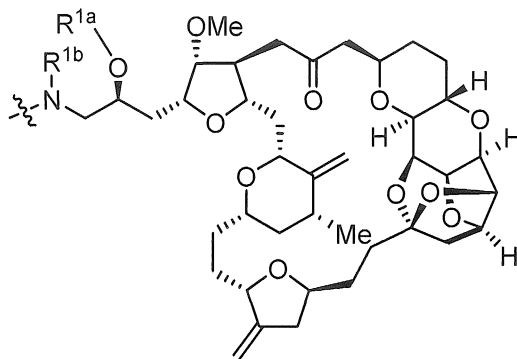
13. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, như được thể hiện trong công thức chung Pc-(L-D)_k, trong đó:

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7;

L là đoạn nối;

k là số nguyên hoặc số thập phân từ 1 đến 20; và

D là như được thể hiện trong công thức (III):



công thức (III),

trong đó,

R^{1a} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl, trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl là độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkoxy, halogen, đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1a} là metyl;

R^{1b} được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, alkoxy, cycloalkyl, aryl và heteroaryl,

trong đó mỗi alkyl, cycloalkyl, aryl và heteroaryl là độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm alkyl, alkoxy, halogen, đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; ưu tiên là, R^{1b} là hydro; hoặc

R^{1a} và R^{1b} , cùng với nguyên tử mà chúng được gắn vào, tạo thành C_{5-8} heterocycloalkyl, trong đó heterocycloalkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế trong số alkyl, alkoxy, halogen, đotori, amino, cyano, nitro, hydroxy, hydroxyalkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, aryl và heteroaryl; và R^{1a} và R^{1b} cả hai không phải là hydro.

14. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 13, trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

15. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 13, trong đó đoạn nối này chứa gốc peptit có thể phân cắt.

16. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 15, trong đó gốc peptit có thể phân cắt này có thể cắt bằng enzyme, trong đó ưu tiên là, enzyme này là cathepsin, và ưu tiên hơn là cathepsin B.

17. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo

điểm 15 hoặc 16, trong đó:

đoạn nối này chứa gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin,

trong đó các axit amin này được chọn từ nhóm bao gồm phenylalanin, glycin, valin, lysin, citrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic;

ưu tiên hơn là, gốc peptit này được chọn từ nhóm bao gồm valin-citrullin, alanin-alanin-asparagin, glycin-glycin-lysin, valin-lysin, valin-alanin, valin-phenylalanin, và glycin-glycin-phenylalanin-glycin.

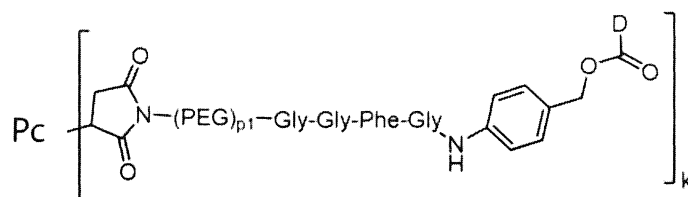
18. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 13, trong đó đoạn nối này chứa gốc sulfonamid có thể phân cắt hoặc gốc disulfua có thể phân cắt.

19. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 18, trong đó đoạn nối này có thể phân cắt dưới các điều kiện khử.

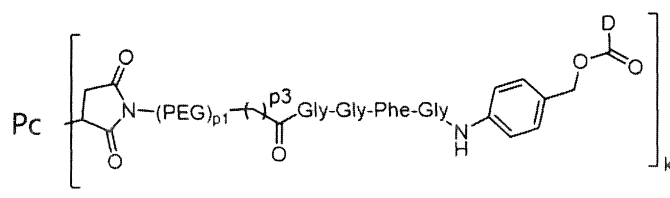
20. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13-19, trong đó đoạn nối này chứa đơn vị đệm được gắn với D.

21. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 20, trong đó đơn vị đệm chứa *p*-aminobenzyloxycarbonyl (PAB).

22. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13-21, như được thể hiện trong một cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc sau:

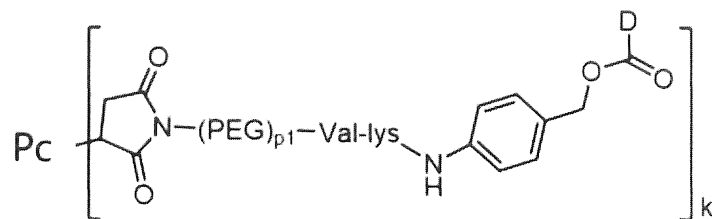


trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;

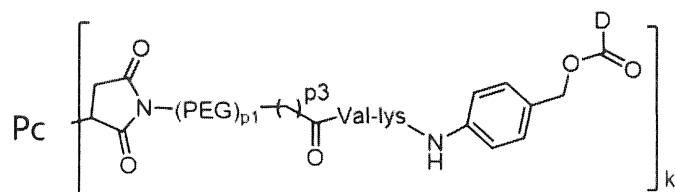


trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ

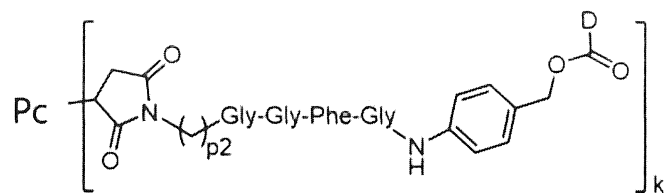
nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



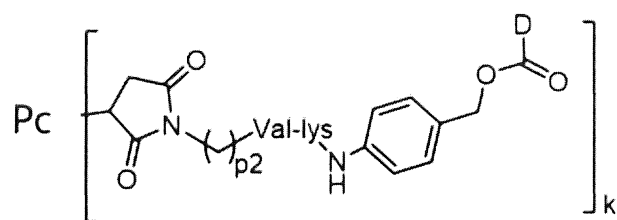
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



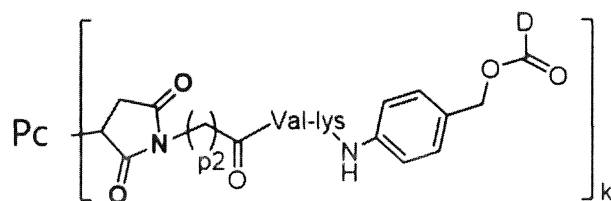
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



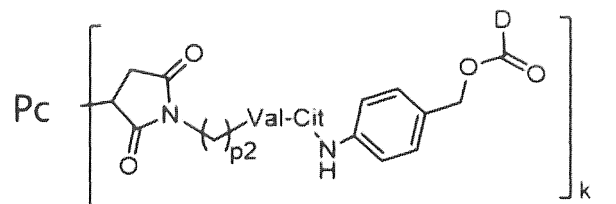
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



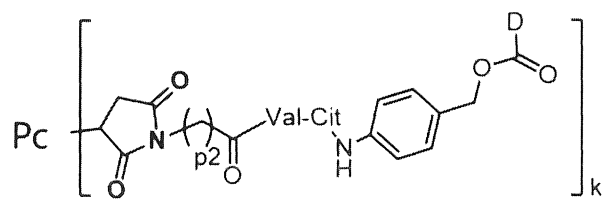
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



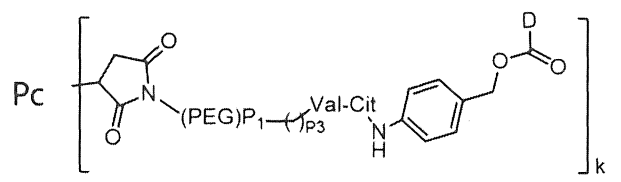
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



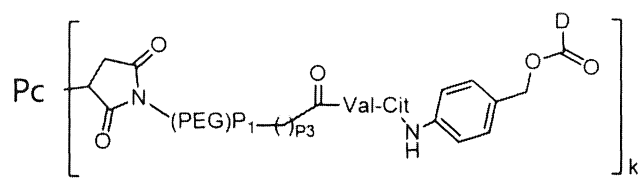
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;



trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và p2 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8;

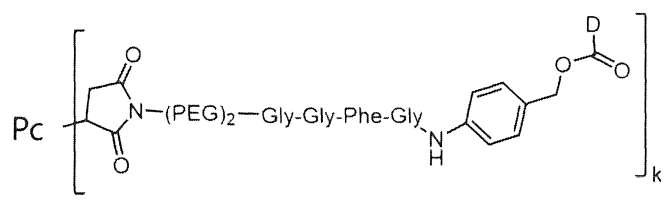


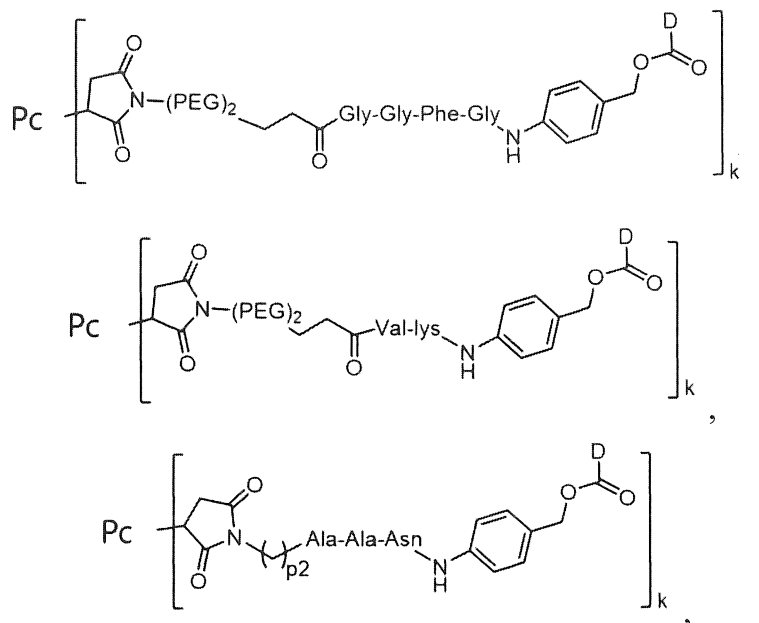
trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2;



trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; p1 được chọn từ nhóm bao gồm 2, 4, 6 và 8; và P3 được chọn từ nhóm bao gồm 0, 1 và 2.

23. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó theo điểm 22, như được thể hiện trong một cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc sau:

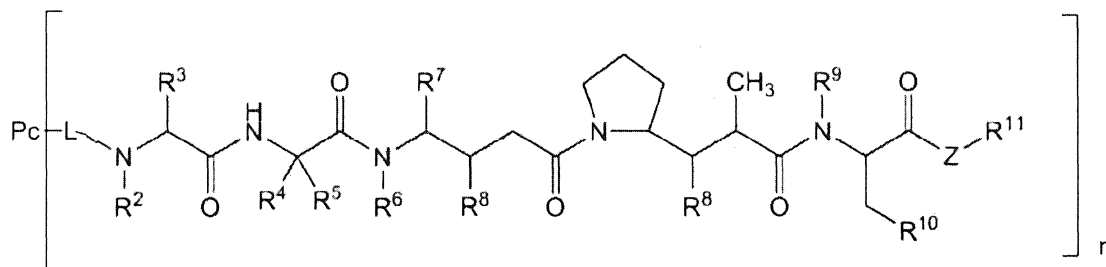




trong đó k được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10, và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

ưu tiên là, trong D, R^{1a} là methyl và R^{1b} là hydro.

24. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, như được thể hiện trong công thức (IV):



công thức (IV)

trong đó,

R² là C₁-C₈ alkyl;

R³ là C₁-C₈ alkyl;

R⁴ là C₁-C₈ alkyl;

R⁵ là H;

R⁶ là C₁-C₈ alkyl;

R⁷ là C₁-C₈ alkyl;

mỗi R⁸ độc lập là O-(C₁-C₈ alkyl);

R⁹ là H;

R¹⁰ là phenyl;

Z là O hoặc NH;

R¹¹ được chọn từ nhóm bao gồm H, C₁-C₂₀ alkyl và -(R¹³O)₃-R¹⁴;

R^{13} là C_2-C_8 alkyl;

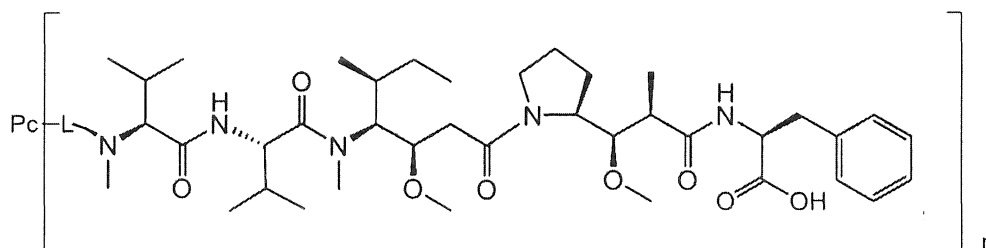
R^{14} là C_1-C_8 alkyl;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định trong các điểm 1-7;

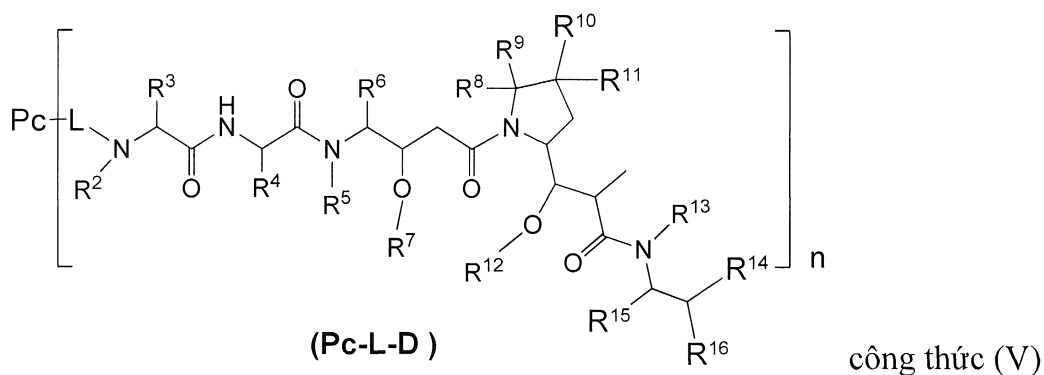
L là đoạn nối; và

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

25. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 24, chứa cấu trúc như được thể hiện dưới đây:



26. Thẻ tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, chứa cấu trúc như được thể hiện trong công thức (V):



trong đó R^2-R^6 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, hydroxy, cyano, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

R^7 được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

hai bất kỳ trong số R^8-R^{11} tạo thành cycloalkyl, và hai nhóm còn lại được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl và cycloalkyl;

R^{12} được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro và alkyl;

$R^{13}-R^{15}$ được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, hydroxy, alkyl, alkoxy và halogen;

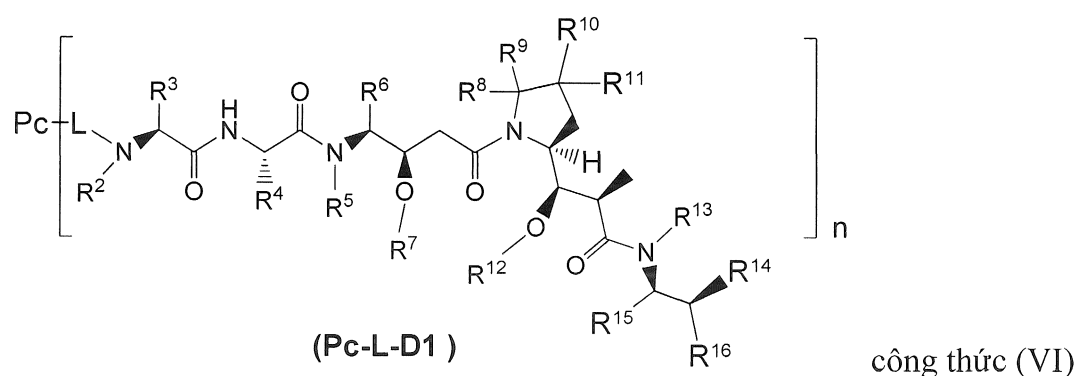
R^{16} được chọn từ nhóm bao gồm aryl và heteroaryl, trong đó aryl và heteroaryl này tùy ý được thế bằng phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, halogen, hydroxy, alkyl, alkoxy và cycloalkyl;

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7; và

L là đoạn nối.

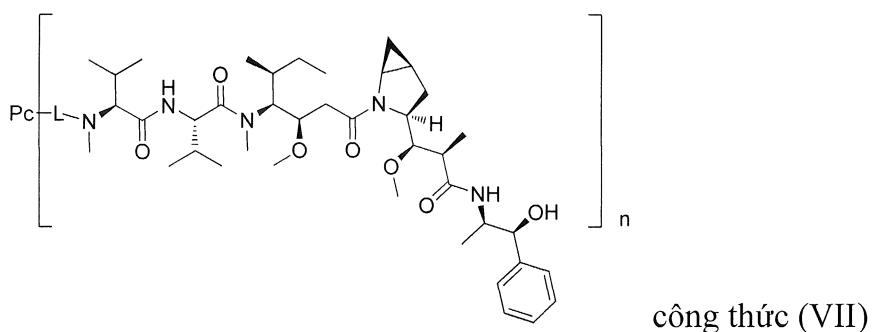
27. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, chứa cấu trúc như được thể hiện trong công thức (VI):



trong đó n và R^2 - R^{16} là như được xác định theo điểm 26;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7; và L là đoạn nối.

28. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7, như được thể hiện trong công thức (VII):



n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7; và

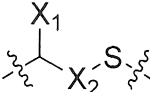
L là đoạn nối.

29. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24-28, trong đó:

n là từ 1 đến 8 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

ưu tiên là, n là từ 1 đến 6 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân.

30. Thể tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24-29, trong đó đoạn nối này là $-Y-L^1-L^2-L^3-L^4$, trong đó:

Y được chọn từ nhóm bao gồm  và liên kết hóa học, trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm nguyên tử hydro, alkyl, alkoxy, aryl và halogen, và X_2 được chọn từ alkylen, alkylen này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đotori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

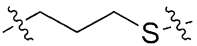
L^1 được chọn từ nhóm bao gồm $-(\text{succinimid-3-yl-N})-W-C(O)-$, $-\text{CH}_2-C(O)-\text{NR}^{17}-W-C(O)-$ và $-C(O)-W-C(O)-$, trong đó W được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-8} alkyl, C_{1-8} alkyl-cycloalkyl và heteroalkyl thẳng có từ 1 đến 8 nguyên tử, heteroalkyl này chứa từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm N, O và S, trong đó mỗi C_{1-8} alkyl, cycloalkyl và heteroalkyl thẳng độc lập và tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đotori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

L^2 được chọn từ nhóm bao gồm $-\text{NR}^{18}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{NR}^{18}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{S}(\text{CH}_2)^{p^1}\text{C(O)-}$ và liên kết hóa học, trong đó p^1 là số nguyên từ 1 đến 20; ưu tiên là, L^2 là liên kết hóa học;

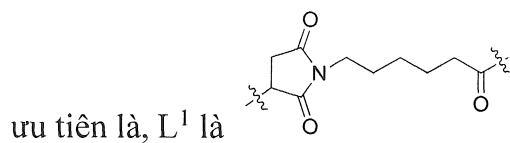
L^3 là gốc peptit chứa từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin, citrullin và metyl valin, trong đó các axit amin này tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halogen, hydroxy, cyano, amino, alkyl, cloalkyl, alkyl được đotori hóa, alkoxy và cycloalkyl;

R^{17} và R^{18} là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ nhóm bao gồm hydro, alkyl, haloalkyl, alkyl được đotori hóa và hydroxyalkyl; và

L^4 là đơn vị kéo dài, ưu tiên là, L^4 là PAB.

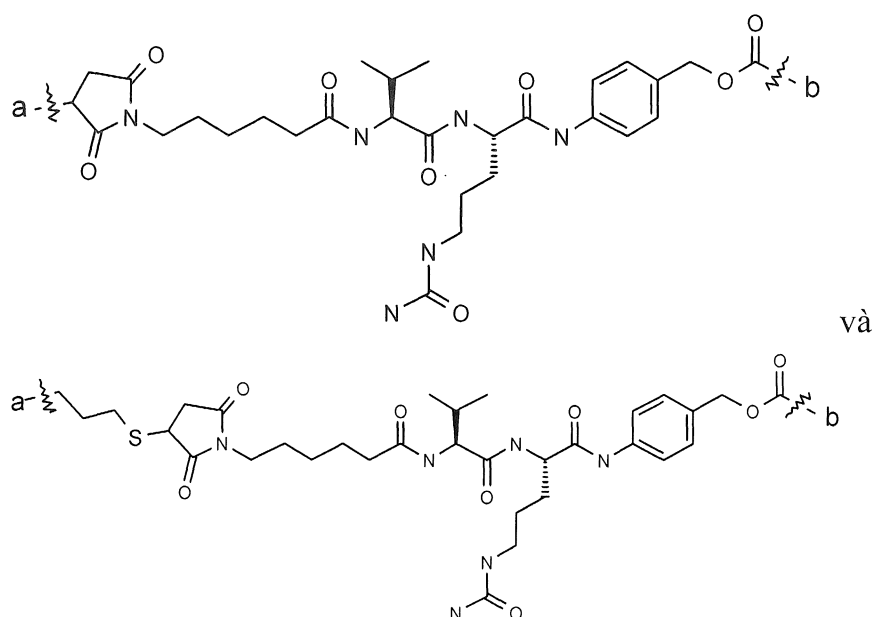
31. Thể tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 30, trong đó Y là .

32. Thể tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 30, trong đó L^1 được chọn từ $-(\text{succinimid-3-yl-N})-(\text{CH}_2)^{s^1}-C(O)-$, trong đó s^1 là số nguyên từ 2 đến 8;



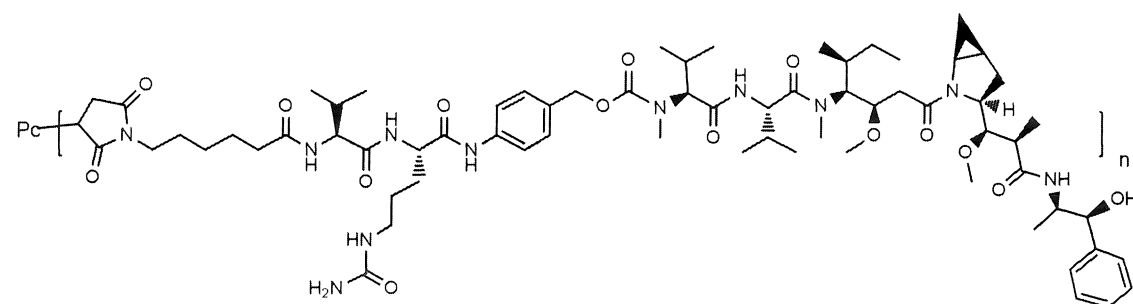
33. Thẻ tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30-32, trong đó L^3 là đơn vị axit amin dipeptit, ưu tiên là, L^3 là valin-citrullin.

34. Thẻ tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24-33, trong đó đoạn nối này được chọn từ nhóm bao gồm:

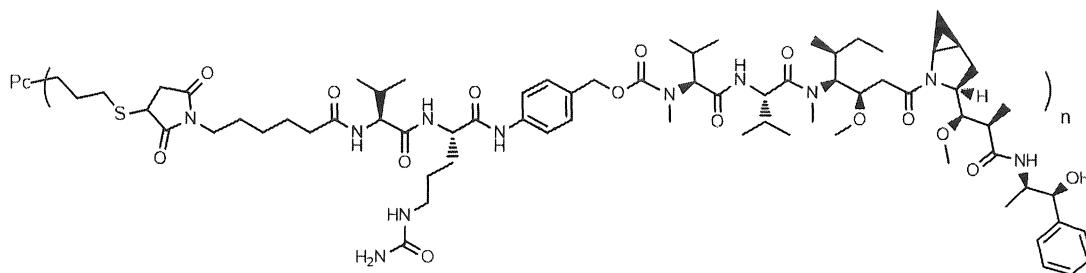


trong đó a kết thúc được nối với Pc, và b kết thúc được nối với được chất.

35. Thẻ tiếp hợp phối tử-được chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24-34, được chọn từ nhóm bao gồm các công thức cấu trúc sau:



và

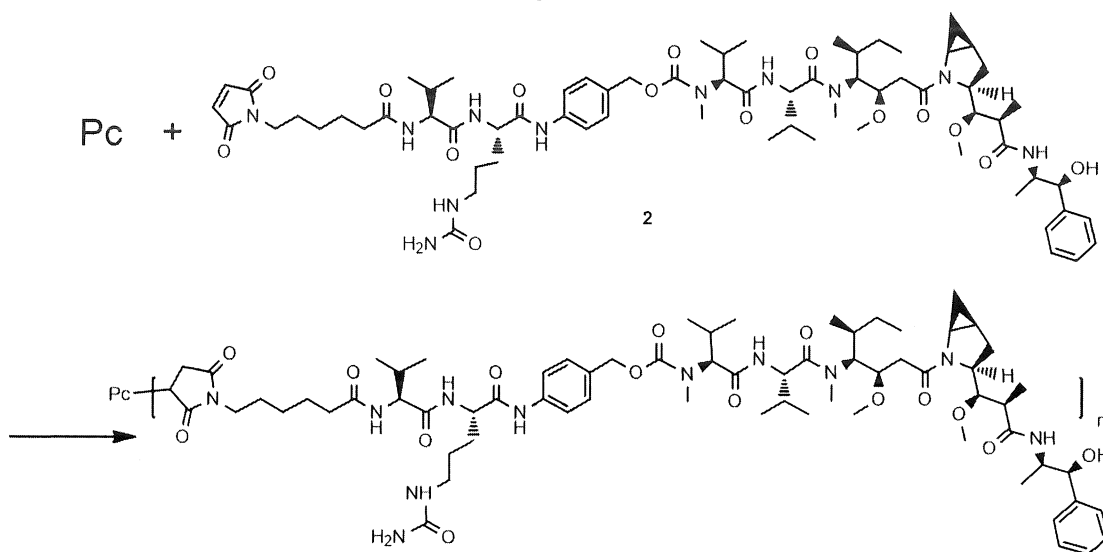


trong đó:

n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân; và

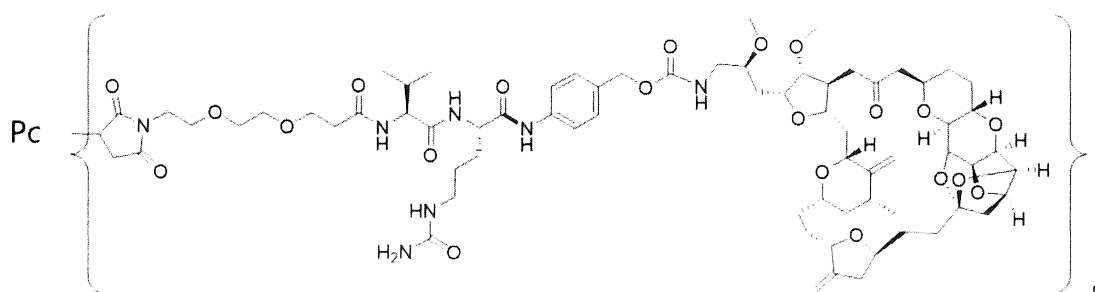
Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-7.

36. Phương pháp điều chế thể tiếp hợp phối tử-độc chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo điểm 35, bao gồm bước sau:

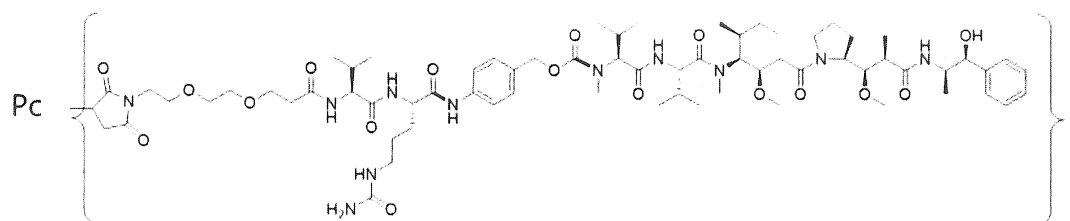


trong đó Pc và n là như được xác định theo điểm 35.

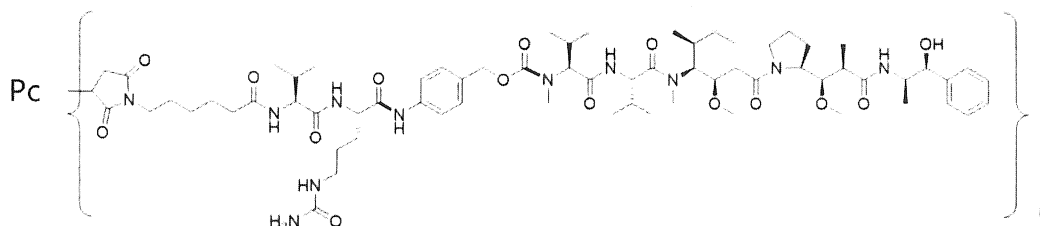
37. Thể tiếp hợp phối tử-độc chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó, như được thể hiện trong một cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc sau:



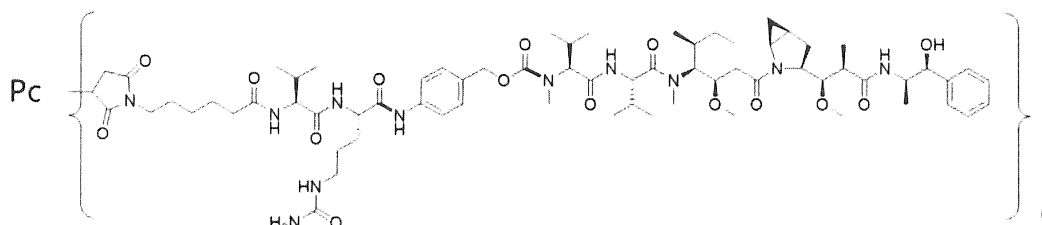
ADC-1



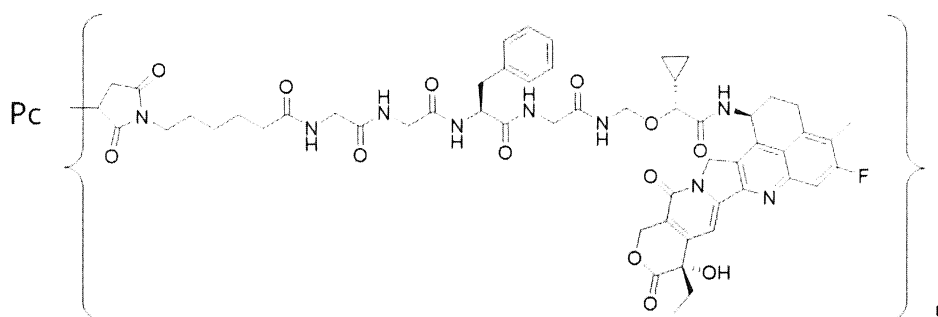
ADC-2



ADC-3



ADC-4



ADC-5

trong đó Pc là kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó như được xác định trong các điểm 1-7, và n là từ 1 đến 10 và có thể là số nguyên hoặc số thập phân;

ưu tiên là, n là số nguyên hoặc số thập phân nằm trong khoảng từ 1 đến 6.

38. Thể tiếp hợp phối tử-dược chất hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó, là đơterit hydrua hoặc hỗn hợp của nó chứa thể tiếp hợp phối tử-dược chất theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-11, 13-35 và 37.

39. Dược phẩm chứa:

chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng; và khối lượng hữu hiệu để điều trị bệnh thể tiếp hợp phổi tử-dược chất hoặc muối được dụng hoặc solvat của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-11, 13-35 và 37-38.

40. Kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, chứa: vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12.

41. Kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 40, chứa: vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 19 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 20 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này.

42. Kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 40 hoặc 41, chứa vùng hằng định Fc, trong đó ưu tiên là, Fc là IgG1, IgG2 hoặc IgG4.

43. Kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40-42, chứa chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này, và chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 29 hoặc có ít nhất 90% giống trình tự này.

44. Polynucleotit mã hóa kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40-43.

45. Tế bào chủ chứa polynucleotit theo điểm 44, trong đó ưu tiên là, tế bào chủ là vi khuẩn, nấm men hoặc tế bào động vật có vú; và ưu tiên hơn là, tế bào chủ này là *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, tế bào trứng chuột hamster Trung Quốc hoặc tế bào 293 thận phôi người.

46. Phương pháp điều chế kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm: biểu hiện kháng thể kháng CD76B người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó

trong tế bào chủ theo điểm 45, và phân tách kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó từ dịch nuôi cấy.

47. Dược phẩm chứa tác nhân hoặc hỗn hợp bất kỳ của nó được chọn từ nhóm bao gồm trong số sau:

kháng thể kháng CD79B hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40-43 hoặc polynucleotit theo điểm 44; và tùy ý, tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

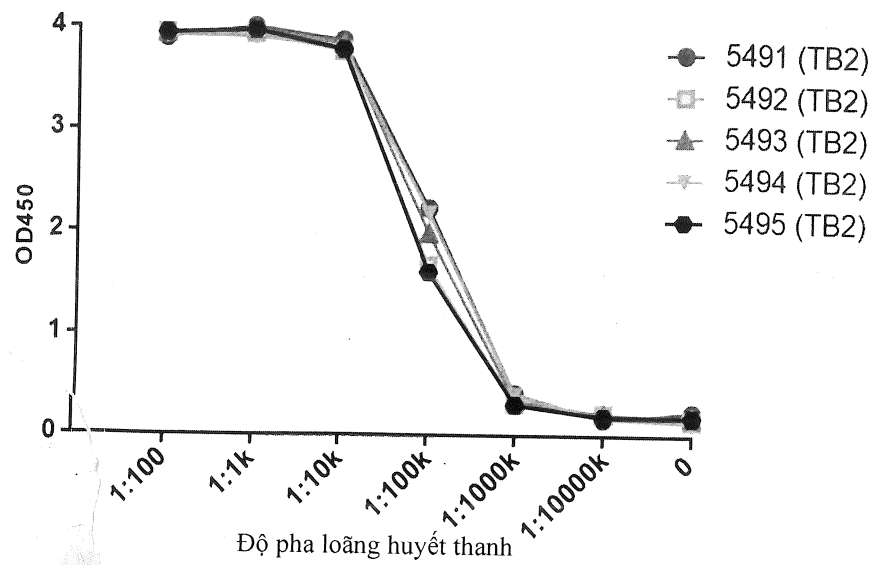


FIG. 1

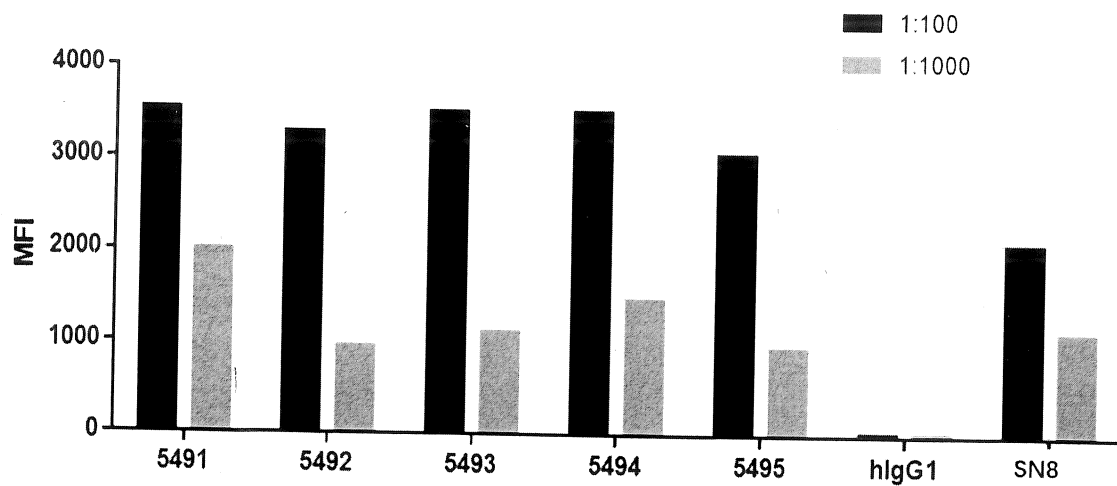


FIG. 2

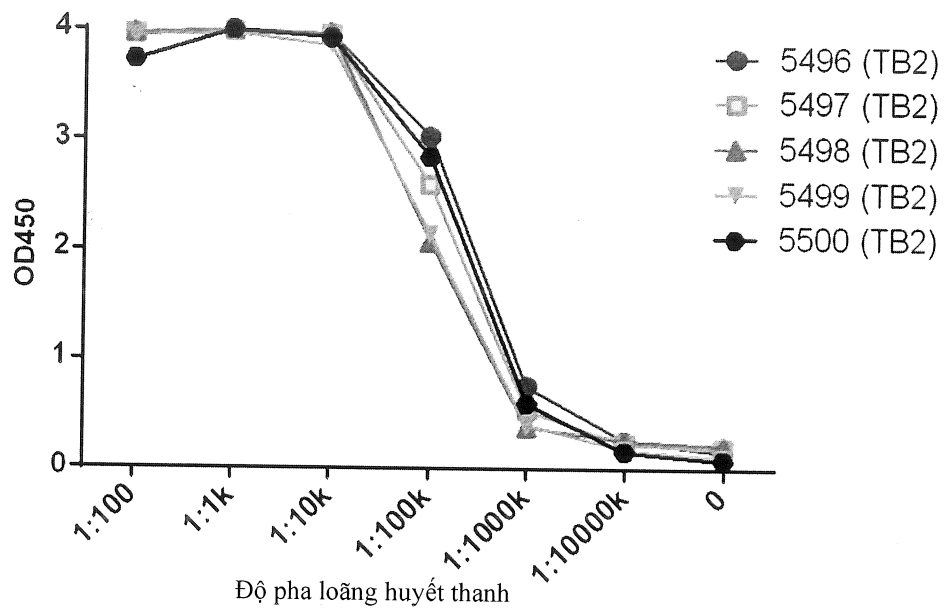


FIG. 3

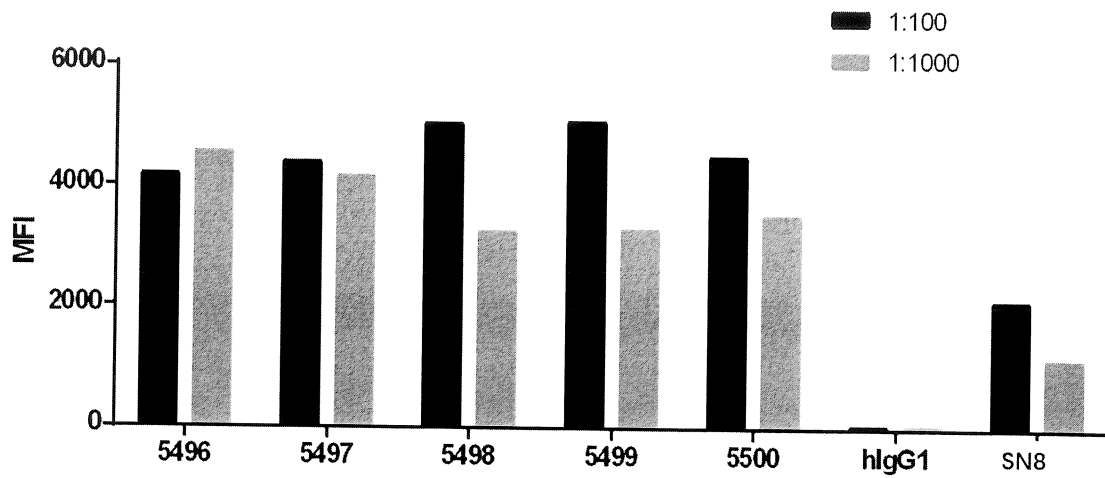


FIG. 4

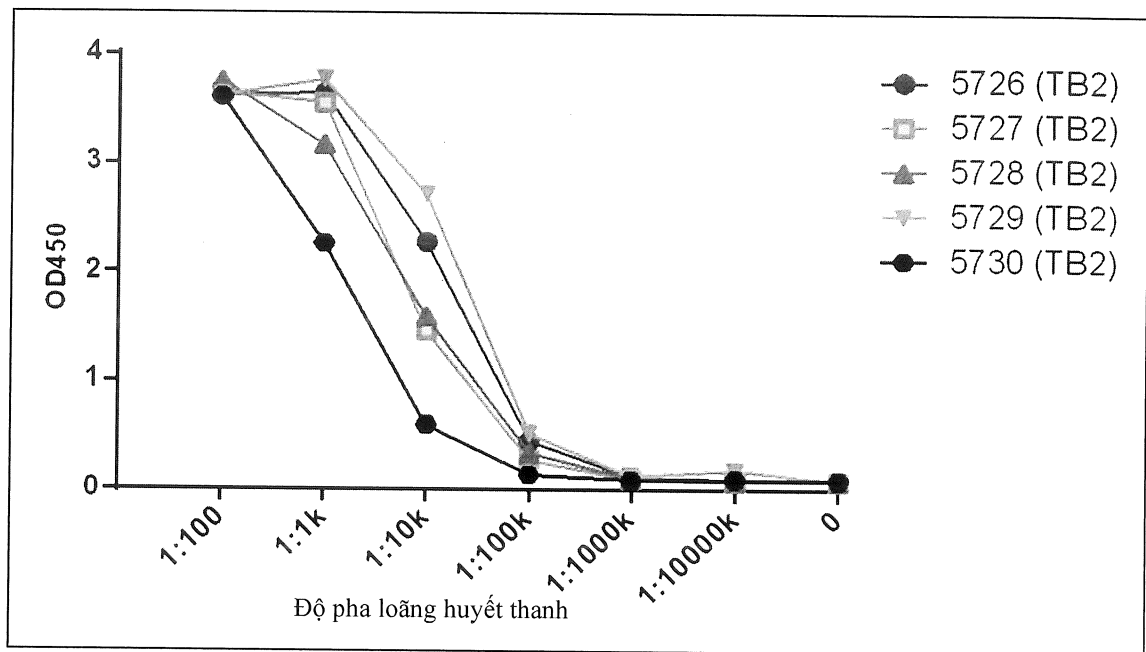


FIG. 5

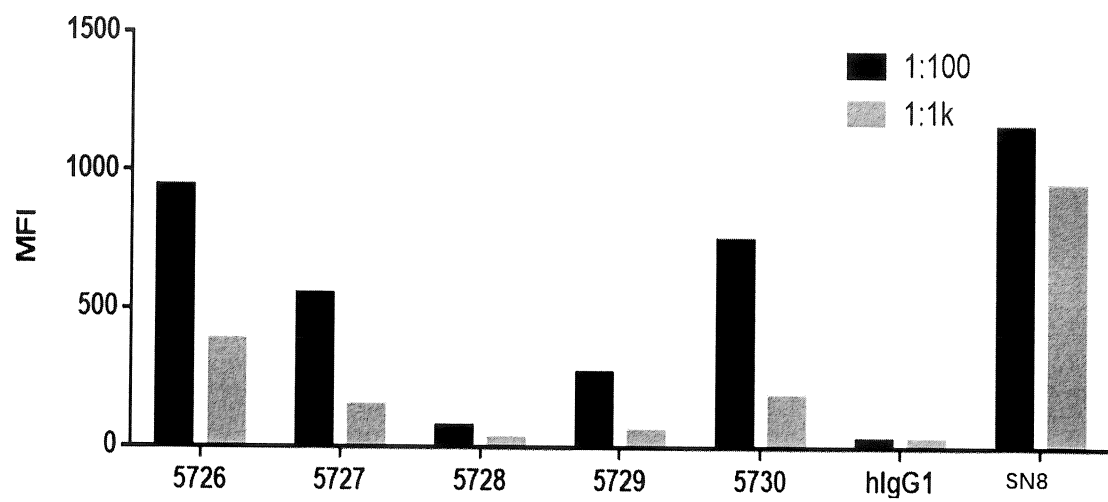


FIG. 6

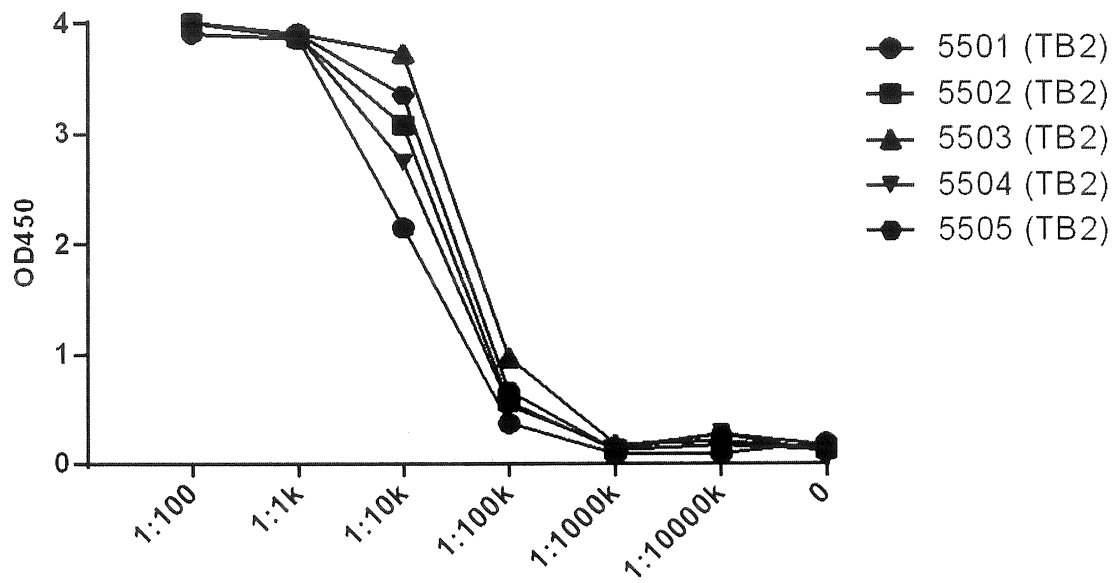


FIG. 7

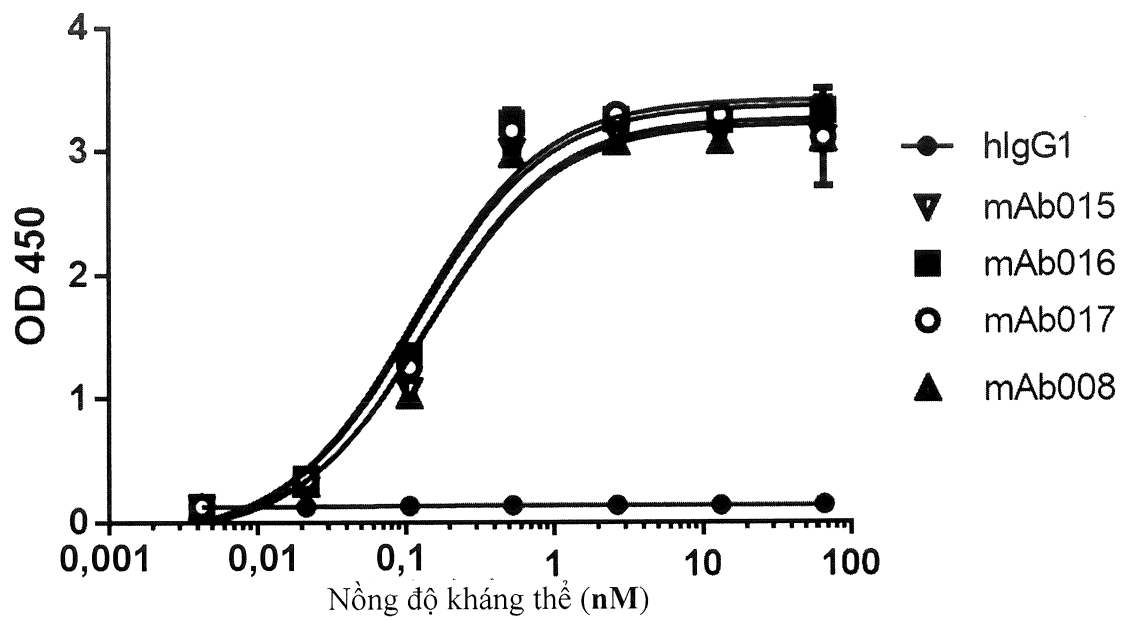


FIG. 8

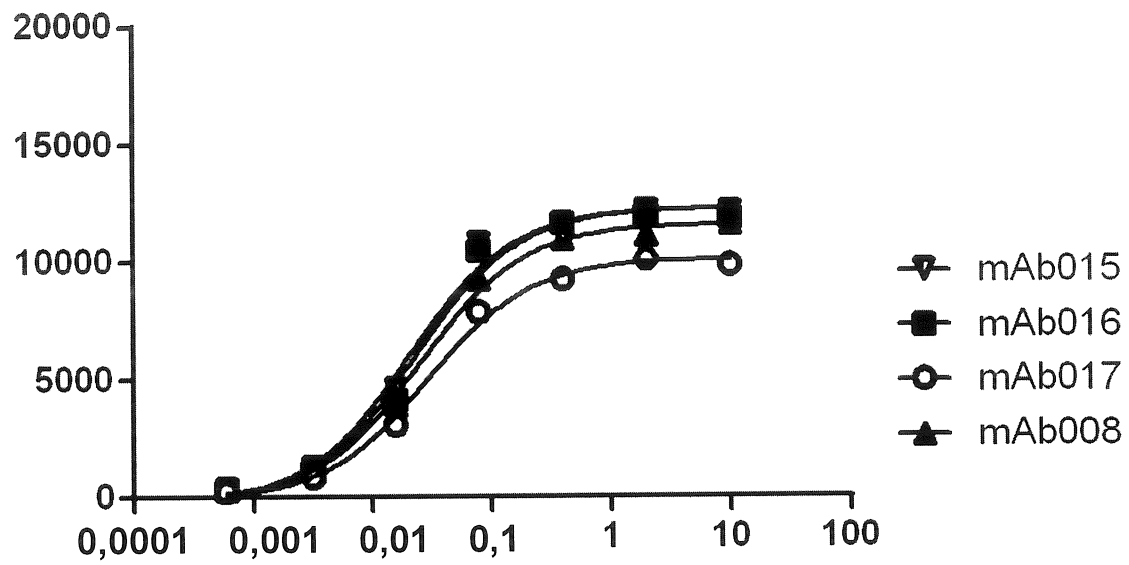


FIG. 9A

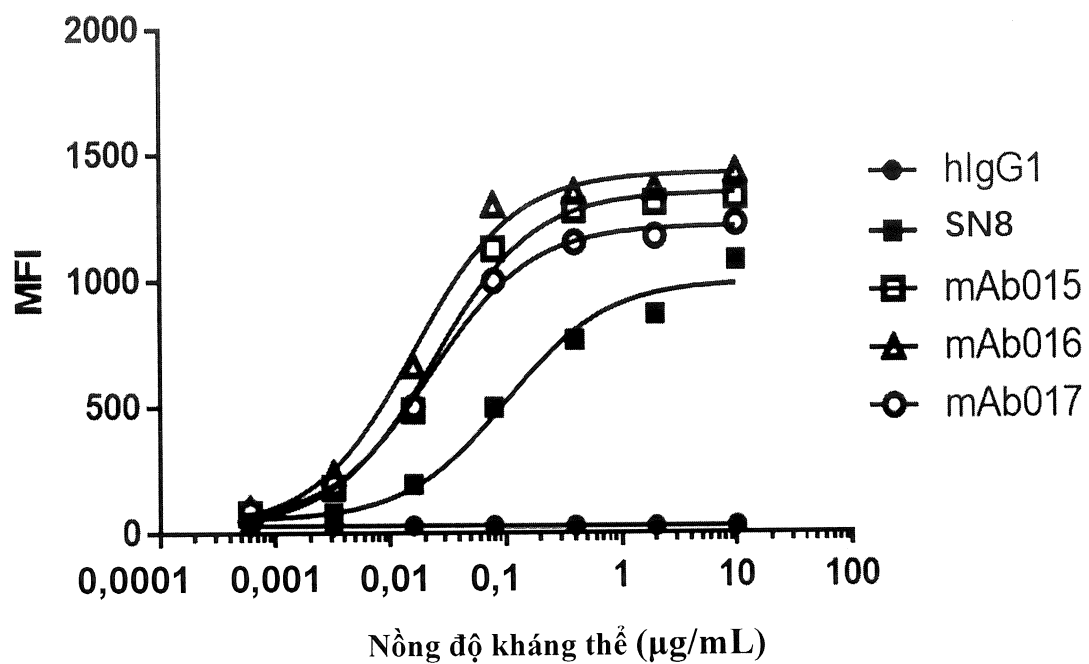


FIG. 9B

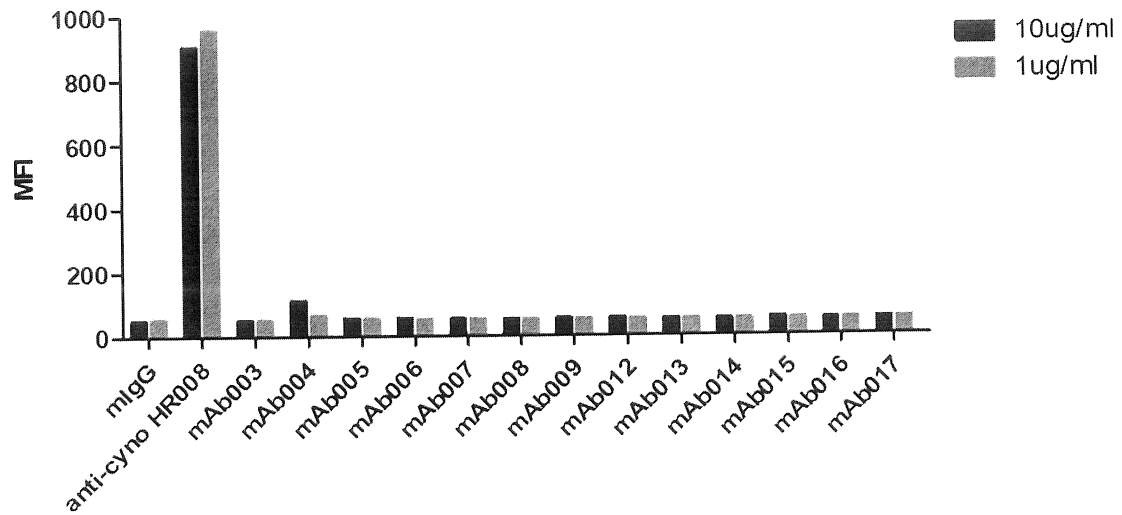


FIG. 10

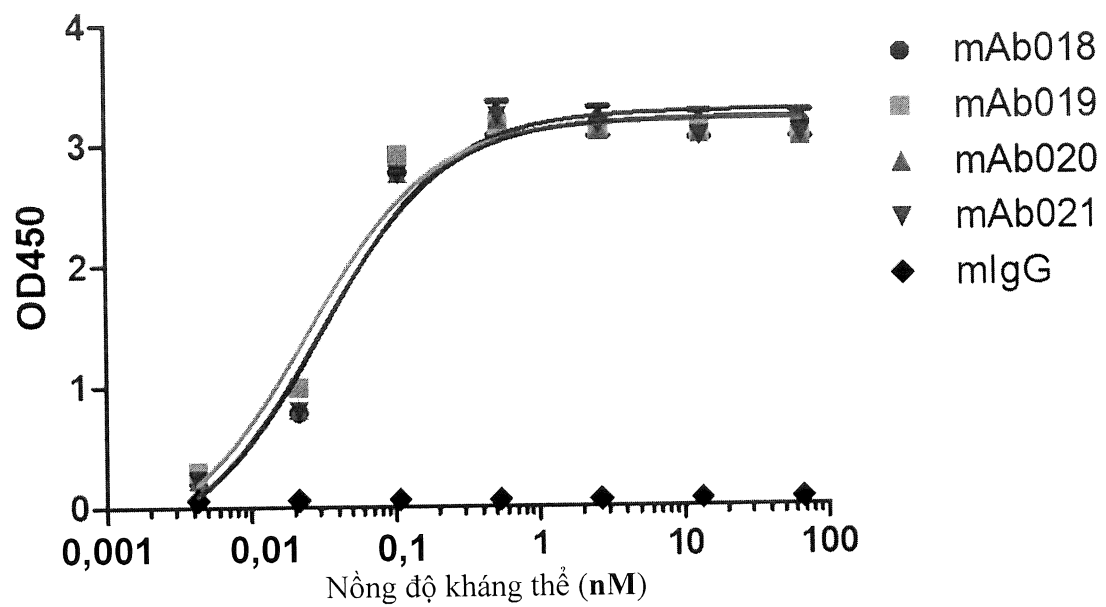
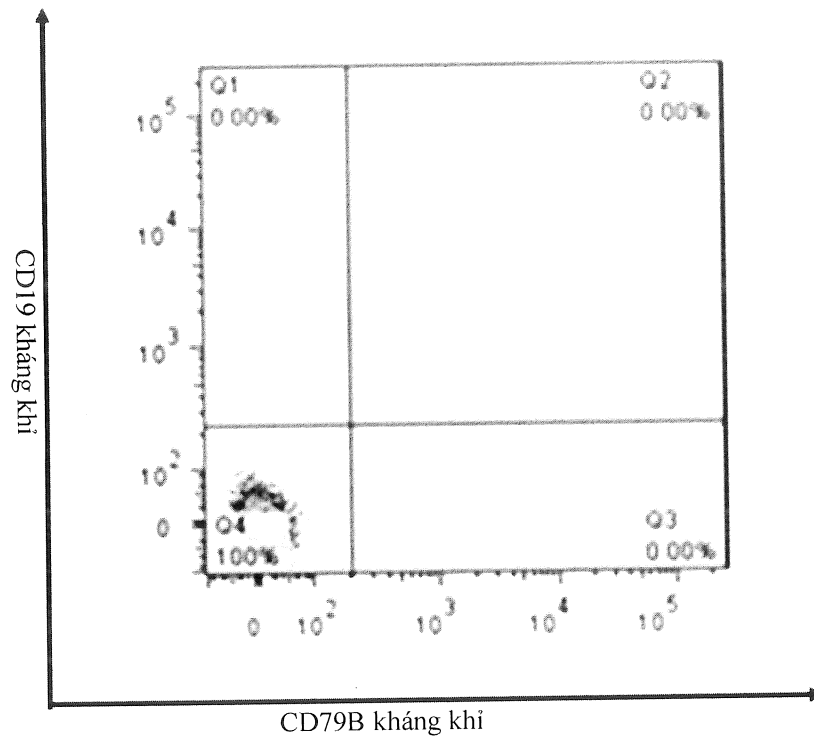
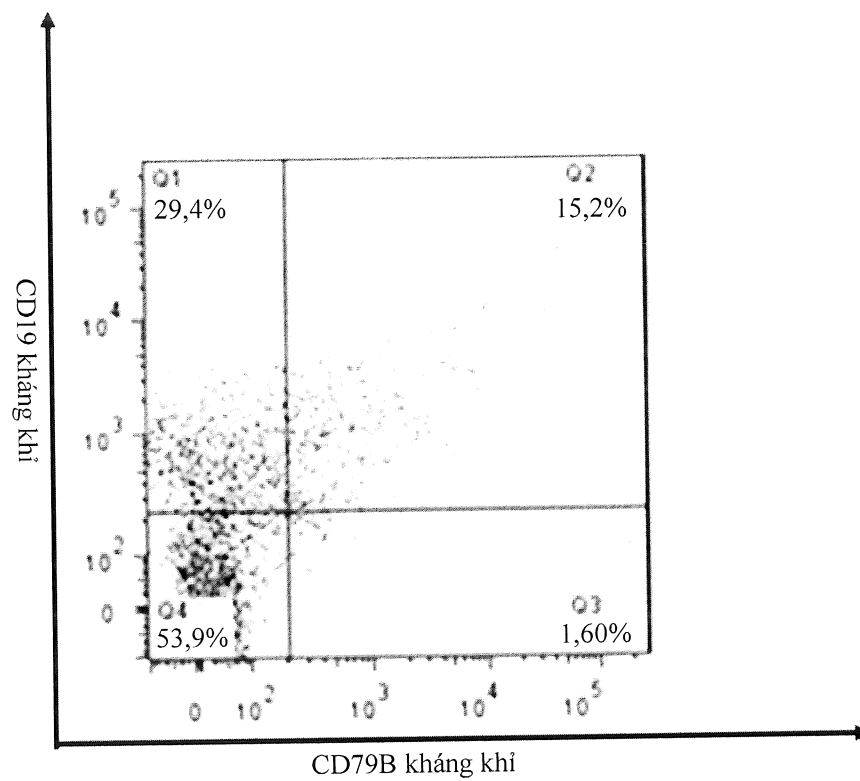
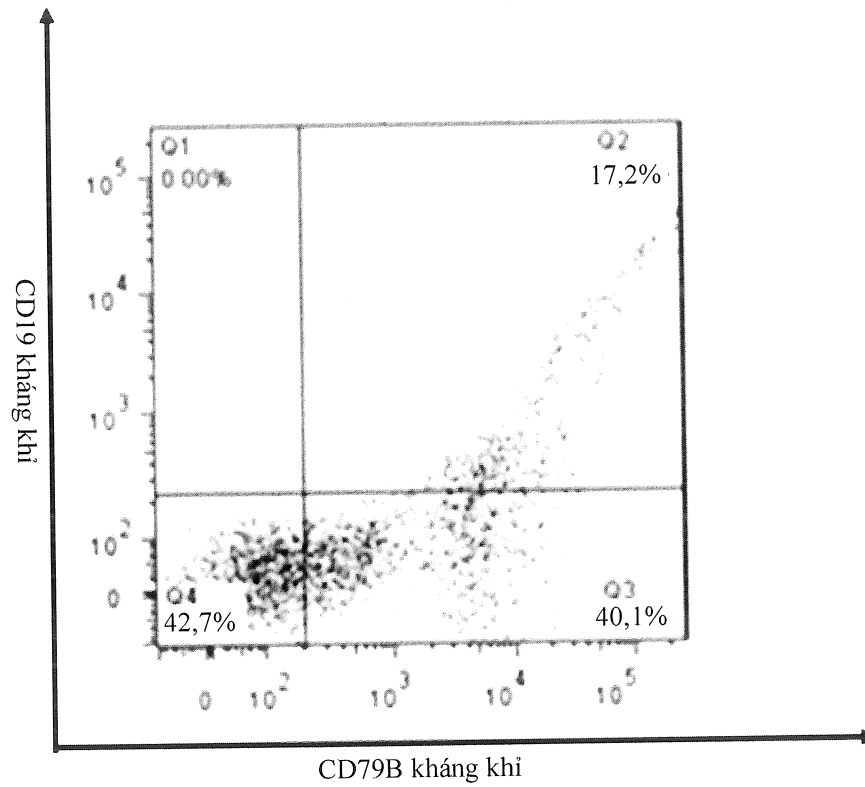
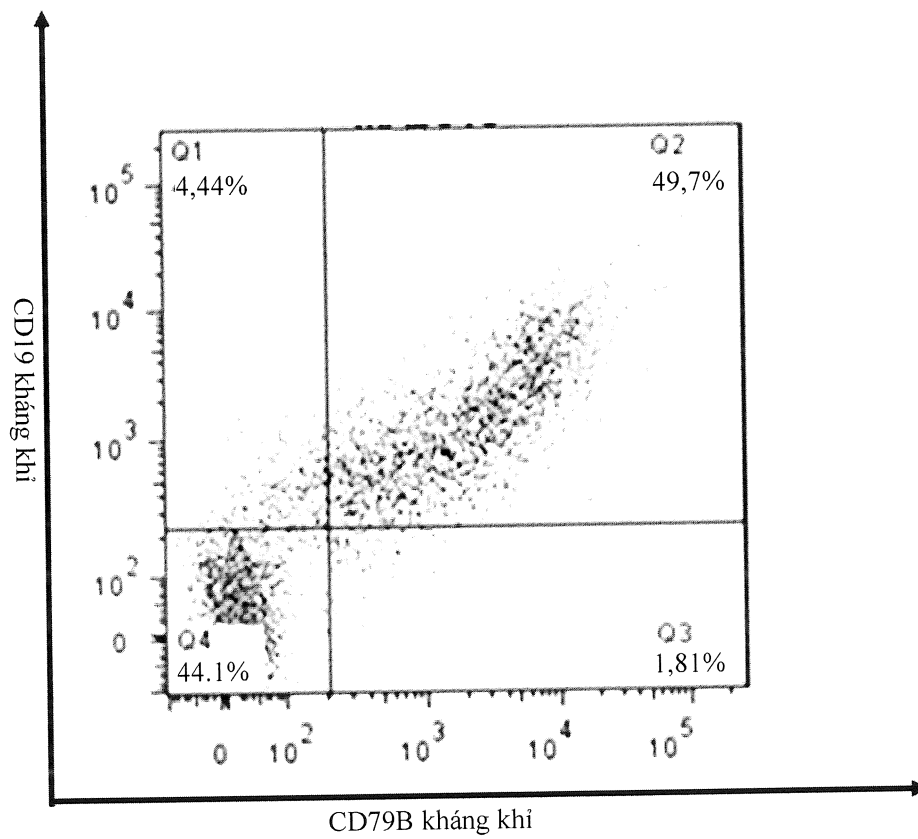


FIG. 11

**FIG. 12A****FIG. 12B**

**FIG. 12C****FIG. 12D**

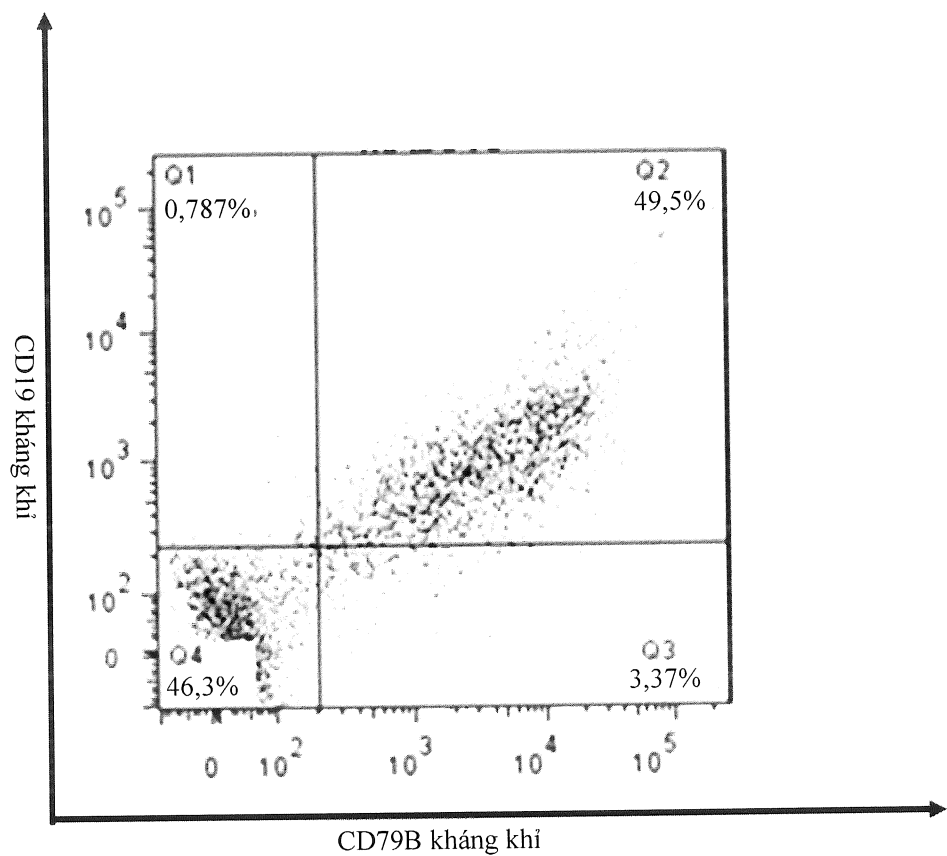


FIG. 12E

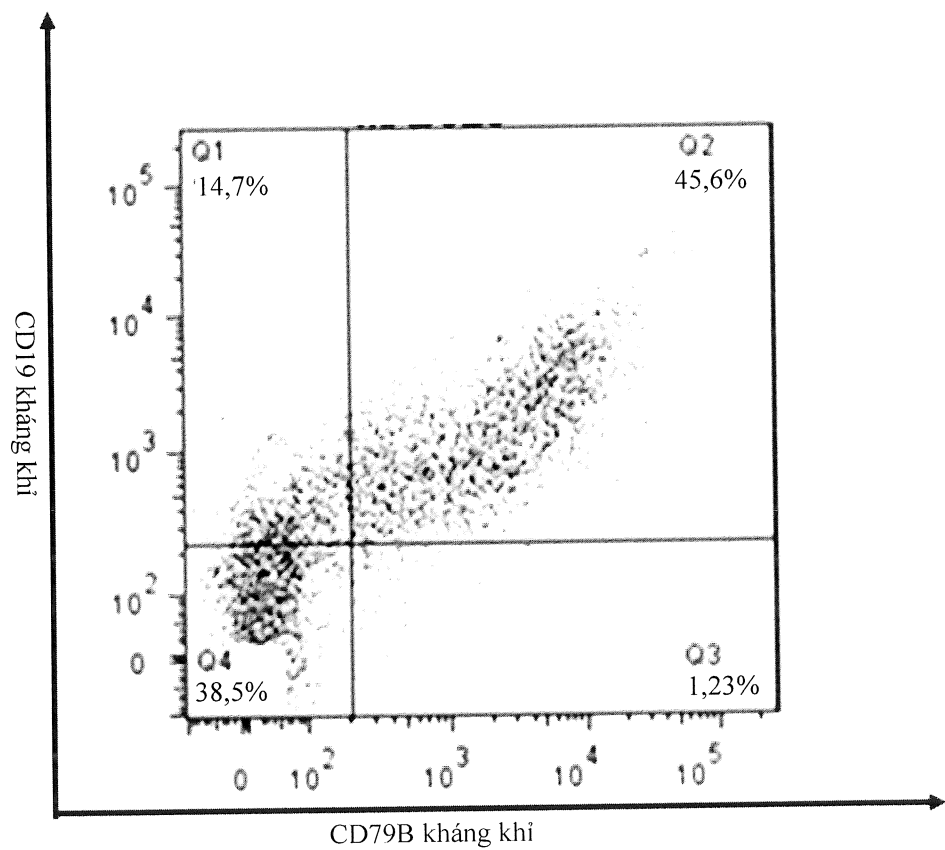


FIG. 12F

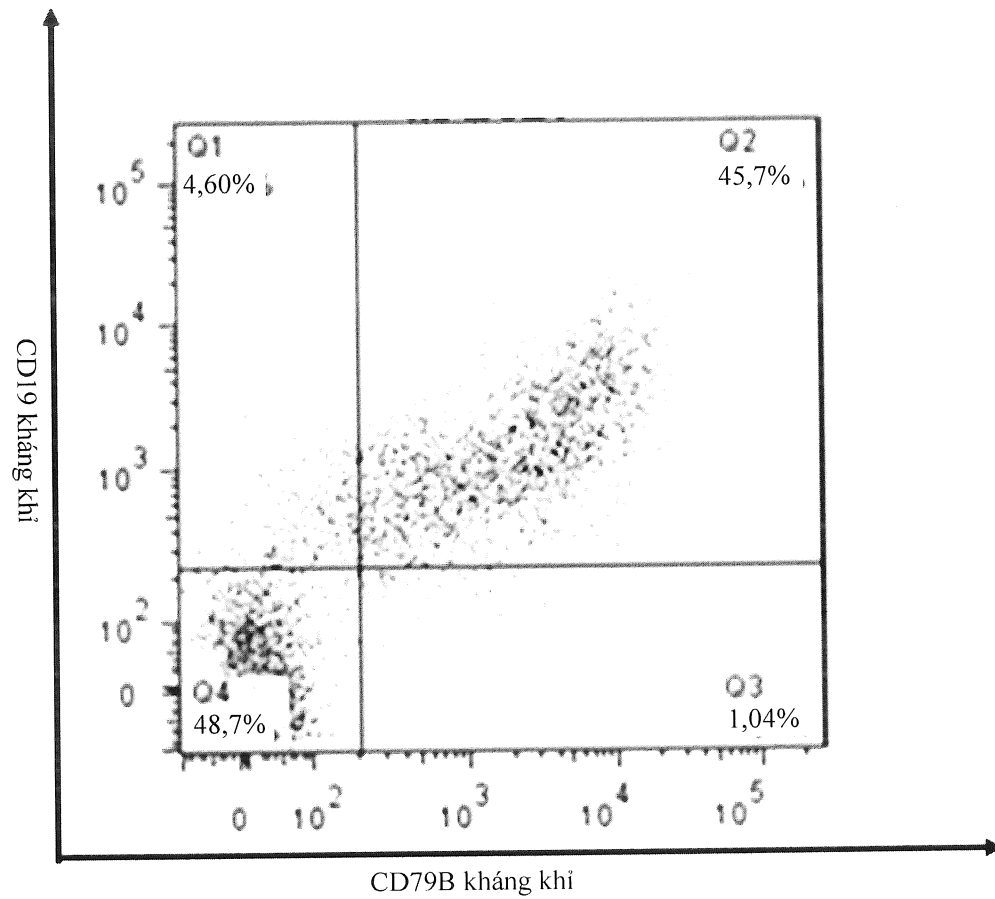


FIG. 12G

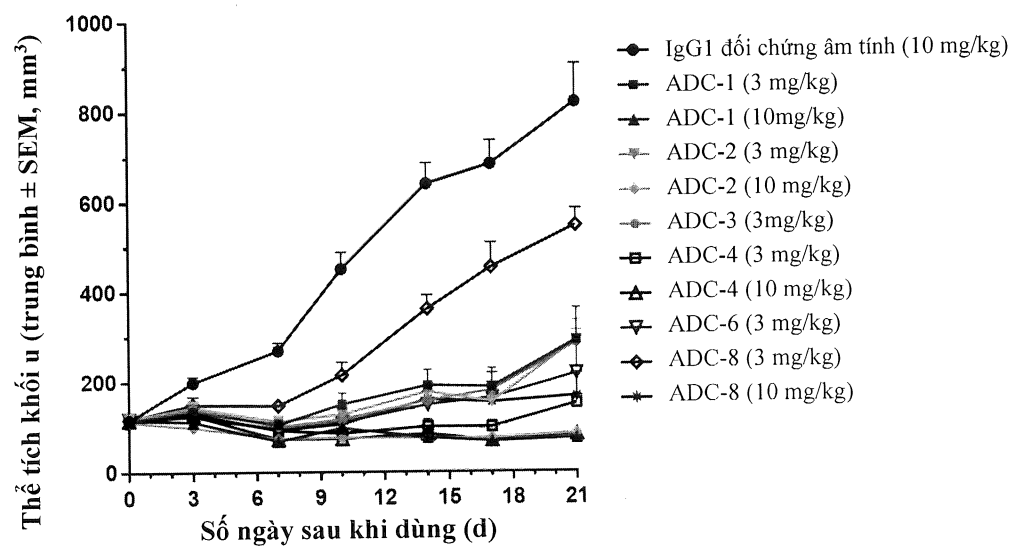


FIG. 13A

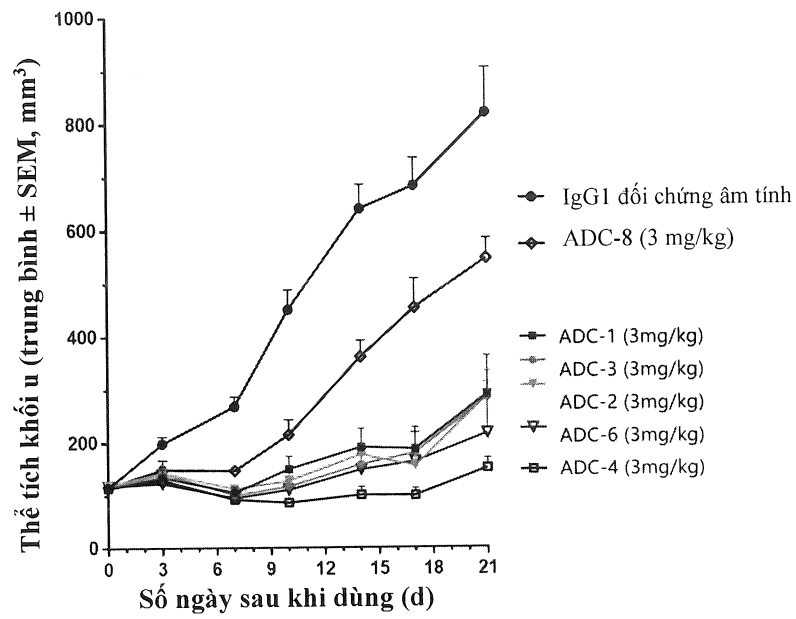


FIG. 13B

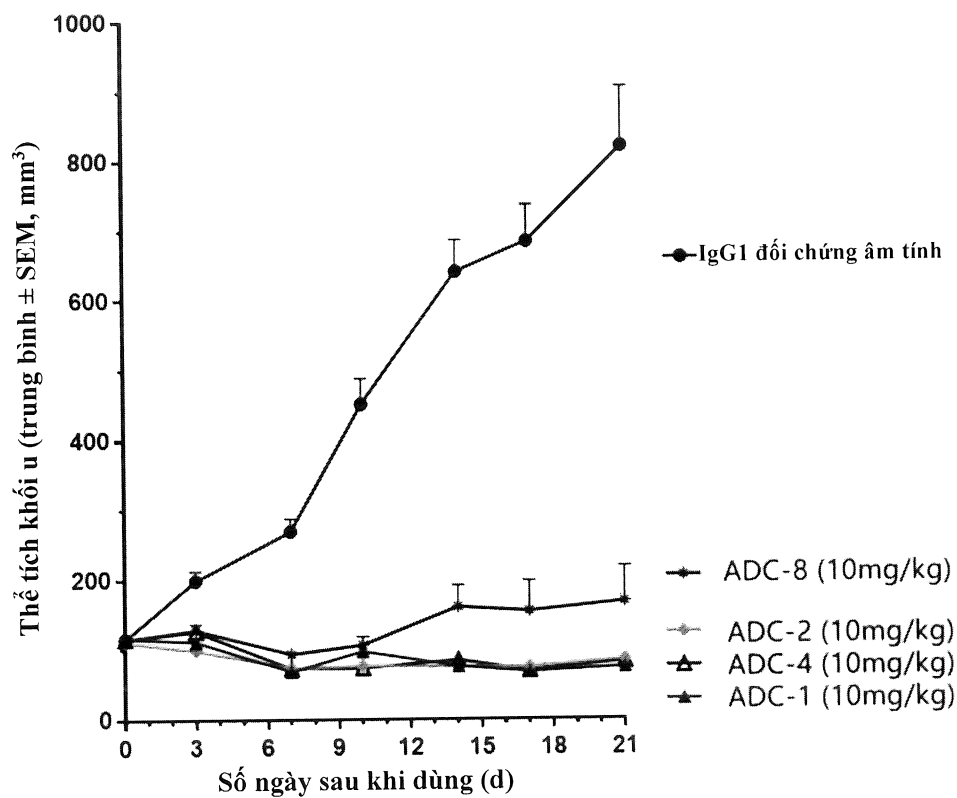


FIG. 13C

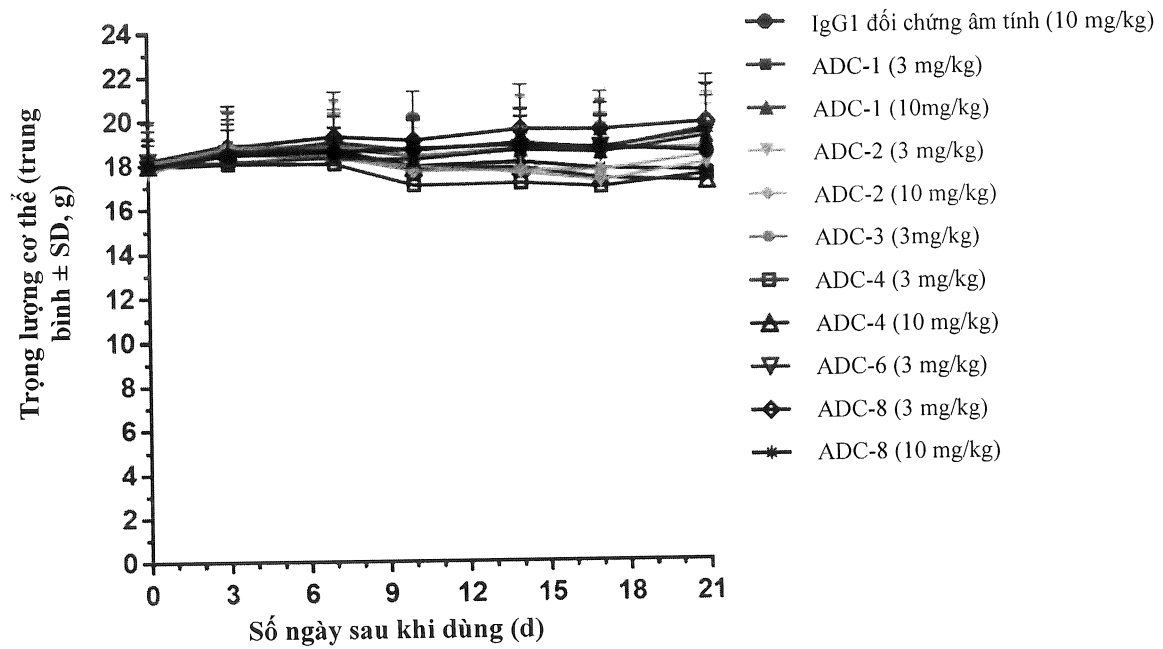


FIG. 14

WSU-DLCL2

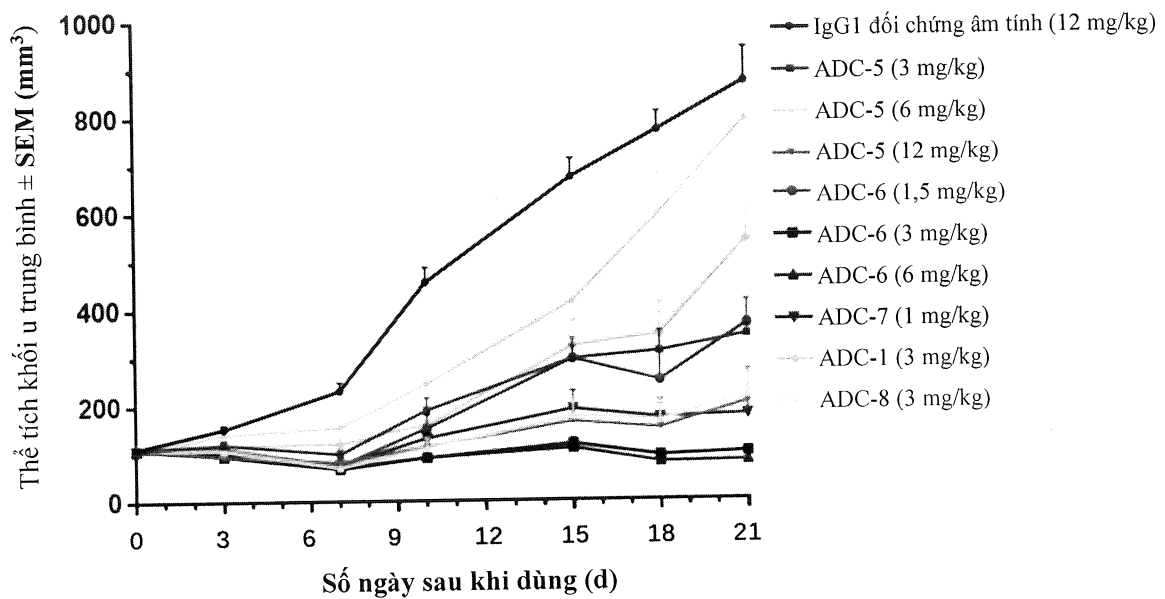


FIG. 15

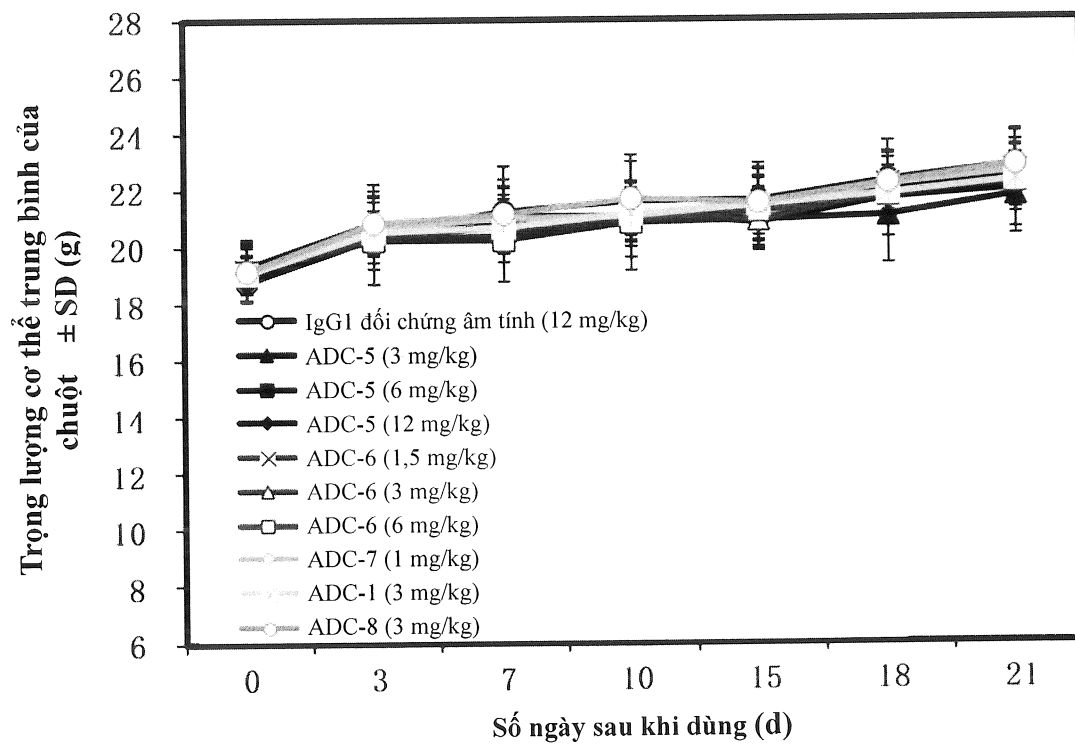


FIG. 16

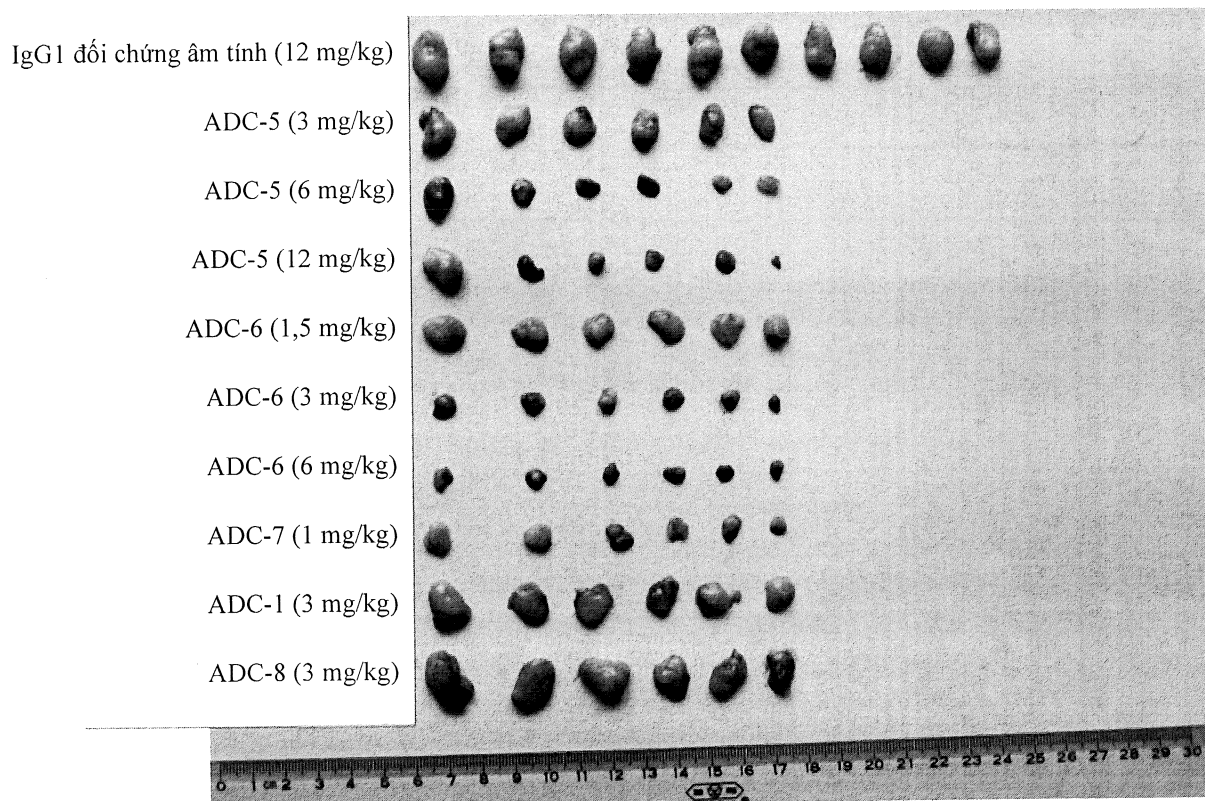


FIG. 17

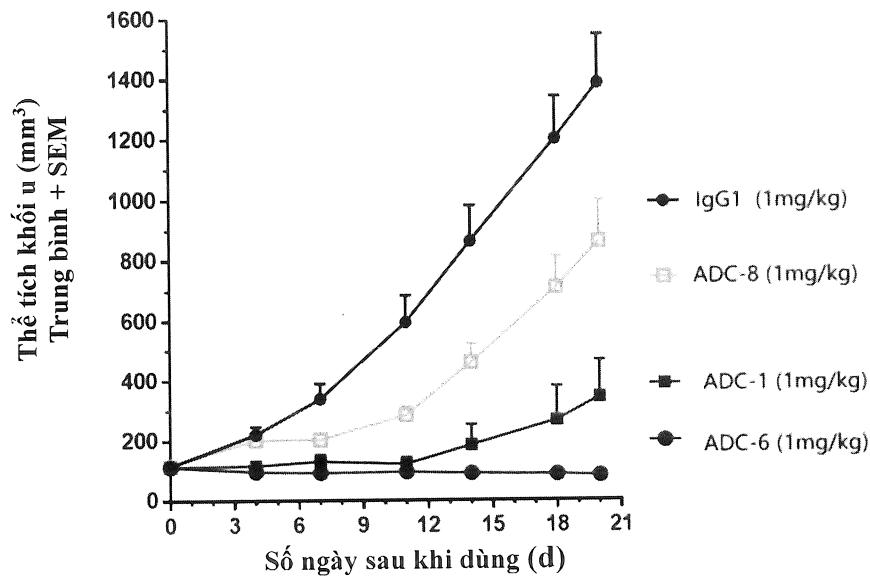


FIG. 18

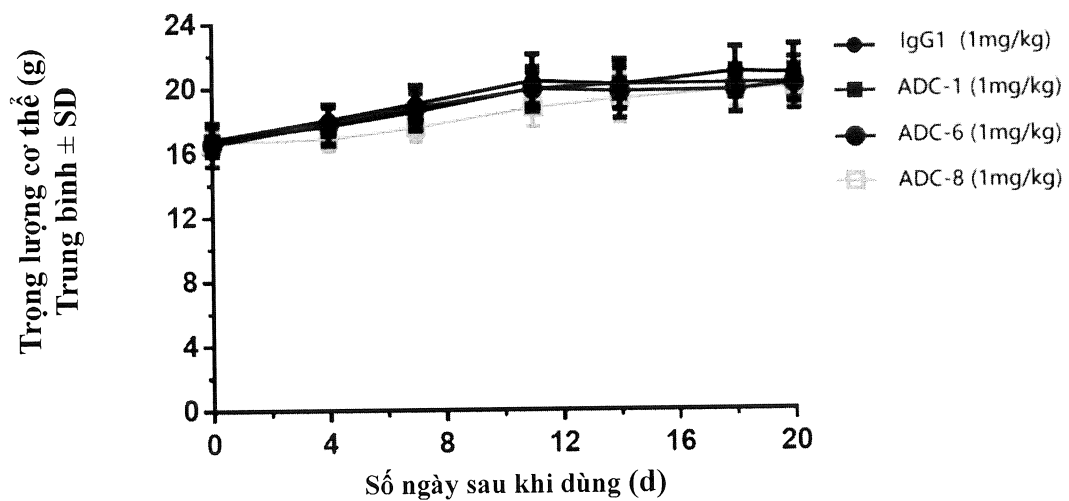


FIG. 19

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Tuojie Biotech (Shanghai) Co., Ltd.

<120> THỂ TIẾP HỢP KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B-DƯỢC CHẤT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

<130> 721085CPCT

<140> PCT/CN2021/108666

<141> 2021-07-27

<150> 202010730899.8

<151> 2020-07-27

<150> 202010735910.X

<151> 2020-07-28

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD79B người ECD-hFc

<400> 1

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser

1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr

20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp

35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu

50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95
 Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
 115 120 125
 Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
 130 135 140
 Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr
 165 170 175
 Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp
 180 185 190
 Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 195 200 205
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 210 215 220
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 225 230 235 240
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 245 250 255
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 260 265 270
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 290 295 300
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 305 310 315 320
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

325 330 335
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 340 345 350
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 355 360 365
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 370 375 380
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 385 390 395 400
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 405 410 415
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 420 425 430
 Lys
 <210> 2
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CD79B người ECD-His
 <400> 2
 Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
 1 5 10 15
 Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
 20 25 30
 Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
 35 40 45
 Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95
 Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
 115 120 125
 Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
 130 135 140
 Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr
 165 170 175
 Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp
 180 185 190
 Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu His His His His His His
 195 200 205
 <210> 3
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100

105

110

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20

25

30

Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85

90

95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

```

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

```

115

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

```

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

```

85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Phe Pro Arg Ser Gly Asn

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Tyr Pro Arg Ser Gly Asn

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb015-10

<400> 19

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

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb015-10

<400> 20

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

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

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb017-10

<400> 21

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb017-10

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 đột biến

<400> 23

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr

1

5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Công thức chung của HCDR1

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là S hoặc Y

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> Xaa là S hoặc T

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> Xaa là T hoặc S

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> Xaa là S hoặc T

<400> 24

Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr

1

5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Công thức chung của HCDR2

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)..(1)

<223> Xaa là F hoặc Y

<400> 25

Xaa Pro Arg Ser Gly Asn

1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Công thức chung của HCDR3

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)..(1)

<223> Xaa là không có hoặc G

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là không có hoặc S

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> Xaa là G hoặc D

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (4)..(4)

<223> Xaa là D hoặc Y

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> Xaa là L hoặc D

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)..(9)

<223> Xaa là D hoặc A

<400> 26

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Phe Xaa Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Công thức chung của LCDR1

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)..(9)

<223> Xaa là S hoặc H

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (14)..(14)

<223> Xaa là F hoặc L

<400> 27

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Xaa Gly Asn Thr Tyr Xaa Glu

1 5 10 15

<210> 28

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb015-10

<400> 28

```

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

```

210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 29
 <211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb015-10

<400> 29

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 30

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của kháng thể được làm giống người hAb017-10

<400> 30

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 31
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống người hAb017-10
 <400> 31
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng của SN8
 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

24

115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215