



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

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

(11)



1-0051499

(51)<sup>2006.01</sup> C07K 16/28; A61K 39/395; C12N  
15/09; A61P 35/00; A61K 31/4745;  
A61K 47/48

(13) B

(21) 1-2020-06826

(22) 24/12/2014

(62) 1-2016-02685

(86) PCT/JP2014/006421 24/12/2014

(87) WO 2015/098099 02/07/2015

(30) 2013-267548 25/12/2013 JP

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/02/2021 395A

(73) 1. DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)

3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 1038426, Japan

2. SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (JP)

291-85, Minami 1-jo Nishi 17-chome, Chuo-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 0608556,  
Japan

(72) AGATSUMA, Toshinori (JP); TAKAHASHI, Shu (JP); HASEGAWA, Jun (JP);  
OKAJIMA, Daisuke (JP); HAMADA, Hirofumi (JP); YAMAGUCHI, Miki (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ LIÊN HỢP THUỐC-KHÁNG THỂ

(21) 1-2020-06826

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thể liên hợp thuốc - kháng thể. Thể liên hợp thuốc - kháng thể kháng khối u có tác dụng trị liệu tuyệt vời đối với tác dụng kháng khối u và tính an toàn. Sáng chế đề xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể trong đó hợp chất kháng khối u được biểu thị bằng công thức dưới đây được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 thông qua liên kết có công thức cấu tạo:  $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)_{n^1}-L^a-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$ , trong đó kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của  $L^1$ , và hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm  $-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$  với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

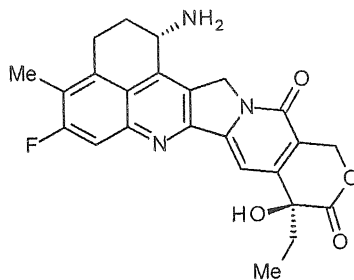
Sáng chế đề cập đến thể liên hợp thuốc-kháng thể có thuốc kháng khối u được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 qua một gốc cấu trúc liên kết, thể liên hợp này hữu ích làm thuốc kháng khối u.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thể liên hợp thuốc-kháng thể (ADC) chứa thuốc có tính độc tế bào được liên hợp với một kháng thể, mà kháng nguyên của nó được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư và kháng thể này cũng gắn kết với kháng nguyên có khả năng nhập nội tế bào, và do đó có thể chuyển vận thuốc chọn lọc đến các tế bào ung thư và bởi vậy được cho là gây tích lũy thuốc trong các tế bào ung thư và tiêu diệt các tế bào ung thư (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế từ 1 đến 3). Là một ADC, Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin (nhãn hiệu đã đăng ký bảo hộ độc quyền)), trong đó calicheamicin được liên hợp với kháng thể kháng-CD33 được cấp phép lưu hành như chất trị liệu cho bệnh bạch cầu tủy cấp. Ngoài ra, Adcetris (Brentuximab vedotin (nhãn hiệu đã đăng ký)), trong đó auristatin E được liên hợp với kháng thể kháng-CD30, gần đây đã được cấp phép lưu hành như một chất trị liệu cho u bạch huyết Hodgkin và u bạch huyết tế bào lớn thoái biến (tham khảo tài liệu không phải bằng độc quyền sáng chế 4). Các thuốc có chứa trong các ADC đã được cấp phép lưu hành cho đến nay nhằm đích ADN hoặc tubulin.

Trong số các hợp chất phân tử lượng thấp kháng khối u, các dẫn xuất camptothecin, các hợp chất mà ức chế topoisomeraza I để thể hiện tác dụng kháng khối u, là đã biết. Trong số các hợp chất này, hợp chất kháng khối u có công thức dưới đây

[Công thức 1]



(exatecan, tên hoá học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-flo-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-metyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion) là dẫn xuất tan trong nước của camptothecin (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 1 và 2). Khác với irinotecan hiện được sử dụng trong lâm sàng, hợp chất này không cần hoạt hoá bởi enzym để có tác dụng kháng khối u. Ngoài ra, hoạt tính ức chế đối với topoisomeraza I là lớn hơn SN-38, đây là dược chất chính của irinotecan và topotecan cũng được sử dụng trong lâm sàng, và có được hoạt tính tiêu diệt tế bào in vitro mạnh hơn đối với nhiều loại tế bào ung thư. Cụ thể là, hợp chất này thể hiện tác dụng kháng lại các tế bào ung thư có tính kháng đối với SN-38 hoặc hợp chất tương tự do có biểu hiện P-glycoprotein. Ngoài ra, trong khối u của người được cấy dưới da trên mô hình ở chuột, hợp chất này thể hiện tác dụng kháng khối u mạnh, và do đó đã được thử nghiệm trên lâm sàng, nhưng chưa được đưa ra thị trường (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế từ 5 đến 10). Hiện chưa rõ là exatecan có tác dụng hữu hiệu như một ADC hay không.

DE-310 là phức hợp, trong đó exatecan được liên hợp với polyme rượu đa chức carboxymetyldextran dễ bị vi sinh vật phân huỷ qua nhóm đệm peptit GGFG (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 3). Bằng cách chuyển hoá exatecan thành dạng tiền dược chất polyme, có thể duy trì tính chất lưu giữ trong máu và cũng gia tăng thụ động tính chất có thể nhằm đích đến các vùng khối u bằng cách sử dụng tính thẩm gia tăng của các mạch máu mới tạo ở trong khối u và tính chất lưu giữ ở các mô khối u. Đối với DE-310, thông qua phân giải nhóm đệm peptit bằng enzym, exatecan và exatecan với glyxin được nối với một nhóm amino được giải phóng liên tục dưới dạng hoạt chất chính. Do đó, các tính chất dược động học được cải thiện. DE-310 đã xác định được là có hiệu quả cao hơn



exatecan khi sử dụng đơn độc cho dù tổng lượng exatecan có chứa trong đó thấp hơn khi sử dụng exatecan đơn độc theo nhiều loại mô hình đánh giá khối u trong các nghiên cứu phi lâm sàng. Một nghiên cứu lâm sàng đã được tiến hành đối với DE-310, và đã khẳng định các trường hợp có hiệu quả, trong đó một báo cáo gợi ý là hoạt chất chính này tích lũy trong khối u nhiều hơn các mô bình thường, tuy nhiên, cũng có báo cáo chỉ ra là sự tích lũy DE-310 và hoạt chất chính trong khối u là không khác nhiều so với tích lũy ở các mô bình thường ở người, và do đó không nhận thấy có nhằm đích thụ động ở người (tham khảo, Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế từ 11 đến 14). Do đó, DE-310 không được đưa ra thị trường, và hiện vẫn chưa rõ là exatecan có tác dụng hữu hiệu như một thuốc nhằm đích như thế này hay không.

Dưới dạng hợp chất liên quan đến DE-310, phức hợp trong đó nhóm cấu trúc có công thức  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  được cài xen giữa nhóm đệm-GGFG- và exatecan để tạo thành  $\text{-GGFG-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$  được sử dụng như cấu trúc đệm, cũng là đã biết (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 4). Tuy nhiên, tác dụng kháng khối u của phức hợp này hiện hoàn toàn chưa rõ.

TROP2 của người (TACSTD2: chất tải nạp tín hiệu canxi có liên quan đến khối u 2, GA733-1, EGP-1, M1S1; sau đây được gọi là hTROP2) là protein màng tế bào tủy 1 xuyên màng đơn nhất gồm có 323 gốc axit amin. Trong khi sự có mặt của protein màng tế bào có tham gia vào quá trình đề kháng miễn dịch, hay gặp đối với các các dưỡng mạc và các tế bào ung thư của người (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 15), trước đây đã được gợi ý, phân tử kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng (162-25.3 hoặc 162-46.2) kháng lại protein màng tế bào ở dòng tế bào ung thư nhau của người đã được nhận dạng và ký hiệu là TROP2 như một trong số các phân tử được biểu hiện trong các dưỡng mạc của người (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 16). Phân tử này sau đó cũng được các nhà nghiên cứu khác xác định và cũng được gọi là kháng nguyên khối u GA733-1 được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng GA733 của chuột (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 17) thu được bằng cách gây miễn dịch bằng dòng tế bào ung thư dạ dày hoặc

glycoprotein biểu mô (EGP-1; Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18) được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng RS7-3G11 của chuột thu được bằng cách gây miễn dịch bằng các tế bào ung thư phổi không nhỏ. Vào năm 1995, tuy nhiên, đã tách dòng gen TROP2, và tất cả các phân tử này được xác nhận là các phân tử giống nhau (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19). Trình tự ADN và trình tự axit amin của hTROP2 là có trong các cơ sở dữ liệu công bố công khai và có thể truy cập, ví dụ, theo số truy cập số NM\_002353 và NP\_002344 (NCBI).

Gen hTROP2 cấu thành họ gen TACSTD, cùng với gen TROP-1 của người (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) có mức tương đồng khoảng 50% (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 21). Protein hTROP2 cấu thành bởi trình tự tín hiệu gồm có 26 gốc axit amin đầu tận cùng-N, miền ngoại bào gồm có 248 gốc axit amin, miền xuyên màng gồm có 23 gốc axit amin, và miền nội bào gồm có 26 gốc axit amin. Miền ngoại bào có bốn vị trí glycosyl hoá được liên kết qua-N và đã biết có phân tử lượng khoảng 10 kD + giá trị được tính trên lý thuyết 35 kD (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19).

Chưa nhận dạng được phối tử sinh lý của hTROP2, các chức năng phân tử của nó hiện chưa được biết. hTROP2 đã được xác định là gây tải nạp tín hiệu canxi trong các tế bào khối u (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 20). Hơn nữa, hTROP2 được phosphoryl hoá ở gốc nội bào serin 303 bởi protein kinaze C, đây là kinaze tùy thuộc- $\text{Ca}^{2+}$  (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18), và có trình tự gắn kết-PIP<sub>2</sub> ở miền nội bào, gợi ý là có các chức năng phát tín hiệu ở các tế bào khối u (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 22).

Trong phân tích hoá mô miễn dịch bằng cách sử dụng các mẫu lâm sàng, hTROP2 được xác định là có biểu hiện quá mức ở nhiều loại caxinom tế bào biểu mô và có biểu hiện ở các tế bào biểu mô ở một số loại hạn chế các mô bình thường ở mức biểu hiện thấp so với các mô khối u (Tài liệu tham khảo không phải bằng độc quyền sáng chế 23 to 27). Khả năng biểu hiện của hTROP2 đã được báo cáo là có liên quan đến tiên lượng xấu của ung thư ruột kết-trực tràng

(Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 23), ung thư dạ dày (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 24), ung thư tụy (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 25), ung thư miệng (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 26), và u thần kinh đệm (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 27).

Từ các mô hình sử dụng các tế bào ung thư ruột kết-trực tràng, còn ghi nhận có biểu hiện hTROP2 có liên quan đến tăng trưởng tế bào không phụ thuộc 'scaffold' của các tế bào khối u và sinh khối u ở chuột suy giảm miễn dịch (Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 28).

Do thông tin gợi ý mối liên quan này với bệnh ung thư, cho đến nay đã xác định nhiều kháng thể kháng-hTROP2 và nghiên cứu về tác dụng kháng khối u của chúng. Trong số các kháng thể này, ví dụ đã công bố kháng thể không được liên hợp thể hiện hoạt tính kháng khối u trên các mô hình dị ghép chuột trụi lông (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 5 to 8) cũng như một kháng thể có thể hiện hoạt tính kháng khối u dưới dạng ADC với thuốc gây độc tế bào (Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 9 to 12). Tuy nhiên, mức độ hoặc phổ hoạt tính của chúng vẫn chưa thoả mãn, và có các nhu cầu y học chưa được đáp ứng đối với hTROP2 như một đích trị liệu.

Danh sách tài liệu tham khảo

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 1: Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 5-59061

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 2: Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 8-337584

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 3: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1997/46260

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 4: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2000/25825

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 5: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2008/144891

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 6: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/145744

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 7: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/155579

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 8: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2013/077458

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 9: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/074566

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 10: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/068845

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 11: Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2013/068946

Tài liệu tham khảo Bằng độc quyền sáng chế 12: Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 7999083

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 1: Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13 của Ducry, L., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 2: Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537 của Alley, S. C., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 3: Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452 của Damle N.K..

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 4: Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637 của Senter P. D., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 5: Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632 của Kumazawa, E., Tohgo, A..

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 6: Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-782 của Mitsui, I., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 7: Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769 của Takiguchi, S., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 8: Int J Cancer (1997) 72, 680-686 của Joto, N. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 9: Cancer Chemother. Pharmacol. (1998) 42, 210-220 của Kumazawa, E. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 10: Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273 của De Jager, R., và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 11: Polymer Drugs in the Clinical Stage, của Inoue, K. và các đồng tác giả, Maeda và các đồng tác giả biên tập (2003), 145-153.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 12: Cancer Sci (2004) 95, 168-175 của Kumazawa, E. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 13: Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711 của Soepenbergh, O. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 14: Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347 của Wenthe M. N. và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 15: Proc. Natl. Acad. Sci. 75(4), 1947-1951 (1978) của Faulk WP, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 16: Proc. Natl. Acad. Sci. 78(8), 5147-5150 (1981) của Lipinski M, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 17: Proc. Natl. Acad. Sci. 86(1), 27-31 (1989) của Linnenbach A J, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 18: Int. J. Cancer, 62(4), 472-479 (1995) của Basu A, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 19: Int. J. Cancer, 62(5), 610-618 (1995) của Fornaro M, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 20: Int. J. Cancer, 76(5), 671-676 (1998) của Ripani E, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 21: Cytogenet. Cell Genet., 92(1-2), 164-165 (2001) của Calabrese G, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 22: Int. J. Cancer, 75(2), 324-330 (1998) của El Sewedy T, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 23: Clin. Cancer Res., 12(10), 3057-3063 (2006) của Ohmachi T, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 24: J. Clin. Pathol., 62(2), 152-158 (2009) của Muhlmann G, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 25: Br. J. Cancer, 99(8), 1290-1295 (2008) của Fong D, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 26: Mod. Pathol., 21(2), 186-191 (2008) của Fong D, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 27: Neurol. Sci., 34(10), 1745-1750 (2013) của Ning S, và các đồng tác giả.

Tài liệu tham khảo không phải Bằng độc quyền sáng chế 28: Mol. Cancer Ther., 7(2), 280-285 (2008) của Wang J, và các đồng tác giả.

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

#### **Vấn đề kỹ thuật**

Đối với điều trị khối u bằng một kháng thể, có thể nhận thấy tác dụng kháng khối u không đầy đủ thậm chí khi kháng thể này nhận biết kháng nguyên để gắn kết với các tế bào khối u, và có trường hợp trong đó cần một kháng thể kháng khối u hiệu quả hơn. Ngoài ra, nhiều hợp chất phân tử lượng thấp kháng khối u có vấn đề về tác dụng phụ liên quan đến tính an toàn và độc tính thậm chí các hợp chất có tác dụng kháng khối u tuyệt vời, hợp chất này vẫn cần đạt được tác dụng trị liệu ưu việt hơn bằng cách tăng cường hơn nữa tính an toàn. Do đó, đối tượng của sáng chế là cung cấp thuốc kháng khối u có tác dụng trị liệu tuyệt vời, mà đặc biệt tốt về tác dụng kháng khối u và tính an toàn.

Các tác giả sáng chế cho rằng, khi hợp chất kháng khối u exatecan được chuyển hoá thành thể liên hợp thuốc-kháng thể, qua một gốc cấu trúc liên kết,

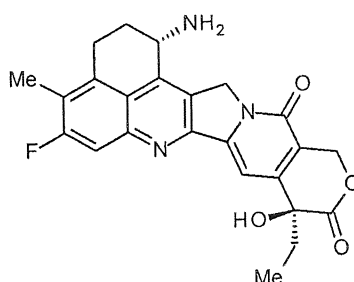
bằng cách tiếp hợp với kháng thể kháng-TROP2, đây là kháng thể có khả năng nhằm đích các tế bào khối u, nghĩa là có tính chất có khả năng nhận biết các tế bào khối u, tính chất có khả năng gắn kết với các tế bào khối u, tính chất nhập nội vào các tế bào khối u, hoặc tính chất tương tự, hoạt tính tiêu diệt tế bào dựa trên kháng thể có thể có được, hợp chất kháng khối u có thể được chuyển vận một cách chắc chắn hơn đến các tế bào khối u để biểu hiện đặc hiệu tác dụng kháng khối u của hợp chất này ở các tế bào khối u, và do đó tác dụng kháng khối u có thể chắc chắn được thể hiện, và liều dùng của hợp chất kháng khối u có thể giảm đi so với trường hợp sử dụng hợp chất này đơn độc, và do đó ảnh hưởng của hợp chất kháng khối u đối với các tế bào bình thường có thể giảm nhẹ để có thể đạt được tính an toàn cao hơn.

Về khía cạnh này, các tác giả sáng chế đã tạo ra một liên kết có cấu trúc cụ thể và thành công thu được thể liên hợp thuốc-kháng thể, trong đó kháng thể kháng-TROP2 và exatecan được liên hợp với nhau qua liên kết này, và khẳng định tác dụng kháng khối u tuyệt vời được thể liên hợp này thể hiện để thực hiện sáng chế.

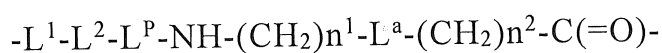
Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các đối tượng dưới đây.

[1] thể liên hợp thuốc-kháng thể trong đó hợp chất kháng khối u có công thức:

[Công thức 2]



được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 bởi liên kết thioete, liên kết này được tạo thành ở nhóm liên kết liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2 qua liên kết có công thức cấu tạo:



Trong công thức này, kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của  $L^1$ , hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm  $-(CH_2)n^2-C(=O)-$  với nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, trong đó

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^1$  là  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-(CH_2)n^3-C(=O)-$ ,

trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$  hoặc liên kết đơn,

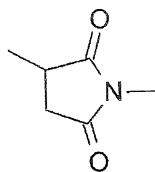
trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,

$L^P$  là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin,

$L^a$  là  $-O-$  hoặc liên kết đơn, và

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$  có công thức cấu tạo:

[Công thức 3]



mà được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen ở cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

Sáng chế ngoài ra đề cập đến lần lượt các đối tượng dưới đây.

[2] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục [1], trong đó gốc peptit của  $L^P$  là gốc peptit bao gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic.

[3] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo [1] hoặc [2], trong đó  $L^P$  là gốc peptit được chọn từ nhóm dưới đây:

-GGF-,

-DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,



-SGGF-,  
 -KGGF-,  
 -DGGFG-,  
 -GGFGG-,  
 -DDGGFG-,  
 -KDGGFG-, và  
 -GGFGGGF-;

trong đó "(D-)D" là D-axit aspartic.

[4] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo [1] hoặc [2], trong đó  $L^P$  là gốc peptit gồm có 4 axit amin.

[5] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó  $L^P$  là gốc tetrapeptit -GGFG-.

[6] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5, và  $L^2$  là liên kết đơn.

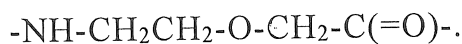
[7] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ , và  $n^4$  là 2 hoặc 4.

[8] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là cấu trúc bán phần có độ dài mạch từ 4 đến 7 nguyên tử.

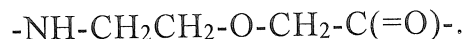
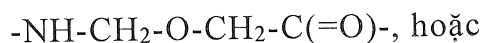
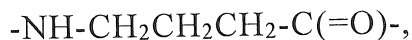
[9] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là cấu trúc bán phần có độ dài mạch 5 hoặc 6 nguyên tử.

[10] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó  $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là

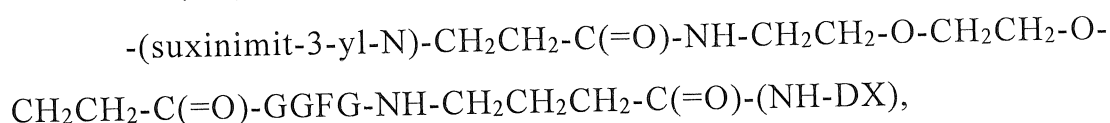
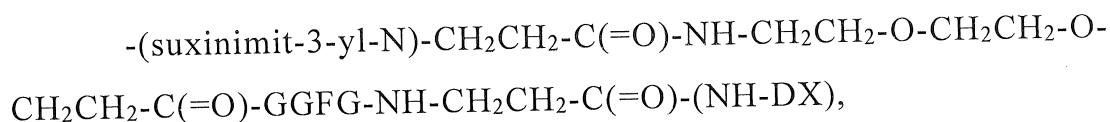
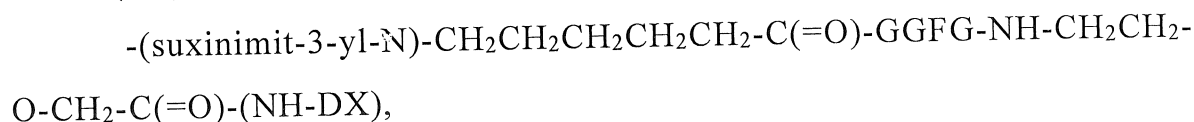
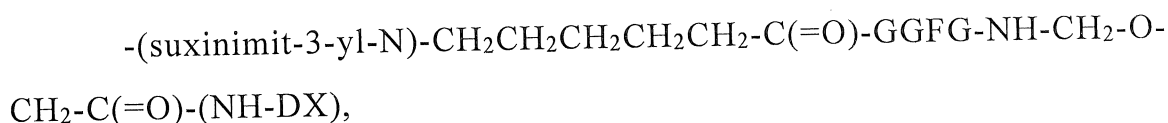
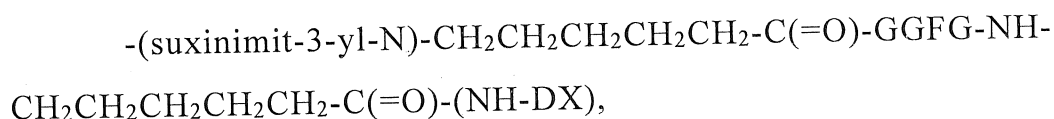
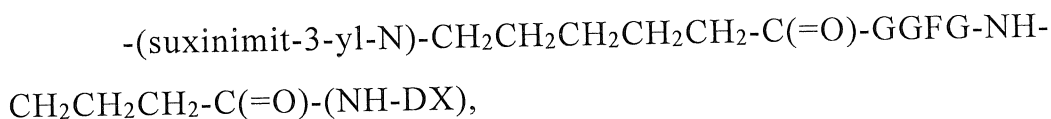
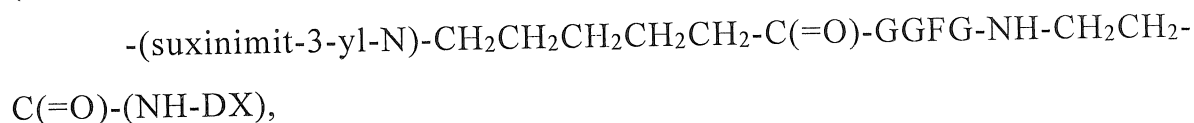
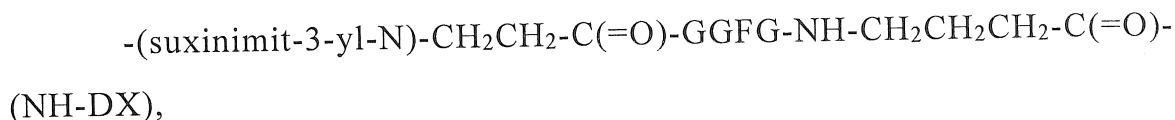
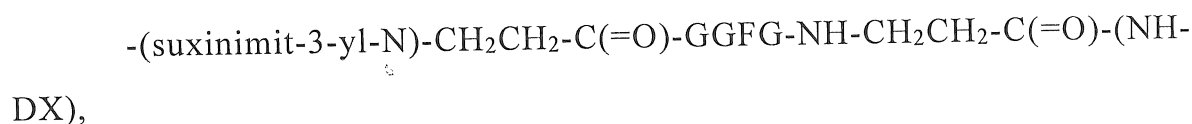
$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  
 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ , hoặc



[11] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  là



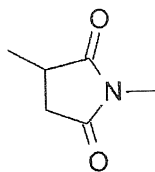
[12] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được kết nối với  $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  là cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:



$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$   
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$   
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}).$

Trong đó  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$  có công thức cấu tạo:

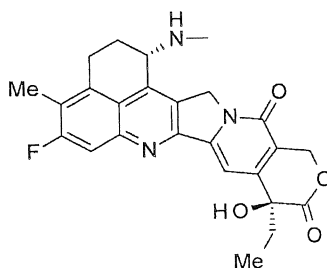
[Công thức 4]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

$-(\text{NH-DX})$  là nhóm có công thức:

[Công thức 5]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và

$-\text{GGFG}-$  là gốc tetrapeptit  $-\text{Gly-Gly-Phe-Gly}-$ .

[13] Thở liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được kết nối với  $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-\text{L}^a-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$  là một cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

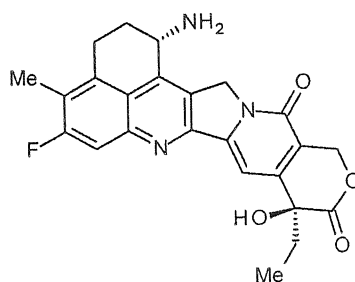
$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-$   
 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$   
 $\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Ở đây, -(suxinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX), và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[14] Thể liên hợp thuốc-kháng thể trong đó hợp chất kháng khối u có công thức:

[Công thức 6]



được liên hợp với kháng thể kháng-TROP2 bởi liên kết thioete mà được tạo thành ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2 thông qua liên kết có công thức cấu tạo:

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$

trong đó kháng thể kháng-TROP2 được nối với đầu tận cùng của  $L^1$ , hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm  $-(CH_2)^{n^2}-C(=O)-$ ,

trong đó

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^1$  là  $-(suxinimit-3-yl-N)-(CH_2)^{n^3}-C(=O)-$ ,

trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$  hoặc liên kết đơn,

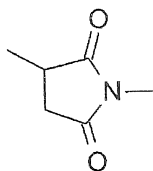
trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,

$L^P$  là gốc tetrapeptit -GGFG-,

$L^a$  là -O- hoặc liên kết đơn, và

-(suxinimit-3-yl-N)- có công thức cấu tạo:

[Công thức 7]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1.

[15] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [14], trong đó

$n^1$  bằng 3,  $n^2$  bằng 0,  $n^3$  bằng 2,  $L^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $n^4$  bằng 2, và  $L^a$  là liên kết đơn,

$n^1$  bằng 1,  $n^2$  bằng 1,  $n^3$  bằng 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $L^a$  là  $-\text{O}-$ , hoặc

$n^1$  bằng 2,  $n^2$  bằng 1,  $n^3$  bằng 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $L^a$  là  $-\text{O}-$ .

[16] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [14] hoặc [15], trong đó  $n^3$  bằng 2 hoặc 5, và  $L^2$  là liên kết đơn.

[17] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [14] hoặc [15], trong đó  $n^3$  bằng 2 hoặc 5,  $L^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , và  $n^4$  bằng 2 hoặc 4.

[18] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [14] đến [17], trong đó  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$  là

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ , hoặc

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ .

[19] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [14] đến [18], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được kết nối với  $-L^1-L^2-L^p-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$  là cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

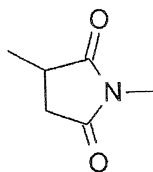
$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ ,

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ ,

$-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$   
 $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX});$

trong đó  $-(\text{suxinimit-3-yl-N})-$  có công thức cấu tạo:

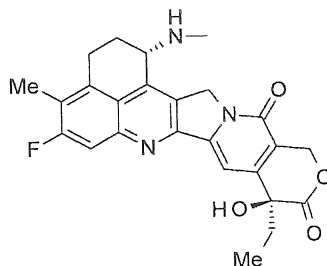
[Công thức 8]



nhóm này được nối với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

$-(\text{NH-DX})$  là nhóm có công thức:

[Công thức 9]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và -GGFG- là gốc tetrapeptit -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[20] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [14] đến [18], trong đó nhóm cấu trúc liên kết-thuốc có thuốc được kết nối với -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)- là một cấu trúc liên kết-thuốc được chọn từ nhóm dưới đây:

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong các nhóm này, -(suxinimit-3-yl-N)-, -(NH-DX) và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[21] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[22] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[23] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [20], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[24] Thuốc có chứa thẻ liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

[25] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

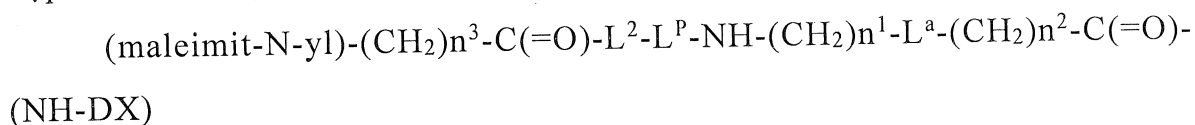
[26] Thuốc kháng khối u và/hoặc thuốc chống ung thư theo mục [25], thuốc này được dùng cho ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u mêlanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản.

[27] Dược phẩm có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó làm thành phần hoạt tính, và thành phần bào chế được dùng.

[28] Dược phẩm theo mục [27], dược phẩm này được dùng cho ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u mêlanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản.

[29] Phương pháp điều trị khối u và/hoặc bệnh ung thư bao gồm cho dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [23], muối của nó hoặc hydrat của nó.

[30] Phương pháp sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể bao gồm cho hợp chất có công thức:



phản ứng với kháng thể kháng-TROP2 hoặc dẫn xuất phản ứng của nó và tiếp hợp nhóm liên kết-thuộc với kháng thể này bằng phương pháp để tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể này.

Trong công thức,  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 8,

$\text{L}^2$  là  $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$  hoặc liên kết đơn,

trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 1 đến 6,



$L^P$  là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic,

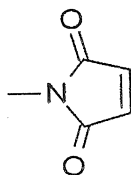
$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6,

$n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5,

$L^a$  là -O- hoặc a liên kết đơn,

(maleimide-N-yl)- là nhóm có công thức:

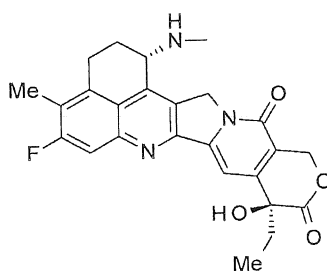
[Công thức 10]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối.

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 11]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

[31] Phương pháp sản xuất theo mục [30], trong đó phương pháp để tiếp hợp nhóm liên kết-thuốc với kháng thể kháng-TROP2 là phương pháp khử hoá kháng thể này để chuyển hoá kháng thể này thành dẫn xuất phản ứng.

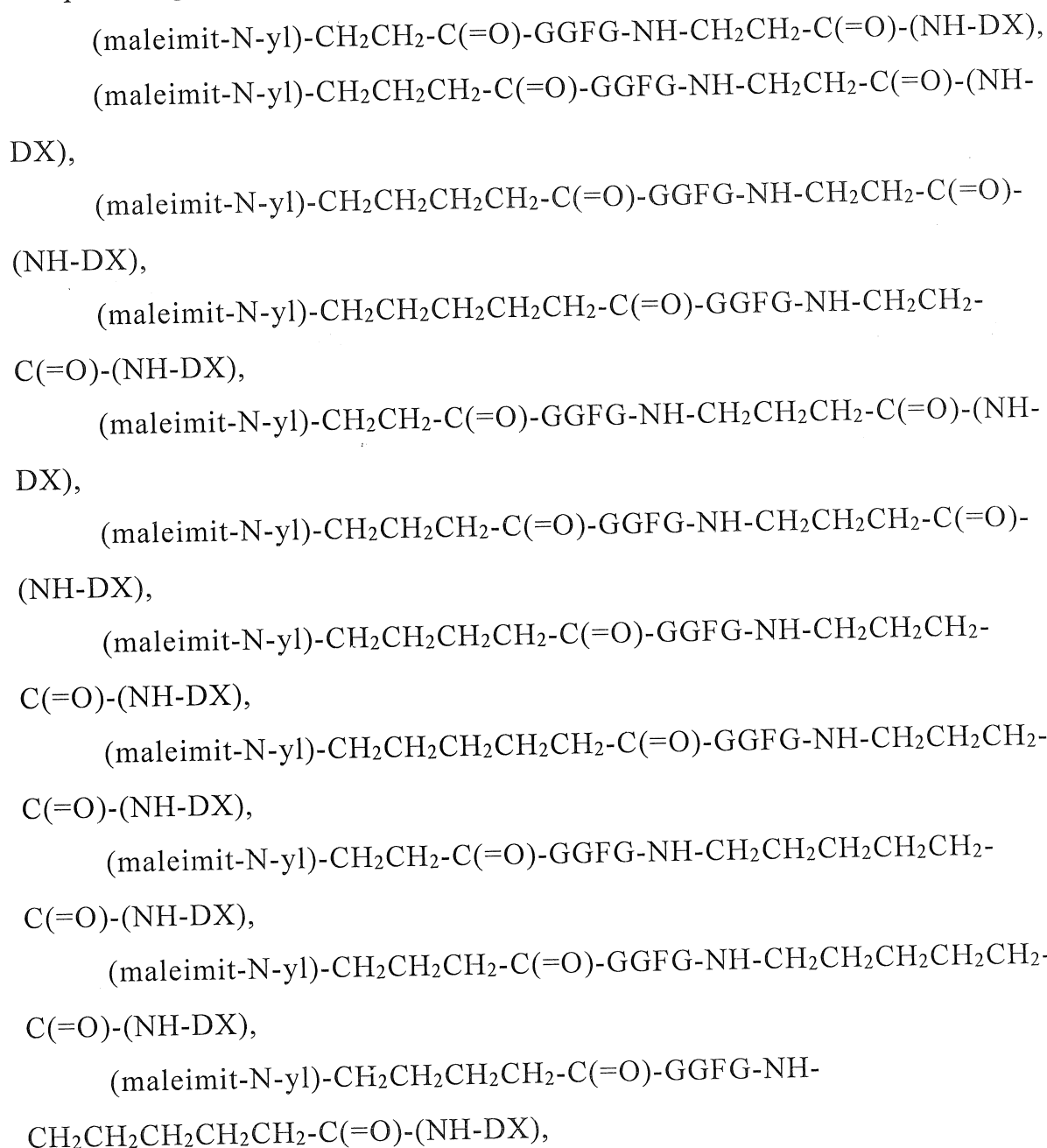
[32] Phương pháp sản xuất theo mục [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[33] Phương pháp sản xuất theo mục [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[34] Phương pháp sản xuất theo [30] hoặc [31], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

[35] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [30] đến [34].

[36] Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua trong phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2, trong đó kháng thể kháng-TROP2 được xử lý trong điều kiện khử hoá và tiếp đó cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm dưới đây:



(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-  
 DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 (NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 (NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-  
 C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 (NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-  
 (NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-  
 C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-  
 CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-  
 C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-  
 C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),  
 (maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

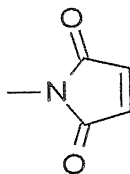
(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), và

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong các hợp chất nêu trên, (maleimit-N-yl)- là nhóm có công thức:

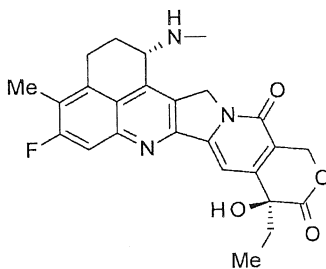
[Công thức 12]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối.

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 13]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

-GGFG- là gốc tetrapeptit -Gly-Gly-Phe-Gly-.

[37] Thể liên hợp thuốc-kháng thể thu được bằng cách tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết sulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2,

trong đó kháng thể kháng-TROP2 được xử lý trong điều kiện khử hoá và tiếp đó cho phản ứng với hợp chất được chọn từ nhóm dưới đây:

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), và

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong các hợp chất nêu trên, (maleimit-N-yl)-, -(NH-DX), và -GGFG- là như được xác định ở trên.

[38] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

[39] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.

[40] Thể liên hợp thuốc-kháng thể theo [36] hoặc [37], trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết-thuốc đã chọn được liên hợp/kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

#### Lợi ích của sáng chế

Với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 có hợp chất kháng khối u exatecan được liên hợp thông qua một liên kết có cấu trúc cụ thể, có thể đạt được tác dụng kháng khối u và tính an toàn rất tốt.

#### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 7) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 8) của chuỗi nặng kháng thể cTINA1.

FIG. 2 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 9) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 10) của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1.

FIG. 3 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 11) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 12) của chuỗi nặng hTINA1-H1.

FIG. 4 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 13) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 14) của chuỗi nặng hTINA1-H2.

FIG. 5 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 15) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 16) của chuỗi nặng hTINA1-H3.

FIG. 6 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 17) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 18) của chuỗi nhẹ hTINA1-L1.

FIG. 7 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 19) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 20) của chuỗi nhẹ hTINA1-L2.

FIG. 8 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 21) và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 22) của chuỗi nhẹ hTINA1-L3.

FIG. 9 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 23) của CDRH1 của kháng thể TINA1, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 24) của CDRH2 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 25) của CDRH3 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 26) của CDRL1 của nó, trình tự axit amin (SEQ ID NO: 27) của CDRL2 của nó, và trình tự axit amin (SEQ ID NO: 28) của CDRL3 của nó.

FIG. 10 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của kháng thể kháng-CD9, kháng thể kháng-CD46, kháng thể kháng-CD55, kháng thể kháng-CD59, kháng thể kháng-CD71, kháng thể kháng-CD73, kháng thể kháng-CD147, kháng thể kháng-CD276, kháng thể kháng-EpCAM, kháng thể kháng-EGFR, và kháng thể kháng-TROP2 (kháng thể TINA1).

FIG. 11 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của kháng thể kháng-CD59, kháng thể kháng-CD71, kháng thể kháng-EGFR, kháng thể kháng-EpCAM, và kháng thể kháng-TROP2 (kháng thể TINA1).

FIG. 12 thể hiện khả năng nhập nội tế bào của nhiều loại kháng thể kháng-TROP2.

FIG. 13 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 14 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 15 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Capan-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 16 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 17 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 18 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 19 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người BxPC-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 20 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư buồng trứng của người NIH:OVCA-3 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 21 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 22 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H292 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 23 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào ung thư vòm họng của người FaDu được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 24 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người CFPAC-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 25 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người CFPAC-1 được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 26 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người HPAC được cấy ghép dưới da ở chuột BALB/c-nu/nu.

FIG. 27 thể hiện tác dụng kháng khối u của thể liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) lên mô ung thư thực quản của người được cấy ghép dưới da ở chuột NOD-scid.

### **Mô tả chi tiết các phương án của sáng chế**

Dưới đây sẽ mô tả các phương thức ưu tiên để thực hiện sáng chế có tham chiếu đến các hình vẽ. Các phương án được mô tả dưới đây là các ví dụ điển hình của các phương án của sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế là thuốc kháng khối u trong đó kháng thể kháng-TROP2 được liên hợp với hợp chất kháng khối u qua một gốc cấu trúc liên kết và được mô tả chi tiết dưới đây.

### **Kháng thể**

Kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể thu được từ loài bất kỳ, và các ví dụ ưu tiên của các loài này có thể bao gồm người, chuột cống, chuột nhắt và thỏ. Trong trường hợp khi thu được từ loài khác không phải là người, tốt hơn là được khám hoặc được làm tương thích với người bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Kháng thể này của sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng và tốt hơn là kháng thể đơn dòng.



Kháng thể kháng-TROP2 có khả năng nhắm đích các tế bào khối u, nghĩa là, có tính chất có khả năng nhận biết tế bào khối u, tính chất có khả năng gắn kết với tế bào khối u, tính chất nhập nội vào tế bào khối u, hoặc tính chất tương tự, và có thể được chuyển hoá thành thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách tiếp hợp với hợp chất có hoạt tính kháng khối u thông qua một liên kết.

Hoạt tính gắn kết của kháng thể này kháng lại các tế bào khối u có thể được khẳng định bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Ví dụ về phương pháp để khẳng định sự nhập nội kháng thể này vào các tế bào khối u có thể bao gồm (1) thử nghiệm hiển thị hoá một kháng thể được hợp nhất vào các tế bào dưới kính hiển vi huỳnh quang bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai (được đánh dấu huỳnh quang) gắn kết với kháng thể trị liệu này (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) thử nghiệm đo cường độ huỳnh quang được hợp nhất vào các tế bào bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai (được đánh dấu huỳnh quang) gắn kết với kháng thể trị liệu này (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), hoặc (3) thử nghiệm Mab-ZAP sử dụng độc tố miễn dịch gắn kết với kháng thể trị liệu này trong đó độc tố này được giải phóng khi hợp nhất vào các tế bào để ức chế tăng trưởng tế bào (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000). Protein phức hợp tái tổ hợp có vùng xúc tác của độc tố bệnh bạch hầu và protein G có thể được sử dụng làm độc tố miễn dịch.

Do thuốc được liên hợp trong thể liên hợp thuốc-kháng thể có tác dụng kháng khối u, tốt hơn là không nhất thiết là bản thân kháng thể này phải có tác dụng kháng khối u. Để có hoạt tính tiêu diệt tế bào đặc hiệu và chọn lọc của hợp chất kháng khối u lên các tế bào khối u, quan trọng là và cũng ưu tiên là kháng thể này phải có tính chất nhập nội để xâm nhập vào các tế bào khối u.

Kháng thể kháng-TROP2 có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường được thực hiện trong lĩnh vực này, phương pháp này bao gồm gây miễn dịch cho động vật bằng một polypeptit kháng nguyên và thu gom và tinh chế các kháng thể được sản sinh *in vivo*. Nguồn gốc của kháng nguyên không chỉ giới hạn ở người, và các con vật có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên thu

được từ động vật không phải là người như chuột nhắt, chuột cống, và các động vật tương tự. Trong trường hợp, tính phản ứng chéo của các kháng thể gắn kết với kháng nguyên khác loài thu được với các kháng nguyên của người có thể được thử nghiệm để sàng lọc kháng thể có thể áp dụng cho bệnh ở người.

Theo cách khác, các tế bào sản sinh kháng thể mà sản xuất kháng thể kháng lại kháng nguyên được dung hợp với các tế bào u tuỷ theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Nature (1975) 256, trang 495-497 của Kohler và Milstein; và Monoclonal Antibodies, trang 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980), Kennet, R. biên tập) để tạo ra các tế bào lai, từ đó có thể thu được các kháng thể đơn dòng.

Kháng nguyên có thể thu được bằng cách chế tạo bằng kỹ thuật di truyền các tế bào chủ để tạo ra gen mã hoá protein kháng nguyên này. Cụ thể là, các vật truyền cho phép biểu hiện gen kháng nguyên được điều chế và chuyển vào các tế bào chủ sao cho biểu hiện gen này. Kháng nguyên được biểu hiện theo cách này có thể được tinh chế. Kháng thể này cũng có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp gây miễn dịch các động vật bằng các tế bào biểu hiện kháng nguyên được chế tạo bằng kỹ thuật di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Kháng thể kháng-TROP2 có thể thu được bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực này.

Kháng thể kháng-TROP2 mà có thể được sử dụng trong Sáng chế không bị hạn chế cụ thể, ví dụ, tốt hơn là có thể sử dụng các kháng thể được xác định cụ thể bằng các trình tự axit amin đã thể hiện trong Danh mục trình tự của sáng chế. Kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong Sáng chế tốt hơn là có các tính chất như được mô tả dưới đây.

(1) Một kháng thể có các tính chất dưới đây:

(a) gắn kết đặc hiệu với TROP2, và

(b) có hoạt tính nhập nội ở tế bào biểu hiện-TROP2 bằng cách gắn kết với TROP2.

(2) Kháng thể theo mục (1), trong đó TROP2 là TROP2 của người.

(3) Kháng thể theo mục (1) hoặc (2), trong đó kháng thể này có CDRH1 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23, CDRH2 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 24, và CDRH3 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 25 như các vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nặng, và CDRL1 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26, CDRL2 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 27, và CDRL3 bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 28 như các vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ.

(4) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (3), trong đó vùng ổn định của nó là vùng ổn định thu được từ-người.

(5) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (4), trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.

(6) Kháng thể theo mục (5), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12, (b) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14, (c) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16, (d) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (c), và (e) trình tự axit amin thu được từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (a) đến (c) bằng cách khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một axit amin, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (f) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, (g) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, (h) trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, (i) trình tự axit amin có tính mức đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (f) đến (h), và (j) trình tự axit amin thu được từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự từ (f) đến (h) bằng cách khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung ít nhất một axit amin.

(7) Kháng thể theo mục (6), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, và vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22.

(8) Kháng thể theo mục (7), trong đó kháng thể này có vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 12 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 18, vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 14 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 20, và vùng thay đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 140 trong SEQ ID NO: 16 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 129 trong SEQ ID NO: 22.

(9) Kháng thể theo mục (6) hoặc (7), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit

amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22.

(10) Kháng thể theo mục (6) hoặc (7), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 20, và chuỗi

nặng bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 22.

(11) Kháng thể theo (8), trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 20, và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 20 đến 470 trong SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được mô tả ở các vị trí axit amin từ 21 đến 234 trong SEQ ID NO: 22.

(12) Kháng thể theo mục bất kỳ từ (1) đến (11), trong đó kháng thể này không có gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.

(13) Một kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể theo theo mục bất kỳ từ (1) đến (12), phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ đã biến nạp với vật truyền biểu hiện có chứa polynucleotit mã hoá kháng thể này; và thu gom kháng thể quan tâm này từ các dịch nuôi cấy thu được ở bước nêu trên.

Sau đây, mô tả kháng thể kháng-TROP2 được sử dụng trong sáng chế.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" và "khối u" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng với ý nghĩa như nhau.

Thuật ngữ "gen" như được sử dụng trong bản mô tả này không chỉ bao gồm ADN, mà còn cả ARNtt của nó, ADN bổ trợ của nó, và ARN bổ trợ của nó.

Thuật ngữ "polynucleotit" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng cùng nghĩa như axit nucleic và cũng bao gồm ADN, ARN, các đoạn dò, các oligonucleotit, và các đoạn mồi.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" như được sử dụng trong bản mô tả này là được sử dụng không có sự phân biệt.

Thuật ngữ "tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này cũng bao gồm các tế bào ở cá thể động vật và các tế bào được nuôi cấy.

Thuật ngữ "TROP2" như được sử dụng trong bản mô tả này được sử dụng cùng ý nghĩa như protein TROP2.

Thuật ngữ "CDR" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ vùng xác định tính bổ trợ (CDR). Đã biết là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một phân tử kháng thể có ba vùng xác định tính bổ trợ (các CDR). CDR còn được gọi là miền thay đổi mạnh, và có mặt trong vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một kháng thể. Đây là vị trí mà có mức độ thay đổi đặc biệt cao về cấu trúc bậc một, và có ba CDR phân biệt trong cấu trúc bậc một của chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. Trong bản mô tả này, đối với các CDR của một kháng thể, các CDR của chuỗi nặng được biểu thị bằng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ bên đầu tận cùng-amino của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các CDR của chuỗi nhẹ được biểu thị bằng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ bên đầu tận cùng-amino của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ này. Các vị trí này là gần nhau ở cấu trúc bậc ba và xác định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể này gắn kết.

Thuật ngữ "tiến hành lai hoá trong điều kiện nghiêm ngặt" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ quy trình trong đó tiến hành lai hoá trong điều kiện mà có thể nhận dạng được bằng cách lai ở 68°C trong dung dịch lai hoá có bán sẵn trên thị trường ExpressHyb Hybridization Solution (do Clontech, Inc. sản xuất) hoặc bằng cách tiến hành lai ở 68°C với sự có mặt từ 0,7 đến 1,0 M NaCl có sử dụng màng lọc có ADN được cố định trên đó, tiếp đó rửa ở 68°C bằng cách sử dụng dung dịch từ 0,1 đến 2 x SSC (dung dịch 1 x SSC gồm có 150 mM NaCl và 15 mM natri xitrat) hoặc trong các điều kiện tương đương.

## 1. TROP2

TROP2 là thành viên của họ TACSTD được biểu hiện ở các đường mạc của người và là protein màng tế bào típ 1 xuyên màng đơn nhất tham gia vào quá



trình đề kháng miễn dịch, hay gặp đối với các dưỡng mạc và các tế bào ung thư của người.

Đối với protein TROP2 sẽ sử dụng trong sáng chế, protein TROP2 có thể được tinh chế trực tiếp từ các tế bào biểu hiện-TROP2 của người hoặc động vật có vú không phải là người (như chuột cống hoặc chuột nhắt) và được sử dụng, hoặc phân đoạn màng tế bào của các tế bào nêu trên có thể được điều chế và sử dụng. Ngoài ra, TROP2 có thể thu được bằng cách tổng hợp in vitro hoặc sản xuất ở tế bào chủ bằng cách xử lý bằng công nghệ di truyền. Trong xử lý bằng công nghệ di truyền, cụ thể là sau khi ADN bổ trợ của TROP2 được tích hợp vào vật truyền có khả năng biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2, protein TROP2 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch có chứa enzym, cơ chất và chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện TROP2 ở tế bào chủ đã biến nạp chưa có nhân điển hình hoặc đã có nhân điển hình khác. Theo cách khác, các tế bào biểu hiện-TROP2 đã xử lý bằng công nghệ di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm protein TROP2.

Trình tự ADN và trình tự axit amin của TROP2 là có sẵn trong các cơ sở dữ liệu công bố rộng rãi và có thể tham khảo, ví dụ theo số truy cập NM\_002353 và NP\_002344 (NCBI).

Ngoài ra, protein mà gồm có trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được thay thế, khuyết đoạn và/hoặc bổ sung trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trên của TROP2 và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của protein cũng bao gồm trong TROP2.

Protein TROP2 của người được cấu thành bởi trình tự tín hiệu gồm có đầu tận cùng-N gồm có 26 gốc axit amin, miền ngoại bào gồm có 248 gốc axit amin, miền xuyên màng gồm có 23 gốc axit amin, và miền nội bào gồm có 26 gốc axit amin.

## 2. Sản xuất kháng thể kháng-TROP2

Kháng thể kháng lại TROP2 của sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp thường thực hiện trong lĩnh vực này, phương pháp này bao

gồm gây miễn dịch cho động vật bằng TROP2 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ trình tự axit amin của TROP2, và thu gom và tinh chế kháng thể được sản xuất in vivo này. Các loại sinh học của TROP2 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên không chỉ giới hạn ở là của người, và động vật có thể được gây miễn dịch bằng TROP2 thu được từ một động vật khác không phải là người, như chuột nhắt hoặc chuột cống. Trong trường hợp này, bằng cách xét nghiệm tính phản ứng chéo giữa một kháng thể gắn kết với TROP2 khác loài thu được và TROP2 của người, một kháng thể có thể dùng cho bệnh ở người có thể được chọn lọc.

Ngoài ra, kháng thể đơn dòng có thể thu được từ tế bào lai tạo ra bằng các dung hợp các tế bào sản sinh-kháng thể mà sản xuất một kháng thể kháng lại TROP2 với các tế bào u tuỷ theo phương pháp đã biết (ví dụ, Nature, (1975) 256, các trang 495-497 của Kohler và Milstein; Monoclonal Antibodies, các trang 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980) của Kennet, R. biên tập).

TROP2 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên có thể thu được bằng biểu hiện gen TROP2 ở tế bào chủ bằng cách xử lý bằng công nghệ di truyền.

Cụ thể là, vật truyền có khả năng biểu hiện gen TROP2 được tạo ra, và vật truyền thu được được chuyển nhiễm vào tế bào chủ để biểu hiện gen này, và tiếp đó, tinh chế TROP2 đã biểu hiện.

Theo cách khác, tế bào biểu hiện TROP2 được xử lý bằng công nghệ di truyền nêu trên hoặc dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm protein TROP2. Sau đây, mô tả cụ thể phương pháp thu được một kháng thể kháng lại TROP2.

#### (1) Điều chế kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên sẽ sử dụng để sản xuất kháng thể kháng-TROP2 bao gồm TROP2, hoặc polypeptit gồm có trình tự axit amin bán phần bao gồm ít nhất 6 axit amin liên kề của TROP2, hoặc dẫn xuất thu được bằng bổ sung trình tự axit amin xác định hoặc chất mang của nó.

TROP2 có thể được tinh chế trực tiếp từ các mô khối u của người hoặc các tế bào khối u và được sử dụng. Ngoài ra, TROP2 có thể thu được bằng tổng hợp in vitro hoặc bằng cách sản xuất trong tế bào chủ bằng công nghệ di truyền.

Đối với công nghệ di truyền, cụ thể là, sau khi ADN bổ trợ của TROP2 được tích hợp vào vật truyền có khả năng biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2, kháng nguyên này có thể thu được bằng cách tổng hợp nó trong dung dịch có chứa enzym, cơ chất và chất cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình phiên mã và dịch mã, hoặc bằng cách biểu hiện TROP2 trong tế bào chủ được biến nạp chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình khác.

Ngoài ra, kháng nguyên này cũng có thể thu được dưới dạng protein bài tiết bằng cách biểu hiện protein dung hợp thu được bằng nối miễn ngoại bào của TROP2, đây là protein màng, với vùng ổn định của một kháng thể trong hệ vật truyền-vật chủ thích hợp.

ADN bổ trợ của TROP2 có thể thu được bằng, ví dụ, phương pháp được gọi là PCR trong đó tiến hành phản ứng chuỗi polymeraza (sau đây được gọi là "PCR"; xem tài liệu: Science, (1988) 239, các trang 487-489 của Saiki, R. K., và các đồng tác giả) bằng cách sử dụng thư viện ADN bổ trợ biểu hiện ADN bổ trợ của TROP2 dưới dạng khuôn mẫu và các đoạn mồi khuếch đại đặc hiệu ADN bổ trợ của TROP2.

Để tổng hợp polypeptit in vitro, ví dụ, Hệ thống Dịch mã Nhanh (RTS) do Roche Diagnostics, Inc. sản xuất là một ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở ví dụ này.

Ví dụ về các tế bào chủ chưa có nhân điển hình bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*. Để biến nạp các tế bào chủ với gen đích, các tế bào chủ được biến nạp bởi vật truyền plasmit bao gồm replicon, nghĩa là điểm khởi đầu sao chép thu được từ loài tương hợp với vật chủ, và trình tự điều hoà. Ngoài ra, vật truyền tốt hơn là có trình tự có khả năng áp đặt tính chọn lọc kiểu hình gen lên tế bào được biến nạp.

Các ví dụ về các tế bào chủ có nhân điển hình bao gồm các tế bào động vật có xương sống, các tế bào côn trùng, và các tế bào nấm men. Cho các tế bào động vật có xương sống, ví dụ, tế bào COS của khỉ (Cell, (1981) 23, các trang 175-182, của Gluzman, Y., ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), nguyên bào sợi NIH3T3 của chuột (ATCC No. CRL-1658), và chủng

thiếu hụt-dihydrofolat reductaza (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, các trang 4126-4220 của Urlaub, G. và Chasin, L. A.), tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và tế bào tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, không chỉ giới hạn ở các tế bào này.

Thế biến nạp thu được như trên có thể được nuôi cấy theo phương pháp thường được thực hiện trong lĩnh vực này, và bằng cách nuôi cấy thế biến nạp này, polypeptit đích được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào.

Môi trường thích hợp để sử dụng cho nuôi cấy có thể được lựa chọn bởi chuyên gia trong lĩnh vực này từ các môi trường nuôi cấy thông thường được sử dụng tùy thuộc vào các tế bào chủ đã sử dụng. Nếu sử dụng *Escherichia coli*, ví dụ, có thể sử dụng môi trường LB có bổ sung kháng sinh như ampicilin hoặc IPMG nếu cần.

Protein tái tổ hợp được sản xuất nội bào hoặc ngoại bào bởi thế biến nạp thông qua nuôi cấy có thể được phân tách và tinh chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tách đã biết có sử dụng tính chất vật lý hoặc hóa học của protein này.

Các ví dụ cụ thể của các phương pháp này bao gồm xử lý với chất làm kết tủa protein hay gập, siêu lọc, nhiều loại sắc ký lỏng như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực, thẩm tách, và kết hợp các phương pháp này.

Ngoài ra, bằng cách gắn nhãn 6 gốc histidin cho protein tái tổ hợp cần được biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hiệu quả bằng cột sắc ký nickel. Theo cách khác, bằng cách gắn vùng Fc IgG vào protein tái tổ hợp có biểu hiện, protein này có thể được tinh chế một cách hiệu quả bằng cột protein A.

Bằng cách kết hợp các phương pháp nêu trên, có thể dễ dàng sản xuất được lượng lớn polypeptit đích với năng suất cao và độ tinh khiết cao.

Thế biến nạp nêu trên cũng có thể được sử dụng như kháng nguyên. Theo cách khác, dòng tế bào biểu hiện TROP2 có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Ví dụ về dòng tế bào này bao gồm các dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-

H322, PC14, NCIH-H2122, và LCAM1, dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt của người PC3, dòng tế bào ung thư tụy của người BxPC-3, Capan-1, và PK-1, dòng tế bào ung thư buồng trứng của người SKOV3, và dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205, mặc dù không chỉ giới hạn ở các dòng tế bào này theo Sáng chế miễn là có biểu hiện TROP2.

## (2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng-TROP2

Ví dụ về kháng thể gắn kết đặc hiệu với TROP2 bao gồm kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với TROP2, và phương pháp thu được kháng thể này như được mô tả dưới đây.

Việc sản xuất kháng thể đơn dòng nói chung đòi hỏi các bước tiến hành dưới đây:

(a) tinh chế polyme sinh học sẽ sử dụng làm kháng nguyên, hoặc điều chế các tế bào biểu hiện-kháng nguyên;

(b) điều chế các tế bào sản sinh-kháng thể bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng cách tiêm kháng nguyên này, lấy máu, định lượng hiệu giá kháng thể để xác định khi cắt lá lách;

(c) điều chế các tế bào u tủy (dưới đây gọi là "u tủy");

(d) dung hợp các tế bào sản sinh-kháng thể này với u tủy;

(e) sàng lọc nhóm các tế bào lai sản sinh kháng thể mong muốn;

(f) chia các tế bào lai thành các dòng tế bào đơn nhất (tách dòng);

(g) tùy ý, nuôi cấy tế bào lai này hoặc nuôi động vật được ghép tế bào lai này để sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng;

(h) xét nghiệm kháng thể đơn dòng được sản xuất theo cách này về hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu gắn kết, hoặc thử nghiệm tương tự cho các tính chất như chất thử được đánh dấu; và xét nghiệm tương tự.

Sau đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết theo các bước nêu trên, tuy nhiên, không giới hạn ở phương pháp này và, ví dụ, có thể sử dụng các tế bào sản sinh-kháng thể không phải là tế bào lá lách và u tủy.

## (a) Tinh chế kháng nguyên

Cho kháng nguyên, có thể sử dụng TROP2 được điều chế bằng phương pháp nêu trên hoặc peptit bán phần của nó.

Ngoài ra, phân đoạn màng được điều chế từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện TROP2 hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện chính TROP2, và peptit bán phần của protein của sáng chế được tổng hợp bằng phương pháp hoá học đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

Ngoài ra, dòng tế bào biểu hiện TROP2 cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

(b) Điều chế các tế bào sản sinh-kháng thể

Kháng nguyên thu được ở bước (a) được trộn với tá được như tá được hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh hoặc chất phụ trợ như nhôm kali sulfat và hỗn hợp thu được được sử dụng làm tác nhân miễn dịch để gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm. Theo phương pháp khác, động vật thí nghiệm được gây miễn dịch bằng tế bào biểu hiện-kháng nguyên như là tác nhân gây miễn dịch. Để làm động vật thí nghiệm, động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp sản xuất lai đã biết có thể được sử dụng. Cụ thể là, ví dụ, có thể sử dụng chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, bò, ngựa hoặc động vật tương tự. Tuy nhiên, theo quan điểm sẵn có các tế bào u tủy để dung hợp với các tế bào sản sinh-kháng thể đã chiết xuất, tốt hơn là sử dụng chuột nhắt hoặc chuột cống làm động vật sẽ được gây miễn dịch.

Ngoài ra, giống chuột nhắt hoặc chuột cống sẽ sử dụng không bị giới hạn cụ thể, và trong trường hợp chuột nhắt, ví dụ, nhiều giống như A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, và 129 và giống tương tự có thể được sử dụng, và trong trường hợp chuột cống, ví dụ, có thể sử dụng Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer và giống tương tự.

Các con chuột nhắt và chuột cống này có thể thu được từ cơ sở gây giống/phân phối động vật thí nghiệm, ví dụ, CLEA Japan, Inc. và Charles River Laboratories Japan, Inc.

Xét đến tính tương hợp dung hợp với các tế bào u tuỷ nêu dưới đây, trong trường hợp chuột nhắt, đặc biệt ưu tiên giống BALB/c, và trong trường hợp chuột cống, đặc biệt ưu tiên các giống Wistar và Low làm động vật sẽ gây miễn dịch.

Ngoài ra, xét đến tính tương đồng kháng nguyên giữa người và chuột nhắt, cũng ưu tiên sử dụng chuột nhắt có chức năng sinh học giảm thiểu để loại bỏ các tự kháng thể, nghĩa là, chuột mắc bệnh tự miễn.

Lứa tuổi của chuột nhắt hoặc chuột cống này ở thời điểm gây miễn dịch tốt hơn là 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn là từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch động vật bằng TROP2 hoặc thể tái tổ hợp của nó, ví dụ, có thể sử dụng phương pháp đã biết được mô tả chi tiết trong, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) hoặc phương pháp tương tự.

Trong số các phương pháp gây miễn dịch này, phương pháp cụ thể được ưu tiên trong Sáng chế là, ví dụ, như sau.

Nghĩa là, trước tiên, phân đoạn protein màng vai trò như kháng nguyên hoặc các tế bào gây biểu hiện kháng nguyên này được sử dụng qua đường trong da hoặc trong màng bụng cho động vật. Tuy nhiên, ưu tiên kết hợp cả hai đường dùng để làm gia tăng hiệu quả gây miễn dịch, và khi sử dụng trong da ở nửa đầu và sử dụng trong màng bụng ở nửa còn lại hoặc chỉ ở lần sử dụng cuối cùng, hiệu quả gây miễn dịch có thể được gia tăng đặc biệt.

Phác đồ sử dụng kháng nguyên này thay đổi tùy thuộc vào loại động vật sẽ gây miễn dịch, sự khác biệt giữa các cá thể hoặc yếu tố tương tự. Tuy nhiên, nói chung phác đồ sử dụng, trong đó ưu tiên tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 6 lần và khoảng cách giữa các lần dùng là từ 2 đến 6 tuần, và ưu tiên hơn phác đồ sử dụng trong đó tần suất sử dụng kháng nguyên là từ 3 đến 4 lần và khoảng cách giữa các lần dùng là từ 2 đến 4 tuần.

Ngoài ra, liều dùng của kháng nguyên thay đổi tùy thuộc vào loại động vật, sự khác biệt giữa các cá thể hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, nói chung liều dùng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ 0,1 đến 0,5 mg.

Tiến hành gây miễn dịch tăng cường từ 1 đến 6 tuần, tốt hơn là từ 1 đến 4 tuần, tốt hơn nữa là từ 1 đến 3 tuần sau khi sử dụng kháng nguyên như nêu trên. Khi tác nhân gây miễn dịch là các tế bào, sử dụng từ  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^7$  tế bào.

Liều dùng của kháng nguyên này ở thời điểm tiến hành gây miễn dịch tăng cường thay đổi tùy thuộc vào loại hoặc kích cỡ của động vật hoặc yếu tố tương tự, tuy nhiên, ví dụ, trong trường hợp chuột nhắt, liều dùng nói chung là ấn định trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg, tốt hơn là từ 0,1 đến 0,5 mg, tốt hơn nữa là khoảng từ 0,1 đến 0,2 mg. Khi tác nhân gây miễn dịch là các tế bào, sử dụng từ  $1 \times 10^6$  đến  $1 \times 10^7$ .

Các tế bào lá lách hoặc các lympho bào kể cả các tế bào sản sinh-kháng thể lấy bằng cách vô khuẩn từ động vật đã gây miễn dịch sau từ 1 đến 10 ngày, tốt hơn là từ 2 đến 5 ngày, tốt hơn nữa là từ 2 đến 3 ngày sau khi gây miễn dịch tăng cường. Ở thời điểm này, xác định đo hiệu giá kháng thể, và nếu động vật có hiệu giá kháng thể gia tăng đủ được sử dụng làm nguồn cung cấp các tế bào sản sinh- kháng thể, có thể thực hiện quy trình tiếp đó hiệu quả hơn.

Ví dụ về phương pháp xác định hiệu giá kháng thể sẽ sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp này. Ví dụ, nếu sử dụng phương pháp ELISA, có thể thực hiện đo hiệu giá kháng thể theo các quy trình như nêu dưới đây.

Đầu tiên, kháng nguyên đã tinh chế hoặc đã tinh chế một phần được hấp phụ vào bề mặt pha rắn như là đĩa 96-giếng cho ELISA, và bề mặt pha rắn không có kháng nguyên hấp phụ được phủ với protein không cùng họ kháng nguyên này như albumin huyết thanh bò (BSA). Sau khi rửa bề mặt, cho bề mặt này tiếp xúc với mẫu thử được pha loãng theo bậc (ví dụ, huyết thanh chuột) dưới dạng kháng thể cấp một để kháng thể trong mẫu thử gắn kết với kháng nguyên này.

Ngoài ra, làm kháng thể thứ hai, một kháng thể được đánh dấu bằng enzym kháng lại kháng thể của chuột được thêm vào và để gắn kết với kháng thể của



chuột. Sau khi rửa, bổ sung thêm cơ chất cho enzym và xác định thay đổi về độ hấp thụ do hiện màu được cảm ứng bởi sự phân huỷ cơ chất hoặc chất tương tự và tính hiệu giá kháng thể dựa trên chỉ số đo xác định được này.

Việc tách các tế bào sản sinh-kháng thể từ các tế bào lá lách hoặc các lympho bào động vật đã gây miễn dịch có thể thực hiện theo phương pháp đã biết (ví dụ, Nature (1975), 256, trang 495 của Kohler và các đồng tác giả; Eur. J. Immunol. (1977), 6, trang 511 của Kohler và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 550 của Milstein và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 495 của Walsh). Ví dụ, trong trường hợp các tế bào lá lách, phương pháp chung trong đó các tế bào sản sinh-kháng thể được phân tách bằng cách đồng thể hoá lá lách để thu được các tế bào bằng cách lọc với rây thép không gỉ và tạo hỗn dịch các tế bào này có thể sử dụng trong Môi trường Thiết yếu Tối thiểu (MEM) Eagle's. (c) Điều chế các tế bào u tuỷ (dưới đây gọi là "u tuỷ")

Các tế bào u tuỷ sẽ được sử dụng để dung hợp tế bào không bị giới hạn cụ thể và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, xét đến việc thuận tiện khi tế bào lai được chọn từ các tế bào được dung hợp, tốt hơn là sử dụng giống thiếu hụt HGPRT (hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza) mà có quy trình chọn lọc đã được xác định.

Cụ thể hơn là, ví dụ về giống thiếu hụt-HGPRT bao gồm X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, và BU.1 thu được từ chuột nhắt; 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) thu được từ chuột cống; và U266AR(SKO-007), GM1500.GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) và 8226AR/NIP4-1(NP41) thu được từ người. Các giống thiếu hụt-HGPRT là có sẵn từ, ví dụ, ATCC hoặc cơ sở tương tự.

Các giống tế bào này được nuôi cấy chuyển tiếp trong môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin (môi trường thu được bằng bổ sung thêm 8-azaguanin vào môi trường RPMI 1640 có bổ sung glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, và huyết thanh bào thai bê (dưới đây gọi là "FBS")), môi trường Dulbecco cải biến của Iscove (IMDM), hoặc môi trường Eagle cải biến của

(DMEM). Trong trường hợp này, từ 3 đến 4 ngày trước khi tiến hành dung hợp tế bào, các tế bào được nuôi cấy chuyển tiếp trong môi trường bình thường (ví dụ, môi trường ASF104 (do Ajinomoto Co., Ltd. sản xuất) có chứa 10% FCS) để đảm bảo không ít hơn  $2 \times 10^7$  tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

#### (d) Dung hợp tế bào

Có thể tiến hành một cách thích hợp dung hợp giữa các tế bào sản sinh-kháng thể và các tế bào u tuỷ theo phương pháp đã biết (Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987) của Weir, D. M.; Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), của Kabat, E. A. và Mayer, M. M., v.v.), trong các điều kiện sao cho tỷ lệ sống sót của các tế bào không bị giảm đi quá mức.

Cho phương pháp này, ví dụ, có thể sử dụng phương pháp hoá học trong đó các tế bào sản sinh-kháng thể và các tế bào u tuỷ được trộn trong dung dịch có chứa polyme như là polyetylen glycol ở nồng độ cao, có thể sử dụng phương pháp vật lý sử dụng kích thích bằng điện, hoặc phương pháp tương tự. Trong số các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hoá học được mô tả dưới đây.

Nghĩa là, trong trường hợp sử dụng polyethylene glycol trong dung dịch có chứa polyme ở nồng độ cao, các tế bào sản sinh-kháng thể và các tế bào u tuỷ được trộn trong dung dịch polyethylene glycol có phân tử lượng từ 1500 đến 6000, tốt hơn là từ 2000 đến 4000 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, tốt hơn là từ 35 đến 38°C trong từ 1 đến 10 phút, tốt hơn là từ 5 đến 8 phút.

#### (e) Chọn lọc nhóm các tế bào lai

Phương pháp chọn lọc các tế bào lai thu được bằng cách dung hợp tế bào nêu trên là không bị giới hạn cụ thể. Thông thường, sử dụng phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin, aminopterin, thymidin) (Nature (1975), 256, trang 495 của Kohler và các đồng tác giả; Nature (1977), 266, trang 550 của Milstein và các đồng tác giả,).

Phương pháp này có hiệu quả khi các tế bào lai được thu được bằng cách sử dụng các tế bào u tuỷ của giống thiếu hụt-HGPRT không thể sống sót với sự

có mặt của aminopterin. Nghĩa là, bằng cách nuôi cấy các tế bào không được dung hợp và các tế bào lai trong môi trường HAT, chỉ các tế bào lai kháng lại aminopterin được chọn lọc để sống sót và tăng sinh.

(f) Tách dòng thành dòng tế bào đơn nhất (tách dòng)

Cho phương pháp tách dòng các tế bào lai, có thể sử dụng phương pháp đã biết như phương pháp metyloxenuloza, phương pháp agaroza mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn (xem, ví dụ: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman và Company, San Francisco (1980) của Barbara, B. M. và Stanley, M. S.). Trong số các phương pháp này, cụ thể là, ưu tiên phương pháp nuôi cấy ba chiều như là phương pháp metyloxenuloza. Ví dụ, nhóm các tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào được tạo huyền phù trong môi trường metyloxenuloza như môi trường chọn lọc ClonaCell-HY D (do StemCell Technologies, Inc., sản xuất #03804) và nuôi cấy. Tiếp đó, thu gom các khuẩn lạc tế bào lai tạo thành, từ đó có thể thu được các tế bào lai đơn dòng. Nuôi cấy các khuẩn lạc tế bào lai tương ứng đã thu gom, và chọn lọc tế bào lai đã được xác nhận có hiệu giá kháng thể ổn định trong dịch nổi nuôi cấy tế bào lai thu được làm giống tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng- TROP2.

Ví dụ về giống tế bào lai đã được xác định này bao gồm tế bào lai TROP2 TINA1. Trong bản mô tả này, một kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai TROP2 TINA1 được gọi là "kháng thể TINA1" hoặc đơn giản là "TINA1".

Vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể TINA1 có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự.

(g) Điều chế kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy tế bào lai

Bằng cách nuôi cấy tế bào lai đã chọn lọc này, có thể thu được kháng thể đơn dòng một cách hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuôi cấy, ưu tiên tiến hành sàng lọc tế bào lai mà sản sinh kháng thể đơn dòng đích.

Để sàng lọc này, có thể sử dụng phương pháp đã biết.

Thực hiện xác định hiệu giá kháng thể theo sáng chế bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong mục (b) nêu trên.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được bảo quản ở trạng thái đông lạnh trong nitơ lỏng trong tủ đá ở  $-80^{\circ}\text{C}$  hoặc thấp hơn.

Sau khi hoàn thành bước tách dòng, thay đổi môi trường từ môi trường HT thành môi trường bình thường, và nuôi cấy tế bào lai.

Tiến hành nuôi cấy quy mô lớn bằng cách nuôi cấy luân phiên bằng cách sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc bằng cách nuôi cấy quay tròn. Từ dịch nổi thu được bằng cách nuôi cấy quy mô lớn, kháng thể đơn dòng mà gắn kết đặc hiệu với protein của sáng chế có thể thu được bằng cách tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này như lọc qua gel.

Ngoài ra, tiêm tế bào lai vào khoang bụng của chuột nhắt cùng giống như tế bào lai (ví dụ, BALB/c nêu trên) hoặc chuột nhắt Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, từ đó có thể thu được dịch cổ trướng có chứa lượng lớn kháng thể đơn dòng của sáng chế.

Trong trường hợp, khi sử dụng tế bào lai trong khoang bụng, nếu dầu khoáng như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được sử dụng từ 3 đến 7 ngày trước đó, có thể thu được lượng lớn các dịch cổ trướng.

Ví dụ, chất ức chế miễn dịch trước đó được tiêm vào khoang bụng của chuột cùng giống như tế bào lai để làm bất hoạt tế bào T. 20 ngày sau đó, từ  $10^6$  đến  $10^7$  các tế bào dòng tế bào lai được tạo huyền phù trong môi trường không có huyết thanh (0,5 ml), và huyền phù này được sử dụng trong khoang bụng của chuột nhắt. Nói chung, khi bụng trướng lên và đầy dịch cổ trướng, thu gom dịch cổ trướng từ chuột này. Bằng phương pháp này, có thể thu được kháng thể đơn dòng ở nồng độ gấp khoảng 100 lần hoặc cao hơn nồng độ trong dung dịch nuôi cấy.

Kháng thể đơn dòng thu được bằng phương pháp nêu trên có thể được tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong, ví dụ: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978) của Weir, D. M..

Kháng thể đơn dòng thu được theo cách này có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với TROP2.

(h) Thử nghiệm kháng thể đơn dòng

Xác định isotyp và phân nhóm kháng thể đơn dòng thu được theo cách này như sau.

Trước tiên, các ví dụ về phương pháp nhận dạng bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA, và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony là đơn giản, nhưng khi nồng độ kháng thể đơn dòng thấp, cần phải có quá trình ngưng tụ.

Mặt khác, khi sử dụng phương pháp ELISA hoặc phương pháp RIA, bằng cách cho dịch nổi nuôi cấy phản ứng trực tiếp pha rắn có hấp phụ-kháng nguyên và sử dụng các kháng thể tương ứng với nhiều loại các isotyp globulin miễn dịch và các phân nhóm làm kháng thể thứ hai, có thể nhận dạng isotyp và phân nhóm của kháng thể đơn dòng.

Hơn nữa, cho phương pháp đơn giản hơn, bộ kit nhận dạng có bán sẵn trên thị trường (ví dụ, Mouse Typer Kit do Bio-Rad Laboratories, Inc. sản xuất) hoặc kit tương tự cũng có thể được sử dụng.

Ngoài ra, có thể tiến hành xác định định lượng protein bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính toán dựa trên độ hấp thụ ở 280 nm ( $1,4 \text{ (OD } 280) = 1 \text{ mg/ml globulin miễn dịch}$ ).

Ngoài ra, thậm chí khi thu được kháng thể đơn dòng một cách riêng rẽ và độc lập bằng cách lặp lại các bước từ (a) đến (h) trong (2), có thể thu được một kháng thể có hoạt tính gây độc tế bào tương đương với hoạt tính của kháng thể TINA1. Như một ví dụ của kháng thể này, lấy ví dụ một kháng thể mà gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Nếu kháng thể đơn dòng mới được sản xuất gắn kết với peptit bán phần hoặc cấu trúc bậc ba bán phần mà kháng thể TINA1 gắn kết với, có thể xác định được là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Ngoài ra, bằng cách xác nhận là kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể TINA1 để gắn kết với TROP2 (nghĩa là, kháng thể đơn dòng ức chế gắn kết giữa kháng thể TINA1 và TROP2), có thể xác định

là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng-TROP2 thậm chí nếu trình tự epitop hoặc cấu trúc đặc hiệu chưa được xác định. Khi xác nhận được là kháng thể đơn dòng gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng-TROP2, kháng thể đơn dòng được cho là có ái lực gắn kết-kháng nguyên và hoạt tính sinh học tương đương với các tính chất này của kháng thể TINA1.

### (3) Các kháng thể khác

Kháng thể của sáng chế không chỉ bao gồm kháng thể đơn dòng nêu trên kháng lại TROP2 mà còn bao gồm kháng thể tái tổ hợp thu được bằng cách cải biến nhân tạo để làm giảm tính kháng nguyên khác loài đối với người như là kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể của người. Các kháng thể này có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp đã biết.

Cho kháng thể khảm, có thể lấy ví dụ kháng thể trong đó các vùng thay đổi và ổn định của kháng thể là thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm trong đó các vùng thay đổi của kháng thể thu được từ-chuột nhắt hoặc –chuột cống được nối với vùng ổn định của kháng thể thu được từ người (xem: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

Cho kháng thể được làm tương thích với người, có thể lấy ví dụ một kháng thể thu được bằng tích hợp chỉ vùng xác định tính bổ trợ (CDR) vào kháng thể thu được từ-người (xem Nature (1986) 321, các trang 522-525), và một kháng thể thu được bằng ghép một phần của gốc axit amin của trình tự khung cũng như trình tự CDR với kháng thể của người bằng phương pháp ghép-CDR (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 90/07861).

Tuy nhiên, kháng thể được làm tương thích với người thu được từ kháng thể TINA1 không chỉ giới hạn ở kháng thể được làm tương thích với người đặc hiệu miễn là kháng thể được làm tương thích với người này có tất cả 6 loại trình tự CDR của kháng thể TINA1. Vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 có CDRH1 (TAGMQ) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 23 trong Danh mục trình tự, CDRH2 (WINTHSGVPKYAEDFKG) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 24 trong Danh mục trình tự, và

CDRH3 (SGFGSSYWYFDV) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 25 trong Danh mục trình tự. Ngoài ra, vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 có CDRL1 (KASQDVSTAVA) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự, CDRL2 (SASYRYT) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 27 trong Danh mục trình tự, và CDRL3 (QQHYITPLT) gồm có trình tự axit amin được biểu thị bằng SEQ ID NO: 28 trong Danh mục trình tự.

Cho ví dụ về kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể chuột TINA1, có thể lấy ví dụ tổ hợp tùy ý chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng gồm có trình tự bất kỳ trong số (1) trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:14, hoặc SEQ ID NO:16 trong Danh mục trình tự, (2) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1) nêu trên, và (3) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin (1) nêu trên được khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ gồm có trình tự bất kỳ trong số (4) trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:20, hoặc SEQ ID NO:22 trong Danh mục trình tự, (5) trình tự axit amin có mức tương đồng ít nhất là 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (4) nêu trên, và (6) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin (4) nêu trên được khuyết đoạn, thay thế hoặc bổ sung.

Thuật ngữ "một vài" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2.

Cho thay thế axit amin trong bản mô tả này, ưu tiên thay thế axit amin bảo toàn. Thay thế axit amin bảo toàn chỉ thay thế ở nhóm các axit amin có liên quan đến các mạch bên axit amin. Các nhóm axit amin được ưu tiên là như sau: nhóm axit (axit aspartic và axit glutamic); nhóm bazơ (lysin, arginin, và histidin); nhóm không phân cực (alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, phenylalanin, methionin, và tryptophan); và nhóm phân cực không tích điện (glyxin, asparagin,

glutamin, xystein, serin, threonin, và tyrosin). Các axit amin được ưu tiên hơn là như sau: nhóm hydroxy béo (serin và threonin); nhóm có chứa-amit (asparagin và glutamin); nhóm béo (alanine, valin, loxin, và isoloxin); và nhóm thơm (phenylalanin, tryptophan, và tyrosin). Thay thế axit amin này tốt hơn là trong khoảng trình tự mà không ảnh hưởng đến các tính chất của chất có trình tự axit amin ban đầu.

Cho kháng thể có tổ hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng



thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, cho kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ

ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Cho kháng thể có tổ hợp được ưu tiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm vùng thay đổi gồm có trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, cho một kháng thể có một tổ hợp được ưu tiên hơn khác của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có

chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22.

Cho một kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Ngoài ra, cho một kháng thể có tổ hợp được ưu tiên hơn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên, có thể lấy ví dụ một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18; một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các

vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20; và một kháng thể gồm có chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 20 đến 469 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin gồm có các vị trí axit amin từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

Bằng cách kết hợp một trình tự có mức tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nặng được mô tả ở trên với trình tự có mức tương đồng cao với trình tự axit amin chuỗi nhẹ được mô tả ở trên, có thể chọn lọc một kháng thể có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của từng kháng thể trong số các kháng thể nêu trên. Mức tương đồng này nói chung là 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là mức tương đồng 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là mức tương đồng 95% hoặc cao hơn, tốt nhất là mức tương đồng 99% hoặc cao hơn. Ngoài ra, bằng cách kết hợp trình tự axit amin trong đó từ một đến một vài gốc axit amin được thay thế, khuyết đoạn hoặc bổ sung trong trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, cũng có thể chọn lọc một kháng thể có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của từng kháng thể trong số các kháng thể nêu trên.

Mức tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng các thông số mặc định của thuật toán Blast phiên bản 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, và David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST và PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Cũng có thể sử dụng thuật toán Blast qua Internet bằng cách truy cập vào: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Trong trình tự axit amin chuỗi nặng được biểu thị bằng SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 hoặc SEQ ID NO: 16 trong Danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140 là vùng thay đổi, và trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 141 đến 470 là vùng ổn định. Trình tự của SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 và SEQ ID NO:16 tương ứng được thể hiện trên Fig. 3, Fig. 4 và Fig. 5.

Ngoài ra, trong trình tự axit amin chuỗi nhẹ được biểu thị bằng SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 trong Danh mục trình tự, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20 là trình tự tín hiệu, trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129 là vùng thay đổi, và trình tự axit amin gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 là vùng ổn định. Trình tự của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 22 tương ứng được thể hiện trên Fig. 6, Fig.7 và Fig.8.

Ngoài ra, kháng thể của sáng chế bao gồm kháng thể của người mà gắn kết với TROP2. Kháng thể kháng-TROP2 của người chỉ kháng thể của người chỉ có trình tự của một kháng thể thu được từ nhiễm sắc thể của người. Kháng thể kháng-TROP2 của người có thể thu được bằng phương pháp sử dụng chuột sản sinh-kháng thể của người có mảnh nhiễm sắc thể của người bao gồm các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người (xem: Nature Genetics (1997) 16, các trang 133-143 của Tomizuka, K. và các đồng tác giả; Nucl. Acids Res. (1998) 26, các trang 3447-3448 của Kuroiwa, Y. và các đồng tác giả; Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects tập 10, các trang 69-73 của Yoshida, H. và các đồng tác giả, (Kitagawa, Y., Matuda, T. và Iijima, S. biên tập), Kluwer Academic Publishers, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, các trang 722-727 của Tomizuka, K. và các đồng tác giả, v.v.).

Chuột sản sinh-kháng thể của người có thể được tạo ra cụ thể như sau. Động vật biến đổi gen trong đó locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch nội sinh đã bị phá vỡ, và thay vào đó, gen trong đó locus gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của người được đưa vào thông qua vật truyền nhiễm sắc thể nấm men (YAC) hoặc vật truyền tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra con khuyết gen và con chuyển gen và cho các con này giao phối với nhau.

Ngoài ra, theo kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bằng cách sử dụng ADN bổ trợ mã hoá lần lượt chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của người, và tốt hơn là vật truyền bao gồm ADN bổ trợ này, các tế bào có nhân điển hình được biến nạp, và tế bào biến nạp sản sinh kháng thể đơn dòng của người tái tổ hợp được nuôi cấy, từ đó cũng có thể thu được kháng thể này từ dịch nổi nuôi cấy.

Ở đây, để làm vật chủ, ví dụ, có thể sử dụng các tế bào có nhân điển hình, tốt hơn là các tế bào động vật có vú như các tế bào CHO, các lympho bào, hoặc các tế bào u tủy.

Ngoài ra, phương pháp pháp thu được kháng thể của người thu được từ bộ lọc thực khuẩn thể được chọn từ thư viện kháng thể của người (xem: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), các trang 2301-2308 của Wormstone, I. M. và các đồng tác giả; *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2), các trang 189-203 của Carmen, S. và các đồng tác giả; *Ophthalmology* (2002) 109 (3), các trang 427-431 của Siriwardena, D. và các đồng tác giả, v.v.) cũng là đã biết.

Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp bộ lọc thực khuẩn thể trong đó vùng thay đổi kháng thể của người được biểu hiện trên bề mặt của thực khuẩn thể dưới dạng kháng thể đơn-chuỗi (scFv), và thực khuẩn thể mà gắn kết với kháng nguyên được chọn lọc (*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9), các trang 1105-1116).

Bằng cách phân tích gen của thực khuẩn thể được chọn lọc dựa trên khả năng gắn kết với kháng nguyên, có thể xác định trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của kháng thể của người mà gắn kết với kháng nguyên.

Nếu trình tự ADN của scFv mà gắn kết với kháng nguyên được xác định, kháng thể của người có thể thu được bằng điều chế vật truyền biểu hiện bao gồm trình tự và đưa vật truyền này vào vật chủ thích hợp để biểu hiện nó (các Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12, các trang 433-455; *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9), các trang 1105-1116).

Nếu kháng thể của người mới sản sinh gắn kết với peptit bán phần hoặc cấu trúc bậc ba bán phần mà kháng thể TINA1 gắn kết với, có thể xác định được là kháng thể của người này gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1. Ngoài ra, bằng cách xác nhận là kháng thể của người cạnh tranh với kháng thể TINA1 để gắn kết với TROP2 (nghĩa là, kháng thể của người ức chế sự gắn kết giữa

kháng thể TINA1 và TROP2), có thể xác định được là kháng thể của người gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1 cho dù trình tự epitop hoặc cấu trúc đặc hiệu chưa xác định được. Khi xác nhận là kháng thể của người gắn kết với cùng epitop như kháng thể TINA1, kháng thể của người được cho là có hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính của kháng thể TINA1.

Các kháng thể khảm, các kháng thể được làm tương thích với người, hoặc các kháng thể của người thu được bằng phương pháp nêu trên được đánh giá về tính chất gắn kết với kháng nguyên bằng phương pháp đã biết hoặc phương pháp tương tự, và có thể chọn lọc kháng thể được ưu tiên.

Cho ví dụ về một chỉ số khác để sử dụng trong so sánh các tính chất của các kháng thể, có thể lấy ví dụ độ ổn định của các kháng thể. Phân tích nhiệt quét vi sai (DSC) là thiết bị có khả năng xác định nhanh chóng và chính xác nhiệt độ trung điểm biến tính nhiệt ( $T_m$ ) sẽ sử dụng là chỉ số ưu tiên về độ ổn định cấu dạng tương đối của các protein. Bằng cách xác định các giá trị  $T_m$  sử dụng DSC và so sánh các giá trị này, có thể so sánh mức chênh lệch độ ổn định nhiệt. Đã biết là độ ổn định bảo quản của các kháng thể thể hiện sự tương quan với độ ổn định nhiệt của các kháng thể (Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, các trang 265-273 của Lori Burton, và các đồng tác giả), và có thể chọn lọc kháng thể được ưu tiên bằng cách sử dụng độ ổn định nhiệt như là một chỉ số. Các ví dụ về các chỉ số khác để chọn lọc các kháng thể bao gồm các dấu hiệu sau: hiệu suất ở tế bào chủ thích hợp là cao; và khả năng kết tụ trong dung dịch nước là thấp. Ví dụ, một kháng thể mà thể hiện hiệu suất cao nhất không phải lúc nào cũng thể hiện độ ổn định nhiệt cao nhất, và do đó, cần thiết chọn lọc một kháng thể thích hợp nhất để sử dụng cho người bằng cách so sánh toàn diện dựa trên các chỉ số nêu trên.

Theo Sáng chế, cũng bao gồm biến thể được cải biến của kháng thể này. Biến thể được cải biến chỉ biến thể thu được bằng cách cải biến hoá học hoặc sinh học kháng thể của sáng chế. Các ví dụ về biến thể được cải biến hoá học bao gồm các biến thể được cải biến hoá học bằng cách liên kết nhóm hoá học với khung axit amin, các biến thể được cải biến hoá học với mạch hydrat cacbon

được liên kết qua-N hoặc -O, v.v.. Ví dụ về biến thể được cải biến hoá học bao gồm các biến thể thu được bằng cách cải biến sau dịch mã (như glycosyl hoá liên kết qua-N hoặc -O, xử lý đầu tận cùng-N hoặc -C, khử amit hoá, đồng phân hoá axit aspartic, hoặc oxi hoá methionin), và các biến thể, trong đó gốc methionin đã được thêm vào đầu tận cùng N bằng cách cho biểu hiện ở tế bào chủ chưa có nhân điển hình.

Ngoài ra, một kháng thể được đánh dấu sao cho tạo điều kiện để phát hiện hoặc phân tách kháng thể này hoặc kháng nguyên của sáng chế, ví dụ, kháng thể được đánh dấu bằng-enzym, kháng thể được đánh dấu-huỳnh quang, và kháng thể được đánh dấu-ái lực cũng được bao gồm trong định nghĩa biến thể được cải biến. Biến thể được cải biến của kháng thể của sáng chế là hữu ích để cải thiện độ ổn định và lưu giữ trong máu của kháng thể này, giảm tính kháng nguyên của nó, phát hiện hoặc phân tách một kháng thể hoặc kháng nguyên, và v.v..

Ngoài ra, bằng cách điều hoà cải biến glycan được liên kết với kháng thể của sáng chế (glycosyl hoá, khử fucosyl hoá, v.v.), có thể làm tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc-kháng thể. Cho kỹ thuật điều hoà cải biến glycan của các kháng thể, các Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, v.v. là đã biết. Tuy nhiên, không chỉ giới hạn ở kỹ thuật này. Trong kháng thể của sáng chế, cũng bao gồm một kháng thể trong đó cải biến glycan được điều hoà.

Trong trường hợp, một kháng thể được sản xuất trước tiên bằng cách phân lập một gen kháng thể và tiếp đó đưa gen này vào vật chủ thích hợp, có thể sử dụng tổ hợp vật chủ thích hợp và vật truyền biểu hiện thích hợp. Các ví dụ cụ thể về gen kháng thể này bao gồm tổ hợp của gen mã hoá trình tự chuỗi nặng của một kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và gen mã hoá trình tự chuỗi nhẹ của nó. Khi tế bào chủ được biến nạp, có thể cài xen gen trình tự chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào cùng một vật truyền biểu hiện, và cũng có thể cài xen vào các vật truyền biểu hiện khác nhau một cách riêng rẽ.

Trong trường hợp, các tế bào có nhân điển hình được sử dụng làm vật chủ, có thể sử dụng các tế bào động vật, các tế bào thực vật và các vi sinh vật có nhân



điển hình. Làm các tế bào động vật, có thể lấy ví dụ các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào COS (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, các trang 175-182, ATCC CRL-1650), nguyên bào sợi của chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, các trang 4126-4220) của tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61).

Trong trường hợp, sử dụng các tế bào chưa có nhân điển hình, ví dụ, có thể lấy ví dụ *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*.

Bằng cách đưa gen kháng thể mong muốn vào các tế bào này thông qua việc biến nạp, và nuôi cấy các tế bào đã biến nạp này in vitro, có thể thu được kháng thể này. Trong phương pháp nuôi cấy nêu trên, hiệu suất đôi khi có thể biến thiên tùy thuộc vào trình tự của kháng thể này, và do đó, có thể chọn lọc một kháng thể mà dễ dàng được sản xuất làm thuốc bằng cách sử dụng hiệu suất như là một chỉ số cho các kháng thể có hoạt tính gắn kết tương đương. Do đó, kháng thể của sáng chế cũng bao gồm một kháng thể thu được bằng phương pháp sản xuất kháng thể, đặc trưng ở chỗ bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ đã biến nạp và bước thu gom kháng thể mong muốn từ sản phẩm được nuôi cấy trong bước nuôi cấy.

Đã biết là gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy được phát hiện (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), và cũng đã biết là hai gốc axit amin (glyxin và lysin) ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể được sản sinh trong tế bào động vật có vú được nuôi cấy được phát hiện và gốc prolin mới ở vị trí đầu tận cùng carboxyl được amit hoá (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Tuy nhiên, việc khuyết đoạn và cải biến trình tự chuỗi nặng không ảnh hưởng đến ái lực gắn kết-kháng nguyên và chức năng hiệu ứng (hoạt hoá bổ thể, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc-kháng thể, v.v.) của kháng thể này. Do đó, kháng thể theo Sáng chế cũng bao gồm một kháng thể được cải biến và mảnh hoạt động của kháng thể này, và biến thể khuyết đoạn trong đó một hoặc hai axit amin đã được khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng, biến thể thu

được bằng cách amit hoá biến thể khuyết đoạn (ví dụ, chuỗi nặng trong đó gốc prolin đầu tận cùng carboxyl đã được amit hoá), và biến thể tương tự. Loại biến thể khuyết đoạn có khuyết đoạn ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các biến thể nêu trên miễn là ái lực gắn kết-kháng nguyên và chức năng hiệu ứng được bảo toàn. Hai chuỗi nặng cấu thành kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại được chọn từ nhóm gồm có chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và biến thể khuyết đoạn nêu trên, hoặc có thể thuộc hai loại kết hợp hai biến thể này được chọn lọc. Tỷ lệ lượng mỗi biến thể khuyết đoạn có thể bị ảnh hưởng bởi loại tế bào động vật có vú được nuôi cấy mà sản xuất kháng thể theo sáng chế và điều kiện nuôi cấy, tuy nhiên, có thể lấy ví dụ trường hợp khi một gốc axit amin ở đầu tận cùng carboxyl đã được khuyết đoạn ở cả hai chuỗi nặng có chứa như là các thành phần chính trong kháng thể theo sáng chế.

Isotyp của kháng thể của sáng chế, ví dụ, có thể lấy ví dụ là IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) và tốt hơn là có thể lấy ví dụ IgG1 hoặc IgG2.

Cho hoạt tính sinh học của kháng thể, nói chung có thể lấy ví dụ hoạt tính gắn kết-kháng nguyên, hoạt tính nhập nội ở các tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng cách gắn kết với kháng nguyên này, hoạt tính trung hoà hoạt tính kháng nguyên, hoạt tính làm tăng cường hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC), hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc-bổ thể (CDC), và hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCP). Chức năng của kháng thể của sáng chế là hoạt tính gắn kết với TROP2, tốt hơn là hoạt tính nhập nội ở các tế bào biểu hiện-TROP2 bằng cách gắn kết với TROP2. Ngoài ra, kháng thể của sáng chế có thể có hoạt tính ADCC, hoạt tính CDC, và/hoặc hoạt tính ADCP ngoài hoạt tính nhập nội tế bào.

Kháng thể thu được có thể được tinh chế đến đồng nhất. Có thể tiến hành phân tách và tinh chế kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp phân tách và tinh chế protein thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được phân tách và tinh chế bằng cách chọn lọc thích hợp và kết hợp sắc ký cột, lọc, siêu lọc, kết tủa bằng muối, thẩm tách, điện di gel polyacrylamit điều chế, điện di tâm đẳng điện,

và phương pháp tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996) do Daniel R. Marshak và các đồng tác giả biên tập; Antibodies: A Laboratory Manual. Của Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp này.

Ví dụ về phương pháp sắc ký bao gồm sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc qua gel, sắc ký pha đảo, và sắc ký hấp phụ.

Có thể tiến hành sắc ký này bằng cách sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Cho cột sẽ sử dụng trong sắc ký ái lực, có thể lấy ví dụ cột Protein A và cột Protein G. Ví dụ, cho cột sử dụng cột Protein A, có thể lấy ví dụ Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) và cột tương tự.

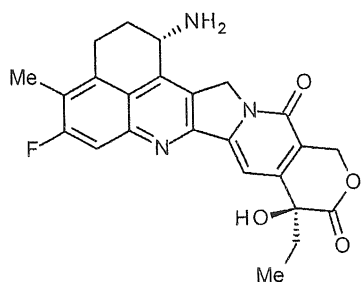
Ngoài ra, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được cố định trên đó, cũng có thể tinh chế kháng thể bằng cách sử dụng tính chất gắn kết của kháng thể với kháng nguyên.

[Hợp chất kháng khối u]

Hợp chất kháng khối u sẽ được liên hợp với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế được mô tả. Hợp chất kháng khối u được sử dụng trong Sáng chế không bị giới hạn cụ thể nếu là hợp chất có tác dụng kháng khối u và nhóm thể hoặc cấu trúc bán phần cho phép kết nối với cấu trúc liên kết. Khi một phần hoặc toàn bộ liên kết được phân giải trong các tế bào khối u, nhóm hợp chất kháng khối u được giải phóng thể hiện tác dụng kháng khối u của hợp chất kháng khối u. Khi liên kết được phân giải ở vị trí kết nối, hợp chất kháng khối u được giải phóng ở cấu trúc chưa được cải biến của nó thể hiện tác dụng kháng khối u vốn có của nó.

Cho hợp chất kháng khối u được sử dụng trong Sáng chế, tốt hơn là có thể sử dụng exatecan (((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dione; được thể hiện trong công thức dưới đây), một trong số các dẫn xuất camptothecin.

[Công thức 14]



Mặc dù có tác dụng kháng khối u tuyệt vời, exatecan chưa được đưa ra thị trường làm thuốc kháng khối u. Hợp chất này có thể dễ dàng thu được bằng phương pháp đã biết và nhóm amino group ở vị trí 1 có thể tốt hơn là được sử dụng như vị trí kết nối với cấu trúc liên kết. Ngoài ra, mặc dù exatecan cũng có thể được giải phóng ở các tế bào khối u trong khi một phần của liên kết vẫn được gắn liền với nó, đây là một hợp chất tuyệt vời thể hiện tác dụng kháng khối u tuyệt vời thậm chí ở cấu trúc này. -

Do exatecan có cấu trúc camptothecin, đã biết là nó dịch chuyển cân bằng sang cấu trúc có vòng lacton đóng (vòng đóng) trong môi trường nước axit (ví dụ, pH 3 hoặc tương đương) nhưng dịch chuyển sang cấu trúc có vòng lacton mở (vòng mở) trong môi trường nước bazơ (ví dụ, pH 10 hoặc tương đương). Thể liên hợp thuốc có đưa vào gốc tương ứng với cấu trúc vòng đóng và cấu trúc vòng mở được cho là có cùng tác dụng kháng khối u và không cần phải nói là trạng thái bất kỳ trong số các trạng thái này là thuộc phạm vi của sáng chế.

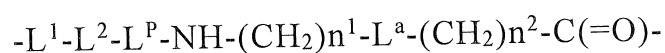
Các ví dụ về hợp chất kháng khối u có thể bao gồm doxorubixin, daunorubixin, mitomycin C, bleomycin, cycloxytidin, vincristin, vinblastin, methotrexat, tác nhân kháng khối u dựa trên-platin (cisplatin hoặc các dẫn xuất của nó), taxol hoặc các dẫn xuất của nó, và camptothecin hoặc các dẫn xuất của nó (tác nhân kháng khối u được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 6-87746).

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể, số lượng các phân tử thuốc được liên hợp/phân tử kháng thể là yếu tố then chốt có ảnh hưởng đến hiệu lực và tính an toàn. Tiến hành sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách xác định điều kiện phản ứng bao gồm các lượng nguyên liệu và chất thử sử dụng cho phản

ứng sao cho có số lượng hằng định các phân tử thuốc được liên hợp, và thể liên hợp thuốc-kháng thể nói chung thu được dưới dạng hỗn hợp có chứa số lượng khác nhau các phân tử thuốc được liên hợp, khác với phản ứng hoá học của hợp chất có phân tử lượng thấp. Số lượng thuốc được liên hợp trong một phân tử kháng thể được biểu hiện hoặc xác định cụ thể bằng giá trị trung bình, nghĩa là, số lượng trung bình các phân tử thuốc được liên hợp. Trừ khi được mô tả cụ thể theo cách khác theo nguyên tắc, số lượng các phân tử thuốc được liên hợp nghĩa là giá trị trung bình trừ trường hợp, trong đó giá trị này biểu thị thể liên hợp thuốc-kháng thể có số lượng cụ thể các phân tử thuốc được liên hợp mà được bao gồm trong một hỗn hợp thể liên hợp thuốc-kháng thể có số lượng khác nhau các phân tử thuốc được liên hợp. Số lượng các phân tử exatecan được liên hợp với một phân tử kháng thể là có thể kiểm soát được, và như số lượng trung bình các phân tử thuốc được liên hợp/kháng thể, khoảng từ 1 đến 10 exatecan có thể được kết nối. Tốt hơn là, là từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 8. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể thiết kế phản ứng để tiếp hợp số lượng cần thiết các phân tử thuốc với một phân tử kháng thể dựa trên phần mô tả các Ví dụ của sáng chế và có thể thu được thể liên hợp thuốc-kháng thể với số lượng được kiểm soát của các phân tử exatecan.

#### [Cấu trúc Liên kết]

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, cấu trúc liên kết để tiếp hợp hợp chất kháng khối u với kháng thể kháng-TROP2 được mô tả. Liên kết này có cấu trúc có công thức dưới đây:



Kháng thể được nối với đầu tận cùng của  $L^1$  (đầu đối diện với đầu tận cùng nối với  $L^2$ ), và hợp chất kháng khối u được nối với nhóm carbonyl của nhóm  $-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ .

$n^1$  là số nguyên từ 0 đến 6 và tốt hơn là số nguyên từ 1 đến 5, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 3.

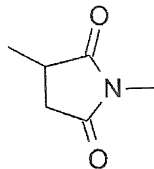
#### 1. $L^1$

$L^1$  được biểu thị bằng cấu trúc

-(suxinimit-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-.

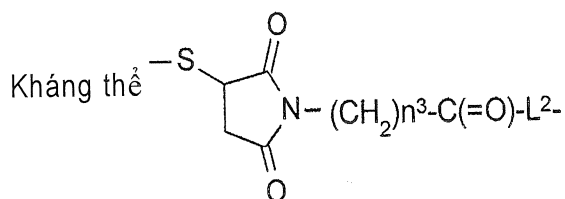
Trong công thức trên, n<sup>3</sup> là số nguyên từ 2 đến 8, và "-(suxinimit-3-yl-N)-" có công thức cấu tạo:

[Công thức 15]



Vị trí 3 của cấu trúc bán phần nêu trên là vị trí kết nối với kháng thể kháng-TROP2. Liên kết với kháng thể kháng-TROP2 ở vị trí 3 đặc trưng ở chỗ tạo liên kết với sự tạo thành thioete. Nguyên tử nitơ ở vị trí 1 của nhóm cấu trúc được nối với nguyên tử cacbon của metylen mà có mặt trong liên kết bao gồm cấu trúc. Cụ thể là, -(suxinimit-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-L<sup>2</sup>- là cấu trúc được biểu thị bằng công thức dưới đây (trong bản mô tả này, "kháng thể-S-" có nguồn gốc từ một kháng thể).

[Công thức 16]



Trong công thức, n<sup>3</sup> là số nguyên từ 2 đến 8, và tốt hơn là từ 2 đến 5.

Ví dụ cụ thể của L<sup>1</sup> có thể bao gồm

- (suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,
- (suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

2. L<sup>2</sup>

L<sup>2</sup> là liên kết được biểu thị bằng cấu trúc dưới đây:

-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

L<sup>2</sup> có thể không có mặt, và trong trường hợp này, L<sup>2</sup> là liên kết đơn. Trong cấu trúc trên, n<sup>4</sup> là số nguyên từ 1 đến 6, và tốt hơn là từ 2 đến 4. L<sup>2</sup> được nối với L<sup>1</sup>

ở nhóm amino đầu tận cùng của nó và được nối với  $L^P$  ở nhóm carbonyl của nó ở đầu tận cùng còn lại.

Các ví dụ cụ thể của  $L^2$  có thể bao gồm

-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-.

[0094]

### 3. $L^P$

$L^P$  là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin. Cụ thể là, nó gồm có gốc oligopeptit trong đó từ 2 đến 7 axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết peptit.  $L^P$  được nối với  $L^2$  ở đầu tận cùng N của nó và được nối với nhóm amino của nhóm -NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O) của liên kết ở đầu tận cùng C của nó.

Axit amin cấu thành  $L^P$  trong liên kết này là không bị giới hạn cụ thể, tuy nhiên, các ví dụ về các axit amin này bao gồm L- axit amin hoặc D- axit amin, tốt hơn là L-axit amin. Và, có thể là axit amin có cấu trúc như β-alanin, axit ε-aminocaproic, hoặc axit γ-aminobutyric ngoài axit α-amino, ngoài ra, có thể là axit amin loại không có trong tự nhiên như axit amin được N-metyl hoá.

Trình tự axit amin của  $L^P$  là không bị giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ về axit amin cấu thành bao gồm phenylalanin (Phe; F), tyrosin (Tyr; Y), leucin (Leu; L), glyxin (Gly; G), alanin (Ala; A), valin (Val; V), lysin (Lys; K), xitrullin (Cit), serin (Ser; S), axit glutamic (Glu; E), và axit aspartic (Asp; D).

Trong số các axit amin này, các ví dụ được ưu tiên bao gồm phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic. Tùy thuộc vào loại axit amin, kiểu giải phóng thuốc có thể được kiểm soát. Số lượng axit amin có thể nằm trong khoảng từ 2 đến 7.

Các ví dụ cụ thể của  $L^P$  có thể bao gồm

-GGF-,  
 -DGGF-,  
 -(D-)D-GGF-,  
 -EGGF-,  
 -GGFG-,  
 -SGGF-,  
 -KGGF-,  
 -DGFGF-,  
 -GGFGG-,  
 -DDGGFG-,  
 -KDGGFG-,  
 -GGFGGGF-.

Trong công thức trên, "(D-)D" là D-axit aspartic.

Các ví dụ được ưu tiên đặc biệt của  $L^P$  cho thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế có thể bao gồm gốc tetrapeptit -GGFG-.

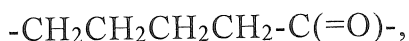
#### 4. $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$

$L^a$  trong  $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  là cấu trúc -O- hoặc liên kết đơn.  $n^2$  là số nguyên từ 0 đến 5, tốt hơn là từ 0 đến 3, tốt hơn nữa là 0 hoặc 1.

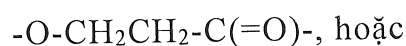
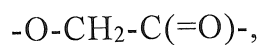
Các ví dụ về  $L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$  có thể bao gồm các nhóm có cấu trúc dưới đây:

-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-,



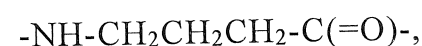
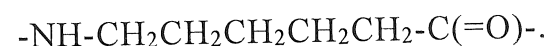
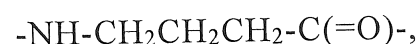
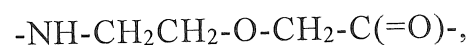
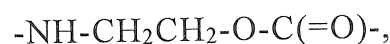
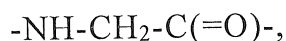


Trong số các nhóm này,



trường hợp, trong đó  $\text{L}^a$  là liên kết đơn, và  $n^2$  bằng 0 là được ưu tiên.

Các ví dụ cụ thể của cấu trúc được biểu thị bằng  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$  trong liên kết có thể bao gồm

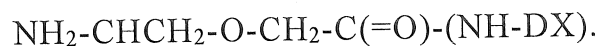
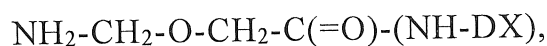
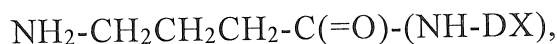
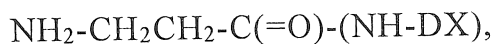


là được ưu tiên hơn.

Trong liên kết, độ dài mạch của  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$  tốt hơn là có từ 4 đến 7 nguyên tử, và tốt hơn nữa là có 5 hoặc 6 nguyên tử.

Đối với thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, xét đến là khi thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 được chuyển vào bên trong các tế bào khối u, nhóm liên kết bị phân giải và dẫn xuất thuốc có cấu trúc được biểu thị bằng  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$  được giải phóng để biểu hiện tác dụng kháng khối u. Các ví dụ về dẫn xuất kháng khối u thể hiện tác dụng kháng khối u bằng cách giải phóng từ thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế bao gồm dẫn xuất kháng khối u có nhóm cấu trúc trong đó cấu trúc này được

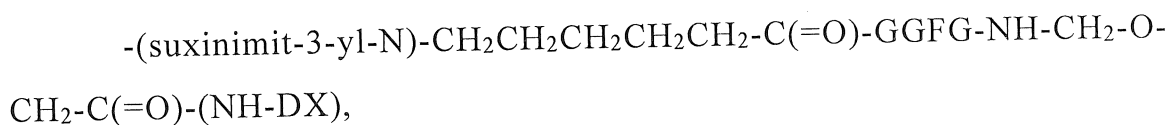
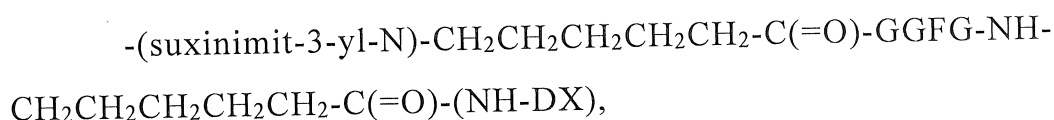
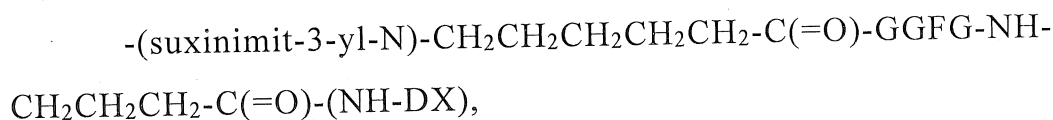
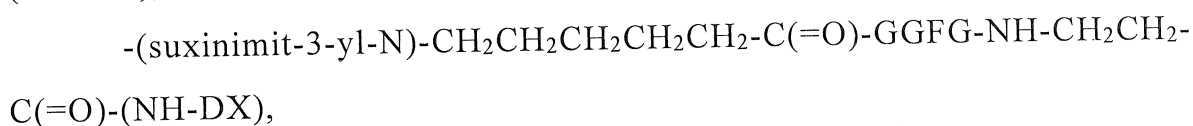
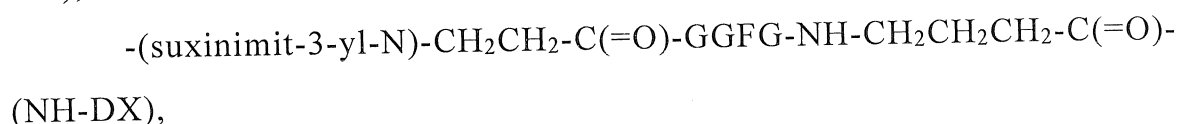
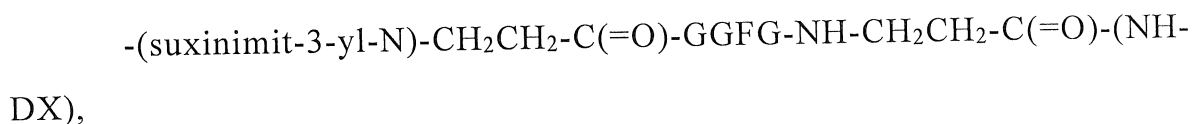
biểu thị bằng  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-C(=O)-}$  của liên kết có nhóm amino đầu tận cùng, và được đặc biệt ưu tiên bao gồm các nhóm dưới đây.



Tuy nhiên, trong trường hợp  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)- (NH-DX)}$ , đã xác nhận là do cấu trúc amin trong phân tử không bền, cấu trúc này bị tự phân huỷ để giải phóng nhóm dưới đây.

$\text{HO-CH}_2\text{-C(=O)- (NH-DX)}$ . Các hợp chất đó có thể tốt hơn là được sử dụng làm hợp chất trung gian sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế.

Cho thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế trong đó exatecan được sử dụng làm thuốc, tốt hơn là nhóm cấu trúc liên kết-thuốc  $[\text{-L}^1\text{-L}^2\text{-L}^p\text{-NH-(CH}_2\text{)}_{n^1}\text{-L}^a\text{-(CH}_2\text{)}_{n^2}\text{-C(=O)- (NH-DX)}]$  có cấu trúc dưới đây được nối với một kháng thể. Số lượng được liên hợp trung bình của nhóm cấu trúc liên kết-thuốc này/phân tử kháng thể có thể từ 1 đến 10. Tốt hơn là, từ 2 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 3 đến 8.



-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

Trong số các cấu trúc này, ưu tiên hơn các cấu trúc dưới đây.

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

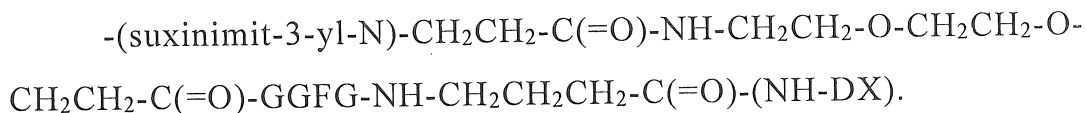
-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX).

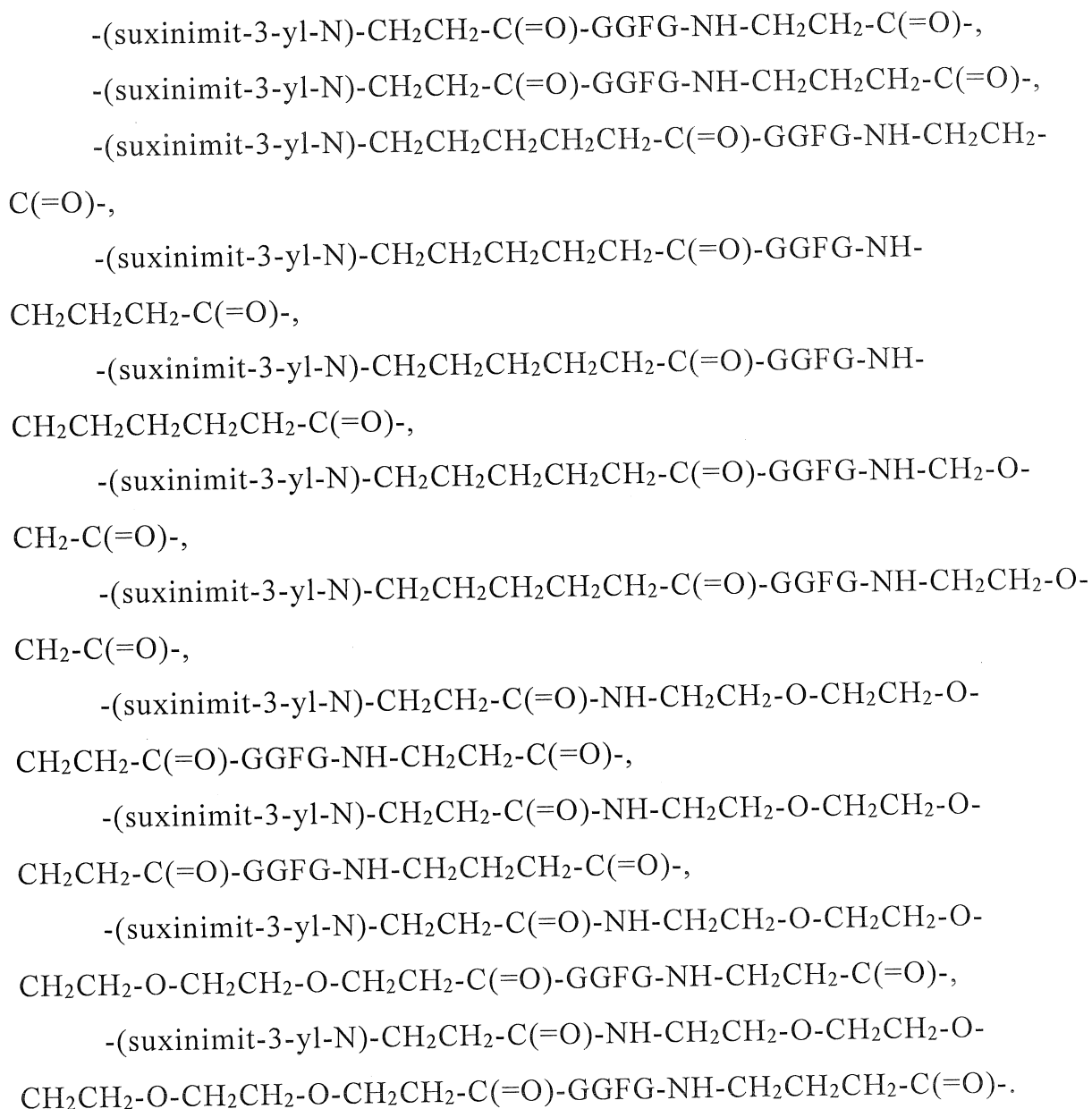
Được đặc biệt ưu tiên là các cấu trúc dưới đây.

-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

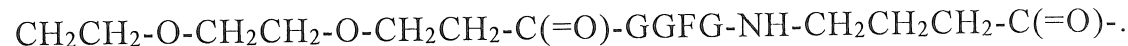
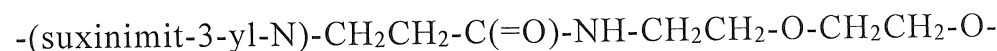
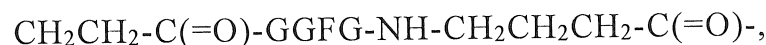
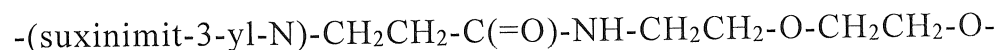
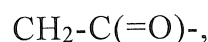
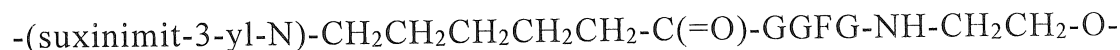
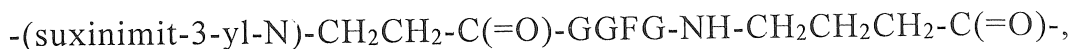
-(suxinimit-3-yl-N)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),



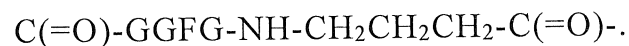
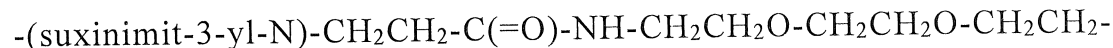
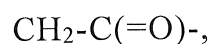
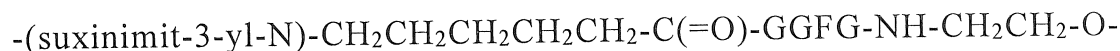
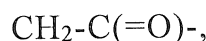
Đối với cấu trúc liên kết để tiếp hợp kháng thể kháng-TROP2 và thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế, liên kết được ưu tiên có thể được xây dựng cấu trúc bằng cách kết nối các cấu trúc được ưu tiên được thể hiện cho từng phần của liên kết này được mô tả ở trên. Đối với cấu trúc liên kết, các liên kết có cấu trúc dưới đây tốt hơn là được sử dụng. Tuy nhiên, đầu tận cùng bên trái của cấu trúc này là vị trí kết nối với kháng thể và đầu tận cùng bên phải là vị trí kết nối với thuốc.



Trong số chúng, được ưu tiên hơn là các cấu trúc dưới đây.



Được đặc biệt ưu tiên là các cấu trúc dưới đây.



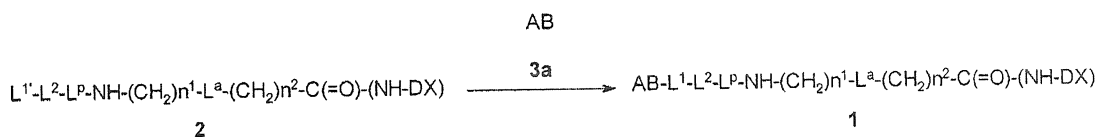
### [Phương pháp sản xuất]

Tiếp theo mô tả phương pháp đại diện để sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế hoặc hợp chất trung gian sản xuất của chúng. Các hợp chất được mô tả dưới đây với số hợp chất được thể hiện trong từng công thức phản ứng. Cụ thể là, các hợp chất này được gọi là "hợp chất có công thức (1)", "hợp chất (1)", hoặc hợp chất tương tự. Các hợp chất có số không phải là các hợp chất này cũng được mô tả tương tự.

#### 1. Phương pháp sản xuất 1

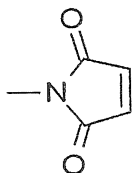
Thế liên hợp thuốc-kháng thể được biểu thị bằng công thức (1) mà được nối với cấu trúc liên kết-thuốc qua thioete ví dụ có thể được sản xuất bằng phương pháp sau đây.

[Công thức 17]



[Trong công thức, AB là một kháng thể có nhóm sulfhydryl, và L<sup>1</sup> là cấu trúc liên kết L<sup>1</sup> trong đó đầu tận cùng liên kết là nhóm maleimityl (công thức được thể hiện dưới đây)

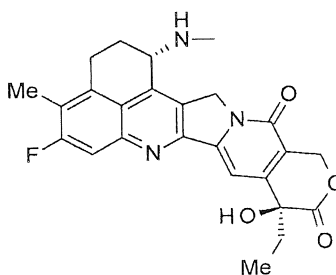
[Công thức 18]



(trong công thức, nguyên tử nitơ là vị trí kết nối),

và cụ thể là nhóm trong đó nhóm -(suxinimit-3-yl-N)- trong -(suxinimit-3-yl-N)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)- của L<sup>1</sup> là nhóm maleimityl. Ngoài ra, -(NH-DX) là cấu trúc có công thức:

[Công thức 19]



và là nhóm mà thu được bằng cách tách loại một nguyên tử hydro của nhóm amino ở vị trí 1 của exatecan.]

Ngoài ra, hợp chất có công thức (1) trong công thức phản ứng nêu trên được hiểu là cấu trúc trong đó một nhóm cấu trúc tương ứng từ thuốc kết nối đầu tận cùng liên kết với một kháng thể. Tuy nhiên, chỉ mô tả cho thuận tiện, và thực tế có nhiều trường hợp, trong đó nhiều nhóm cấu trúc được kết nối với một phân

tử kháng thể. Nguyên tắc này cũng áp dụng cho phần mô tả phương pháp sản xuất nêu dưới đây.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) có thể được sản xuất bằng cách cho hợp chất (2), mà có thể thu được bằng phương pháp được mô tả dưới đây, phản ứng với kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl.

Kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl có thể thu được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Bioconjugate Techniques, các trang 56-136, các trang 456-493, Academic Press (1996) của Hermanson, G.T.). Các ví dụ bao gồm: cho thuốc thử Traut phản ứng với nhóm amino của kháng thể; N-suxinimidyl S-axetylthioalkanoat được cho phản ứng với nhóm amino của kháng thể, tiếp đó phản ứng với hydroxylamin; sau khi cho phản ứng với N-suxinimidyl 3-(pyridyldithio)propionat, kháng thể được cho phản ứng với tác nhân khử hoá; kháng thể được cho phản ứng với tác nhân khử hoá như là dithiothreitol, 2-mercaptoetanol, và tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP) để khử liên kết disulfua ở phần bản lề của kháng thể để tạo thành nhóm sulfhydryl, nhưng không chỉ giới hạn ở quy trình này.

Cụ thể là, sử dụng từ 0,3 đến 3 đương lượng mol của TCEP làm tác nhân khử hoá/disulfua trong phần bản lề của kháng thể và cho phản ứng với kháng thể này trong dung dịch đệm có chứa tác nhân chelat hoá, có thể thu được kháng thể có disulfua được khử hoá một phần hoặc toàn phần trong phần bản lề của kháng thể. Các ví dụ về tác nhân chelat hoá bao gồm axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA) và axit diethylentriamin pentaaxetic (DTPA). Tác nhân này có thể được sử dụng ở nồng độ từ 1 mM đến 20 mM. Các ví dụ về dung dịch đệm mà có thể sử dụng bao gồm dung dịch chứa natri phosphat, natri borat, hoặc natri axetat. Cụ thể là, bằng cách cho kháng thể phản ứng với TCEP ở nhiệt độ từ 4°C đến 37°C trong từ 1 đến 4 giờ, có thể thu được kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl được khử hoá một phần hoặc hoàn toàn.

Tuy nhiên, bằng cách tiến hành phản ứng để bổ sung nhóm sulfhydryl vào nhóm liên kết-thuốc, nhóm liên kết-thuốc có thể được liên hợp qua liên kết thioete.

Sử dụng từ 2 đến 20 đương lượng mol của hợp chất (2)/kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl, có thể sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) trong đó từ 2 đến 8 phân tử thuốc được liên hợp/kháng thể. Cụ thể là, thêm dung dịch có chứa hợp chất (2) được hoà tan trong đó vào dung dịch đệm có chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl cho phản ứng, là đủ. Ở đây, các ví dụ về dung dịch đệm mà có thể sử dụng bao gồm dung dịch natri axetat, natri phosphat, và natri borat. pH cho phản ứng là từ 5 đến 9, và tốt hơn nữa là tiến hành phản ứng ở pH gần 7. Ví dụ về dung môi để hoà tan hợp chất (2) bao gồm dung môi hữu cơ như dimetyl sulfoxit (DMSO), dimetylformamit (DMF), dimetyl axetamit (DMA), và N-metyl-2-pyridon (NMP).

Thêm dung dịch dung môi hữu cơ có chứa hợp chất (2) được hoà tan trong đó ở nồng độ từ 1 đến 20% thể tích/thể tích vào dung dịch đệm có chứa kháng thể (3a) có nhóm sulfhydryl cho phản ứng là đủ. Nhiệt độ phản ứng là từ 0 đến 37°C, tốt hơn nữa là từ 10 đến 25°C, và thời gian phản ứng là từ 0,5 đến 2 giờ. Dừng phản ứng bằng cách làm bất hoạt tính phản ứng của hợp chất (2) chưa phản ứng với thuốc thử có chứa-thiol. Ví dụ về thuốc thử có chứa-thiol bao gồm xystein và N-axetyl-L-xystein (NAC). Cụ thể hơn là, thêm từ 1 đến 2 đương lượng mol của NAC vào hợp chất (2) được sử dụng và, bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong từ 10 đến 30 phút, có thể dừng phản ứng.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) được sản xuất, sau khi cô, có thể được tinh chế trao đổi đệm, và xác định nồng độ kháng thể và số lượng trung bình các phân tử thuốc được liên hợp/phân tử kháng thể theo các quy trình chung được mô tả dưới đây, nhận dạng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1).

Quy trình chung A: Nồng độ dung dịch nước của kháng thể hoặc thể liên hợp thuốc-kháng thể

Cho vào ống ly tâm Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation), dung dịch kháng thể hoặc thể liên hợp thuốc-kháng thể và dung dịch chứa kháng thể này hoặc thể liên hợp thuốc-kháng thể được cô bằng cách ly tâm (ly tâm trong từ 5 đến 20 phút ở tốc độ từ 2000 G đến 3800 G) sử dụng máy ly tâm (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).



### Quy trình chung B: Xác định nồng độ kháng thể

Sử dụng bộ phát hiện UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), tiến hành xác định nồng độ kháng thể theo phương pháp do nhà sản xuất xác định. Đồng thời, sử dụng hệ số hấp thụ ở 280 nm khác biệt cho từng kháng thể (từ  $1.3 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  đến  $1.8 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### Quy trình chung C-1: Trao đổi đệm cho kháng thể

Cân bằng cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) sử dụng chất mang Sephadex G-25 bằng dịch đệm phosphat (10 mM, pH 6,0; được gọi là PBS6.0/EDTA trong bản mô tả này) có chứa natri clorua (137 mM) và axit etylen diamin tetraaxetic (EDTA, 5 mM) theo phương pháp do nhà sản xuất xác định. Dung dịch nước chứa kháng thể được áp dụng với lượng 2,5 mL một cột NAP-25, và tiếp đó thu gom phân đoạn (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6.0/EDTA. Cô phân đoạn thu được bằng Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể bằng cách sử dụng Quy trình chung B, điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 10 mg/mL bằng cách sử dụng PBS6.0/EDTA.

### Quy trình chung C-2: Trao đổi đệm cho kháng thể

Cân bằng cột NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) bằng cách sử dụng chất mang Sephadex G-25 bằng dịch đệm phosphat (50 mM, pH 6,5; được gọi là PBS6.5/EDTA trong bản mô tả này) có chứa natri clorua (50 mM) và EDTA (2 mM) theo phương pháp do nhà sản xuất xác định. Dung dịch nước chứa kháng thể này được áp dụng với lượng 2,5 mL vào một cột NAP-25, và tiếp đó thu gom phân đoạn (3,5 mL) được rửa giải bằng 3,5 mL PBS6.5/EDTA. Cô phân đoạn thu được bằng Quy trình chung A. Sau khi xác định nồng độ của kháng thể này bằng cách sử dụng Quy trình chung B, điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 20 mg/mL bằng cách sử dụng PBS6.5/EDTA.

### Quy trình chung D: Tinh chế thể liên hợp thuốc-kháng thể

Cân bằng cột NAP-25 bằng dịch đệm bất kỳ được chọn từ dịch đệm phosphat có bán trên thị trường (PBS7.4, Cat. No. 10010-023, Invitrogen), dịch đệm natri phosphat (10 mM, pH 6,0; được gọi là PBS6.0) có chứa natri clorua (137 mM), và dịch đệm axetat có chứa sorbitol (5%) (10 mM, pH 5,5; được gọi

là ABS trong bản mô tả này). Dung dịch nước chứa hỗn hợp phản ứng thể liên hợp thuốc-kháng thể được áp dụng với lượng khoảng 1,5 mL vào cột NAP-25, và tiếp đó được rửa giải bằng dịch đệm với lượng do nhà sản xuất xác định để thu gom phân đoạn kháng thể. Phân đoạn đã thu gom lại được áp dụng lại vào cột NAP-25 và, bằng cách lặp lại tổng cộng từ 2 đến 3 lần quá trình tinh chế lọc gel để rửa giải bằng dịch đệm, thể liên hợp thuốc-kháng thể loại trừ liên kết thuốc chưa được liên hợp và thu được hợp chất phân tử lượng thấp (tris(2-carboxyethyl)phosphin hydroclorua (TCEP), N-acetyl-L-cysteine (NAC), và dimethyl sulfoxide).

Quy trình chung E: Xác định nồng độ kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể (1).

Có thể tính toán nồng độ thuốc được liên hợp trong thể liên hợp thuốc-kháng thể bằng cách đo độ hấp thụ UV của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở hai bước sóng 280 nm và 370 nm, tiếp đó tiến hành tính toán như dưới đây.

Do độ hấp thụ tổng cộng ở bước sóng bất kỳ là bằng tổng độ hấp thụ của tất cả các loại hoá chất hấp thụ ánh sáng mà có mặt trong hệ thống (cộng hợp độ hấp thụ), khi hệ số hấp thụ mol của kháng thể và thuốc là không thay đổi trước và sau khi tiếp hợp giữa kháng thể và thuốc, nồng độ kháng thể và nồng độ thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể được biểu thị bằng các phương trình dưới đây.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Phương trình (I)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Phương trình (II)}$$

Trong phương trình trên,  $A_{280}$  là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở 280 nm,  $A_{370}$  là độ hấp thụ của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể ở 370 nm,  $A_{A,280}$  là độ hấp thụ của kháng thể ở 280 nm,  $A_{A,370}$  là độ hấp thụ của kháng thể ở 370 nm,  $A_{D,280}$  là độ hấp thụ của tiền chất thể liên hợp ở 280 nm,  $A_{D,370}$  là độ hấp thụ của tiền chất thể liên hợp ở 370 nm,  $\epsilon_{A,280}$  là hệ số hấp thụ mol của kháng thể ở 280 nm,  $\epsilon_{A,370}$  là hệ số hấp thụ

mol của kháng thể ở 370 nm,  $\epsilon_{D,280}$  là hệ số hấp phụ mol của tiền chất thể liên hợp ở 280 nm,  $\epsilon_{D,370}$  là hệ số hấp phụ mol của tiền chất thể liên hợp ở 370 nm,  $C_A$  là nồng độ kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể, và  $C_D$  thể hiện nồng độ thuốc trong thể liên hợp thuốc-kháng thể.

Đối với  $\epsilon_{A,280}$ ,  $\epsilon_{A,370}$ ,  $\epsilon_{D,280}$ , và  $\epsilon_{D,370}$  trong phương trình nêu trên, sử dụng các giá trị có được trước đó (giá trị ước tính dựa trên tính toán hoặc giá trị đo được thu được bằng đo hợp chất bằng UV). Ví dụ,  $\epsilon_{A,280}$  có thể được ước tính từ trình tự axit amin của một kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp tính toán đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423).  $\epsilon_{A,370}$  nói chung bằng 0.  $\epsilon_{D,280}$  và  $\epsilon_{D,370}$  có thể thu được dựa trên định luật Lambert-Beer (độ hấp thụ = nồng độ mol  $\times$  hệ số hấp phụ mol  $\times$  độ dài tế bào) bằng cách đo xác định độ hấp thụ của dung dịch trong đó tiền chất thể liên hợp sẽ sử dụng được hoà tan ở nồng độ mol nhất định. Bằng cách xác định  $A_{280}$  và  $A_{370}$  của dung dịch nước chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể và giải đồng thời các phương trình (I) và (II) sử dụng các giá trị, có thể thu được  $C_A$  và  $C_D$ . Ngoài ra, bằng cách chia  $C_D$  cho  $C_A$ , có thể thu được số lượng trung bình của thuốc được liên hợp/kháng thể.

Quy trình chung F: Xác định số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể - (2).

Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể cũng có thể được xác định bằng cách phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng phương pháp được mô tả dưới đây, ngoài Quy trình chung E nêu trên.

[F-1. Điều chế mẫu để phân tích HPLC (khử hoá thể liên hợp thuốc-kháng thể)]

Trộn dung dịch thể liên hợp thuốc-kháng thể (khoảng 1 mg/mL, 60  $\mu$ L) với dung dịch dithiothreitol (DTT) trong nước (100 mM, 15  $\mu$ L). Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 30 phút để phân giải liên kết disulfua giữa chuỗi L và chuỗi H của thể liên hợp thuốc-kháng thể. Sử dụng mẫu thu được trong phân tích HPLC.

[F-2. Phân tích HPLC]

Tiến hành phân tích HPLC trong các điều kiện đo dưới đây:

Hệ thống HPLC: hệ thống Agilent 1290 HPLC (Agilent Technologies, Inc.)

Bộ phát hiện: Máy đo hấp thụ UV (bước sóng đo: 280 nm)

Cột: PLRP-S ( $2.1 \times 50$  mm, 8  $\mu$ m, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

Nhiệt độ cột: 80°C

Pha động A: dung dịch 0,04% axit trifloaxetic (TFA) trong nước

Pha động B: dung dịch axetonitril có chứa 0,04% TFA

Chương trình gradien: 29%-36% (0 phút-12,5 phút), 36%-42% (12,5-15 phút), 42%-29% (15 phút-15,1 phút), 29%-29% (15,1 phút-25 phút)

Thể tích tiêm mẫu: 15  $\mu$ L

[F-3. Phân tích dữ liệu]

[F-3-1] So sánh với chuỗi L ( $L_0$ ) và chuỗi H ( $H_0$ ) của kháng thể không được liên hợp, chuỗi L được liên hợp thuốc (chuỗi L được nối với một phân tử thuốc:  $L_1$ ) và các chuỗi H (chuỗi H được nối với một phân tử thuốc:  $H_1$ , chuỗi H được nối với hai phân tử thuốc:  $H_2$ , chuỗi H được nối với ba phân tử thuốc:  $H_3$ ) thể hiện tính kỵ nước cao hơn tỷ lệ với số lượng các phân tử thuốc được liên hợp và do đó có thời gian lưu lớn hơn. Các chuỗi này do đó được rửa giải theo thứ tự  $L_0$  và  $L_1$  hoặc  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , và  $H_3$ . Pic phát hiện có thể gán cho pic bất kỳ của  $L_0$ ,  $L_1$ ,  $H_0$ ,  $H_1$ ,  $H_2$ , và  $H_3$  bằng cách so sánh thời gian lưu với  $L_0$  và  $H_0$ .

[F-3-2] Do liên kết thuốc có hấp thụ UV, hiệu chỉnh các giá trị diện tích pic theo số lượng các phân tử liên kết thuốc được liên hợp theo công thức dưới đây bằng cách sử dụng hệ số hấp phụ mol của chuỗi L, chuỗi H, và liên kết thuốc.

[Công thức 1]

Giá trị được hiệu chỉnh của diện tích pic của chuỗi L ( $L_i$ )

= Diện tích pic

$$\times \frac{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi L}}{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi L} + \text{số lượng của các phân tử thuốc được tiếp hợp} \times \text{hệ số dập tắt mol của liên kết thuốc}}$$

## [Công thức 2]

Giá trị hiệu chỉnh của diện tích pic của chuỗi H ( $H_i$ )

= Diện tích pic

$$\times \frac{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi H}}{\text{Hệ số dập tắt mol của chuỗi H} + \text{số lượng các phân tử thuốc được tiếp hợp} \times \text{hệ số dập tắt mol của liên kết thuốc}}$$

Trong công thức này, đối với hệ số dập tắt mol (280 nm) của chuỗi L hoặc chuỗi H của mỗi kháng thể, có thể sử dụng giá trị được ước tính từ trình tự axit amin chuỗi L hoặc chuỗi H của mỗi kháng thể bằng phương pháp tính toán đã biết (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). Trong trường hợp hTINA, hệ số dập tắt mol 34690 và hệ số dập tắt mol 95000 tương ứng đã được sử dụng làm giá trị ước tính đối với chuỗi L và chuỗi H, theo trình tự axit amin của nó. Đối với hệ số dập tắt mol (280 nm) của liên kết thuốc, hệ số dập tắt mol đo được (280 nm) của hợp chất trong đó nhóm maleimide được chuyển đổi thành suxinimide thioete bằng cách cho từng liên kết thuốc phản ứng với mercaptoetanol hoặc N-acetylcysteine.

[F-3-3] Tỷ lệ diện tích pic (%) của mỗi chuỗi được tính toán cho tổng cộng các giá trị diện tích pic đã hiệu chỉnh theo công thức dưới đây.

## [Phương trình 3]

$$\text{Tỷ lệ diện tích pic của chuỗi L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ diện tích pic của chuỗi H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

$A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$  : Giá trị diện tích pic tương ứng đã hiệu chỉnh của  $L_i$  và  $H_i$

[F-3-4] Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp trên một phân tử kháng thể trong thể liên hợp thuốc-kháng thể được tính toán theo công thức dưới đây.

Số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp = (tỷ lệ diện tích pic  $L_0 \times 0$  + tỷ lệ diện tích pic  $L_0 \times 1$  + tỷ lệ diện tích pic  $H_0 \times 0$  + tỷ lệ diện tích pic  $H_1 \times 1$  + tỷ lệ diện tích pic  $H_2 \times 2$  +  $H_3$  tỷ lệ diện tích pic  $\times 3$ ) /  $100 \times 2$

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (2) trong phương pháp sản xuất 1 là hợp chất có công thức:

(maleimide-N-yl)-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>3</sup></sup>-C(=O)-L<sup>2</sup>-L<sup>P</sup>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>1</sup></sup>-L<sup>a</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sup>n<sup>2</sup></sup>-C(=O)-(NH-DX)

Trong công thức,

n<sup>3</sup> là số nguyên từ 2 đến 8,

L<sup>2</sup> là -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O)<sup>n<sup>4</sup></sup>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)- hoặc liên kết đơn,

trong đó n<sup>4</sup> là số nguyên từ 1 đến 6,

L<sup>P</sup> là gốc peptit gồm có từ 2 đến 7 axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic

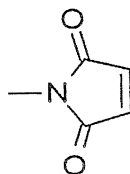
n<sup>1</sup> là số nguyên từ 0 đến 6,

n<sup>2</sup> là số nguyên từ 0 đến 5,

L<sup>a</sup> là -O- hoặc a liên kết đơn,

(maleimide-N-yl)- là nhóm maleimityl (2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl group) có công thức:

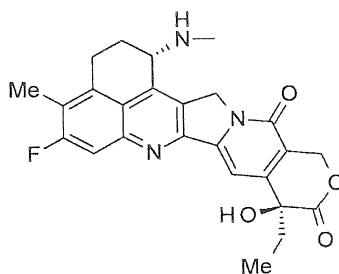
[Công thức 20]



trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối,

-(NH-DX) là nhóm có công thức:

[Công thức 21]



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối.

Khi  $L^2$  là liên kết đơn hoặc  $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ , ưu tiên hợp chất trong đó  $n^4$  là số nguyên từ 2 đến 4 làm chất trung gian sản xuất.

Đối với gốc peptit của  $L^P$ , ưu tiên hợp chất có gốc peptit bao gồm axit amin được chọn từ phenylalanin, glyxin, valin, lysin, xitrullin, serin, axit glutamic, và axit aspartic làm chất trung gian sản xuất. Trong số các gốc peptit này, ưu tiên hợp chất trong đó  $L^P$  là gốc peptit gồm có 4 axit amin làm chất trung gian sản xuất. Cụ thể hơn là, ưu tiên hợp chất trong đó  $L^P$  là gốc tetrapeptit -GGFG- làm chất trung gian sản xuất.

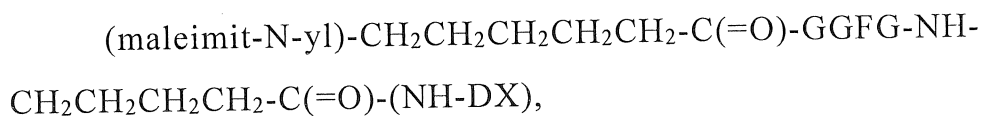
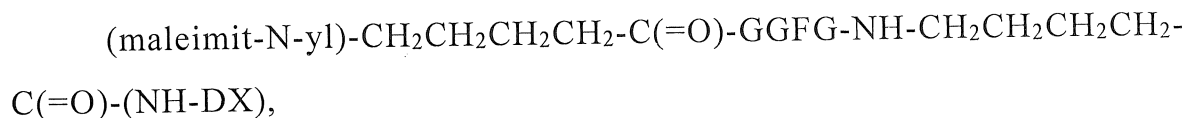
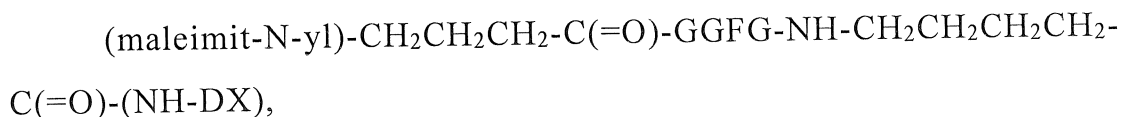
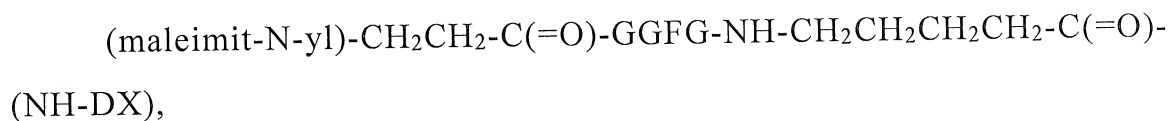
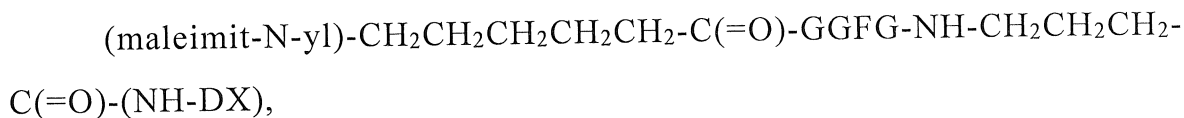
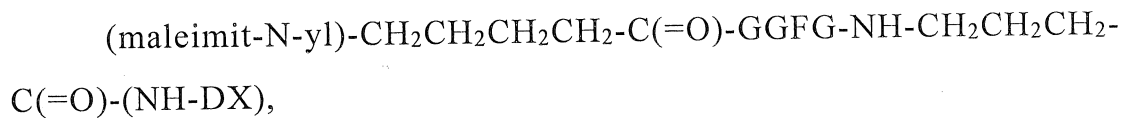
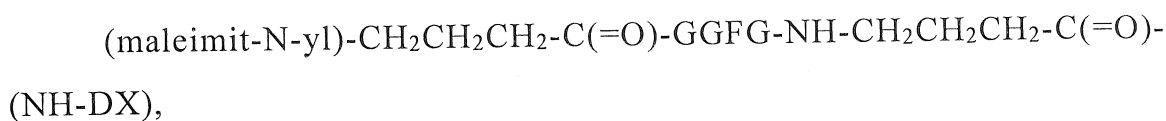
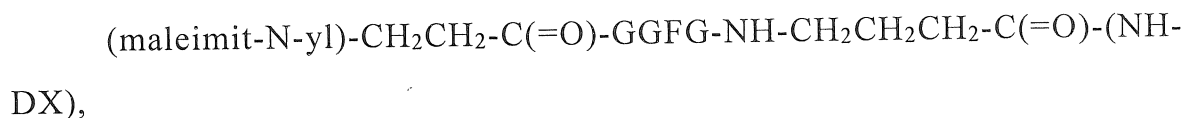
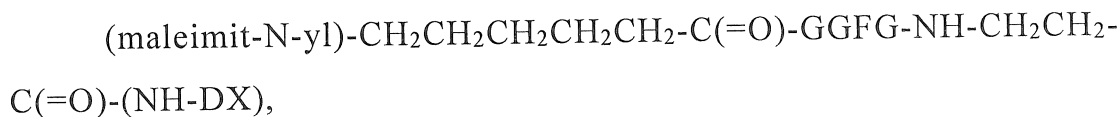
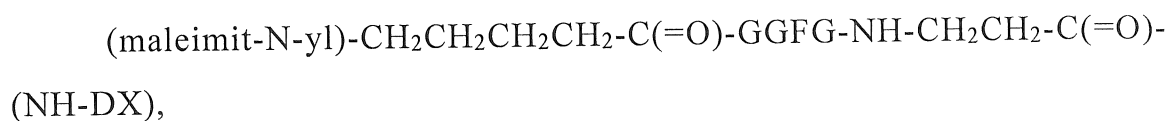
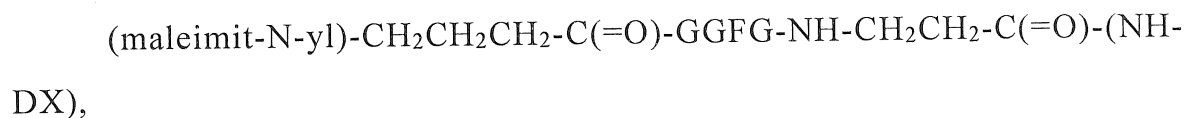
Ngoài ra, đối với  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$ , ưu tiên hợp chất có  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , hoặc  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  làm chất trung gian sản xuất. Ưu tiên hơn hợp chất có  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , hoặc  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ .

Ngoài ra, trong hợp chất được biểu thị bằng công thức (2), ưu tiên hợp chất trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $L^2$  là liên kết đơn, và  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$  là  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , hoặc  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$  làm chất trung gian sản xuất. Ưu tiên hơn hợp chất trong đó  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$  là  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2-O-CH_2-$ , hoặc  $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ . Ưu tiên hơn nữa hợp chất trong đó  $n^3$  là số nguyên bằng 2 hoặc 5.

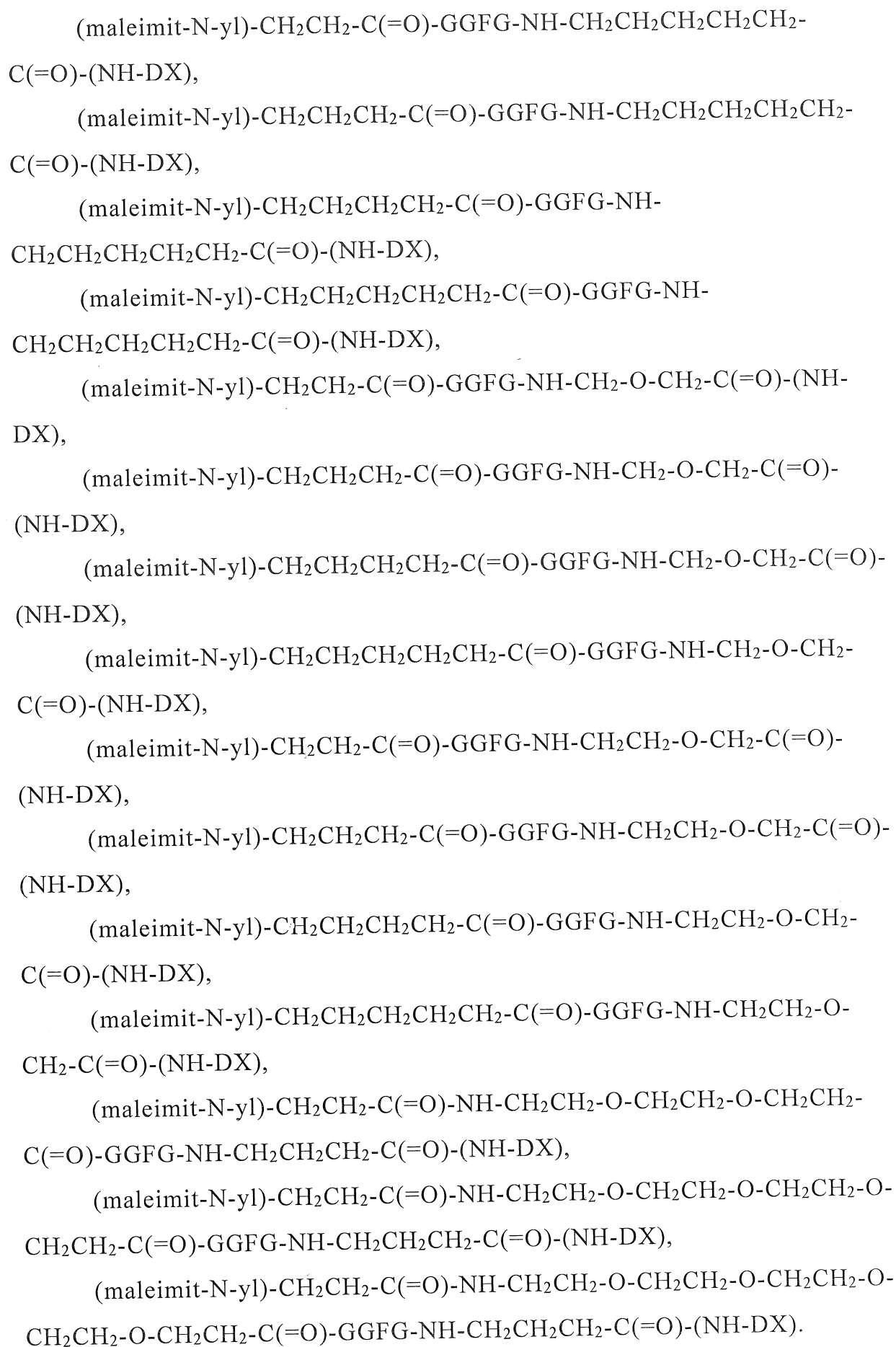
Ngoài ra, trong hợp chất được biểu thị bằng công thức (2), ưu tiên hợp chất trong đó  $n^3$  là số nguyên từ 2 đến 5,  $L^2$  là  $-NH-(CH_2CH_2-O)^{n^4}-CH_2CH_2-C(=O)-$ ,  $n^4$  là số nguyên từ 2 đến 4, và  $-NH-(CH_2)^{n^1}-L^a-(CH_2)^{n^2}-$  là  $-NH-CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-NH-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , hoặc  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  làm chất trung gian sản xuất. Ưu tiên hơn hợp chất trong đó  $n^4$  là số nguyên bằng 2 hoặc 4. Ưu tiên hơn nữa hợp chất trong đó  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-\text{L}^a-(\text{CH}_2)n^2-$  là  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , hoặc  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ .

Cho hợp chất trung gian được ưu tiên hữu ích để sản xuất hợp chất của sáng chế, có thể lấy ví dụ dưới đây.

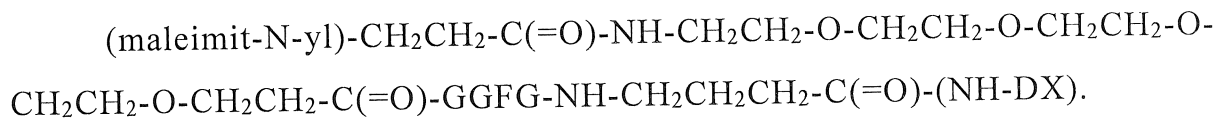
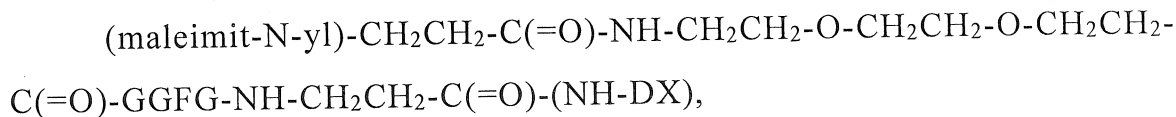
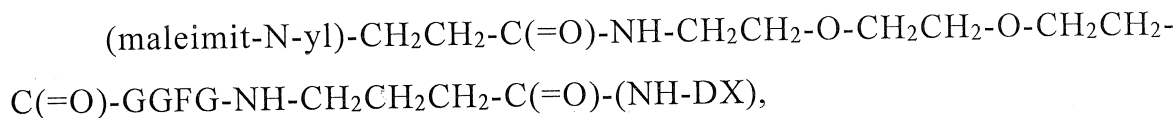
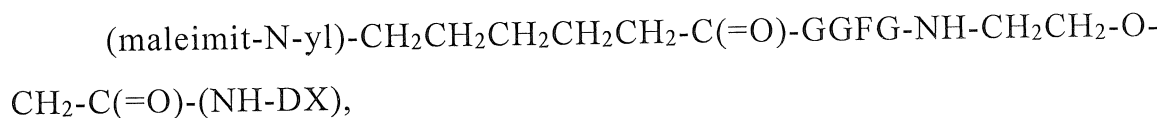
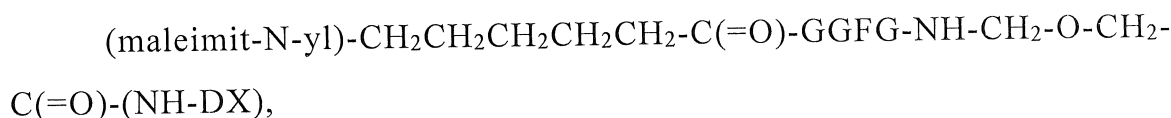
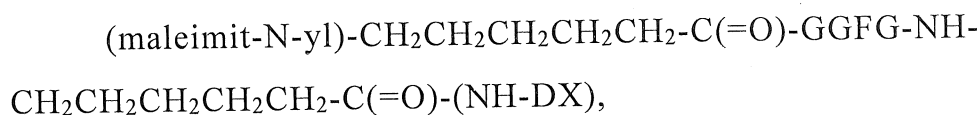
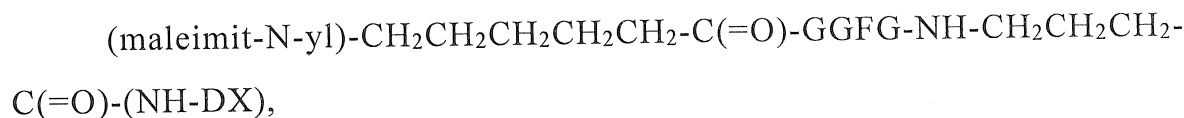
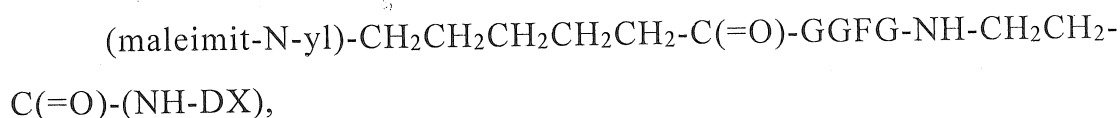
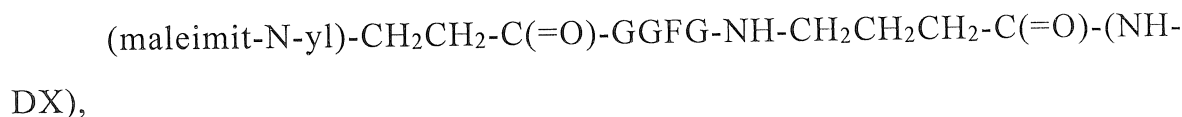






Có thể sản xuất thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế bằng cách cho hợp chất liên kết-thuốc được chọn từ nhóm nêu trên của các hợp chất trung gian sản xuất phản ứng với kháng thể kháng-TROP2 hoặc dẫn xuất phản ứng của nó và tạo thành liên kết thioete ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng-TROP2. Trong trường hợp này, tốt hơn là sử dụng dẫn xuất phản ứng của kháng thể kháng-TROP2. Cụ thể là, điều chế dẫn xuất phản ứng thu được bằng cách khử hoá kháng thể kháng-TROP2.

Các hợp chất dưới đây là các hợp chất được ưu tiên hơn làm các chất trung gian sản xuất.



Trong số nhóm nêu trên của các hợp chất trung gian, hợp chất có công thức:

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), hoặc

(maleimit-N-yl)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

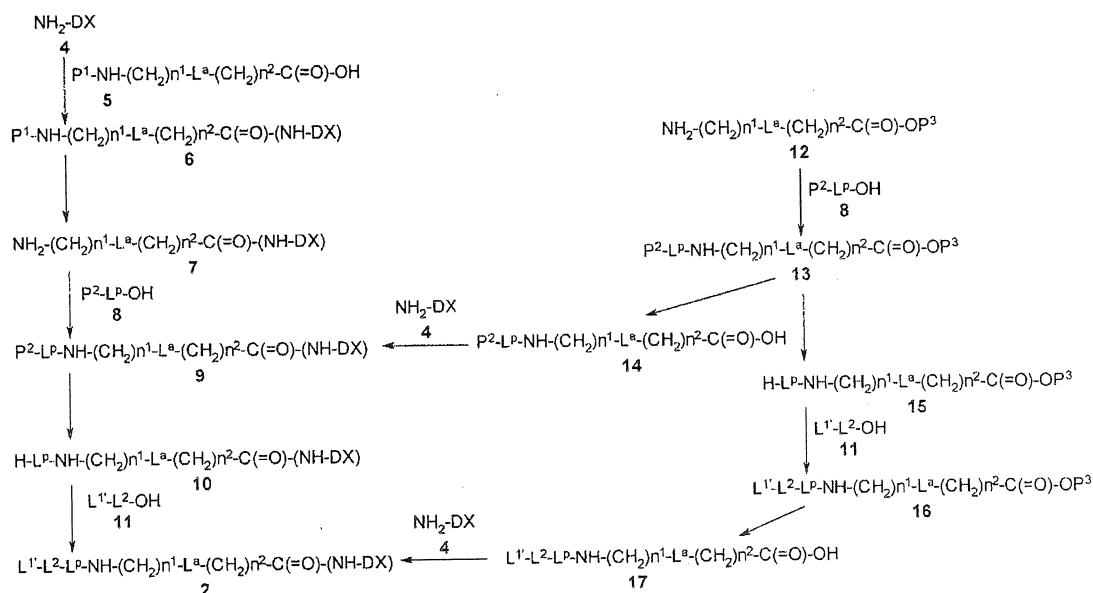
là hợp chất được ưu tiên hơn.

Để đảm bảo lượng thể liên hợp, có thể trộn nhiều thể liên hợp thu được trong các điều kiện sản xuất tương tự để có số lượng tương đương các thuốc (ví dụ, khoảng  $\pm 1$ ) để điều chế các lô mẻ mới. Trong trường hợp này, số lượng trung bình của thuốc nằm trong khoảng các số lượng trung bình của thuốc trong các thể liên hợp trước khi trộn.

## 2. Phương pháp sản xuất 2

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (2) làm chất trung gian được sử dụng trong phương pháp sản xuất trước đây và muối được dùng của nó ví dụ có thể được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

[Công thức 22]



Trong công thức, L<sup>1'</sup> là nhóm maleimetyl, và P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, và P<sup>3</sup> lần lượt là nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (6) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (5) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc axit tương tự và cho phản ứng với  $\text{NH}_2\text{-DX}$  (4) hoặc muối được dụng của nó với sự có mặt của bazơ.  $\text{NH}_2\text{-DX}$  (4) là exatecan (tên hoá học: (1S,9S)-1-amino-9-etyl-5-flo-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-metyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-dion).

Các chất thử và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit cho phản ứng này. Có nhiều loại este có hoạt tính. Ví dụ, có thể sản xuất chất này bằng cách cho các phenol như p-nitrophenol, N-hydroxy benzotriazol, N-hydroxy suxinimit, hoặc phenol tương tự, phản ứng với axit carboxylic (5) bằng cách sử dụng tác nhân gây ngưng tụ như N,N'-dicyclohexylcarbodiimit hoặc 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua. Ngoài ra, có thể sản xuất este có hoạt tính bằng cách cho axit carboxylic (5) phản ứng với pentaflorophenyl trifloaxetat hoặc chất tương tự; cho axit carboxylic (5) phản ứng với 1-benzotriazolyl oxytripyrrolidinophosphonium hexaflorophosphit; cho axit carboxylic (5) phản ứng với dietyl xyanophosphonat (phương pháp khử muối); cho axit carboxylic (5) phản ứng với triphenylphosphin và 2,2'-dipyridyl disulfua (phương pháp Mukaiyama); cho axit carboxylic (5) phản ứng với dẫn xuất triazin như 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorpholini clorua (DMTMM); hoặc dẫn xuất tương tự. Ngoài ra, cũng có thể tiến hành phản ứng bằng cách, ví dụ phương pháp axit halogenua theo đó xử lý axit carboxylic (5) với axit halogenua như thionyl clorua và oxalyl clorua với sự có mặt của bazơ.

Bằng cách cho este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc axit halogenua của axit carboxylic (5) thu được như ở trên phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ thích hợp trong môi trường trơ ở nhiệt độ phản ứng từ -78°C đến 150°C, có thể sản xuất hợp chất (6). Trong đó, "dung môi trơ" chỉ dung môi không ức chế phản ứng đích mà sử dụng dung môi đó.

Các ví dụ cụ thể của bazơ được sử dụng cho từng bước nêu trên có thể bao gồm cacbonat, alkoxit, hydroxit, hoặc hydrua của kim loại kiềm hoặc kim loại

kiềm thổ bao gồm natri cacbonat, kali cacbonat, natri etoxit, kali butoxit, natri hydroxit, kali hydroxit, natri hydrua, và kali hydrua, bazơ kim loại hữu cơ được biểu thị bằng alkyl lithi bao gồm n-butyl lithi, dialkylamino lithi kể cả lithi diisopropylamit; bazơ kim loại hữu cơ của bissilylamin kể cả lithi bis(trimetylsilyl)amit; và bazơ hữu cơ kể amin bậc ba hoặc hợp chất dị vòng có chứa-nitơ như pyridin, 2,6-lutidin, collidin, 4-dimetylaminopyridin, trietylamin, N-metylmorpholin, diisopropyletylamin, và diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).

Ví dụ về dung môi trơ được sử dụng cho phản ứng của sáng chế bao gồm a) dung môi hydrocacbon được halogen hoá như diclometan, clorofom, và cacbon tetraclorea; dung môi ete như tetrahydrofuran, 1,2-dimetoxyetan, và dioxan; dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen; và dung môi amit như N,N-dimetylformamit, N,N-dimetylaxetamit, và N-metylpyrrolidin-2-on. Ngoài các dung môi này, dung môi sulfoxit như dimetyl sulfoxit và sulfolan; dung môi keton như axeton và metyl etyl keton; và dung môi rượu như metanol và etanol có thể được sử dụng trong một vài trường hợp. Ngoài ra, có thể trộn lẫn các dung môi này để sử dụng.

Đối với nhóm bảo vệ P<sup>1</sup> cho nhóm đầu tận cùng amino của hợp chất (6), có thể sử dụng nhóm bảo vệ cho nhóm amino nói chung được sử dụng để tổng hợp peptit, ví dụ, nhóm carbonyl tert-butyloxy, nhóm carbonyl 9-florenylmetyloxy, và nhóm carbonyl benzyloxy. Ví dụ về nhóm bảo vệ khác cho nhóm amino có thể bao gồm nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm alkoxy carbonyl như nhóm metoxy carbonyl và nhóm etoxycarbonyl; nhóm arylmetoxy carbonyl như nhóm parametoxibenzyloxy carbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy carbonyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl metyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl và nhóm orthonitrobenzen sulfonyl. Nhóm bảo vệ P<sup>1</sup> có thể được chọn lọc tùy thuộc vào, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm amino sẽ được bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^1$  cho nhóm đầu tận cùng amino của hợp chất (6) thu được, có thể sản xuất hợp chất (7). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện phản ứng tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Hợp chất (9) có thể được sản xuất bằng cách tạo dẫn xuất axit peptit carboxylic (8) có đầu tận cùng N được bảo vệ bằng  $P^2$  thành có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (7) thu được. Có thể lựa chọn các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (8) và hợp chất (7) một cách thích hợp và sử dụng từ các chất được mô tả cho tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ  $P^2$  có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng từ các chất được mô tả cho nhóm bảo vệ của hợp chất (6), và việc lựa chọn có thể dựa trên, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm amino sẽ được bảo vệ. Như thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit, bằng cách lặp lại lần lượt phản ứng và quá trình khử bảo vệ axit amin hoặc peptit cấu thành axit peptit carboxylic (8) để kéo dài mạch, cũng có thể sản xuất hợp chất (9).

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^2$  cho nhóm amino của hợp chất (9) thu được, có thể sản xuất hợp chất (10). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện dựa trên nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (11) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc axit tương tự và cho phản ứng với hợp chất (10) thu được. Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit carboxylic (11) và hợp chất (10) có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng từ phần được mô tả để tổng hợp của hợp chất (6).

Hợp chất (9) ví dụ cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

Hợp chất (13) có thể được sản xuất bằng cách tạo dẫn xuất axit peptit carboxylic (8) có đầu tận cùng N được bảo vệ bằng  $P^2$  thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với sự có mặt của bazơ với hợp chất amin (12) có nhóm carboxy được bảo vệ bằng  $P^3$ . Các điều

kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trơ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (8) và hợp chất (12) có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Nhóm bảo vệ P<sup>2</sup> cho nhóm amino của hợp chất (13) có thể được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ mà thông thường được sử dụng.

Cụ thể là, ví dụ về nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxyl bao gồm nhóm alkoxymetyl như metoxymetyl; nhóm arylmetyl như benzyl group, nhóm 4-metoxybenzyl, và nhóm triphenylmetyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm silyl như nhóm tert-butyl diphenylsilyl. Nhóm carboxy có thể được bảo vệ, ví dụ este bằng nhóm alkyl như nhóm methyl, nhóm ethyl, và nhóm tert-butyl, nhóm allyl, hoặc nhóm arylmetyl như nhóm benzyl. Các ví dụ về nhóm bảo vệ cho nhóm amino bao gồm, ví dụ, nhóm alkyloxycarbonyl như nhóm tert-butyloxycarbonyl, nhóm metoxycarbonyl, và nhóm etoxycarbonyl; nhóm allyloxycarbonyl, hoặc nhóm arylmetoxycarbonyl như nhóm 9-florenylmetyloxy carbonyl, nhóm benzyloxy carbonyl, nhóm parametoxibenzyloxy carbonyl, và nhóm para (hoặc ortho)nitrobenzyloxy carbonyl; nhóm alkanoyl như nhóm axetyl; nhóm arylmetyl như nhóm benzyl và nhóm triphenyl metyl; nhóm aroyl như nhóm benzoyl; và nhóm aryl sulfonyl như nhóm 2,4-dinitrobenzen sulfonyl hoặc nhóm orthonitrobenzen sulfonyl.

Đối với nhóm bảo vệ P<sup>3</sup> cho nhóm carboxy, có thể sử dụng nhóm bảo vệ thông thường được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy trong hoá học tổng hợp hữu cơ, cụ thể là, tổng hợp peptit. Các ví dụ cụ thể bao gồm các este có nhóm alkyl như nhóm methyl, nhóm ethyl, hoặc tert-butyl, allyl este, và benzyl este, và nhóm bảo vệ có thể được chọn thích hợp từ các nhóm bảo vệ nêu trên. Trong trường hợp này, ưu tiên nhóm bảo vệ cho nhóm amino và nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy có thể tốt hơn được loại bỏ bằng phương pháp khác hoặc các điều kiện khác nhau. Ví dụ, ví dụ đại diện bao gồm kết hợp, trong đó P<sup>2</sup> là nhóm tert-butyloxy carbonyl và P<sup>3</sup> là nhóm benzyl. Các nhóm bảo vệ có thể được chọn từ các nhóm nêu trên tùy thuộc vào, ví dụ các tính chất của hợp chất có nhóm

amino và nhóm carboxy sẽ được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm bảo vệ, có thể lựa chọn các chất thử và các điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^3$  cho nhóm carboxy của hợp chất (13) thu được, có thể sản xuất hợp chất (14). Cho phản ứng khử bảo vệ này, lựa chọn các chất thử và các điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (9) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (14) thu được thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Cho phản ứng này, cũng có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit, và lựa chọn các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng một cách thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

Cũng có thể tổng hợp hợp chất (2) ví dụ bằng phương pháp dưới đây.

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ  $P^2$  cho nhóm amino của hợp chất (13), có thể sản xuất hợp chất (15). Cho phản ứng khử bảo vệ này, có thể lựa chọn các chất thử và điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (16) bằng cách tạo dẫn xuất dẫn xuất axit carboxylic (11) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (15) thu được với sự có mặt của bazơ. Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết amit giữa axit peptit carboxylic (11) và hợp chất (15) có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả ở trên để tổng hợp hợp chất (6).

Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (16) thu được, có thể sản xuất hợp chất (17). Có thể thực hiện phản ứng khử bảo vệ này tương tự phản ứng khử bảo vệ ở nhóm carboxy để sản xuất hợp chất (14).

Có thể sản xuất hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (17) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (4) với sự có mặt của bazơ. Cho phản ứng này, cũng có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng mà thông thường

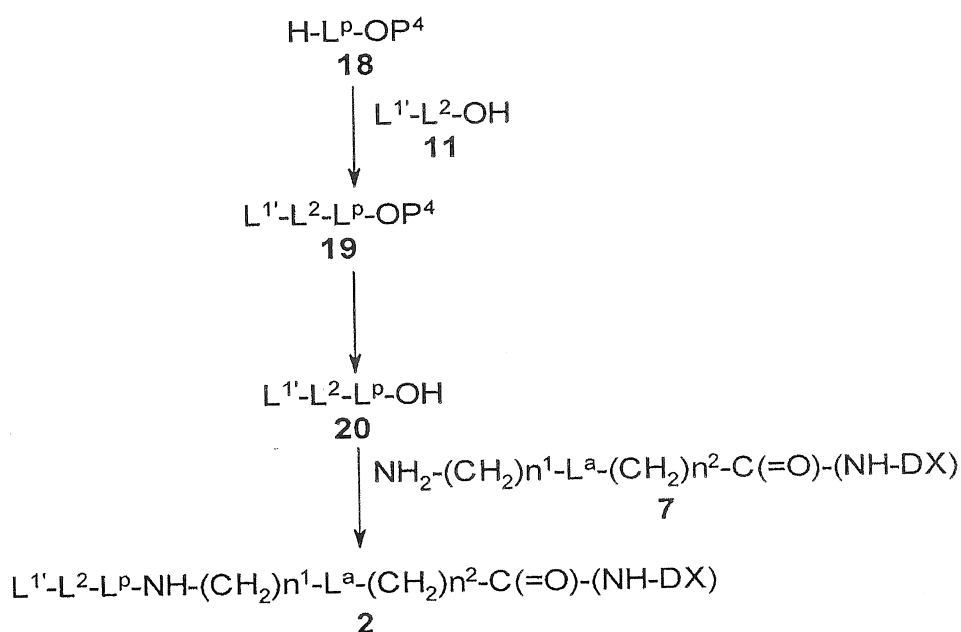


được sử dụng để tổng hợp peptit, và các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp của hợp chất (6).

### 3. Phương pháp sản xuất 3

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (2) của hợp chất trung gian cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

[Công thức 23]



Trong công thức,  $\text{L}^{1'}$  tương ứng với  $\text{L}^1$  có cấu trúc trong đó đầu tận cùng được chuyển hoá thành nhóm maleimetyl, và  $\text{P}^4$  là nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (19) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (11) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này với sự có mặt của bazơ phản ứng với axit peptit carboxylic (18) có đầu tận cùng C được bảo vệ bởi  $\text{P}^4$ . Các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng để tạo thành liên kết peptit giữa axit peptit carboxylic (18) và hợp chất (11) có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6). Nhóm bảo vệ  $\text{P}^4$  cho nhóm carboxy của hợp chất (18) có thể được lựa chọn thích hợp từ nhóm bảo vệ nêu trên.

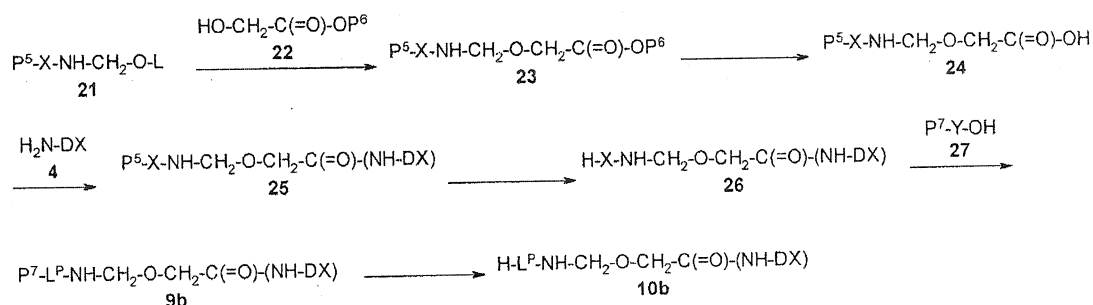
Bằng cách khử bảo vệ nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy của hợp chất (19) thu được, có thể sản xuất hợp chất (20). Có thể tiến hành phản ứng khử bảo vệ này tương tự như phản ứng khử bảo vệ nhóm carboxy để sản xuất hợp chất (14).

Có thể sản xuất hợp chất (2) bằng cách tạo dẫn xuất hợp chất (20) thu được thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (7). Cho phản ứng này, các chất và điều kiện phản ứng mà thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit cũng có thể sử dụng, và các điều kiện phản ứng, các chất thử, bazơ, và dung môi trợ được sử dụng cho phản ứng này có thể được lựa chọn thích hợp từ phần được mô tả để tổng hợp hợp chất (6).

#### 4. Phương pháp sản xuất 4

Trong bản mô tả dưới đây, phương pháp để sản xuất hợp chất (10b) có  $n^1 = 1$ ,  $L^a = O$  trong chất trung gian sản xuất (10) được mô tả trong phương pháp sản xuất 2 được mô tả chi tiết. Hợp chất được biểu thị bằng công thức (10b), ví dụ có thể sản xuất muối hoặc solvat của nó theo phương pháp dưới đây.

[Công thức 24]



Trong công thức,  $L^p$  là như được xác định ở trên, L là nhóm axyl mà là nhóm alkanoyl như nhóm axetyl hoặc nhóm alloy như nhóm benzoyl, nguyên tử hydro, hoặc nhóm tương tự, X và Y lần lượt biểu thị oligopeptit gồm có từ 1 đến 3 nhóm axit amin,  $P^5$  và  $P^7$  lần lượt biểu thị nhóm bảo vệ cho nhóm amino, và  $P^6$  là nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy.

Hợp chất được biểu thị bằng công thức (21) có thể sản xuất bằng cách sử dụng hoặc áp dụng phương pháp được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 2002-60351 hoặc tài liệu tham khảo (J. Org. Chem., Vol. 51, page 3196, 1986), và, bằng cách tiến hành loại bỏ các nhóm bảo vệ hoặc cải biến các nhóm

chức, nếu cần. Theo cách khác, hợp chất này cũng có thể thu được bằng cách xử lý axit amin với nhóm đầu tận cùng amino được bảo vệ hoặc amit của axit oligopeptit với nhóm amino được bảo vệ bằng aldehyt hoặc keton.

Bằng cách cho hợp chất (21) phản ứng với hợp chất (22) có nhóm hydroxyl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ điều kiện nhiệt độ làm mát đến nhiệt độ trong phòng trong môi trường trơ với sự có mặt của axit hoặc bazơ, có thể sản xuất hợp chất (23).

Ví dụ về axit mà có thể sử dụng ở đây có thể bao gồm axit vô cơ như axit flohydric, axit clohydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric, và axit boric; axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric, axit paratoluen sulfonic, và axit metansulfonic; và axit Lewis như tetrafloroborat, kẽm clorua, thiếc clorua, nhôm clorua, và sắt clorua. Trong số các axit này, các axit sulfonic, cụ thể là, axit paratoluen sulfonic là được ưu tiên. Đối với bazơ, bazơ bất kỳ trong số bazơ nêu trên có thể được lựa chọn thích hợp và sử dụng. Các ví dụ được ưu tiên của các chất này bao gồm kim loại kiềm alkoxit như kali tert-butoxit; kim loại kiềm hydroxit như natri hydroxit và kali hydroxit; kim loại kiềm hydrua như natri hydrua và kali hydrua; bazơ kim loại hữu cơ được biểu thị bằng dialkylamino lithi như lithi diisopropylamit; và bazơ kim loại hữu cơ của bissilylamin như lithi bis(trimetylsilyl)amit. Các ví dụ về dung môi sẽ sử dụng cho phản ứng này bao gồm dung môi ete như tetrahydrofuran và 1,4-dioxan; và dung môi hydrocacbon thơm như benzen và toluen. Các dung môi này có thể được điều chế dưới dạng hỗn hợp với nước. Ngoài ra, nhóm bảo vệ cho nhóm amino, ví dụ bằng P<sup>5</sup> là không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm này là nhóm thông thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu bao gồm các nhóm bảo vệ cho nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Tuy nhiên, trong phản ứng của sáng chế, có thể có trường hợp trong đó nhóm bảo vệ cho nhóm amino ví dụ bằng P<sup>5</sup> bị phân giải. Trong trường hợp này, cần thiết tiến hành phản ứng với chất thử thích hợp để bảo vệ nhóm amino nếu cần thiết phải đưa nhóm bảo vệ vào lại.

Có thể sản xuất hợp chất (24) bằng cách loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>6</sup> của hợp chất (23). Trong bản mô tả này, các ví dụ tiêu biểu về nhóm bảo vệ cho nhóm carboxy ví dụ bởi P<sup>6</sup> được mô tả trong phương pháp sản xuất 2, và có thể lựa chọn nhóm thích hợp trong số các nhóm đó. Trong hợp chất (23), mong muốn là nhóm bảo vệ P<sup>5</sup> cho nhóm amino và nhóm bảo vệ P<sup>6</sup> cho nhóm carboxy là các nhóm bảo vệ mà có thể bị loại bỏ bằng một phương pháp khác hoặc các điều kiện khác. Ví dụ, ví dụ tiêu biểu bao gồm kết hợp trong đó P<sup>5</sup> là nhóm 9-florenylmethyloxy carbonyl và P<sup>6</sup> là nhóm benzyl. Có thể lựa chọn các nhóm bảo vệ tùy thuộc vào, ví dụ, các tính chất của hợp chất có nhóm amino và nhóm carboxy cần được bảo vệ. Để loại bỏ các nhóm bảo vệ, lựa chọn các chất thử và điều kiện tùy thuộc vào nhóm bảo vệ.

Có thể sản xuất hợp chất (26) bằng cách tạo dẫn xuất axit carboxylic (24) thành este có hoạt tính, anhydrit axit hỗn hợp, axit halogenua, hoặc chất tương tự và cho hợp chất này phản ứng với hợp chất (4) hoặc muối được dụng của nó để sản xuất hợp chất (25) tiếp đó loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>5</sup> của hợp chất (25) thu được. Cho phản ứng giữa hợp chất (4) và axit carboxylic (24) và phản ứng để loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>6</sup>, có thể sử dụng cùng các chất thử và các điều kiện phản ứng như phần được mô tả cho Phương pháp sản xuất 2.

Có thể sản xuất hợp chất (10b) bằng cách cho hợp chất (26) phản ứng với axit amin có nhóm amino đầu tận cùng được bảo vệ hoặc oligopeptit (27) có nhóm amino được bảo vệ để sản xuất hợp chất (9b) và loại bỏ nhóm bảo vệ P<sup>7</sup> của hợp chất (9b) thu được. Nhóm bảo vệ cho nhóm amino như được biểu thị bằng P<sup>7</sup> là không bị giới hạn cụ thể nếu nhóm này thông thường được sử dụng để bảo vệ nhóm amino. Các ví dụ tiêu biểu cho các nhóm này bao gồm các nhóm bảo vệ cho nhóm amino được mô tả trong phương pháp sản xuất 2. Để loại bỏ nhóm bảo vệ, các chất thử và điều kiện được lựa chọn tùy thuộc vào nhóm bảo vệ. Cho phản ứng giữa hợp chất (26) và hợp chất (27), có thể sử dụng các chất và điều kiện phản ứng thông thường được sử dụng để tổng hợp peptit. Hợp chất (10b) được sản xuất theo phương pháp nêu trên có thể được tạo dẫn xuất thành hợp chất (1) của sáng chế theo phương pháp nêu trên.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế, khi để ngoài không khí hoặc được kết tinh lại, ví dụ, để tinh chế, có thể hấp thụ hơi ẩm để có nước hấp thụ hoặc chuyển thành hydrat, và hợp chất và muối này có chứa nước cũng được bao gồm trong Sáng chế.

Hợp chất được đánh dấu bằng nhiều loại đồng vị phóng xạ hoặc không có tính phóng xạ cũng được bao gồm trong Sáng chế. Một hoặc nhiều nguyên tử cấu thành thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế có thể có chứa đồng vị nguyên tử ở tỷ lệ phi tự nhiên. Các ví dụ về đồng vị nguyên tử bao gồm đơteri ( $^2\text{H}$ ), triti ( $^3\text{H}$ ), iốt-125 ( $^{125}\text{I}$ ), và cacbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Ngoài ra, hợp chất của sáng chế có thể được đánh dấu phóng xạ bằng đồng vị phóng xạ như triti ( $^3\text{H}$ ), iốt-125 ( $^{125}\text{I}$ ), cacbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ), đồng-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), zirconi-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ), iốt-124 ( $^{124}\text{I}$ ), flo-18 ( $^{18}\text{F}$ ), indi-111 ( $^{111}\text{I}$ ), cacbon-11 ( $^{11}\text{C}$ ) và iốt-131 ( $^{131}\text{I}$ ). Hợp chất được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ hữu ích làm tác nhân điều trị hoặc phòng bệnh, chất thử cho nghiên cứu như chất thử cho thử nghiệm và chất thử chẩn đoán như chất chụp ảnh chẩn đoán in vivo. Không liên quan đến hoạt tính phóng xạ, loại biến thể đồng vị bất kỳ của thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế là thuộc phạm vi của sáng chế.

#### [Thuốc]

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế thể hiện hoạt tính gây độc tế bào kháng lại các tế bào ung thư, và do đó, có thể sử dụng làm thuốc, cụ thể là làm chất điều trị và/hoặc chất phòng bệnh ung thư.

Nghĩa là, thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng chọn lọc làm thuốc để hoá trị liệu, đây là phương pháp chính để điều trị ung thư, và do đó, có thể trì hoãn sự phát triển của các tế bào ung thư, ức chế tăng trưởng các tế bào này, và ngoài ra tiêu diệt các tế bào ung thư. Việc này có thể cho phép các bệnh nhân ung thư không còn các triệu chứng do bệnh ung thư hoặc đạt được sự cải thiện chất lượng cuộc sống (QOL) của các bệnh nhân ung thư và đạt được tác dụng trị liệu bằng cách duy trì cuộc sống của các bệnh nhân ung thư. Thậm chí nếu thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế không đạt được việc tiêu diệt các tế bào ung thư, nó có thể đạt được

QOL cao hơn cho các bệnh nhân ung thư đồng thời có tỷ lệ sống sót kéo dài hơn, bằng cách ức chế hoặc kiểm soát sự tăng trưởng của các tế bào ung thư.

Trong liệu pháp thuốc này, thể liên hợp này có thể được sử dụng làm thuốc đơn độc cũng như làm thuốc kết hợp với liệu pháp bổ sung trong liệu pháp phụ trợ và có thể kết hợp với phẫu thuật, trị liệu phóng xạ, trị liệu hormon, hoặc trị liệu tương tự. Ngoài ra, thể liên hợp này cũng có thể được sử dụng làm thuốc cho liệu pháp trong liệu pháp phụ trợ mới.

Ngoài ứng dụng điều trị nêu trên, có thể hy vọng có tác dụng ức chế tăng trưởng các tế bào ung thư di căn nhỏ và ngoài ra tiêu diệt các tế bào này bằng cách gắn kết với các tế bào ung thư này do tính chất gắn kết của kháng thể này với kháng nguyên. Cụ thể là, khi xác nhận có biểu hiện TROP2 ở các tế bào ung thư cấp một, có thể hy vọng có ức chế di căn ung thư hoặc tác dụng phòng bệnh bằng cách cho dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế. Ví dụ, có thể hy vọng có tác dụng ức chế và tiêu diệt các tế bào ung thư trong dịch cơ thể trong giai đoạn di căn hoặc tác dụng, ví dụ, ức chế và tiêu diệt các tế bào ung thư nhỏ ngay sau khi cấy vào mô bất kỳ. Ngoài ra, có thể hy vọng có ức chế di căn ung thư hoặc tác dụng phòng bệnh, cụ thể là, sau khi phẫu thuật loại bỏ ung thư. Do đó, có thể hy vọng có tác dụng ức chế di căn ung thư.

Có thể hy vọng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có tác dụng trị liệu bằng cách sử dụng như liệu pháp toàn thân cho các bệnh nhân, và ngoài ra, bằng cách sử dụng tại chỗ vào các mô ung thư.

Ví dụ về loại bệnh ung thư mà ứng dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế bao gồm ung thư phổi, ung thư thận, ung thư biểu mô tiết niệu, ung thư ruột kết-trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào xốp đa dạng, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, ung thư vú, u melanin, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, ung thư cổ tử cung, ung thư đầu và cổ, hoặc ung thư thực quản, tuy nhiên, không chỉ giới hạn ở các loại ung thư này miễn là tế bào ung thư có biểu hiện, trong tế bào ung thư như một đối tượng điều trị, protein kháng nguyên mà thể liên hợp thuốc-kháng thể có thể nhận biết.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế tốt hơn là được sử dụng cho động vật có vú, nhưng tốt hơn nữa là sử dụng cho người.

Các chất được sử dụng trong dược phẩm có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được lựa chọn thích hợp và áp dụng từ các chất phụ gia bào chế hoặc các chất tương tự thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này, theo liều lượng hoặc nồng độ sử dụng.

Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng dược phẩm có chứa ít nhất một thành phần được dụng. Ví dụ, dược phẩm nêu trên thông thường có chứa ít nhất một chất mang được dụng (ví dụ, chất lỏng được tiết khuẩn). Trong bản mô tả này, chất lỏng bao gồm, ví dụ, nước và dầu (dầu mỏ và dầu có nguồn gốc động vật, thực vật, hoặc tổng hợp). Dầu này có thể là, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, hoặc dầu vùng. Nước là chất mang điển hình hơn khi được phẩm nêu trên được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Dung dịch nước muối, dung dịch dextroza trong nước, và dung dịch glyxerol trong nước cũng có thể sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể là, để làm dung dịch tiêm. Chất dẫn được dụng thích hợp là đã biết trong lĩnh vực. Nếu muốn, chế phẩm nêu trên cũng có thể có chứa lượng vết của chất làm ẩm, chất nhũ hoá, hoặc chất đệm pH. Ví dụ về chất mang được dụng thích hợp được đề cập trong "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E. W. Martin. Các chế phẩm bào chế tương ứng cách dùng.

Nhiều hệ chuyển vận là đã biết và có thể được sử dụng để dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế. Các ví dụ đường dùng bao gồm các đường trong da, trong bắp cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, và dưới da, nhưng không chỉ giới hạn ở các đường dùng này. Việc sử dụng có thể tiến hành ví dụ bằng cách tiêm hoặc tiêm liều cao. Theo phương án được ưu tiên cụ thể, việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể là bằng cách tiêm. Sử dụng ngoài đường tiêu hoá là đường dùng được ưu tiên.

Theo phương án đại diện, dược phẩm được kê đơn, làm dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường tĩnh mạch cho người, theo các quy trình thông thường. Chế phẩm để sử dụng qua đường tĩnh mạch thường là dung dịch trong dung dịch

đệm trong nước vô khuẩn và đẳng trương. Nếu cần, thuốc có thể chứa tác nhân hoà tan và chất gây tê tạo chỗ để giảm đau ở vị trí tiêm (ví dụ, lignocain). Nói chung, thành phần nêu trên được cung cấp riêng rẽ dưới dạng bột đông khô hoặc thể cô khan có chứa trong bao bì có được bằng cách hàn kín ampun hoặc gói nhỏ có một lượng hoạt chất hoặc dưới dạng hỗn hợp ở dạng phân liều đơn vị. Khi thuốc ở dạng sử dụng qua đường tiêm, thuốc có thể được sử dụng từ chai thuốc tiêm có chứa nước hoặc nước muối loại được dụng vô khuẩn. Khi thuốc được sử dụng qua đường tiêm, ampun chứa nước vô khuẩn hoặc nước muối để tiêm có thể được cung cấp sao cho các thành phần nêu trên được trộn với nhau trước khi sử dụng.

Dược phẩm của sáng chế có thể là dược phẩm chỉ chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế hoặc dược phẩm có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 và ít nhất một chất điều trị ung thư không phải là thể liên hợp. Thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 của sáng chế có thể được sử dụng với chất điều trị ung thư khác. Tác dụng chống ung thư có thể được tăng cường tương ứng. Một chất chống ung thư khác được sử dụng cho mục đích này có thể được sử dụng cho một cá thể đồng thời với, riêng rẽ với, hoặc sau khi dùng thể liên hợp thuốc-kháng thể, và có thể được sử dụng đồng thời thay đổi khoảng cách dùng liều cho từng chất. Ví dụ về các chất điều trị ung thư bao gồm abraxan, paclitaxel, cisplatin, gemxitabin, irinotecan (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinorelbin, các thuốc được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/038043, các chất tương tự LH-RH (leuprorelin, goserelin, hoặc các chất tương tự), estramustin phosphat, chất đối kháng estrogen (tamoxifen, raloxifen, hoặc các chất tương tự), và chất ức chế aromataza (anastrozol, letrozol, exemestan, hoặc các chất tương tự), nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này miễn là thuốc có hoạt tính kháng khối u.

Dược phẩm có thể được bào chế thành dạng đông khô hoặc chế phẩm lỏng dưới dạng có thành phần mong muốn và độ tinh khiết cần thiết. Khi được bào chế dưới dạng chế phẩm đông khô, có thể là chế phẩm có chứa chất phụ gia bào chế thích hợp mà được sử dụng trong lĩnh vực này. Cũng cho chế phẩm dạng



lông, chế phẩm này có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm lông có chứa nhiều loại chất phụ gia bào chế mà được sử dụng trong lĩnh vực này.

Thành phần và nồng độ của dược phẩm có thể thay đổi tùy thuộc vào phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thể liên hợp thuốc-kháng thể kháng-TROP2 có chứa trong trong dược phẩm của sáng chế có thể thể hiện tác dụng dược tính ở liều lượng nhỏ khi thể liên hợp thuốc-kháng thể có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên, nghĩa là, ái lực cao (= giá trị  $K_d$  thấp) theo hằng số phân ly (nghĩa là, giá trị  $K_d$ ) đối với kháng nguyên này. Do đó, để xác định liều lượng của thể liên hợp thuốc-kháng thể, có thể xác định liều lượng tùy từng trường hợp liên quan đến ái lực giữa thể liên hợp thuốc-kháng thể và kháng nguyên. Khi thể liên hợp thuốc-kháng thể của sáng chế được sử dụng cho người, ví dụ, khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg có thể được sử dụng làm một lần hoặc được sử dụng vài lần với khoảng cách giữa các lần dùng là từ 1 đến 180 ngày.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả cụ thể bằng các ví dụ được thể hiện dưới đây. Tuy nhiên, Sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này. Ngoài ra, ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trừ khi được mô tả cụ thể theo cách khác, chất phản ứng, dung môi và nguyên liệu ban đầu được mô tả trong bản mô tả này có thể dễ dàng thu được từ nhà cung cấp thương mại.

[Ví dụ 1: Gây miễn dịch cho chuột và thu được tế bào lai]

1-1) Điều chế tế bào sẽ sử dụng để gây miễn dịch cho chuột

Nuôi cấy  $5 \times 10^6$  NCI-H322 tế bào (dòng tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ của người, ATCC CRL-5806; ATCC: American Type Culture Collection) trong môi trường RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) (10 ml) trong 5 ngày, tiếp đó thu hồi, rửa bằng PBS (nước muối đệm-phosphat) hai lần, và tái tạo huyền phù trong PBS (500  $\mu$ l).

1-2) Gây miễn dịch cho chuột

Để gây miễn dịch lần đầu tiên, mỗi con chuột BALB/c (6 tuần tuổi) được gây miễn dịch trong màng bụng bằng các tế bào NCI-H322 ( $1 \times 10^7$  tế bào). Để

gây miễn dịch từ lần thứ hai đến lần thứ năm, chuột được gây miễn dịch trong màng bụng bằng  $1 \times 10^6$  NCI-H322 tế bào cách nhau 1 tuần. Cho gây miễn dịch lần thứ sáu (cuối cùng), gây miễn dịch cho chuột qua tĩnh mạch đuôi và trong màng bụng bằng các tế bào NCI-H322 ở nồng độ  $1 \times 10^6$  tế bào/200  $\mu$ l PBS cho mỗi đường dùng. Các tế bào lá lách được cắt 3 ngày sau khi gây miễn dịch lần cuối cùng.

#### 1-3) Điều chế tế bào lá lách của chuột được gây miễn dịch

Cắt lấy lá lách của chuột được gây miễn dịch, tiếp đó nghiền, và tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 10% FBS (huyết thanh bào thai bò)(+). Huyền phù tế bào được cho đi qua màng lọc tế bào (100  $\mu$ m, BD Falcon) và tiếp đó ly tâm ở 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, và loại bỏ dịch nổi. Thêm vào dung dịch Tris- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 10 mL) vào phần cặn, tiếp đó được xử lý ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Thêm môi trường RPMI 1640 FBS(+) (10 ml) vào huyền phù tế bào này, và hỗn hợp được cho qua màng lọc tế bào và tiếp đó ly tâm ở 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, và các tế bào lá lách được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

#### 1-4) Điều chế tế bào u tủy

Thu hồi các tế bào P3U1 (đòng tế bào u tủy của chuột) và ly tâm ở 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Thêm dung dịch EDTA (0,02%) (10 ml) vào các tế bào P3U1, tiếp đó được xử lý ở 37°C trong 5 phút. Ly tâm huyền phù tế bào P3U1 ở 1500 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 FBS(-) (10 ml).

#### 1-5) Dung hợp tế bào

Trộn các tế bào lá lách và các tế bào u tủy ở tỷ lệ 5:1 và ly tâm (1200 vòng/phút, 5 phút). Các tế bào thu được trong phân đoạn đã kết tủa được phân tán rời, và polyetylen glycol-4000 (PEG-4000; 1 mL) được thêm vào từ từ trong vòng 1 phút kèm theo khuấy. Tiếp đó, môi trường PRMI (1 mL) được thêm vào dịch lỏng có chứa tế bào một vài lần cách nhau 1 phút, và môi trường RPMI tiếp

đó được thêm vào để điều chỉnh thể tích tổng cộng đến 50 mL. Huyền phù tế bào được ly tâm (900 vòng/phút, 5 phút), và các tế bào thu được trong phân đoạn đã kết tủa được phân tán rời nhẹ nhàng và tiếp đó được tạo huyền phù nhẹ nhàng trong môi trường HAT (môi trường PRMI 1640 được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò và bổ sung môi trường HAT; 100 mL). Phân tán huyền phù này 200  $\mu$ L/giếng vào đĩa 96-giếng để nuôi cấy và được nuôi cấy cho đến khi hợp dòng 50% trong tủ ẩm 5% CO<sub>2</sub> 37°C.

#### 1-6) Sàng lọc tế bào lai bằng cách sử dụng adenovirut biến thể FZ33

Gây giống các tế bào NCI-H322 ở  $5 \times 10^3$  tế bào/giếng vào đĩa 96-giếng và nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ. Rửa các tế bào bằng 150  $\mu$ L/giếng PBS hai lần, và dịch nổi nuôi cấy tế bào lai (50  $\mu$ L) lần lượt được thêm vào mỗi giếng và cho phản ứng ở 4°C trong 1 giờ. Rửa các tế bào bằng 150  $\mu$ L/giếng PBS hai lần. Adenovirut Ax3CAZ3-FZ33 (adenovirut biểu hiện- $\beta$ -galactosidaza được cải biến bằng sợi Z33 để gắn kết với một kháng thể (xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2012/0237518)) được pha loãng bằng môi trường RPMI 1640(-) đến nồng độ bằng  $3 \times 10^6$  vp/100  $\mu$ L ( $1 \times 10^3$  vp/tế bào), và thêm dung dịch đã pha loãng này vào 100  $\mu$ L/giếng. Sau phản ứng ở 4°C trong 1 giờ, rửa các tế bào bằng 150  $\mu$ L/giếng PBS hai lần. Môi trường RPMI 1640 FBS(+) được thêm vào 100  $\mu$ L/giếng, và các tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Các tế bào NCI-H322 được xử lý bằng thử nghiệm gen báo cáo  $\beta$ -Gal bằng cách sử dụng Hệ thống Thử nghiệm Gen Báo cáo Galacto-Light Plus (Applied Biosystems, Inc.) được rửa bằng 200  $\mu$ L/giếng PBS. Dung dịch phân giải được thêm vào 50  $\mu$ L/giếng, và hỗn hợp được để ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Dịch phân giải tế bào này (10  $\mu$ L) được pha loãng 100 lần bằng dịch pha loãng đệm phản ứng Galacton-Plus Galacto, tiếp đó, thêm vào đĩa 96 giếng SH vi giếng White (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Inc.), và cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Chất tăng tốc II được thêm vào 150  $\mu$ L/giếng. Đo mức phát quang hoá học trong 5 giây bằng cách sử dụng máy đếm đa nhãn Wallac 1420 ARVOSx (PerkinElmer, Inc.), và liều gây nhiễm của virut trong các tế bào NCI-H322 được chỉ ra bằng giá trị trung bình/giấy theo RLU (mức phát quang hoá học). Từ đó tiến hành sàng lọc

nhóm tế bào lai, dòng tế bào có giá trị đo (RLU) 5000 RLU hoặc cao hơn được chọn từ toàn bộ nhóm (tối thiểu: 1383 RLU, trung bình: 10914 RLU, tối đa: 78746 RLU). Trước tiên, sàng lọc cấp một, 81 giếng dương tính được chọn từ 960 giếng tế bào lai thu được bằng cách dung hợp một tế bào. Cho sàng lọc kiểm định, tiến hành thử nghiệm lặp lại theo cùng phương pháp như trong sàng lọc cấp một. Khi giếng thể hiện giá trị đo bằng 5000 RLU hoặc cao hơn ở cả hai thử nghiệm được xem là dương tính, 52 giếng dương tính được chọn từ 81 giếng thu được trong sàng lọc cấp một. Các dòng đã lựa chọn được tách dòng phụ từ 2 đến 4 lần để thiết lập 44 dòng tế bào lai đơn dòng.

[Ví dụ 2: Tinh chế kháng thể từ tế bào lai]

Pristan (2,6,10,14-tetrametylpentadecan; 0.5 ml) được sử dụng trong màng bụng trước đó cho chuột từ 8- đến 10-tuần tuổi hoặc chuột trụi lông, các con chuột này sau đó được nuôi trong 2 tuần. Tế bào lai sản xuất-kháng thể đơn dòng thu được trong Ví dụ 1 được tiêm trong màng bụng cho chuột. Sau từ 10 đến 21 ngày, tế bào lai được để gây ung thư cổ tử cung, và tiếp đó thu gom dịch cổ tử cung. Dịch cổ tử cung thu được được ly tâm để loại bỏ chất rắn. Tiếp đó, tinh chế các kháng thể bằng cách khử muối bằng từ 40 đến 50% amoni sulfat, phương pháp kết tủa axit caprylic, cột DEAE-Sepharose, và cột protein G, và thu gom các phân đoạn IgG hoặc IgM và sử dụng dưới dạng các kháng thể đơn dòng đã tinh chế.

[Ví dụ 3: nhận dạng kháng nguyên mà gắn kết với kháng thể do tế bào lai sản xuất]

Nhận dạng kháng nguyên đối với TINA1, kháng thể do tế bào lai sản xuất được điều chế trong Ví dụ 2.

3-1) Kết tủa miễn dịch protein bề mặt tế bào được đánh dấu-biotin bằng cách sử dụng kháng thể TINA1

$5 \times 10^6$  các tế bào NCI-H322 được thu hồi và rửa bằng PBS ba lần. EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce/Thermo Fisher Scientific, Inc.) được tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ 0,1 mg/ml. Các tế bào NCI-H322 được quay tròn ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trong dung dịch biotin/PBS, tiếp đó rửa bằng

100 mM dung dịch glyxin/PBS (25 ml) hai lần, và tiếp đó rửa bằng PBS (25 ml) ba lần. Các tế bào đã rửa này được tái tạo huyền phù trong dịch đệm phân giải (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 1% NP-40 + chất ức chế Proteaza, 1 viên nén/50 ml Complete EDTA tự do (Hoffmann-La Roche Ltd.); 2 ml) và xử lý ở 4°C trong 30 phút. Thêm Protein G Sepharoza/dịch đệm phân giải (huyền phù 50%; 30  $\mu$ l) thu được bằng thay thế dịch đệm Protein G Sepharoza (Protein G Sepharoza 4 Fast Flow (GE Healthcare Japan Corporation)) bằng dịch đệm phân giải vào dịch phân giải tế bào, và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 1 giờ và tiếp đó ly tâm ở 4°C trong 5 phút để thu hồi dịch nổi. Thêm kháng thể TINA1 (3  $\mu$ g) vào dịch nổi, và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 1 giờ. Tiếp đó, thêm vào đó Protein G Sepharoza/dịch đệm phân giải (huyền phù 50%; 60  $\mu$ l), và hỗn hợp được quay tròn ở 4°C trong 2 giờ. Protein G Sepharoza được rửa bằng dịch đệm phân giải (1 ml) sáu lần và tiếp đó tái tạo huyền phù trong 1  $\times$  SDS dịch đệm mẫu/dịch đệm 5% 2-ME (2-mercaptoetanol) (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8 ở 25°C), 2% (trọng lượng/thể tích) SDS, 10% glyxerol, và 0,01% (trọng lượng/thể tích) đỏ phenol). Huyền phù được xử lý ở 100°C trong 5 phút, và tiếp đó thu hồi dung dịch và sử dụng làm mẫu cho thử cho SDS-PAGE (điện di gel polyacrylamit).

### 3-2) Phương pháp phân tích SDS-PAGE và thâm tách Western

Mẫu SDS-PAGE được điều chế ở mục 3-1) được điện di ở 20 mA sử dụng Ready Gels J 5-20% (Bio-Rad Laboratories, Inc.) và tiếp đó thâm tách ở 0,1 mA/cm<sup>2</sup> từ gel đến màng. Rửa màng bằng PBS-T (PBS(-)-0,05% Tween 20) trong 5 phút và tiếp đó phong bế trong 1 giờ. Rửa màng bằng PBS-T trong 5 phút 3 lần và tiếp đó cho phản ứng với thể liên hợp Streptavidin-củ cải ngựa (Amersham Biosciences Corp.; được pha loãng 2000 lần bằng PBS-T để sử dụng) trong 1 giờ. Rửa màng bằng PBS-T trong 10 phút 4 lần, và tiếp đó phát hiện dải đích bằng cách sử dụng các thuốc thử phát hiện của phương pháp phân tích thâm tách Western ECL (Amersham Biosciences Corp.) và Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences Corp.). Các tế bào NCI-H322 được đánh dấu-biotin theo các quy trình của Ví dụ 3-1) được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể KCI7A3

trong đó kháng nguyên của nó đã được xác định là TROP2 bằng phổ khối, hoặc kháng thể TINA1, và phân tích các sản phẩm đã kết tủa miễn dịch thu được bằng phương pháp phân tích SDS-PAGE và thấm tách Western khi có mặt hoặc không có mặt DTT. Trong hai trường hợp này sử dụng kháng thể KCI7A3 hoặc kháng thể TINA1, phát hiện dải ở phân tử lượng 46 kDa khi không có DTT, và phát hiện dải ở phân tử lượng 37 kDa trong các mẫu thử có bổ sung DTT.

### 3-3) Phân tích FACS

Do kháng nguyên của kháng thể TINA1 được dự đoán là TROP2 từ kiểu mẫu dải, tiến hành phân tích biểu hiện quá mức bằng cách chuyển gen ADN hỗ trợ không cần đo phổ khối. Từ kết quả phân tích FACS, kháng thể TINA1 thể hiện đáp ứng dương tính mạnh ở các tế bào CHOK1 biểu hiện TROP2 của người, điều này chỉ ra là kháng nguyên của kháng thể TINA1 là TROP2. Tiến hành phân tích FACS tương tự bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư phổi PC14, dòng tế bào ung thư phổi NCI-H322, dòng tế bào ung thư phổi NCI-H2122, dòng tế bào ung thư phổi LCAM1, dòng tế bào ung thư phổi LC2/ad, dòng tế bào ung thư tuyến MIAPaCa2, dòng tế bào ung thư tuyến PK-1, dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC3, dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng HCT116, dòng tế bào u melanin A375, dòng tế bào ung thư buồng trứng SKOV3, dòng tế bào khối u tạo máu RPMI8226, dòng tế bào khối u tạo máu K562, PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người), và tiểu cầu của người. Tất cả các dòng tế bào ung thư phổi đã xét nghiệm dương tính-TROP2, và PC3, PK1, và SKOV3 là dương tính như các dòng tế bào trừ các dòng tế bào ung thư phổi. Mặt khác, tất cả các tế bào máu bình thường là âm tính.

[Ví dụ 4: Xác định hoạt tính nhập nội của kháng thể]

### 4-1) Hệ thống đánh giá hoạt tính nhập nội kháng thể

Protein dung hợp tái tổ hợp DT3C được sản xuất để đo xác định hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch của kháng thể. DT3C này là protein có miền xúc tác của độc tố bệnh bạch hầu (DT) và ba vùng gắn kết-kháng thể của protein G. DT3C gắn kết đặc hiệu với nhóm Fc của một kháng thể, là ổn định, và gây cảm ứng chết tế bào bằng cách ức chế tổng hợp protein khi được hấp thụ

vào các tế bào. Bằng cách sử dụng hệ thống này, có thể đồng thời nhận thấy các dụng nhập nội của kháng thể và tác dụng tiêu diệt tế bào của nó do độc tố miễn dịch (Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603 của Yamaguchi, M., Hamada, H., và các đồng tác giả).

4-2) Đánh giá hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch bằng cách sử dụng DT3C

Thêm 4  $\mu\text{g/mL}$  DT3C 25  $\mu\text{L/giếng}$  vào đĩa 96-giếng, ngoài ra thêm 25  $\mu\text{L/giếng}$  dịch nuôi cấy của 11 các tế bào lai thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 hoặc phương pháp tương đương của nó vào đĩa, và ủ đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các kháng nguyên được nhận biết bởi các kháng thể được sản xuất bởi các tế bào lai không phải là tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1 được xác nhận từ trước là CD9, CD46, CD55, CD59, CD71, CD73, CD147, CD276, EpCAM, hoặc EGFR. Các tế bào NCI-H322  $2 \times 10^4$  tế bào/mL (Môi trường RPMI1640 có bổ sung 20% Low IgG FBS) được gây giống trong đó ở nồng độ 50  $\mu\text{L/giếng}$ . Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, nuôi cấy các tế bào trong 3 ngày trong tủ ấm  $\text{CO}_2$  ở  $37^\circ\text{C}$ . Sau khi nuôi cấy, loại bỏ dịch nổi, và thêm 10% WST-10%FBS-RPMI1640 ở 100  $\mu\text{L/giếng}$  vào đĩa này. Sau khi ủ trong 1 giờ trong tủ ấm  $\text{CO}_2$   $37^\circ\text{C}$ , xác định số lượng các tế bào sống bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa (từ OD<sub>450</sub> đến OD<sub>640</sub>, infinite 200, Tecan Trading AG). Trong số các dịch nổi nuôi cấy của các tế bào lai đã đánh giá, các kháng thể kháng lại CD59, CD71, EGFR, EpCAM, hoặc TROP2 được xác nhận có hoạt tính nhập nội mạnh và hoạt tính độc tố miễn dịch (FIG. 10).

4-3) Chênh lệch hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch trong số các kháng thể kháng CD59, CD71, EGFR, EpCAM, hoặc TROP2

Thêm lần lượt dung dịch đã pha loãng của DT3C (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4, hoặc 40  $\mu\text{g/mL}$ ) 25  $\mu\text{L/giếng}$  vào đĩa 96-giếng, tiếp đó thêm lần lượt kháng thể (40  $\mu\text{g/mL}$ ) 25  $\mu\text{L/giếng}$  vào đĩa, và ủ đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Ngoài ra,  $2 \times 10^4$  tế bào/mL (Môi trường RPMI1640 có bổ sung 20% Low IgG FBS) các tế bào NCI-H322 được gây giống trong đó 50  $\mu\text{L/giếng}$ . Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, nuôi cấy các tế bào trong 3 ngày trong tủ ấm

CO<sub>2</sub> 37°C. Sau khi nuôi cấy, loại bỏ dịch nổi, và thêm 10% WST-1-10% FBS-RPMI1640 100 µL/giếng vào đĩa. Sau khi ủ trong 1 giờ trong tủ ấm CO<sub>2</sub> 37°C, xác định số lượng các tế bào sống bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa (từ OD<sub>450</sub> đến OD<sub>640</sub>). Trong số các kháng thể đã đánh giá, TINA1, một kháng thể kháng lại TROP2, có hoạt tính nhập nội mạnh nhất và hoạt tính độc tố miễn dịch (FIG. 11).

4-4) Chênh lệch mức hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch trong số các dòng kháng thể kháng-TROP2

Các kháng thể kháng-TROP2 TINA1 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư phổi NCI-H322), KCL7A3 và KCL2D6 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tụy KCL-MOH1), Pr1E11 và Pr8H10 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt Pc-1), và NY16 và NY17 (chất gây miễn dịch: dòng tế bào ung thư tụy PK-1) thu được bằng phương pháp của Ví dụ 1 hoặc phương pháp tương đương, và 77220 có bán trên thị trường (R&D Systems Inc.) được đánh giá về hoạt tính nhập nội và hoạt tính độc tố miễn dịch theo cách tương tự như trong Ví dụ 4-3). Do đó, trong số 8 các kháng thể kháng-TROP2, kháng thể TINA1 có hoạt tính mạnh nhất (FIG. 12).

[Ví dụ 5: Xác định trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi của gen kháng thể TINA1 và sản xuất kháng thể TINA1 khảm (sau đây được gọi là cTINA1)]

5-1) Xác định trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi của gen kháng thể TINA1

5-1-1) Điều chế ARNtt từ tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1

Để khuếch đại các ADN bổ trợ mã hoá các vùng thay đổi của kháng thể TINA1, điều chế ARNtt từ tế bào lai sản xuất-kháng thể TINA1 bằng cách sử dụng bộ kit phân lập ARNtt (Roche Applied Science).

5-1-2) Tổng hợp ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready)

ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp bằng cách sử dụng ARNtt (100 ng) được điều chế trong mục 5-1-1), và Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ (Clontech Laboratories, Inc.).



5-1-3) Khuếch đại ADN bổ trợ mã hoá chuỗi nặng vùng thay đổi của kháng thể TINA1 bằng 5'-RACE PCR, và xác định trình tự

UPM (Universal Primer A Mix: được bao gồm trong Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE) và oligonucleotit có trình tự là 5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCAGG-3' (SEQ ID NO: 33: đoạn môi mG2aVR2) được sử dụng làm các đoạn môi để khuếch đại vùng thay đổi ADN bổ trợ của gen chuỗi nặng bằng PCR. UPM được bao gồm trong Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) được sử dụng, và mG2aVR2 được thiết kế từ trình tự của một vùng ổn định chuỗi nặng của chuột (IgG2a) trong cơ sở dữ liệu.

ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi này và ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp trong Ví dụ 5-1-2) làm khuôn mẫu. Tiến hành PCR theo tài liệu hướng dẫn sử dụng của Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) trên chương trình touchdown PCR bằng cách sử dụng KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.) làm polymeraza.

Tinh chế chuỗi nặng ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR MinElute (QIAGEN N.V.) và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). Trình tự nucleotit của chuỗi nặng ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi đã tách dòng được phân tích bằng cách xác định trình tự. Các đoạn môi xác định trình tự được sử dụng là đoạn môi mG2aVR2 nêu trên được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nặng của chuột trên cơ sở dữ liệu, và NUP (Đoạn môi Nested Universal A: được bao gồm trong Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE).

Tiến hành phân tích trình tự bằng cách sử dụng thiết bị phân tích trình tự gen ("ABI PRISM 3700 ADN Analyzer" hoặc "Applied Biosystems 3730xl Analyzer", Applied Biosystems, Inc.), và phản ứng xác định trình tự sử dụng Gene Amp 9700 (Applied Biosystems, Inc.).

Trình tự nucleotit đã được xác định của ADN bổ trợ mã hoá chuỗi nặng vùng thay đổi của kháng thể TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 của Danh mục trình tự, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

5-1-4) Khuếch đại ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 bằng 5'-RACE PCR, và xác định trình tự

UPM (Universal Primer A Mix: được bao gồm trong Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE) và oligonucleotit có trình tự là 5'-AGTCCAACTGTTTCAGGACGCCATTTTGTCG-3' (SEQ ID NO: 34: đoạn môi mKVR2) được sử dụng làm các đoạn môi để khuếch đại vùng thay đổi ADN bổ trợ của gen chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 bằng PCR. UPM được bao gồm trong Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) được sử dụng, và mKVR2 được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nhẹ của chuột trên cơ sở dữ liệu.

ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi này và ADN bổ trợ (ADN bổ trợ 5'-RACE-Ready) được tổng hợp trong Ví dụ 5-1-2) làm khuôn mẫu. Tiến hành PCR theo tài liệu hướng dẫn sử dụng của Bộ kit khuếch đại ADN bổ trợ SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.) trên chương trình touchdown PCR bằng cách sử dụng KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.) làm polymeraza.

Tinh chế ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế PCR MinElute (QIAGEN N.V.) và tiếp đó tách dòng bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen Corp.). Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ đã tách dòng được phân tích bằng cách xác định trình tự.

Các đoạn môi xác định trình tự được sử dụng là đoạn môi mKVR2 nêu trên được thiết kế từ trình tự của vùng ổn định chuỗi nhẹ của chuột trên cơ sở dữ liệu, và NUP.

Phân tích trình tự và phản ứng xác định trình tự sử dụng thiết bị nêu trên.

Trình tự nucleotit đã được xác định của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 của Danh mục trình tự, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

## 5-2) Sản xuất kháng thể cTINA1

5-2-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK

Mảnh khoảng 5,4 kb thu được bằng phân cắt plasmit pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) bằng các enzym giới hạn XbaI và PmeI, và mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi  $\kappa$  của người và vùng ổn định chuỗi  $\kappa$  của người được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) để sản xuất pcDNA3.3/LK.

pcDNA3.3/LK được sử dụng làm khuôn mẫu trong PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây. Mảnh thu được khoảng 3,8 kb được phosphoryl hoá và tiếp đó tự nối để tạo cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, và gen vùng ổn định chuỗi  $\kappa$  của người xuôi dòng phía sau đoạn khởi đầu CMV.

Bộ đoạn mồi

5'-tataccgtcgacctctagctagagcttggc-3' (SEQ ID NO: 35: đoạn mồi 3.3-F1)

5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3' (SEQ ID NO: 36: đoạn mồi 3.3-R1)

5-2-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1

Mảnh ADN của pCMA-LK không có trình tự ADN mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi  $\kappa$  của người và vùng ổn định chuỗi  $\kappa$  của người bằng cách phân cắt bằng XbaI và PmeI, và mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá axit amin của chuỗi nặng trình tự tín hiệu của người và vùng ổn định IgG1 của người để thể hiện trong SEQ ID NO: 6 được nối với nhau bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật

truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, và gen vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người xuôi dòng phía sau đoạn khởi đầu CMV.

#### 5-2-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể cTINA1

Mảnh ADN có chứa ADN bổ trợ mã hoá chuỗi nặng vùng thay đổi của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng cách sử dụng chuỗi nặng ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi thu được trong Ví dụ 5-1-3) làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BspI của vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể cTINA1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/cTINA1". Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể cTINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 8. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 7 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 cũng được mô tả trong FIG. 1.

Bộ đoạn mồi cho chuỗi nặng kháng thể cTINA1

5'-

CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAG-  
3' (SEQ ID NO: 37: đoạn mồi TINA1H-F)

5'-

CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACGGTGACCGCGGTCCCTGCGCCCCAGAC  
-3' (SEQ ID NO: 38: đoạn mồi TINA1H-R)

#### 5-2-4) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

Mảnh ADN có chứa ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN bổ trợ mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ thu được trong Ví dụ 5-1-4) làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BspWI của vật truyền mục đích-chung

biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/cTINA1". Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin được mã hoá từ đó được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 cũng được mô tả trong FIG. 2.

Bộ đoạn mã cho chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

5'-

ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC-  
3' (SEQ ID NO: 39: đoạn mã TINA1L-F)

5'-GGAGGGGGCGGCCACAGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCCAGC-3'  
(SEQ ID NO: 40: đoạn mã TINA1L-R)

5-2-5) Sản xuất quy mô nhỏ kháng thể cTINA1

Các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) được nuôi cấy cấp hai và nuôi cấy theo tài liệu hướng dẫn sử dụng.

$1 \times 10^7$  các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) ở pha tăng trưởng logarit được pha loãng với môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) đến 9,6 mL, tiếp đó gây giống trong chai Square Storage 30 mL (Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Inc.), và tiếp đó lắc-nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 1 giờ trong tủ ấm 8% CO<sub>2</sub> 37°C. Polyetylenimin (Polyscience #24765; 30 µg) được hoà tan trong Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µL). Tiếp đó, vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ (6 µg) và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng (4 µg) được điều chế bằng cách sử dụng Bộ kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) được thêm vào Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 200 µL). Thể dung dịch hỗn hợp vật truyền biểu hiện/Opti-Pro SFM (200 µL) được thêm vào dung dịch hỗn hợp Polyetylenimin/Opti-Pro SFM (200 µL), và hỗn hợp được khuấy nhẹ, để tiếp trong 5 phút, và tiếp đó được thêm vào các tế bào FreeStyle 293F. Dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy lắc ở 90 vòng/phút trong 7 ngày trong tủ ấm

8% CO<sub>2</sub> 37°C được lọc qua lọc Minisart-Plus (Sartorius AG) và sử dụng làm mẫu để đánh giá.

Kháng thể khảm TINA1 của người thu được bằng cách kết hợp pCMA-G1/cTINA1 và pCMA-LK/cTINA1 được chỉ định là "kháng thể cTINA1".

[Ví dụ 6: Thiết kế kháng thể được làm tương thích với người kháng thể đơn dòng kháng-TROP2 của chuột]

6-1) Thiết kế phiên bản được làm tương thích với người của TINA1

6-1-1) Xây dựng mô hình phân tử của vùng thay đổi của TINA1

Tiến hành xây dựng mô hình phân tử của các vùng thay đổi của TINA1 bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như xây dựng mô hình tính tương đồng (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)). Các vùng thay đổi của TINA1 được xác định ở trên được so sánh với các trình tự cấp một (các cấu trúc ba chiều thu được từ các cấu trúc tinh thể tia-X là sẵn có) của các vùng thay đổi globulin miễn dịch của người được đăng ký với Ngân hàng Dữ liệu Protein (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)). Do đó, 1ZEA được lựa chọn là một trình tự có mức tương đồng trình tự cao nhất với chuỗi nặng vùng thay đổi của TINA1 trong số các kháng thể tương tự có khuyết đoạn trong các khung của chúng. 3IU4 cũng được lựa chọn là một trình tự có mức tương đồng trình tự cao nhất với vùng thay đổi chuỗi nhẹ của TINA1. Các cấu trúc ba chiều của các vùng khung được điều chế như "mô hình khung" bằng cách kết hợp các hệ tọa độ của 1ZEA và 3IU4 tương ứng với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của TINA1. Do đó, cấu dạng điển hình của từng CDR được hợp nhất vào mô hình khung.

Cuối cùng, tính toán năng lượng để loại trừ tiếp xúc bất lợi giữa các nguyên tử để thu được các mô hình phân tử có thể có của các vùng thay đổi TINA1 về mặt năng lượng. Tiến hành các quy trình này bằng cách sử dụng chương trình dự đoán cấu trúc ba chiều của protein có bán trên thị trường Discovery Studio (Accelrys, Inc.).

6-1-2) Thiết kế trình tự axit amin cho TINA1 được làm tương thích với người

Xây dựng cấu trúc TINA1 được làm tương thích với người kháng thể bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như ghép nối CDR (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể nhận được lựa chọn trên cơ sở tính tương đồng của các axit amin trong các vùng khung. Các trình tự của các vùng khung của TINA1 được so sánh với các trình tự của tất cả các khung của người được đăng ký trong cơ sở dữ liệu Kabat (Nuc. Acid Res., 29, 205-206 (2001)) của các trình tự axit amin kháng thể. Do đó, kháng thể HuPR1A3 được lựa chọn làm chất tiếp nhận do mức tương đồng trình tự 74% của nó đối với các vùng khung. Gốc axit amin của các vùng khung trong HuPR1A3 được sắp thẳng hàng với gốc axit amin của các vùng khung của TINA1 để nhận dạng các vị trí của axit amin không tương ứng giữa chúng. Vị trí của các gốc này được phân tích bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của TINA1 được xây dựng cấu trúc ở trên. Tiếp đó, các gốc của chất cho được ghép nối vào chất nhận được lựa chọn theo tiêu chí do Queen và các đồng tác giả quy định (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Một vài gốc cho được chọn này được chuyển sang kháng thể nhận để xây dựng cấu trúc trình tự TINA1 được làm tương thích với người như được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

#### 6-2) Làm tương thích với người TINA1 chuỗi nặng

##### 6-2-1) Chuỗi nặng loại-hTINA1-H1:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 21 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin) bằng valin, axit amin vị trí 35 (axit glutamic) bằng alanin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoleuxin) bằng valin, axit amin vị trí 57 (glutamin) bằng arginin, axit amin vị trí 58 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 59 (methionin) bằng alanin, axit amin vị trí 62 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 65 (lysin) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoleuxin) bằng methionin, axit amin vị trí 87 (phenylalanin) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 89 (phenylalanin) bằng isoleuxin, axit amin vị trí 91 (loxin) bằng alanin, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 102 (isoleuxin) bằng loxin, axit amin vị trí 104 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 107

(asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 112 (threonin) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanin) with tyrosin, axit amin vị trí 132 (alanin) bằng glutamin, và axit amin vị trí 135 (alanin) bằng loxin đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H1".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H1 được mô tả trong SEQ ID NO: 12 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 được mô tả trong SEQ ID NO: 11 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 cũng được mô tả trong FIG. 3.

#### 6-2-2) Chuỗi nặng loại-hTINA1-H2:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 21 (isoloxin) bằng valin, axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin) bằng valin, axit amin vị trí 35 (axit glutamic) bằng alanin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoloxin) bằng valin, axit amin vị trí 57 (glutamin) bằng arginin, axit amin vị trí 58 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 59 (methionin) bằng alanin, axit amin vị trí 62 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 65 (lysin) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoloxin) bằng methionin, axit amin vị trí 87 (phenylalanin) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 89 (phenylalanin) bằng isoloxin, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 102 (isoloxin) bằng loxin, axit amin vị trí 104



(asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 107 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 112 (threonin) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanin) bằng tyrosin, axit amin vị trí 132 (alanin) bằng glutamin, và axit amin vị trí 135 (alanin) bằng loxin đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H2".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H2 được mô tả trong SEQ ID NO: 14 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 được mô tả trong SEQ ID NO: 13 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 cũng được mô tả trong FIG. 4.

#### 6-2-3) chuỗi nặng loại-hTINA1-H3:

Chuỗi nặng TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (prolin) bằng alanin, axit amin vị trí 30 (loxin) bằng valin, axit amin vị trí 36 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 38 (arginin) bằng lysin, axit amin vị trí 39 (isoloxin) bằng valin, axit amin vị trí 58 (lysin) bằng glutamin, axit amin vị trí 65 (lysin) bằng axit glutamic, axit amin vị trí 67 (isoloxin) bằng methionin, axit amin vị trí 87 (phenylalanin) bằng valin, axit amin vị trí 88 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 92 (axit glutamic) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 95 (alanin) bằng threonin, axit amin vị trí 102 (isoloxin) bằng loxin, axit amin vị trí 104 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 107 (asparagin) bằng serin, axit amin vị trí 111 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 112 (threonin) bằng valin, axit amin vị trí 114 (phenylalanin) bằng tyrosin,

axit amin vị trí 132 (alanin) bằng glutamin, và axit amin vị trí 135 (alanin) bằng loxin đối với chuỗi nặng TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nặng loại-hTINA1-H3".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng loại-hTINA1-H3 được mô tả trong SEQ ID NO: 16 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 19, trình tự gồm có gốc axit amin từ 20 đến 140, và trình tự gồm có gốc axit amin 141 đến 470 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nặng, và vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 được mô tả trong SEQ ID NO: 15 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 57, trình tự gồm có các nucleotit từ 58 đến 420, và trình tự gồm có các nucleotit từ 421 đến 1410 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng ổn định chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 cũng được mô tả trong FIG. 5.

6-3) Làm tương thích với người chuỗi nhẹ TINA1

6-3-1) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 23 (valin) bằng glutamin, axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysin) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanin) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionin) bằng loxin, axit amin vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng alanin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng loxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng loxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (loxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (loxin) bằng isoloxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi nhẹ TINA1 được thể hiện trong

SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L1 được mô tả trong SEQ ID NO: 18 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20, trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 được mô tả trong SEQ ID NO: 17 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 17 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 17 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 cũng được mô tả trong FIG. 6.

#### 6-3-2) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysin) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanin) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionin) bằng loxin, axit amin vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng alanin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng loxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng loxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (loxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (loxin) bằng isoloxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi nhẹ TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L2 được mô tả trong SEQ ID NO: 20 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20,

trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 được mô tả trong SEQ ID NO: 19 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 19 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 19 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 cũng được mô tả trong FIG. 7.

#### 6-3-3) Chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3:

Chuỗi nhẹ TINA1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin vị trí 28 (histidin) bằng prolin, axit amin vị trí 29 (lysin) bằng serin, axit amin vị trí 30 (phenylalanin) bằng serin, axit amin vị trí 31 (methionin) bằng loxin, axit amin vị trí 33 (threonin) bằng alanin, axit amin vị trí 40 (serin) bằng threonin, axit amin vị trí 62 (glutamin) bằng lysin, axit amin vị trí 63 (serin) bằng glutamin, axit amin vị trí 80 (axit aspartic) bằng serin, axit amin vị trí 83 (threonin) bằng serin, axit amin vị trí 90 (alanin) bằng axit aspartic, axit amin vị trí 93 (phenylalanin) bằng loxin, axit amin vị trí 98 (valin) bằng loxin, axit amin vị trí 100 (alanin) bằng prolin, axit amin vị trí 103 (loxin) bằng phenylalanin, axit amin vị trí 120 (alanin) bằng glutamin, axit amin vị trí 126 (loxin) bằng isoloxin, và axit amin vị trí 129 (alanin) bằng threonin đối với chuỗi nhẹ TINA1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 của Danh mục trình tự được chỉ định là "chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ loại-hTINA1-L3 được mô tả trong SEQ ID NO: 22 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có gốc axit amin từ 1 đến 20, trình tự gồm có gốc axit amin từ 21 đến 129, và trình tự gồm có gốc axit amin từ 130 đến 234 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hoá trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 được mô tả trong SEQ

ID NO: 21 của Danh mục trình tự. Trình tự gồm có các nucleotit từ 1 đến 60, trình tự gồm có các nucleotit từ 61 đến 387, và trình tự gồm có các nucleotit từ 388 đến 702 trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 21 tương ứng mã hoá trình tự tín hiệu, trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng ổn định chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 21 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 cũng được mô tả trong FIG. 8.

[Ví dụ 7: Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện và sản xuất kháng thể kháng thể hTINA1]

7-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng hTINA1

7-1-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-H1

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H1 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 11 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt). Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của hTINA1-H1 được khuếch đại bằng cách sử dụng mảnh AND đã tổng hợp làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn môi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BspI của vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể loại-IgG1 khảm và được làm tương thích với người pCMA-G1 bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-H1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hTINA1-H1".

Bộ đoạn môi

5'-agctcccagatgggtgctgagc-3' (SEQ ID NO: 41: đoạn môi EG-Inf-F)

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (SEQ ID NO: 42: đoạn môi EG1-Inf-R)

7-1-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-H2

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H2 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 13 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-H2 được

xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hTINA1-H2".

#### 7-1-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-H3 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của hTINA1-H3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 15 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-H3 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hTINA1-H3".

#### 7-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ hTINA1

##### 7-2-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L1

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-L1 được thể hiện trong các nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L1 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 17 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt). Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá vùng thay đổi của hTINA1-L1 được khuếch đại bằng cách sử dụng mảnh AND đã tổng hợp làm khuôn mẫu, KOD-Plus- (Toyobo Co., Ltd.), và bộ đoạn mồi được mô tả dưới đây, và được cài xen vào vị trí được phân cắt bằng-enzym giới hạn BsiWI của vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể khảm và được làm tương thích với người pCMA-LK bằng cách sử dụng bộ kit tách dòng PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) để xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L1. Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L1".

Bộ đoạn mồi

5'-ctgtggatctccggcgcggtacggc-3' (SEQ ID NO: 43: đoạn mồi CM-LKF)

5'-ggagggggcgccaccgtacg-3' (SEQ ID NO: 44: đoạn mồi KCL-Inf-R)

##### 7-2-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L2

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi hTINA1-L2 được thể hiện trong các nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L2 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 19 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch

vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-L2 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L2".

#### 7-2-3) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện hTINA1-L3

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi-hTINA1-L3 được thể hiện trong các nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của hTINA1-L3 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 21 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện hTINA1-L3 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-LK/hTINA1-L3".

#### 7-3) Sản xuất và tinh chế kháng thể hTINA1

##### 7-3-1) Sản xuất quy mô nhỏ kháng thể hTINA1

Kháng thể được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ 5-2-5).

Kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H1 và pCMA-LK/hTINA1-L1 được chỉ định là "hTINA1-H1L1"; kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H2 và pCMA-LK/hTINA1-L1 được chỉ định là "hTINA1-H2L1"; kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H2 và pCMA-LK/hTINA1-L2 được chỉ định là "hTINA1-H2L2"; và kháng thể hTINA1 thu được bằng kết hợp pCMA-G1/hTINA1-H3 và pCMA-LK/hTINA1-L3 được chỉ định là "hTINA1-H3L3".

##### 7-3-2) Sản xuất kháng thể hTINA1

hTINA1-H1L1, hTINA1-H2L1, hTINA1-H2L2, và hTINA1-H3L3 được sản xuất bằng phương pháp dưới đây.

Các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) được nuôi cấy cấp hai và được nuôi cấy theo tài liệu hướng dẫn sử dụng.  $1,2 \times 10^9$  các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) ở pha tăng trưởng logarit được gây giống trong bình nón Fernbach Erlenmeyer 3 L (Corning Inc.), tiếp đó được pha loãng với môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) đến  $1,0 \times 10^6$  tế bào/ml, và tiếp đó lắc-nuôi cấy ở 90 vòng/phút trong 1 giờ trong tủ ấm 8% CO<sub>2</sub> 37°C. Polyetylenimin (Polyscience #24765; 3,6 mg) được hoà tan trong Opti-Pro SFM

(Invitrogen Corp.; 20 ml). Tiếp đó, vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ (0,8 mg) và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng (0,4 mg) được điều chế bằng cách sử dụng bộ kit plasmit PureLink HiPure (Invitrogen Corp.) được thêm vào Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.; 20 ml). Dung dịch hỗn hợp vật truyền biểu hiện/Opti-Pro SFM (20 ml) được thêm vào dung dịch hỗn hợp Polyetylenimin/Opti-Pro SFM (20 ml), và hỗn hợp được khuấy nhẹ, để tiếp trong 5 phút, và tiếp đó được thêm vào các tế bào FreeStyle 293F. Dịch nổi nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy lắc ở 90 vòng/phút trong 7 ngày trong tủ ẩm 8% CO<sub>2</sub> 37°C được lọc qua lọc Disposable Capsule (ADVANTEC #CCS-045-E1H).

#### 7-3-3) Tinh chế kháng thể hTINA1

Kháng thể được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được trong mục 7-3-2) ở trên bằng hai bước bằng cách sử dụng sắc ký ái lực rProtein A (từ 4 đến 6°C) và hydroxyapatit gồm (nhiệt độ trong phòng). Tiến hành các bước thay thế dịch đệm sau khi tinh chế bằng sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh chế bằng hydroxyapatit gồm ở từ 4 đến 6°C. Trước hết, dịch nổi nuôi cấy được áp dụng vào MabSelect SuRe (do GE Healthcare Japan Corporation sản xuất, cột HiTrap) được làm cân bằng bằng PBS. Sau khi nhập toàn bộ dịch nổi nuôi cấy vào cột, cột được rửa bằng PBS với lượng ít nhất hai lần thể tích cột. Tiếp theo, các phân đoạn có chứa-kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải bằng dung dịch 2 M arginin hydroclorua (pH 4,0). Các phân đoạn được thay thế-dịch đệm bằng PBS bằng cách thẩm tách (Thermo Fisher Scientific, Inc., hộp thẩm tách Slide-A-Lyzer) và tiếp đó được pha loãng 5-lần bằng dịch đệm chứa 5 mM natri phosphat và 50 mM MES (pH 7.0). Dung dịch kháng thể thu được được áp dụng vào cột gồm hydroxyapatit (Bio-Rad Laboratories, Inc., cột hydroxyapatit Bio-Scale CHT Type-I) được cân bằng bằng dịch đệm có chứa 5 mM NaPi, 50 mM MES, và 30 mM NaCl (độ pH 7,0). Các phân đoạn có chứa-kháng thể được thu gom bằng cách rửa giải gradien nồng độ tuyến tính bằng cách sử dụng natri clorua. Các phân đoạn được thay thế-dịch đệm bằng HBSor (25 mM histidin/5% sorbitol, pH 6,0) bằng cách thẩm tách (Thermo Fisher Scientific, Inc., hộp thẩm tách Slide-A-Lyzer). Cuối cùng, cô các phân đoạn và điều chỉnh đến nồng độ IgG 20



mg/ml hoặc cao hơn bằng cách sử dụng dụng cụ lọc UF ly tâm VIVASPIN 20 (ngưỡng phân tử lượng: UF10K, Sartorius AG, 4°C), và được sử dụng như mẫu đã tinh chế.

[Ví dụ tham khảo 1: Sản xuất vật truyền biểu hiện kháng thể hRS7 và sản xuất kháng thể hRS7]

Kháng thể hRS7 được sản xuất dựa trên các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2003/074566.

#### 1-1) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể hRS7

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nặng kháng thể hRS7 được thể hiện trong các nucleotit từ 36 đến 437 của trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể hRS7 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 29 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện chuỗi nặng kháng thể hRS7 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-1-1). Vật truyền biểu hiện thu được được chỉ định là "pCMA-G1/hRS7". Trình tự axit amin của kháng thể chuỗi nặng hRS7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 30 của Danh mục trình tự.

#### 1-2) Xây dựng cấu trúc vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể hRS7

Mảnh ADN có chứa trình tự ADN mã hoá-vùng thay đổi chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được thể hiện trong các nucleotit từ 38 đến 402 của trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được biểu thị bằng SEQ ID NO: 31 của Danh mục trình tự được tổng hợp (dịch vụ tổng hợp gen nhân tạo GeneArt), và vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể hRS7 được xây dựng cấu trúc theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-2-1). Vật truyền biểu hiện được chỉ định là "pCMA-LK/hRS7". Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể hRS7 được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 của Danh mục trình tự.

#### 1-3) Sản xuất và tinh chế kháng thể hRS7

##### 1-3-1) Sản xuất kháng thể hRS7

Kháng thể hRS7 được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-3-2) bằng cách kết hợp pCMA-G1/hRS7 và pCMA-LK/hRS7.

### 1-3-2) Tinh chế kháng thể hRS7

Kháng thể này được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được trong mục 1-3-1) theo cách tương tự như trong Ví dụ 7-3-3).

[Ví dụ 8: Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên của kháng thể hTINA1 và kháng thể hRS7]

8-1) Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể (dịch nổi nuôi cấy) được sản xuất ở quy mô nhỏ

Kháng thể được thử nghiệm về hằng số phân ly của nó đối với kháng nguyên (thể khảm Fc TROP-2 của người tái tổ hợp) bằng cách sử dụng Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) theo phương pháp bắt giữ kháng thể này như một phối tử vào kháng thể kháng-IgG (Fab) của người được cố định và thử nghiệm kháng nguyên này như một chất phân tích. Khoảng 2000 RU kháng thể kháng-IgG (Fab) của người (bộ kit bắt giữ Fab của người, GE Healthcare Japan Corporation) được liên kết cộng hoá trị với chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) bằng phương pháp ngẫu hợp amin. Theo cách tương tự, kháng thể này được cố định vào tế bào dòng chảy tham chiếu. Dịch đệm chạy được sử dụng là HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Dịch nổi nuôi cấy có chứa kháng thể được thêm trong 80 giây vào chip được cố định-kháng thể kháng-IgG (Fab) của người, và tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc (từ 1 đến 1000 nM) kháng nguyên lần lượt được thêm vào đó ở tốc độ dòng chảy 30  $\mu$ L/phút trong 300 giây. Do đó, theo dõi pha phân ly trong 600 giây. 10 mM Gly-HCl (pH 1,5) có chứa 20% DMSO được thêm vào đó như dung dịch tái tạo ở tốc độ dòng chảy 10  $\mu$ L/phút trong 60 giây. Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng mô hình gắn kết hai hoá trị của phần mềm phân tích (phần mềm đánh giá BIAevaluation, phiên bản 4.1) để tính toán hằng số tốc độ kết hợp  $k_{on}$ , hằng số tốc độ phân ly  $k_{off}$ , và hằng số phân ly ( $KD$ ;  $KD = k_{off}/k_{on}$ ).

[Bảng 1]

|   | Tên         | KD<br>(M) |
|---|-------------|-----------|
| 1 | hTINA1-H1L1 | 6,3E-08   |
| 2 | hTINA1-H2L1 | 6,9E-08   |

|   |             |         |
|---|-------------|---------|
| 3 | hTINA1-H2L2 | 7,1E-08 |
| 4 | hTINA1-H3L3 | 5,8E-08 |
| 5 | cTINA1      | 5,6E-08 |

Hoạt tính gắn kết sử dụng dịch nổi nuôi cấy làm mẫu thử kháng thể

8-2) Xác định ái lực gắn kết-kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể đã tinh chế

Kháng thể lần lượt được thử nghiệm về hằng số phân ly của nó đối với kháng nguyên (thể khảm Fc TROP-2 của người tái tổ hợp) bằng cách sử dụng Biacore 3000 (GE Healthcare Japan Corporation) theo phương pháp bắt giữ kháng thể này dưới dạng phối tử vào kháng thể kháng-IgG (Fab) của người được cố định và thử nghiệm kháng nguyên này dưới dạng chất phân tích. Khoảng 2000 RU kháng thể kháng-IgG (Fab) của người (bộ kit bắt giữ Fab của người, GE Healthcare Japan Corporation) được liên kết cộng hoá trị với chip cảm biến CM5 (BIAcore, Inc.) bằng phương pháp ngẫu hợp amin. Theo cách tương tự, kháng thể này được cố định vào tế bào dòng chảy tham chiếu. Dịch đệm chạy được sử dụng là HBS-EP+ (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20). Kháng thể được thêm trong 1 phút vào chip được cố định-kháng thể kháng-IgG (Fab) của người, và tiếp đó, các dịch pha loãng theo bậc (từ 1 đến 1000 nM) kháng nguyên lần lượt được thêm vào đó ở tốc độ dòng chảy 30  $\mu$ L/phút trong 300 giây. Do đó, theo dõi pha phân ly trong 600 giây. 25 mM NaOH được pha loãng với dịch đệm chạy được thêm vào 2 lần như dung dịch tái tạo ở tốc độ dòng chảy 100  $\mu$ L/phút trong 3 giây. Phân tích dữ liệu theo cách tương tự như trên.

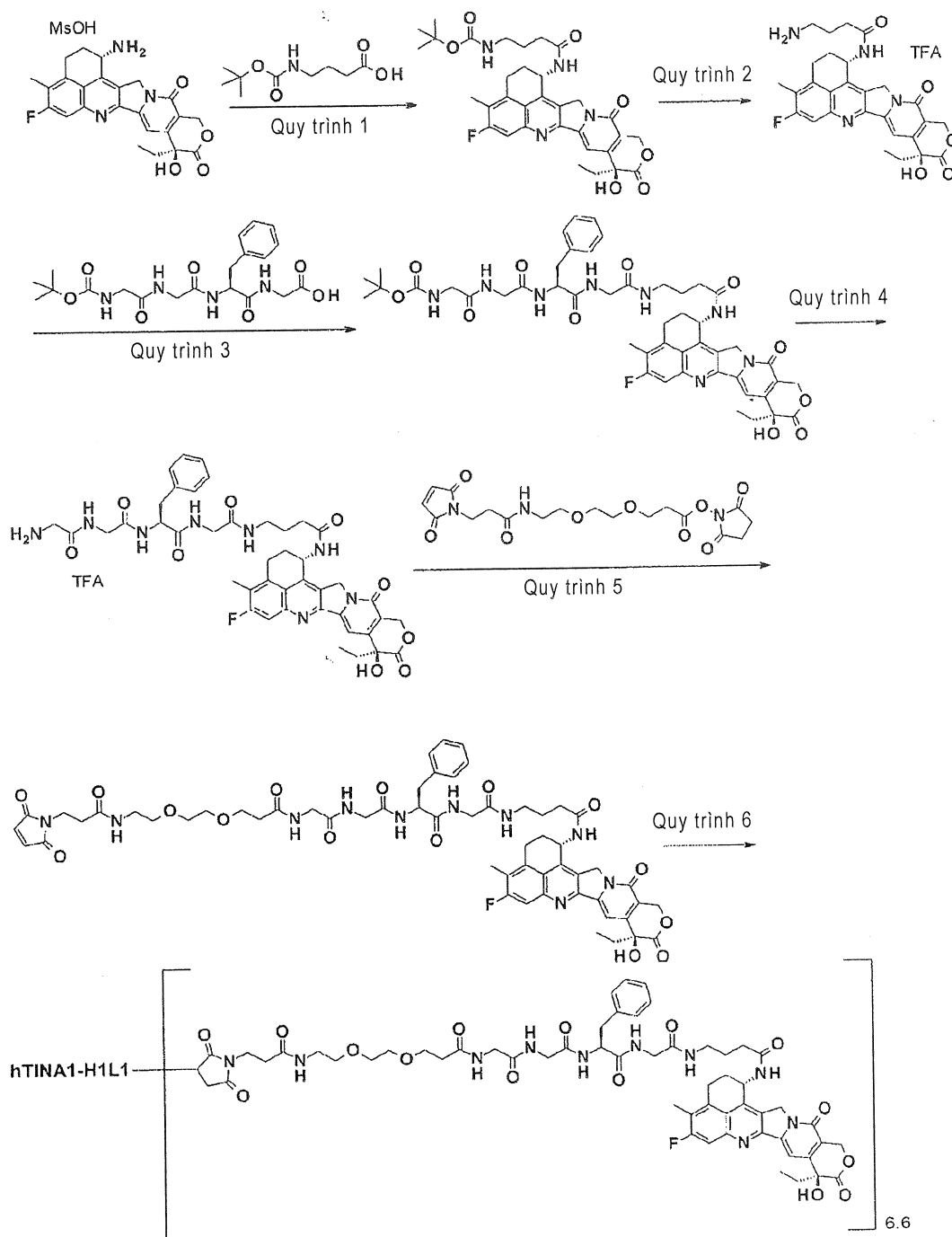
[Bảng 2]

|   | Tên         | KD (M)  |
|---|-------------|---------|
| 1 | hTINA1-H1L1 | 2,7E-08 |
| 2 | hTINA1-H2L1 | 3,0E-08 |
| 3 | hTINA1-H2L2 | 2,7E-08 |
| 4 | hTINA1-H3L3 | 1,5E-08 |
| 5 | hRS7        | 3,0E-10 |

Xác định Hoạt tính gắn kết bằng cách sử dụng kháng thể đã tinh chế làm mẫu thử kháng thể

[Ví dụ 9: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (1)]

[Công thức 25]



Quy trình 1: tert-Butyl (4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)carbamate

Axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic (0,237 g, 1,13 mmol) được hoà tan trong diclometan (10 mL), N-hydroxysuccinimide (0,130 g, 1,13 mmol) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0,216 g, 1,13 mmol) được thêm vào, và khuấy trong 1 giờ. Nhỏ giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-dimethylformamide (10 mL) đã có sẵn exatecan mesylate (0,500 g, 0,94 mmol) và triethylamine (0,157 mL, 1,13 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - chloroform: metanol = 8: 2 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,595 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,31 (9H, s), 1,58 (1H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,66 (2H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,89-1,82 (2H, m), 2,12-2,21 (3H, m), 2,39 (3H, s), 2,92 (2H, t,  $J=6,5$  Hz), 3,17 (2H, s), 5,16 (1H, d,  $J=19,2$  Hz), 5,24 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,59-5,55 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,78 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,30 (1H, s), 7,79 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 8,40 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 621 ( $M+H$ ) $^+$ .

Quy trình 2: 4-amino-N-[(1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]butanamide trifluoroacetate

Hợp chất (0,388 g, 0,61 mmol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên được hoà tan trong diclometan (9 mL). Axit trifluoroacetic (9 mL) được thêm vào và khuấy trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [chloroform - lớp hữu cơ được phân bố chloroform: metanol: nước = 7: 3: 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,343 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,2$  Hz), 1,79-1,92 (4H, m), 2,10-2,17 (2H, m), 2,27 (2H, t,  $J=7,0$  Hz), 2,40 (3H, s), 2,80-2,86 (2H, m), 3,15-3,20 (2H, m), 5,15 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,26 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s),

5,54-5,61 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,32 (1H, s), 7,72 (3H, brs), 7,82 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 8,54 (1H, d,  $J=8,6$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 521 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Quy trình 3: N-(tert-butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit

N-(tert-butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanylglyxin (0,081 g, 0,19 mmol) được hoà tan trong diclometan (3 mL), N-hydroxysuxinimit (0,021 g, 0,19 mol) và 1-ethyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit hydroclorua (0,036 g, 0,19 mmol) được thêm vào và tiếp đó khuấy trong 3,5 giờ. Nhỏ giọt dung dịch phản ứng vào dung dịch N,N-dimetylformamit (1,5 mL) đã có sẵn hợp chất (0,080 g, 0,15 mmol) thu được trong Quy trình 2 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom: metanol = 8: 2 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (0,106 g, 73%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,36 (9H, s), 1,71 (2H, m), 1,86 (2H, t,  $J=7,8$  Hz), 2,15-2,19 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,77 (1H, dd,  $J=12,7, 8,8$  Hz), 3,02 (1H, dd,  $J=14,1, 4,7$  Hz), 3,08-3,11 (2H, m), 3,16-3,19 (2H, m), 3,54 (2H, d,  $J=5,9$  Hz), 3,57-3,77 (4H, m), 4,46-4,48 (1H, m), 5,16 (1H, d,  $J=19,2$  Hz), 5,25 (1H, d,  $J=18,8$  Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 6,53 (1H, s), 7,00 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,17-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,71 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 7,80 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 7,92 (1H, t,  $J=5,7$  Hz), 8,15 (1H, d,  $J=8,2$  Hz), 8,27 (1H, t,  $J=5,5$  Hz), 8,46 (1H, d,  $J=8,2$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 939 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Quy trình 4: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit trifloaxetat

Hợp chất (1,97 g, 2,10 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên được hoà tan trong diclometan (7 mL). Sau khi thêm vào axit trifloaxetic (7 mL), khuấy trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, và đã có sẵn toluen để chưng cất đồng sôi. Tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - lớp hữu cơ được phân bố clorofom: metanol: nước = 7: 3: 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này (1,97 g, 99%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,87 (3H, t, J=7,4 Hz), 1,71-1,73 (2H, m), 1,82-1,90 (2H, m), 2,12-2,20 (4H, m), 2,40 (3H, s), 2,75 (1H, dd, J=13,7, 9,4 Hz), 3,03-3,09 (3H, m), 3,18-3,19 (2H, m), 3,58-3,60 (2H, m), 3,64 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,69 (1H, d, J=5,9 Hz), 3,72 (1H, d, J=5,5 Hz), 3,87 (1H, dd, J=16,8, 5,9 Hz), 4,50-4,56 (1H, m), 5,16 (1H, d, J=19,2 Hz), 5,25 (1H, d, J=18,8 Hz), 5,42 (2H, s), 5,55-5,60 (1H, m), 7,17-7,27 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,78-7,81 (2H, m), 7,95-7,97 (3H, m), 8,33-8,35 (2H, m), 8,48-8,51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 (M+H)<sup>+</sup>.

Quy trình 5: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl]amino}etoxy)etoxy]propanoyl}glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-(4-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-4-oxobutyl)glyxinamit

Thêm diisopropyletylamin (20,8 µL, 0,119 mmol) và N-suxinimidyl 3-(2-(2-(3-maleinimitpropanamit)etoxy)etoxy)propanoat (50,7 mg, 0,119 mmol) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (1,20 mL) chứa hợp chất (100 mg, 0,119 mmol) thu được trong Quy trình 4 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom: metanol = 5: 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (66,5 mg, 48%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,85 (3H, t, J = 7,4 Hz), 1,65-1,74 (2H, m), 1,77-1,90 (2H, m), 2,07-2,19 (4H, m), 2,30 (2H, t, J = 7,2 Hz), 2,33-2,36 (2H, m), 2,38 (3H, s), 2,76 (1H, dd, J = 13,7, 9,8 Hz), 2,96-3,18 (9H, m), 3,42-3,44 (4H, m), 3,53-3,76 (10H, m), 4,43 (1H, td, J = 8,6, 4,7 Hz), 5,14 (1H, d, J = 18,8

Hz), 5,23 (1H, d,  $J = 18,8$  Hz), 5,38 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,42 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,52-5,58 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,98 (2H, s), 7,12-7,17 (1H, m), 7,18-7,25 (4H, m), 7,29 (1H, s), 7,69 (1H, t,  $J = 5,5$  Hz), 7,78 (1H, d,  $J = 11,3$  Hz), 7,98-8,03 (2H, m), 8,11 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 8,16 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,23 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz), 8,44 (1H, d,  $J = 9,0$  Hz),

MS (APCI)  $m/z$ : 1149 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

#### Quy trình 6: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (1)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,4 \pm 0,1$ , liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể được khử hoá bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ trong phòng, thêm dimethyl sulfoxit (0,567 mL) vào. Do đó, dung dịch dimethyl sulfoxit có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 ở trên (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng (MTR-103, do AS ONE Corporation sản xuất) để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 35,0 mL dung dịch có chứa thẻ liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

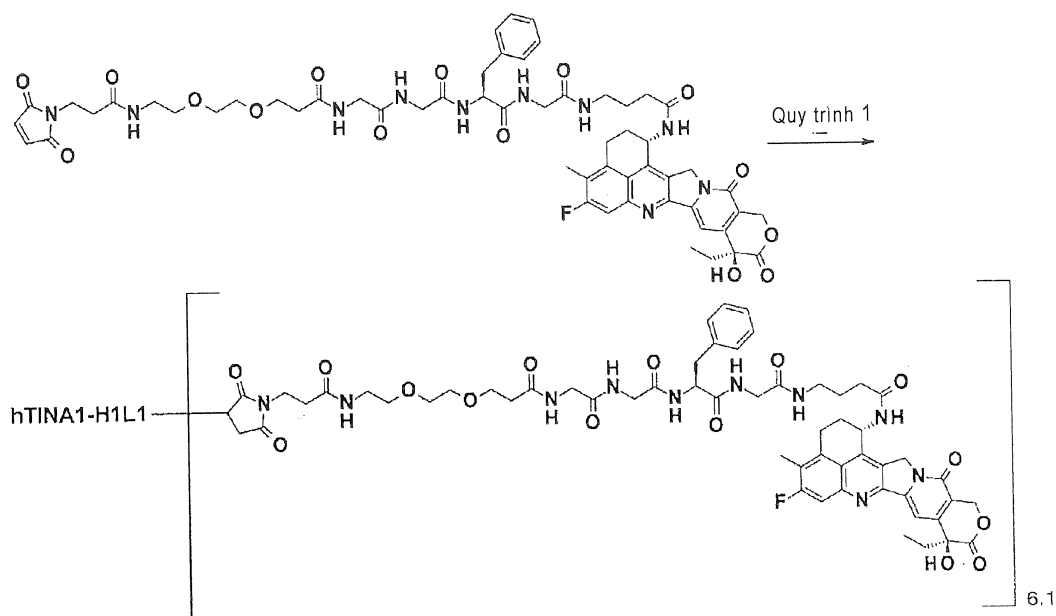


Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 (sử dụng  $\epsilon_{D,280} = 4964$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (giá trị trung bình đo được)), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,70 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 94,5 mg (95%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,6.

[Ví dụ 10: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (2)]

[Công thức 26]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (2)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,00 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque,

Inc.; 0,100 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,4 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở  $15^{\circ}\text{C}$ , dung dịch dimethyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được thêm vào và ủ để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở  $15^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

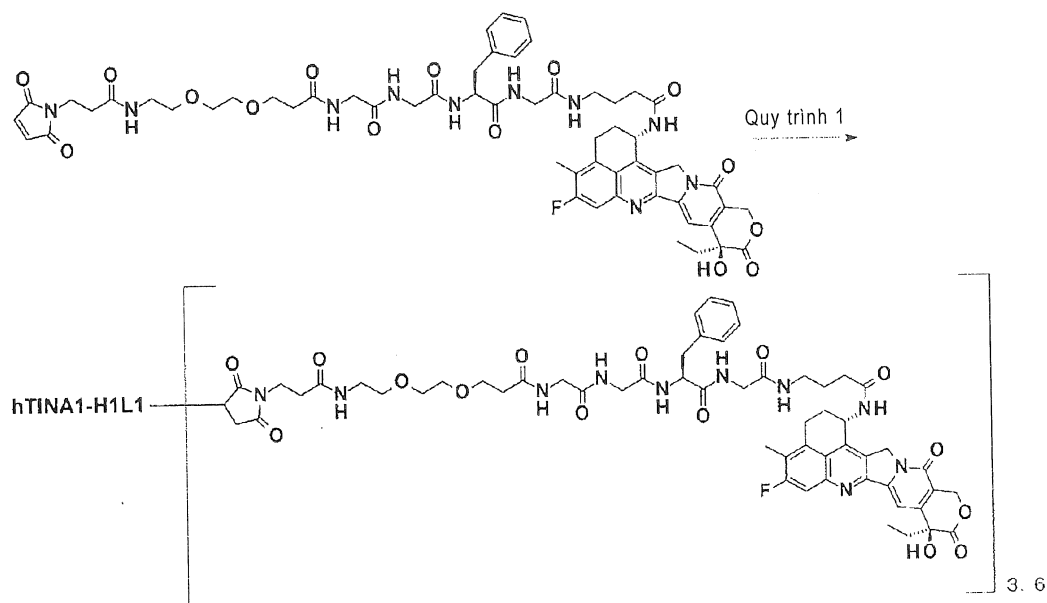
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (giá trị trung bình đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,08 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,7 mg (94%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6.1.

[Ví dụ 11: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (3)]

[Công thức 27]



### Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (3)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (5,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0745 mL; 2,3 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimetyl sulfoxit (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp đó, dung dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM

NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

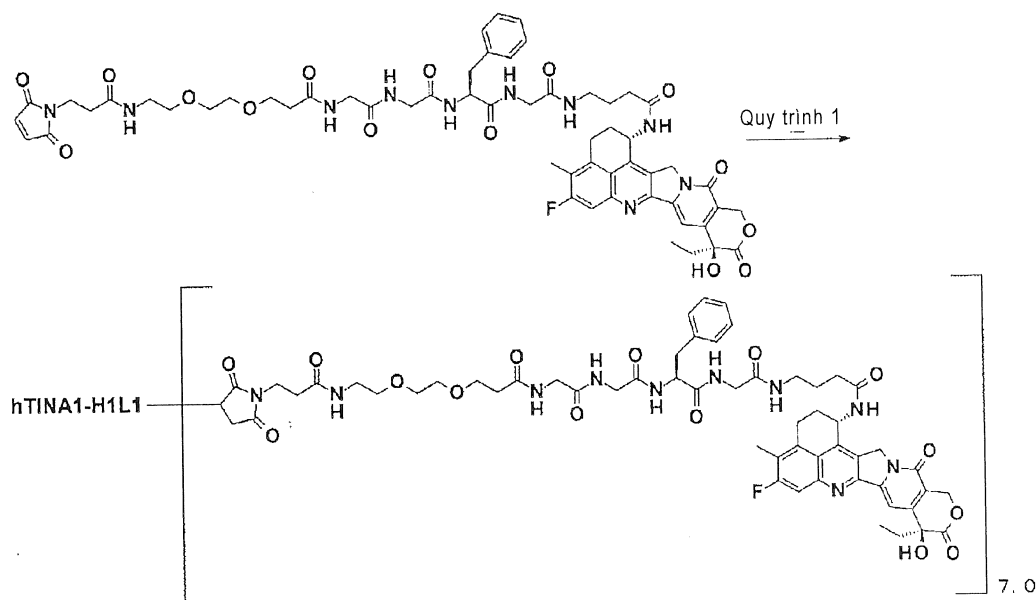
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (giá trị trung bình đo được) được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,19 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 46,0 mg (92%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,6, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,6.

[Ví dụ 12: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (4)]

[Công thức 28]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (4)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10,0 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (5,00 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (0,389 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

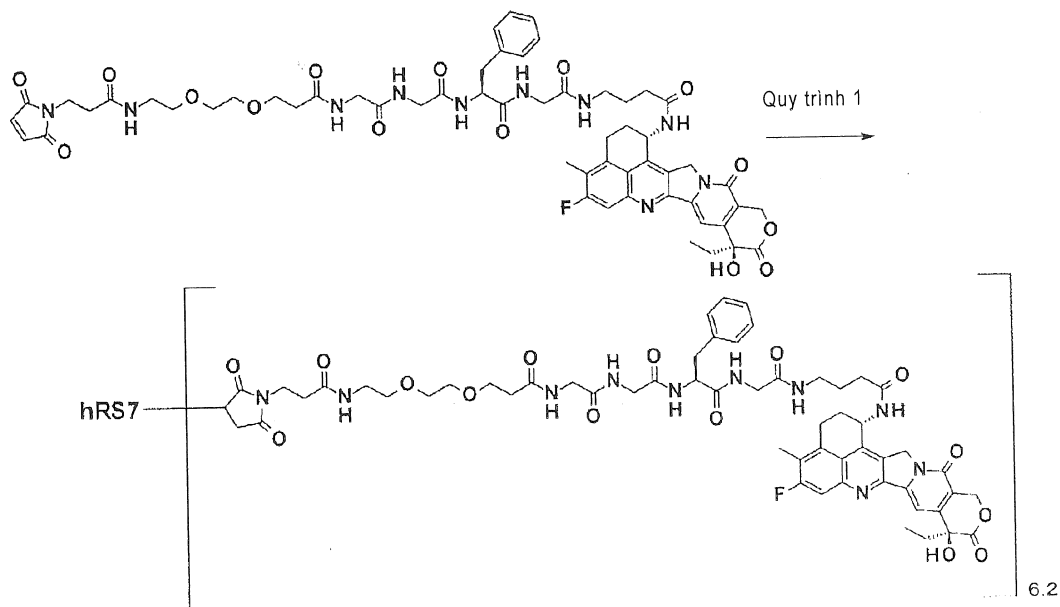
Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,19 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 46,0 mg (92%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 7,0, và số lượng trung bình của các

phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ tham khảo 13: Sản xuất hRS7 ADC (5)]

[Công thức 29]



#### Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (5)

Khử hoá kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,56 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,100 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,4 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimetyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được

trong Quy trình 5 của Ví dụ 9 được thêm vào và ủ để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

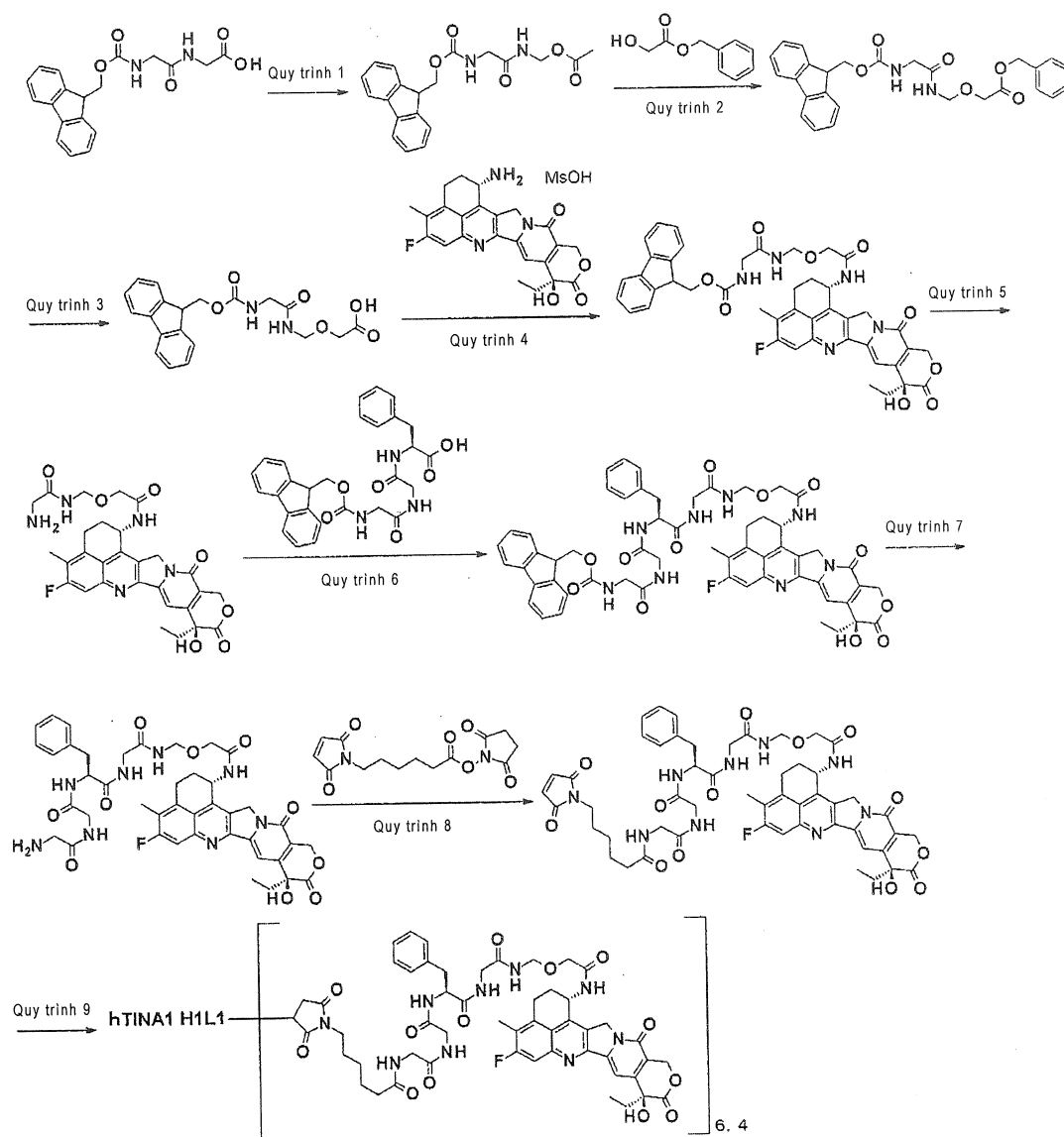
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 4964$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 18982$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,04 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,4 mg (92%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,2.

[Ví dụ 14: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (6)]

[Công thức 30]



Quy trình 1: ((N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxyl}amino)metyl axetat

Thêm vào hỗn hợp có chứa N-9-florenylmethoxycarbonyl-glycylglycine (4,33 g, 12,2 mmol), tetrahydrofuran (120 ml), và toluen (40,0 ml), pyridin (1,16 ml, 14,7 mmol) và chì tetraaxetat (6,84 g, 14,7 mmol) và gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu trong 5 giờ. Sau khi làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ trong phòng, loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Celite, và cô trong điều kiện áp suất giảm. Hoà tan cặn thu được trong etyl axetat và rửa bằng nước và nước muối bão hoà, và tiếp đó làm khô lớp hữu cơ bằng magiê sulfat khan. Sau khi loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm, tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [hexan: etyl axetat = 9: 1 (thể tích/thể tích) - etyl axetat] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (3,00 g, 67%).



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,07 (3H, s), 3,90 (2H, d,  $J=5,1$  Hz), 4,23 (1H, t,  $J=7,0$  Hz), 4,46 (2H, d,  $J=6,6$  Hz), 5,26 (2H, d,  $J=7,0$  Hz), 5,32 (1H, brs), 6,96 (1H, brs), 7,32 (2H, t,  $J=7,3$  Hz), 7,41 (2H, t,  $J=7,3$  Hz), 7,59 (2H, d,  $J=7,3$  Hz), 7,77 (2H, d,  $J=7,3$  Hz).

Quy trình 2: Benzyl [(N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxyl)amino]metoxy]axetat

Thêm kali tert-butoxit (2,24 g, 20,0 mmol) vào dung dịch tetrahydrofuran (40,0 mL) chứa hợp chất (3,68 g, 10,0 mmol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên và benzyl glycolat (4,99 g, 30,0 mmol), ở  $0^\circ\text{C}$  và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Dung dịch phản ứng đã có sẵn etyl axetat và nước ở  $0^\circ\text{C}$  và được chiết bằng etyl axetat và clorofom. Làm khô lớp hữu cơ thu được bằng natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm. Hoà tan cặn thu được trong dioxan (40,0 mL) và nước (10,0 mL), đã có sẵn natri hydrocacbonat (1,01 g, 12,0 mmol) và 9-florenylmetyl clorofomat (2,59 g, 10,0 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng đã có sẵn nước và được chiết bằng etyl axetat. Làm khô lớp hữu cơ thu được bằng natri sulfat và lọc. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [hexan: etyl axetat = 100: 0 (thể tích/thể tích) - 0: 100] thu được hợp chất ở đề mục này ở chất dạng dầu không màu (1,88 g, 40%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,84 (2H, d,  $J=5,5$  Hz), 4,24 (3H, t,  $J=6,5$  Hz), 4,49 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 4,88 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 5,15-5,27 (1H, m), 5,19 (2H, s), 6,74 (1H, brs), 7,31-7,39 (7H, m), 7,43 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 7,61 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,79 (2H, d,  $J=7,4$  Hz).

Quy trình 3: Axit [(N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxyl)amino]metoxy]axetic

Hợp chất (1,88 g, 3,96 mmol) thu được trong Quy trình 2 nêu trên được hoà tan trong etanol (40,0 mL) và etyl axetat (20,0 mL). Sau khi thêm vào chất xúc tác paladi cacbon (376 mg), khuấy trong khí quyển hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ các chất không tan bằng cách lọc qua Celite, và loại

bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn không màu (1,52 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 3,62 (2H, d,  $J=6,3$  Hz), 3,97 (2H, s), 4,18-4,32 (3H, m), 4,60 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 7,29-7,46 (4H, m), 7,58 (1H, t,  $J=5,9$  Hz), 7,72 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,90 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 8,71 (1H, t,  $J=6,5$  Hz).

Quy trình 4: 9H-floren-9-ylmetyl(2-{\[(2-{\[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]amino}-2-oxoetyl)carbamit

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, thêm N,N-diisopropyletylamin (92,9  $\mu\text{L}$ , 0,533 mmol) và N,N'-dixyclohexylcarbodiimit (0,143 g, 0,693 mmol) N,N-dimetylformamit (10.0 mL) vào dung dịch có chứa exatecan mesylat (0,283 g, 0,533 mmol), N-hydroxysuxinimit (61,4 mg, 0,533 mmol), và hợp chất (0,205 g, 0,533 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cạn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - lớp hữu cơ được phân bố clorofom: metanol: nước = 7: 3: 1 (thể tích/thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu nâu nhạt (0.352 g, 82%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,81 (3H, t,  $J=7,4$  Hz), 1,73-1,87 (2H, m), 2,06-2,20 (2H, m), 2,34 (3H, s), 3,01-3,23 (2H, m), 3,58 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 3,98 (2H, s), 4,13-4,25 (3H, m), 4,60 (2H, d,  $J=6,7$  Hz), 5,09-5,22 (2H, m), 5,32-5,42 (2H, m), 5,50-5,59 (1H, m), 6,49 (1H, s), 7,24-7,30 (3H, m), 7,36 (2H, t,  $J=7,4$  Hz), 7,53 (1H, t,  $J=6,3$  Hz), 7,66 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 7,75 (1H, d,  $J=11,0$  Hz), 7,84 (2H, d,  $J=7,4$  Hz), 8,47 (1H, d,  $J=8,6$  Hz), 8,77 (1H, t,  $J=6,7$  Hz).

MS (ESI)  $m/z$ : 802 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Quy trình 5: N-{\[(2-{\[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)metyl]glyxinamit

Thêm piperidin (1,1 mL) vào dung dịch N,N-dimetylformamit (11,0 mL) có chứa hợp chất (0,881 g, 1,10 mmol) thu được trong Quy trình 4 nêu trên, và

khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hỗn hợp có chứa hợp chất nêu ở đề mục này. Hỗn hợp này được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Quy trình 6: N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)methyl]glyxinamit

Trong điều kiện làm lạnh bằng đá, thêm N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (0,181 g, 0,878 mmol) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (50,0 mL) có chứa hỗn hợp (0,439 mmol) thu được trong Quy trình 5 ở trên, N-hydroxysuxinimit (0,101 g, 0,878 mmol), và N-[(9H-floren-9-ylmetoxy)carbonyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanin (Bằng độc quyền sáng chế Nhật số 2002-60351; 0,440 g, 0,878 mmol), và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom: metanol = 9: 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu da cam nhạt (0,269 g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 (M+H)<sup>+</sup>.

Quy trình 7: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-methyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)methyl]glyxinamit

Thêm piperidin (0,251 mL, 2,53 mmol) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (4,00 mL) có chứa hợp chất (0,269 g, 0,253 mmol) thu được trong Quy trình 6 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm thu được hỗn hợp có chứa hợp chất nêu ở đề mục này. Hỗn hợp này được sử dụng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Quy trình 8: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-methyl-

10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoethoxymethyl]glycinamit

Thêm N-suxinimidyl 6-maleimithexanoat (0,156 g, 0,506 mmol) vào dung dịch N,N-dimethylformamit (10,0 mL) có chứa hợp chất (0,253 mmol) thu được trong Quy trình 7 ở trên, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 ngày. Loại bỏ dung môi trong điều kiện áp suất giảm và tinh chế cặn thu được bằng sắc ký cột silicagel [clorofom - clorofom: metanol = 9: 1 (thể tích/thể tích)] thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (0,100 g, 38%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,83 (3H, t, J=7,2 Hz), 1,09-1,21 (2H, m), 1,33-1,47 (4H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,00-2,23 (4H, m), 2,36 (3H, s), 2,69-2,81 (1H, m), 2,94-3,03 (1H, m), 3,06-3,22 (2H, m), 3,23-3,74 (8H, m), 3,98 (2H, s), 4,39-4,50 (1H, m), 4,60 (2H, d, J=6,7 Hz), 5,17 (2H, s), 5,39 (2H, s), 5,53-5,61 (1H, m), 6,50 (1H, s), 6,96 (2H, s), 7,11-7,24 (5H, m), 7,28 (1H, s), 7,75 (1H, d, J=11,0 Hz), 7,97 (1H, t, J=5,7 Hz), 8,03 (1H, t, J=5,9 Hz), 8,09 (1H, d, J=7,8 Hz), 8,27 (1H, t, J=6,5 Hz), 8,48 (1H, d, J=9,0 Hz), 8,60 (1H, t, J=6,5 Hz).

MS (ESI) m/z: 1034 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Quy trình 9: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (6)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng 7,4 ± 0,1, khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ thông thường, dimethyl sulfoxit (0,567 mL) được thêm vào. Do đó, dung dịch dimethyl sulfoxit có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 ở trên (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử

kháng thể) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

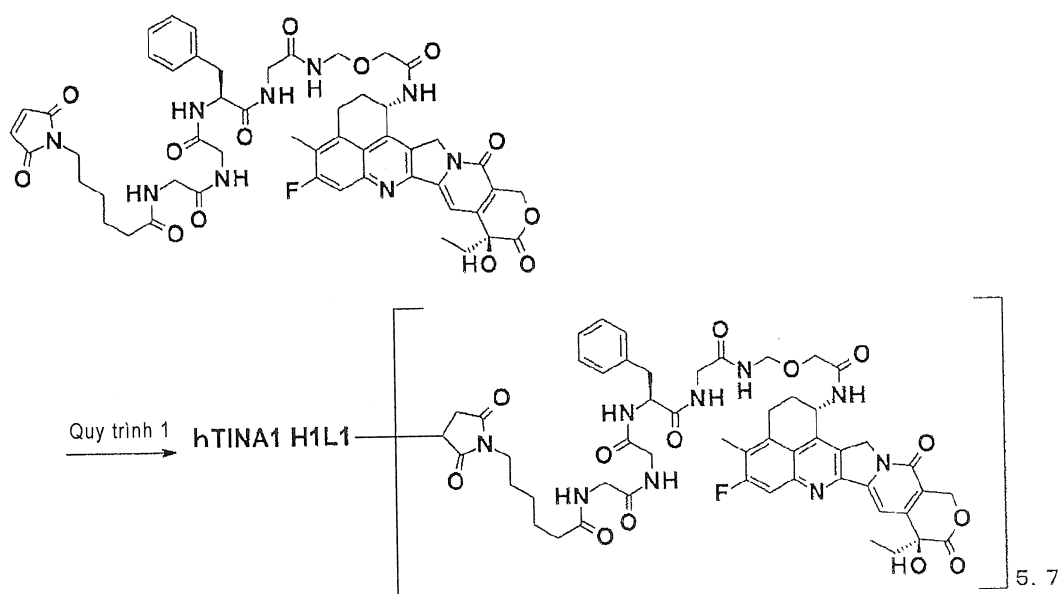
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 35,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,70 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 94,5 mg (95%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,4.

[Ví dụ 15: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (7)]

[Công thức 31]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (7)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở  $15^{\circ}\text{C}$ , dung dịch dimethyl sulfoxit (0,127 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 củ Ví dụ 14 được thêm vào và ủ để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở  $15^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

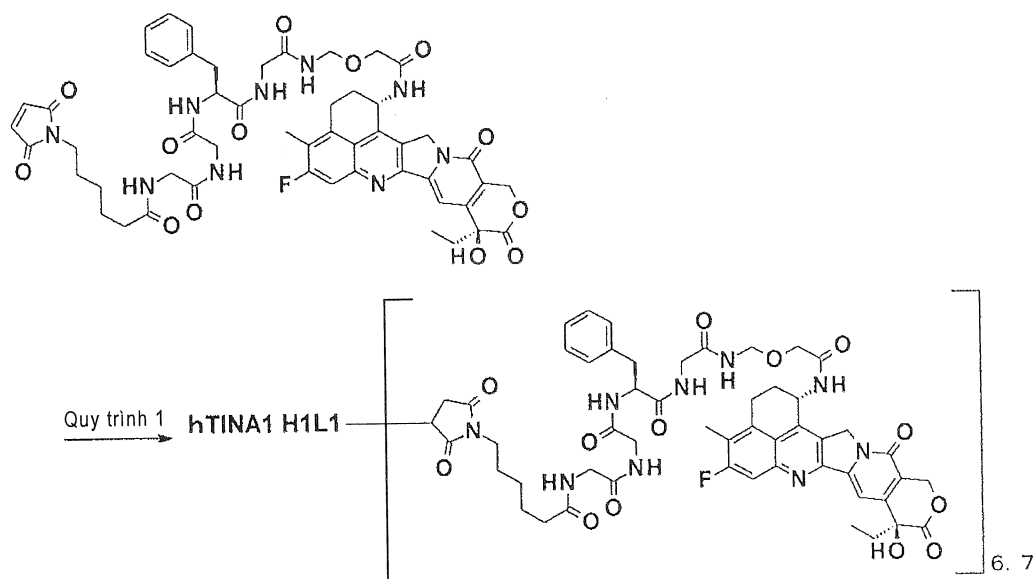
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,04 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,4 mg (92%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 5,7.

[Ví dụ 16: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (8)]

[Công thức 32]



### Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (8)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (30,0 mL) vào bình đựng 100 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,4875 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,9721 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (2,33 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,251 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100

mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

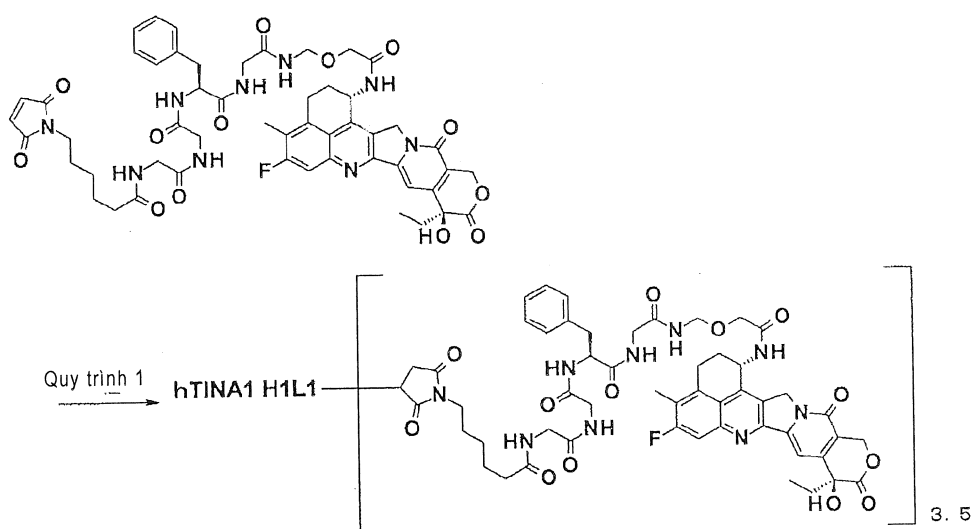
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 98,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này. Tiếp đó, cô dung dịch theo Quy trình chung A được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 17,5 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 14,6 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 256 mg (85%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 6,7, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ 17: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (9)]

[Công thức 33]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (9)



Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch (5,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0813 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0778 mL; 2,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimethyl sulfoxit (0,162 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0418 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 21,0 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

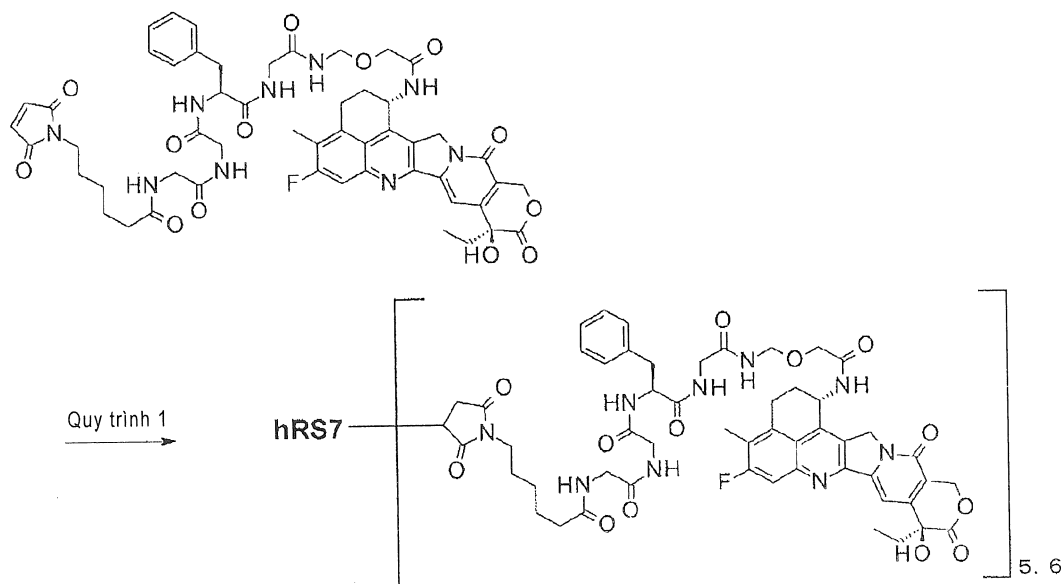
Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,26 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 47,5 mg (95%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,5, và số lượng trung bình của các

phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,6.

[Ví dụ tham khảo 18: Sản xuất hRS7 ADC (10)]

[Công thức 34]



Quy trình 1: Thể liên hợp thuốc-kháng thể (10)

Khử hoá kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,56 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (2,0 mL) vào ống nghiệm 4 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0690 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0299 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, thêm dung dịch dimetyl sulfoxit (0,1269 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 vào đó và ủ để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước

(0,0190 mL; 13,8 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

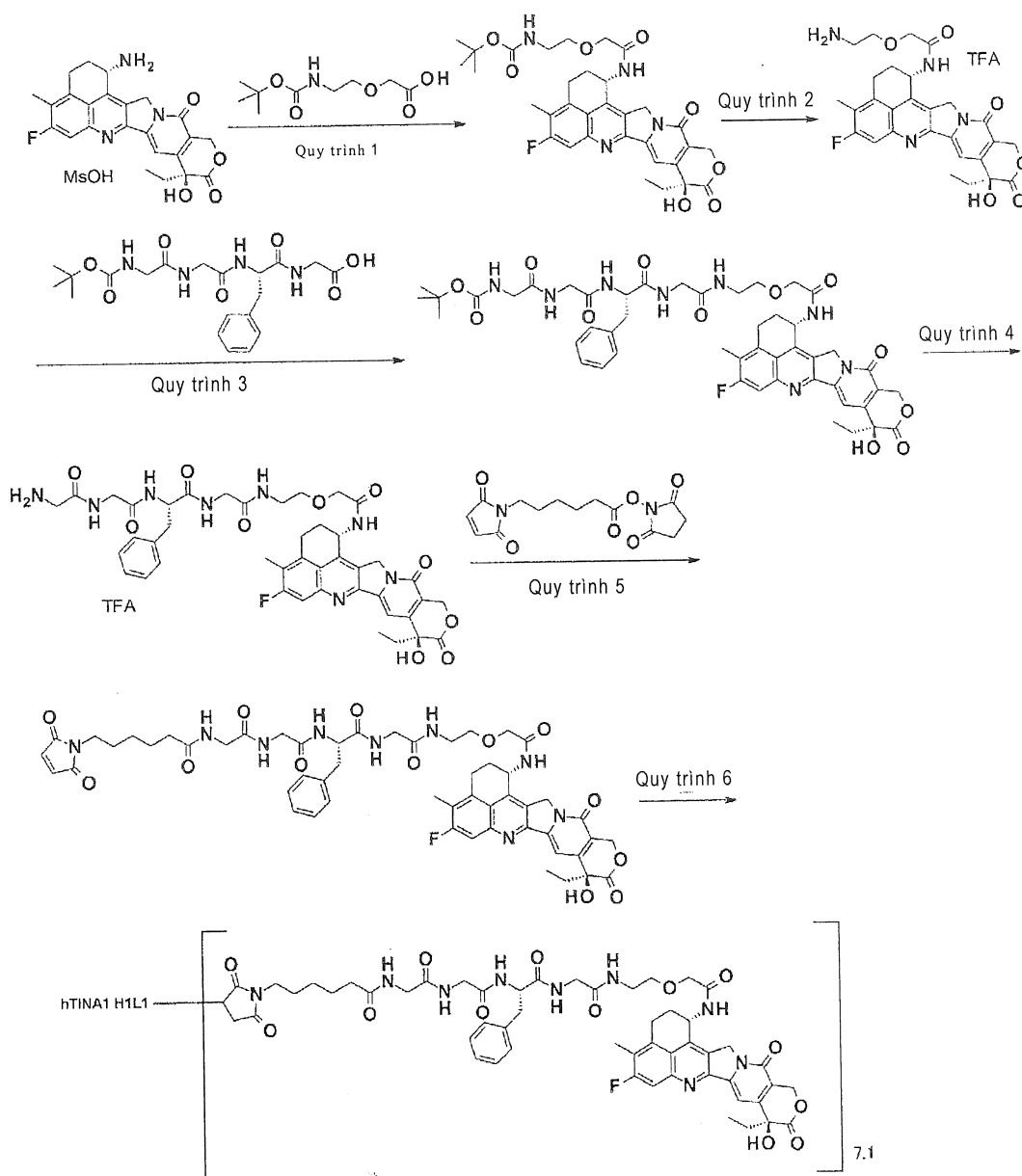
Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 9,00 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5178$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,07 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 18,6 mg (93%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 5,6.

[Ví dụ 19: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (11)]

[Công thức 35]



Quy trình 1: tert-butyl [2-(2-{[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)etyl]carbamate

Exatecan mesylat (3,10 g, 5,47 mol) được cho phản ứng theo cách như Quy trình 1 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng axit {2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]etoxy}axetic (J. Med. Chem., 1992, Tập 35, trang 2928; 1,55 g, 6,01 mmol) thay vì axit 4-(tert-butoxycarbonylamino)butanoic thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (2,56 g, 73%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,3$  Hz), 1,26 (9H, s), 1,81-1,91 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,40 (3H, s), 3,08-3,26 (4H, m), 3,43-3,53 (2H, m), 4,00 (1H, d,  $J = 15,1$  Hz), 4,05 (1H, d,  $J = 15,1$  Hz), 5,14 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,22 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,40 (1H, d,  $J = 16,6$  Hz), 5,44 (1H, d,  $J = 16,6$  Hz), 5,59-5,66 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,86 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz), 7,31 (1H, s), 7,79 (1H, d,  $J = 10,9$  Hz), 8,49 (1H, d,  $J = 9,1$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 637 ( $M+H$ ) $^+$ .

Quy trình 2: 2-(2-aminoetoxy)-N-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-

benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]acetamit trifloaxetat

Hợp chất (1,50 g, 2,36 mol) thu được trong Quy trình 1 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 2 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt (1,50 g, định lượng).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,87 (3H, t,  $J = 7,5$  Hz), 1,81-1,92 (2H, m), 2,15-2,23 (2H, m), 2,41 (3H, s), 3,05 (2H, t,  $J = 5,1$  Hz), 3,15-3,23 (2H, m), 3,71 (2H, t,  $J = 5,1$  Hz), 4,10 (2H, s), 5,19 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,24 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,43 (2H, s), 5,58-5,66 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,33 (1H, s), 7,73-7,84 (4H, m), 8,55 (1H, d,  $J = 9,1$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 537 ( $M+H$ ) $^+$ .

Quy trình 3: N-(tert-butoxycarbonyl)glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-[(1S,9S)-9-etyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)etyl]glyxinamit

Hợp chất (554 mg, 0,85 mmol) thu được trong Quy trình 2 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 3 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này (775 mg, 95%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 0,85 (3H, t,  $J = 7,3$  Hz), 1,36 (9H, s), 1,78-1,89 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd,  $J = 13,4, 9,8$  Hz), 2,95 (1H, dd,  $J = 13,4, 4,3$  Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,23-3,32 (2H, m), 3,40-3,62 (8H, m), 3,73 (1H, dd,  $J = 16,5, 5,5$  Hz), 4,03 (2H, s), 4,39-4,47 (1H, m), 5,17

(1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,45 (1H, d, J = 16,8 Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,54 (1H, s), 6,99 (1H, t, J = 5,8 Hz), 7,13-7,26 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,76-7,82 (2H, m), 7,90 (1H, t, J = 5,2 Hz), 8,13 (1H, d, J = 7,9 Hz), 8,27 (1H, t, J = 5,8 Hz), 8,49 (1H, d, J = 8,5 Hz).

MS (APCI) m/z: 955 (M+H)<sup>+</sup>.

Quy trình 4: Glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)ethyl]glyxinamit trifloaxetat

Hợp chất (630 mg, 0,659 mmol) thu được trong Quy trình 3 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 4 của Ví dụ 1 thu được hợp chất ở đề mục này (588 mg, 92%).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,86 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,79-1,90 (2H, m), 2,13-2,22 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,71 (1H, dd, J = 13,4, 10,1 Hz), 2,99 (1H, dd, J = 13,4, 4,3 Hz), 3,09-3,23 (1H, m), 3,24-3,32 (3H, m), 3,41-3,71 (7H, m), 3,86 (1H, dd, J = 16,8, 5,8 Hz), 4,04 (2H, s), 4,52 (1H, td, J = 9,0, 4,1 Hz), 5,17 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,25 (1H, d, J = 18,9 Hz), 5,41 (1H, d, J = 16,5 Hz), 5,45 (1H, d, J = 16,5 Hz), 5,56-5,65 (1H, m), 6,55 (1H, s), 7,13-7,26 (5H, m), 7,32 (1H, s), 7,80 (1H, d, J = 11,0 Hz), 7,87-8,01 (4H, m), 8,29-8,36 (2H, m), 8,46-8,55 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 855 (M+H)<sup>+</sup>.

Quy trình 5: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrol-1-yl)hexanoyl]glyxylglyxyl-L-phenylalanyl-N-[2-(2-{[(1S,9S)-9-ethyl-5-flo-9-hydroxy-4-metyl-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahydro-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-yl]amino}-2-oxoetoxy)ethyl]glyxinamit

Hợp chất (240 mg, 0,247 mmol) thu được trong Quy trình 4 nêu trên được cho phản ứng theo cách như Quy trình 5 của Ví dụ 1 bằng cách sử dụng triethylamin (31,4 μL, 0,22 mmol) thay vì diisopropyletylamin và N-suxinimidyl 6-maleimit hexanoat (95,3 mg, 0,31 mmol) thay vì N-suxinimidyl 3-(2-(2-(3-

maleinimitpropanamit)etoxy)etoxy)propanoat thu được hợp chất ở đề mục này (162 mg, 62%).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,86 (3H, t,  $J = 7,6$  Hz), 1,13-1,22 (2H, m), 1,40-1,51 (4H, m), 1,78-1,90 (2H, m), 2,09 (2H, t,  $J = 7,6$  Hz), 2,14-2,21 (2H, m), 2,39 (3H, s), 2,74 (1H, dd,  $J = 13,6, 9,7$  Hz), 2,96 (1H, dd,  $J = 13,6, 4,5$  Hz), 3,08-3,24 (1H, m), 3,24-3,30 (1H, m), 3,33-3,40 (4H, m), 3,47-3,68 (7H, m), 3,72 (1H, dd,  $J = 16,6, 5,7$  Hz), 4,03 (2H, s), 4,42 (1H, td,  $J = 8,6, 4,2$  Hz), 5,17 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,25 (1H, d,  $J = 18,7$  Hz), 5,40 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,44 (1H, d,  $J = 17,2$  Hz), 5,57-5,64 (1H, m), 6,52 (1H, s), 6,99 (2H, s), 7,13-7,25 (5H, m), 7,31 (1H, s), 7,74-7,81 (2H, m), 7,99 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,03-8,11 (2H, m), 8,22 (1H, t,  $J = 5,7$  Hz), 8,47 (1H, d,  $J = 9,1$  Hz).

MS (APCI)  $m/z$ : 1048 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Quy trình 6: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (11)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (3,0 mL) vào lọ 15 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0488 mL) kèm theo khuấy, và tiếp đó khuấy ở 37°C trong 10 phút. Sau khi thêm vào đó dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,0972 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) kèm theo khuấy và tiếp đó xác nhận là dung dịch có độ pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách khuấy ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi khuấy dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở 15°C, dung dịch dimetyl sulfoxit (0,2333 mL; 12,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 11 được nhỏ giọt từ từ vào và khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này trong bể nước ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,0251 mL; 12,9 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100

mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút.

Tinh chế: Tinh chế dung dịch nêu trên bằng cách sử dụng Quy trình chung D được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 thu được 14 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

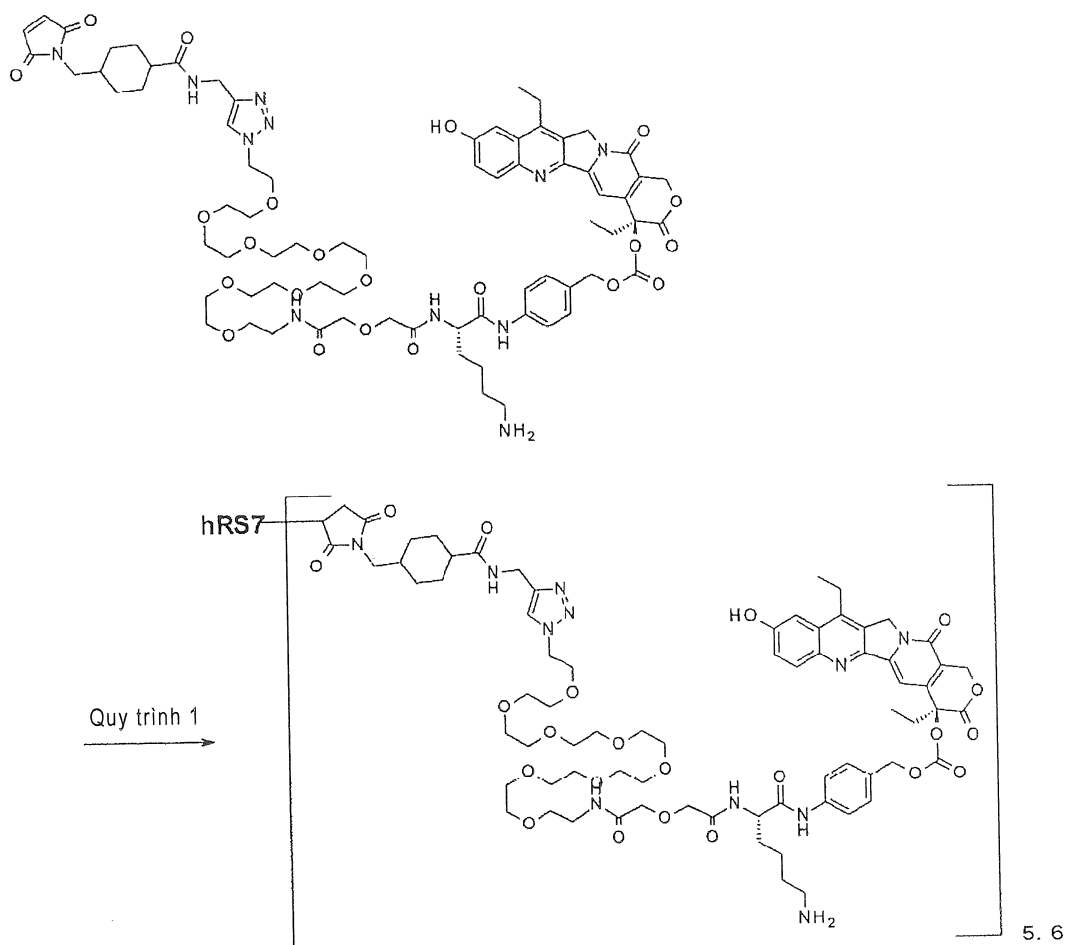
Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng các quy trình thông thường E và F được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 ( $\epsilon_{D,280} = 5193$  (giá trị trung bình đo được), và  $\epsilon_{D,370} = 20347$  (giá trị trung bình đo được) đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 1,93 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 27,0 mg (90%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 7,1, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 7,0.

[Ví dụ tham khảo 2: Sản xuất hRS7-CL2A-SN38 (12)]

[Công thức 36]





### Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (12)

Khử hoá kháng thể: hRS7 được sản xuất trong Ví dụ tham khảo 1 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Thu gom dung dịch này (10,0 mL) vào ống nghiệm 50 mL và đã có sẵn dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,317 mL; 4,6 đương lượng trên một phân tử kháng thể) và dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (Nacalai Tesque, Inc.; 0,500 mL). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,4 \pm 0,1$ , khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi ủ dung dịch nêu trên trong 10 phút trong bể nước ở nhiệt độ thông thường, dimethyl sulfoxit (0.567

mL) được thêm vào đó. Từ đó, dung dịch dimethyl sulfoxit có chứa 10 mM CL2A-SN38 được tổng hợp theo Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2011/0293513 (0,635 mL; 9,2 đương lượng trên một phân tử kháng thể) được thêm vào đó và khuấy bằng cách sử dụng máy lắc vòng để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở nhiệt độ trong phòng trong 40 phút. Tiếp theo, dung dịch nước (0,127 mL; 18,4 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) được thêm vào đó và khuấy để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

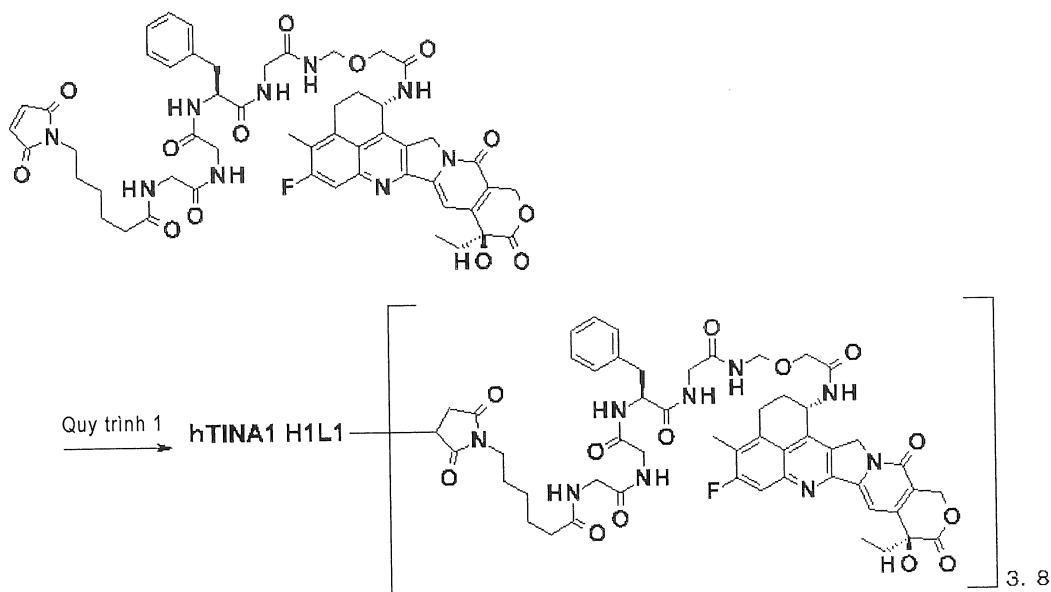
Tinh chế: Dung dịch phản ứng nêu trên được lọc qua gel lặp lại 2 lần và tinh chế được mô tả trong Quy trình chung D của Phương pháp sản xuất và tiếp đó được tinh chế bằng cách lọc gel qua cột NAP-25 sử dụng dung dịch 25 mM trehaloza có chứa polysorbat 80 (0,01%). Tiếp đó, chất rửa giải thu được (35 mL) được đông khô.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E được mô tả trong phương pháp sản xuất 1 cho chất rửa giải này trước khi đông khô, thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 2,78 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 97,3 mg (97%), và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể: 5,6.

[Ví dụ 20: Sản xuất hTINA1-H1L1 ADC (13)]

[Công thức 37]



### Quy trình 1: Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (13)

Khử hoá kháng thể: hTINA1-H1L1 được sản xuất trong Ví dụ 7 được pha chế để có nồng độ kháng thể 10 mg/mL bằng cách thay thế môi trường bằng PBS6.0/EDTA bằng cách sử dụng Quy trình chung B (với hệ số hấp thụ ở 280 nm, 1,54 được sử dụng) và Quy trình chung C được mô tả trong phương pháp sản xuất 1. Dung dịch (100 mL) được cho vào bình nón Erlenmeyer polycarbonat 250 mL, đã có sẵn dung dịch nước chứa 1 M dikali hydrophosphat (1,4 mL) ở nhiệt độ trong phòng kèm theo khuấy sử dụng khuấy từ tính, và được nạp dung dịch nước chứa 10 mM TCEP (1,62 mL; 2,5 đương lượng trên một phân tử kháng thể). Sau khi xác nhận dung dịch có pH bằng  $7,0 \pm 0,1$ , ngừng khuấy, và khử hoá liên kết disulfua ở phần bản lề trong kháng thể này bằng cách ủ ở 37°C trong 2 giờ.

Tiếp hợp giữa kháng thể và liên kết thuốc: Sau khi làm mát dung dịch nêu trên đến 15°C, nhỏ giọt DMSO (3,24 mL) vào từ từ vào kèm theo khuấy. Từ đó, nhỏ giọt dung dịch DMSO có chứa 10 mM hợp chất thu được trong Quy trình 8 của Ví dụ 14 (1,76 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) vào từ từ. Dung dịch này được khuấy để tiếp hợp liên kết thuốc với kháng thể này ở 15°C trong 1 giờ. Tiếp theo, dung dịch nước (0,324 mL; 5,0 đương lượng trên một phân tử kháng thể) chứa 100 mM NAC được thêm vào đó kèm theo khuấy và ủ

để chấm dứt phản ứng của liên kết thuốc chưa phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa.

Tinh chế: dung dịch nước axit axetic 20% (khoảng 0,52 mL) và ABS (100 mL) được thêm từ từ vào dung dịch nêu trên kèm theo khuấy để điều chỉnh pH của dung dịch đến  $5,5 \pm 0,1$ . Dung dịch này được siêu lọc (0,45  $\mu\text{m}$ , màng PVDF) để loại bỏ chất đục màu trắng và thu được khoảng 200 mL dịch lọc. Dịch lọc này được tinh chế siêu lọc bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc gồm có màng siêu lọc (Merck Japan, Pellicon XL Cassette, Ultracell 30 KDa), bơm ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Pump model 77521-40, mô-đen đầu Pump Head 7518-00), và ống (Cole-Parmer International, MasterFlex Tube L/S16). Cụ thể là, trong khi nhỏ giọt ABS (tổng cộng 1600 mL) làm dung dịch đệm để tinh chế vào dung dịch phản ứng, tiến hành tinh chế siêu lọc để loại bỏ các liên kết thuốc chưa được liên hợp và các chất thử phân tử lượng thấp khác, cũng thay thế dung dịch đệm bằng ABS, và cô tiếp dung dịch. Dung dịch đã tinh chế thu được được siêu lọc (0,22  $\mu\text{m}$ , màng PVDF) thu được 88 mL dung dịch có chứa thể liên hợp thuốc-kháng thể nêu ở đề mục này.

Xác định đặc tính hoá lý: Bằng cách sử dụng Quy trình chung E và Quy trình chung F ( $\epsilon_{D,280} = 5178$ , và  $\epsilon_{D,370} = 20217$  đã được sử dụng), thu được các giá trị đặc tính dưới đây.

Nồng độ kháng thể: 9,96 mg/mL, hiệu suất kháng thể: 876 mg (88%), số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung E: 3,8, và số lượng trung bình của các phân tử thuốc được liên hợp (n) trên một phân tử kháng thể được xác định theo Quy trình chung F: 3,8.

[Ví dụ 21: Đánh giá tác dụng kháng khối u của ADC]

21-a) Tác dụng kháng khối u của ADC - (1)

Chuột: chuột BALB/c-nu/nu giống cái từ 5 đến 6 tuần tuổi (Charles River Laboratories Japan, Inc.) được để thích nghi với môi trường trong từ 4 đến 7 ngày trong điều kiện không có mầm bệnh cụ thể (SPF) trước khi sử dụng trong

thí nghiệm. Các con chuột này được cho ăn thức ăn rắn đã tiệt khuẩn (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) và uống nước vôi đã tiệt khuẩn (được pha chế bằng cách bổ sung thêm từ 5 đến 15 ppm dung dịch natri hypochlorua).

Thử nghiệm và phương trình tính toán: trong tất cả các nghiên cứu, trực chính và trực phụ của khối u được đo xác định 2 lần/tuần bằng cách sử dụng thước điện tử kỹ thuật số (CD-15C, Mitutoyo Corp.), và tính toán thể tích khối u ( $\text{mm}^3$ ). Phương trình tính toán được thể hiện như dưới đây.

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{Trục chính (mm)} \times [\text{Trục phụ (mm)}]^2$$

Tất cả thể liên hợp thuốc-kháng thể được pha loãng với nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) và được sử dụng với thể tích 10 mL/kg để sử dụng qua đường tĩnh mạch đuôi của từng con chuột. Dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người COLO205 được mua từ ATCC và được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý.  $2 \times 10^6$  tế bào của huyền phù này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 7. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 7, 14, và 21. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 13). Trên hình vẽ này, trục hoành chỉ số ngày, và trục tung chỉ thể tích khối u.

#### 21-b) Tác dụng kháng khối u của ADC - (2)

Dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Bx-PC3 được mua từ ATCC được cấy ghép vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái và được cấy chuyển tiếp dưới dạng khối u rắn. Mảnh ghép khối u này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 16. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của

từng con chuột vào các Ngày 16, 23, và 30. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể này đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 14).

#### 21-c) Tác dụng kháng khối u của ADC - (3)

Dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người Capan-1 được mua từ ATCC được cấy ghép vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái và được cấy chuyển tiếp dưới dạng khối u rắn. Mảnh ghép khối u này được cấy ghép dưới da vào bụng bên phải của từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 18. Thể liên hợp thuốc-kháng thể (1), (6), hoặc (12) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 18, 25, và 32. Kháng thể hTINA1-H1L1 chưa được liên hợp và kháng thể hRS7 chưa được liên hợp lần lượt được sử dụng làm đối chứng âm tính ở liều dùng 25 mg/kg qua cùng đường dùng như trên. Việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (1) hoặc (6) làm giảm rõ rệt thể tích khối u so với việc sử dụng thể liên hợp thuốc-kháng thể (12), và cả hai thể liên hợp thuốc-kháng thể này đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 15).

#### 21-d) Tác dụng kháng khối u của ADC - (4)

COLO205 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-a) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 11. Tiêm tĩnh mạch thể liên hợp thuốc-kháng thể (2) hoặc (5) ở liều dùng 10 mg/kg và thể liên hợp thuốc-kháng thể (7) hoặc (10) ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 11, 18, và 25. Tất cả các thể liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), và (10) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 16).

#### 21-e) Tác dụng kháng khối u của ADC - (5)

Bx-PC3 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-b) (Ngày 0), và các chuột này được

phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 25. Thử liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), hoặc (10) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 25 và 32. Tất cả các thử liên hợp thuốc-kháng thể (2), (5), (7), và (10) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 17).

21-f) Tác dụng kháng khối u của ADC - (6)

COLO205 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-a) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 9. Thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 10 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 9 và 16. Tất cả các thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 18).

21-g) Tác dụng kháng khối u của ADC - (7)

Bx-PC3 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-b) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 21. Thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào các Ngày 21 và 28. Tất cả các thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 19).

21-h) Tác dụng kháng khối u của ADC - (8)

$8 \times 10^6$  tế bào dòng tế bào ung thư buồng trứng của người NIH:OVCAR-3 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong Matrigel (Becton, Dickinson và Company) và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 25. Thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 25. Tất cả các thử liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 20).

21-i) Tác dụng kháng khối u của ADC - (9)

$1 \times 10^7$  tế bào dòng tế bào ung thư dạ dày của người NCI-N87 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da

vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 6. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 6. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 21).

#### 21-j) Tác dụng kháng khối u của ADC - (10)

$5 \times 10^6$  tế bào dòng tế bào ung thư phổi của người NCI-H292 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 9. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 9. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 22).

#### 21-k) Tác dụng kháng khối u của ADC - (11)

$3 \times 10^6$  tế bào dòng tế bào ung thư vòm họng của người FaDu được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da vào từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 11. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 11. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 23).

#### 21-l) Tác dụng kháng khối u của ADC - (12)

$4 \times 10^6$  tế bào dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người CFPAC-1 được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 14. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), hoặc (9) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 14. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (3), (4), (8), và (9) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 24).

#### 21-m) Tác dụng kháng khối u của ADC - (13)



CFPAC-1 được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái theo cách tương tự như trong Ví dụ 21-l (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 14. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 1 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 14. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 25).

#### 21-n) Tác dụng kháng khối u của ADC - (14)

$3 \times 10^6$  tế bào dòng tế bào adenocarcinoma tụy của người HPAC được mua từ ATCC được tạo huyền phù trong nước muối sinh lý và được cấy ghép dưới da cho từng con chuột BALB/c-nu/nu giống cái (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 12. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 12. Tất cả các thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 26).

#### 21-o) Tác dụng kháng khối u của ADC - (15)

Các mô ung thư thực quản của người thu được từ Japan Health Sciences Foundation được cấy ghép dưới da vào chuột NOG (Central Institute for Experimental Animals) và để phát triển. Mảnh ghép khối u thu được được cấy ghép dưới da tiếp cho chuột NOD-scid giống cái (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (Ngày 0), và các chuột này được phân nhóm ngẫu nhiên vào Ngày 27. Thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) hoặc (13) được tiêm tĩnh mạch ở liều dùng 3 mg/kg vào đuôi của từng con chuột vào Ngày 27. Cả hai thử nghiệm liên hợp thuốc-kháng thể (8) và (13) đã sử dụng đều có tác dụng ức chế tăng trưởng khối u (FIG. 27).

[Ví dụ 22: Đánh giá tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của ADC]

BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCA-3, CFPAC-1, FaDu, dòng tế bào adenocarcinoma phổi của người Calu-3 (ATCC), và dòng tế bào ung thư buồng trứng của người CaOV3 (ATCC) là các dòng tế bào dương tính-kháng nguyên TROP2, và dòng tế bào ung thư phổi của người Calu-6 (ATCC) và dòng tế bào u melanin da của người A375 (ATCC) là các dòng tế bào âm tính-kháng nguyên

TROP2 đã được sử dụng để đánh giá tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của từng ADC. BxPC3 và NCI-H292 được pha chế với môi trường RPMI1640 (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò (Moregate Biotech), NIH:OVCA-3 được pha chế với môi trường RPMI1640 có chứa 20% huyết thanh bào thai bò và 0,01 mg/mL insulin (Invitrogen Corp.), CFPAC-1 được pha chế với môi trường Dulbecco cải biến Iscove (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, FaDu, Calu-3, và Calu-6 được pha chế với môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (ATCC) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, và CaOV3 và A375 pha điều chế với môi trường Eagle cải biến Dulbecco (Gibco) có chứa 10% huyết thanh bào thai bò, cho đến lần lượt có nồng độ  $2,2 \times 10^6$  tế bào/mL. Gây giống lần lượt huyền phù tế bào 90  $\mu$ L/giếng vào đĩa vi chuẩn độ 96-giếng cho mỗi dịch nuôi cấy tế bào. Thẻ liên hợp thuốc-kháng thể (4) hoặc (8) được pha loãng với môi trường RPMI1640 đến nồng độ 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0,8 nM, 0,16 nM, 0,032 nM, hoặc 0,0064 nM, hoặc môi trường RPMI1640 để so sánh được thêm vào 10  $\mu$ L/giếng, và nuôi cấy các tế bào trong điều kiện 5% CO<sub>2</sub> ở 37°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, các đĩa vi chuẩn độ được lấy ra khỏi tủ ấm và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Dung dịch nuôi cấy được nạp lượng tương đương của Thử nghiệm Tính sống còn tế bào Phát quang CellTiter-Glo (Promega) và khuấy trong 10 phút bằng cách sử dụng sử dụng thiết bị khuấy đĩa. Sau khi phân giải tế bào, cường độ phát quang được xác định bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa.

Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào sau khi nuôi cấy trong 6 ngày được tính toán theo phương trình dưới đây:

$$\text{Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào (\%)} = a / b \times 100$$

a: Giá trị trung bình từ các giếng đã bổ sung-mẫu thử sau khi nuôi cấy trong 6 ngày - Giá trị trung bình từ các giếng không bổ sung-mẫu thử lúc bắt đầu nuôi cấy

b: Giá trị trung bình từ các giếng đã bổ sung-môi trường sau khi nuôi cấy trong 6 ngày - Giá trị trung bình từ các giếng không bổ sung-môi trường lúc bắt đầu nuôi cấy

Tính toán giá trị GI<sub>50</sub> theo phương trình dưới đây:

$$GI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog}((50 - f) \times (\text{LOG}_{10}(d) - \text{LOG}_{10}(c)) / (f - e) + \text{LOG}_{10}(d))$$

c: Nồng độ mẫu thử c

d: Nồng độ mẫu thử d

e: Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ mẫu thử c

f: Tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào ở nồng độ mẫu thử d

Các nồng độ c và d xác định mối liên quan  $c > d$  50% tốc độ ức chế tăng trưởng tế bào.

Các thể liên hợp thuốc-kháng thể (4) và (8) thể hiện tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào của  $GI_{50} < 1$  (nM) trên dòng tế bào dương tính-kháng nguyên TROP2 BxPC3, NCI-H292, NIH:OVCAR-3, CFPAC-1, FaDu, Calu-3, và CaOV3. Mặt khác, các thể liên hợp thuốc-kháng thể này không thể hiện tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào ( $> 100$  (nM)) trên dòng tế bào âm tính-kháng nguyên TROP2 Calu-6 và A375.<sup>1</sup>

Ghi chú danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 3: Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ mã hoá vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 4: Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1

SEQ ID NO: 5: Trình tự nucleotit mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi  $\kappa$  của người và vùng ổn định chuỗi  $\kappa$  của người

SEQ ID NO: 6: Trình tự nucleotit mã hoá tín hiệu bài tiết chuỗi nặng của người và vùng ổn định IgG1 của người

SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể cTINA1

SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể cTINA1  
SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của hTINA1-H1  
SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của hTINA1-H1  
SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của hTINA1-H2  
SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của hTINA1-H2  
SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của hTINA1-H3  
SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của hTINA1-H3  
SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của hTINA1-L1  
SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của hTINA1-L1  
SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của hTINA1-L2  
SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của hTINA1-L2  
SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của hTINA1-L3  
SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của hTINA1-L3  
SEQ ID NO: 23: Trình tự axit amin của CDRH1 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của CDRH2 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 25: Trình tự axit amin của CDRH3 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 26: Trình tự axit amin của CDRL1 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 27: Trình tự axit amin của CDRL2 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của CDRL3 của kháng thể TINA1  
SEQ ID NO: 29: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng của kháng thể hRS7  
SEQ ID NO: 30: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể hRS7  
SEQ ID NO: 31: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ của kháng thể hRS7  
SEQ ID NO: 32: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể hRS7  
SEQ ID NO: 33: Đoạn mồi mG2aVR2  
SEQ ID NO: 34: Đoạn mồi mKVR2  
SEQ ID NO: 35: Đoạn mồi 3.3-F1  
SEQ ID NO: 36: Đoạn mồi 3.3-R1  
SEQ ID NO: 37: Đoạn mồi TINA1H-F  
SEQ ID NO: 38: Đoạn mồi TINA1H-R  
SEQ ID NO: 39: Đoạn mồi TINA1L-F

SEQ ID NO: 40: Đoạn mồi TINA1L-R

SEQ ID NO: 41: Đoạn mồi EG-Inf-F

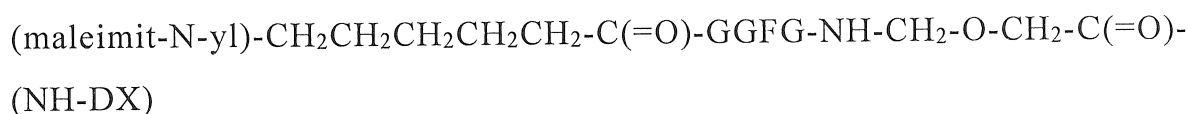
SEQ ID NO: 42: Đoạn mồi EG1-Inf-R

SEQ ID NO: 43: Đoạn mồi CM-LKF

SEQ ID NO: 44: Đoạn mồi KCL-Inf-R

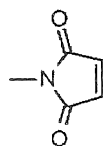
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thể liên hợp thuốc - kháng thể bao gồm bước cho hợp chất có công thức dưới đây:

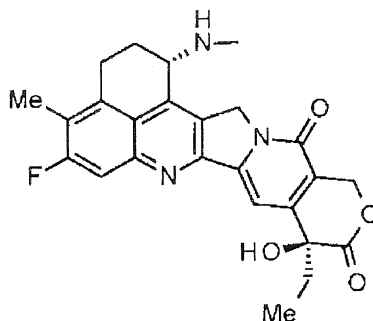


phản ứng với kháng thể kháng - TROP2 hoặc dẫn xuất phản ứng của nó và liên hợp nhóm liên kết - thuốc với kháng thể bởi phương pháp để tạo thành liên kết thioete ở nhóm liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể, trong đó

(maleimide-N-yl)- là nhóm có công thức dưới đây:

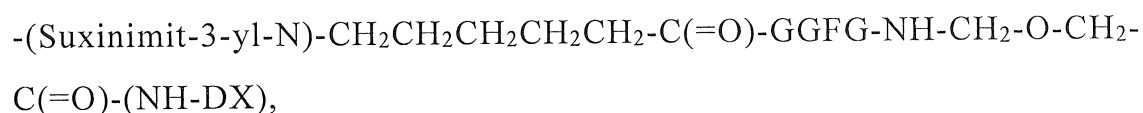


trong đó nguyên tử nitơ là vị trí kết nối, và  
-(NH-DX) là nhóm có công thức dưới đây:



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và  
-GGFG- là gốc tetrapeptit của -Gly-Gly-Phe-Gly-.

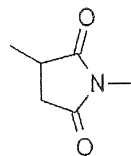
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thể liên hợp thuốc - kháng thể có cấu trúc liên kết - thuốc có công thức dưới đây:



nhóm này được liên hợp với kháng thể kháng TROP2 thông qua liên kết thioete mà được tạo thành ở vị trí liên kết disulfua có mặt ở phần bản lề của kháng thể kháng - TROP2,

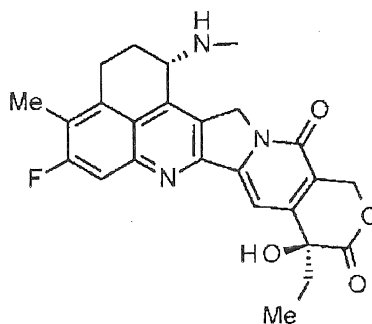
trong đó

-(Suxinimit-3-yl-N)- có cấu trúc được thể hiện bằng công thức dưới đây:



nhóm này được nối với kháng thể kháng TROP2 ở vị trí 3 của nó và được nối với nhóm metylen trong cấu trúc liên kết có chứa cấu trúc này trên nguyên tử nitơ ở vị trí 1,

-(NH-DX) là nhóm có công thức dưới đây:



trong đó nguyên tử nitơ của nhóm amino ở vị trí 1 là vị trí kết nối, và

-GGFG- là gốc tetrapeptit của -Gly-Gly-Phe-Gly-.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa CDRH1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23, CDRH2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và CDRH3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 trong vùng biến đổi chuỗi nặng của nó và CDRL1 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, CDRL2 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và CDRL3 gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của nó.

4. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng TROP2 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm; vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18,

vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18,

vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 20, và

vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 22.

5. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng TROP2 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm;

chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18, chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 20, và

chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 22.

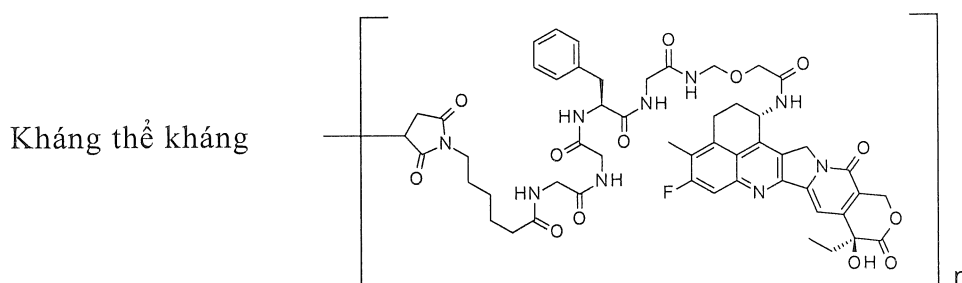
6. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 129 của SEQ ID NO: 18.

7. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng TROP2 chứa chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO: 18.

8. Phương pháp theo điểm 5, trong đó kháng thể kháng TROP2 thiếu gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.



9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó kháng thể kháng TROP2 thiếu gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 2 đến 8.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó số lượng trung bình các đơn vị cấu trúc liên kết - thuốc đã chọn được liên hợp với mỗi kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến 8.
12. Phương pháp sản xuất thể liên hợp thuốc - kháng thể có công thức dưới đây:



trong đó  $n$  là số lượng trung bình của các đơn vị của cấu trúc liên kết - thuốc được liên hợp với kháng thể kháng TROP2,

trong đó kháng thể kháng TROP2 gồm:

chuỗi nặng gồm trình tự axit amin ở các vị trí từ 20 đến 470 của SEQ ID NO:

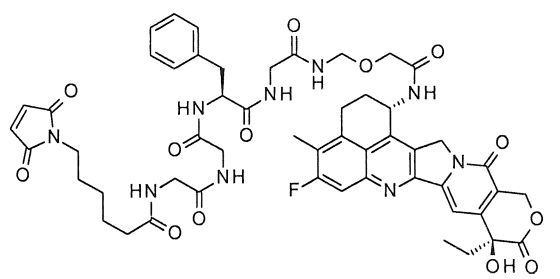
12 và chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin ở vị trí từ 21 đến 234 của SEQ ID NO:

18,

và trong đó phương pháp này gồm bước

xử lý kháng thể kháng TROP2 trong điều kiện khử hóa và tiếp đó

cho kháng thể kháng TROP2 phản ứng với hợp chất có công thức dưới đây:



13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó kháng thể kháng TROP2 thiếu gốc lysin ở đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng.
14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó  $n$  nằm trong khoảng từ 2 đến 8.
15. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó  $n$  nằm trong khoảng từ 3 đến 8.

FIG. 1

## SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể cTINA1

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccag  
 ttggtgcagctctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaggatctcctgcaaggcttct  
 gggatataccttcacaactgctggaatgcagtggtgcaaaagatgccaggaaaggggttgaagtgg  
 attggctggataaacacccactctggagtgccaaaatatgcagaagacttcaagggacggtttgcc  
 ttctcttttgaaacctctgccagcactgcatatttacagataagcaacctcaaaaatgaggacacg  
 actacgtattttctgtgcgagatcgggggttcggtagtagctactggtacttcgatgtctggggcgca  
 gggaccgcgggtcacctgcagctcagcctccaccaagggcccaagcgtcttccccctggcacccctcc  
 tccaagagcacctctggcggcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccc  
 gtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcag  
 tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacc  
 tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattct  
 tgtgacaaaactcacacatgcccacctgcccagcacctgaactcctggggggacctcagctctc  
 ctcttcccccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccttgaggtcacatgcgtgggtg  
 gtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat  
 aatgccaaagacaaaagccccgggagggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacc  
 gtctcgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccca  
 gccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacctg  
 cccccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctat  
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccacctt  
 cccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg  
 cagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaag  
 agcctctccctgtctcccgcaaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

## SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể cTINA 1

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQIQLVQSGPELKKPGETVRISCKASGYTFTTAGMQWVQKMPGKGLKWIGWINT  
 HSGVPKYAEDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTTYFCARSGFGSSYWFYFDVWGAGTAVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.2

## SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatt  
 gtgatgaccaggtctcacaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatcacctgcaag  
 gccagtcaggatgtgagtactgctgtagcctggatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactg  
 ctgatttactcggcatcctaccgctacactggagtccttgatcgcttcactggcagtggtatctggg  
 acggcctttcactttcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgtcagcaa  
 cattatattactccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgggctgtggccgcc  
 cctccgctgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtggtgtgc  
 ctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtc  
 gggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcacc  
 ctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgaccaccagggc  
 ctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

## SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể cTINA1

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS  
 YRYTGVPDRFTGSGSGTAFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYITPLTFGAGTKLELKRAVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

## FIG.3

## SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của hTINA1-H1

atgaaacacctgtggttcttctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg  
 cagctctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggtacaccttt  
 accaccgcccgcagtgagtggtgcccaggtcctggacagggcctggaatggatgggctggatcaacacc  
 cacagcggcgtgcccacaaatagccgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcgccgacaccagcacctcc  
 acagcctacctgcagctgagcagcctgaagtccgaggacaccgcccgtgtactactgcccagaagcggcttc  
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag  
 ggcccagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgctg  
 gtcaaggactacttccccgaaccctgacccgtgagctggaactcaggcgcccctgaccagcggcgtgcacacc  
 tccccctgctcctgacgtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagcttg  
 ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc  
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctcttc  
 ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggac  
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca  
 aagccccgggaggagcagtaaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc  
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaac  
 caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggc  
 cagcccagagaactacaagaccaccctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag  
 ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac  
 aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

## SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của hTINA1-H1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPQGLEWMGWINT  
 HSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFVDVWGQGLVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.4

## SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của hTINA1-H2

atgaaacacctgtggttcttctcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggtg  
 cagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacaccttt  
 accacccgccgcatgcagtgggtgcccaggtcctggacagggcctggaatggatgggctggatcaacacc  
 cacagcggcggtgccaaatacgccgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcctggacaccagcacctcc  
 accgctacctgcagctgagcagcctgaagtcagaggacaccgcccgtgtactactgcgccagaagcggcttc  
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcacccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaag  
 ggcccaagcgtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctg  
 gtcaaggactacttccccgaaccctgacccgtgagctggaactcaggcgcccctgaccagcggcgtgcacacc  
 tccccgctgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacccgtgccctccagcagcttg  
 ggcacccagacctaatactgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc  
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagctcttc  
 ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtgggtgggac  
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca  
 aagccccgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgggtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc  
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaac  
 caggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggc  
 cagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag  
 ctaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcac  
 aaccactacaccagaagagcctctcctgtctcccggcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

## SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của hTINA1-H2

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINT  
 HSGVPKYAEDFKGRVTISLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.5

## SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của hTINA1-H3

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccagctggtg  
 cagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcgagagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacaccttt  
 accaccgcccgcagtgagtggtgagcagatgcctggcaagggcctggaatggatgggctggatcaacacc  
 cacagcggcgtgccccaaatacgcgaggacttcaagggcagagtgaccttcagcctggacaccagcacctcc  
 accgcctacctgcagctgagcagcctgaagtccgaggacacccgcctgtactactgcgccagaagcggcttc  
 ggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcacctcctgacccgtcagctcagcctccaccaag  
 ggcccaagcgtcttccccctggcacctcctccaagagcacctctggcggcacagccgcccctgggctgcctg  
 gtcaaggactacttccccgaacccgtgacccgtgagctggaaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacacc  
 tccccgctgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacccgtgcctccagcagcttg  
 ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc  
 aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacccctgccagcacctgaactcctgggggggaccctcagtcctc  
 ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcaatgcgtggtggtggac  
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca  
 aagccccgggaggagcagtacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcacogtctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc  
 aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaac  
 caggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggc  
 cagcccgagaacaactacaagaccaccctcccgctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag  
 ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac  
 aaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccgcaaa

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), vùng không đổi (421-1410)

## SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của hTINA1-H3

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQIQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFTTAGMQWVQQMPGKLEWMGWINT  
 HSGVPKYAEDFKGRVTFSLDTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), vùng không đổi (141-470)

FIG.6

## SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của hTINA1-L1

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgctacggcgacatccagatg  
 acccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaagccagccaggac  
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcctggcaaggccccaagctgctgatctacagcgccagc  
 taccggtacaccggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc  
 agcctgcagcccaggacttgcgctgtactactgccagcagcactacatcacccccctgaccttggccag  
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtacggtggcgccccctccgtgttcattccccccctccgacgagcag  
 ctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg  
 aaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc  
 tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg  
 acccaccagggcctgagctccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtgt

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

## SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của hTINA1-L1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS  
 YRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)



FIG.7

## SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của hTINA1-L2

atggtgctgcagaccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatcgtgatg  
 acccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac  
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcctggcaaggccccaagctgctgatctacagcgccagc  
 taccgggtacaccggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc  
 agcctgcagcccaggacttcgcccgtgtactactgccagcagcaactacatcacccccctgacctttggccag  
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtacgggtggccgccccctcogtgttcattcttccccccctccgacgagcag  
 ctgaagtccggcacgcctccgtggtgtgctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg  
 aaggtggacaacgccctgcagtcgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc  
 tacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg  
 acccaccaggggcctgagctccccogtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

## SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của hTINA1-L2

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS  
 YRYTGVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

## FIG.8

## SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của hTINA1-L3

atgggtgctgcagacccaggtgttcattctccctgctgctgtggatctccggcgcggtacggcgacatcgtgatg  
 acccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacatgcaaggccagccaggac  
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcccggaagcagcccaagctgctgatctacagcgccagc  
 taccggtacacggcggtgccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagc  
 agcctgcagcccgaggacttcgcccgtgtactactgccagcagcactacatcacccccctgacctttggccag  
 ggcaccaagctggaaatcaagcgtacggtggcgccccctccgtgttcattctccccctccgacgagcag  
 ctgaagtcgggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtgg  
 aaggtggacaacgccctgcagtcggggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacc  
 tacagcctgagcagcaccctgacctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtg  
 acccaccagggcctgagctccccgtcaccaagagcttcaacaggggggagtg

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-387), vùng không đổi (388-702)

## SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của hTINA1-L3

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKQPKLLIYSAS  
 YRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-129), vùng không đổi (130-234)

## FIG.9

SEQ ID NO: 23: Trình tự axit amin của CDRH1 kháng thể TINA1

TAGMQ

SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của CDRH2 kháng thể TINA1

WINTHSGVPKYAEDFKG

SEQ ID NO: 25: Trình tự axit amin của CDRH3 kháng thể TINA1

SGFGSSYWYFDV

SEQ ID NO: 26: Trình tự axit amin của CDRL1 kháng thể TINA1

KASQDVSTAVA

SEQ ID NO: 27: Trình tự axit amin của CDRL2 kháng thể TINA1

SASYRYT

SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của CDRL3 kháng thể TINA1

QQHYITPLT

FIG.10

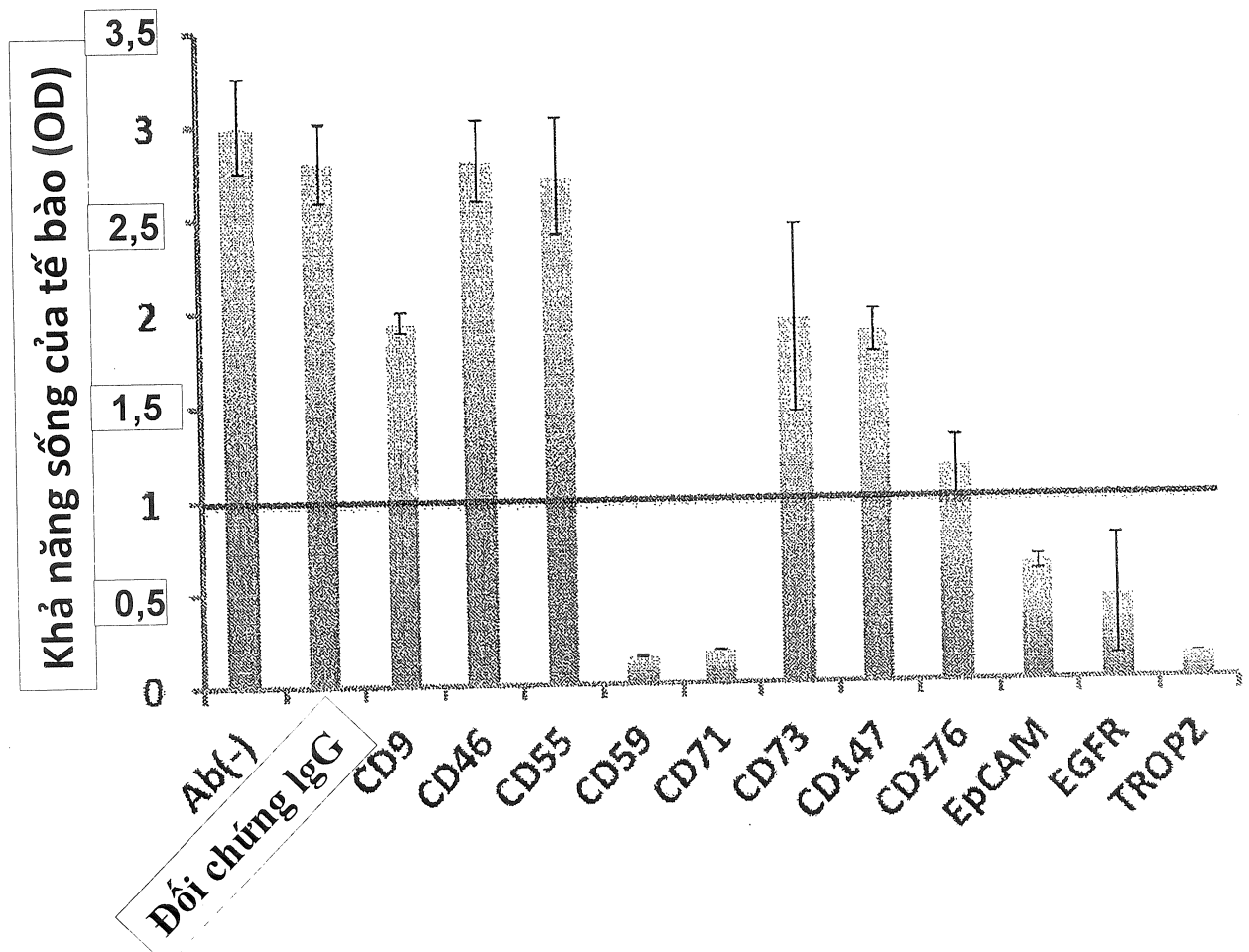


FIG.11

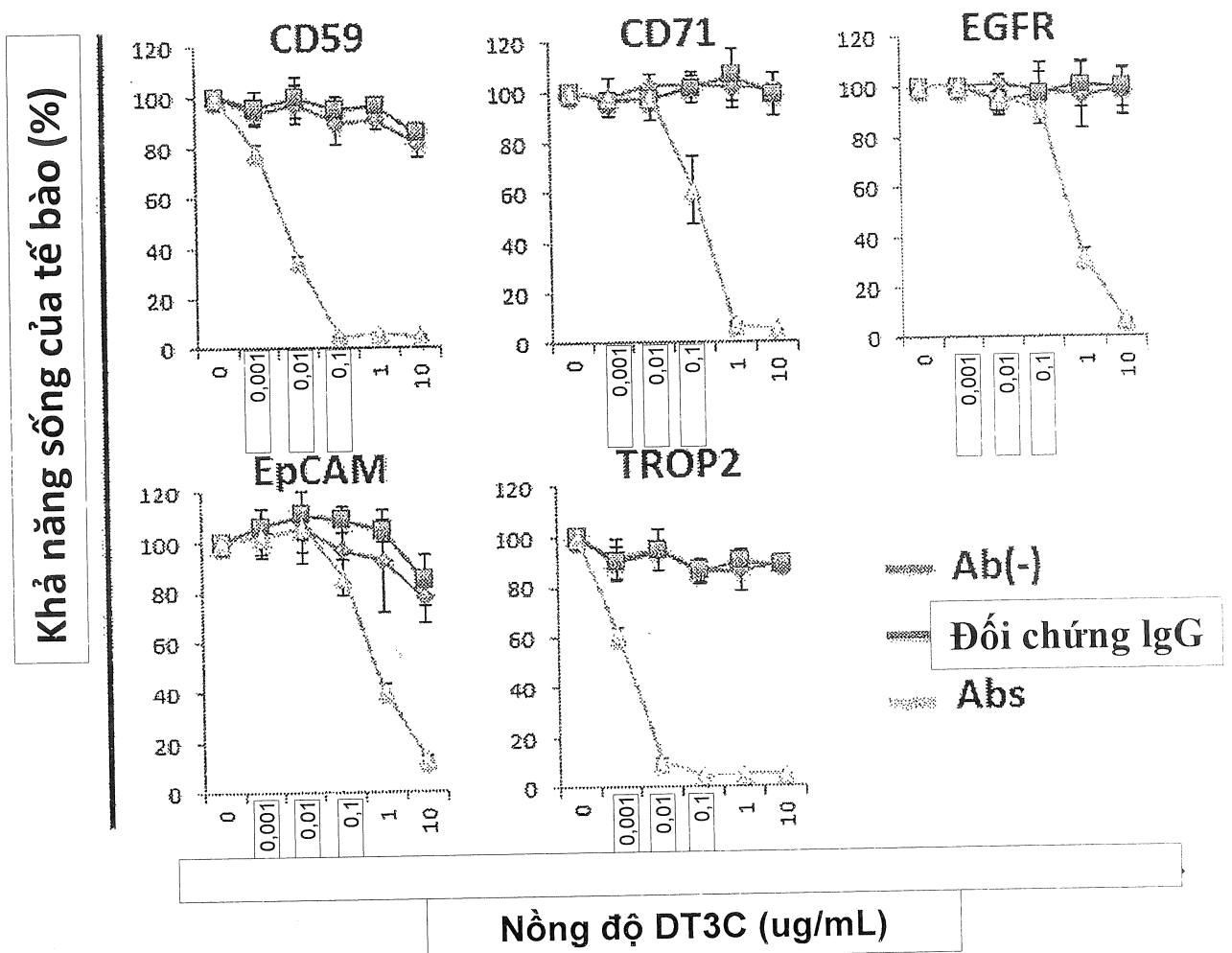


FIG. 12

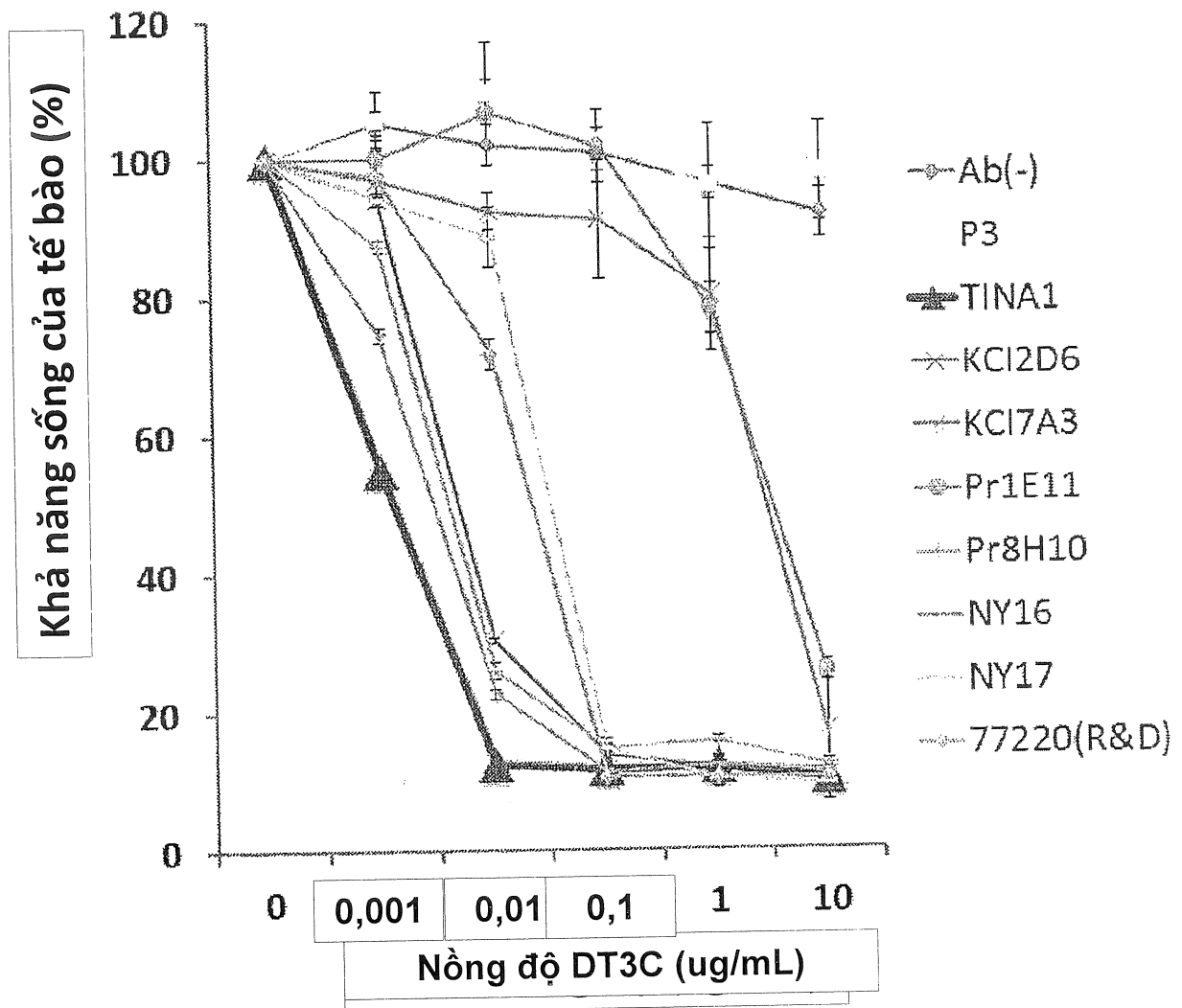


FIG. 13

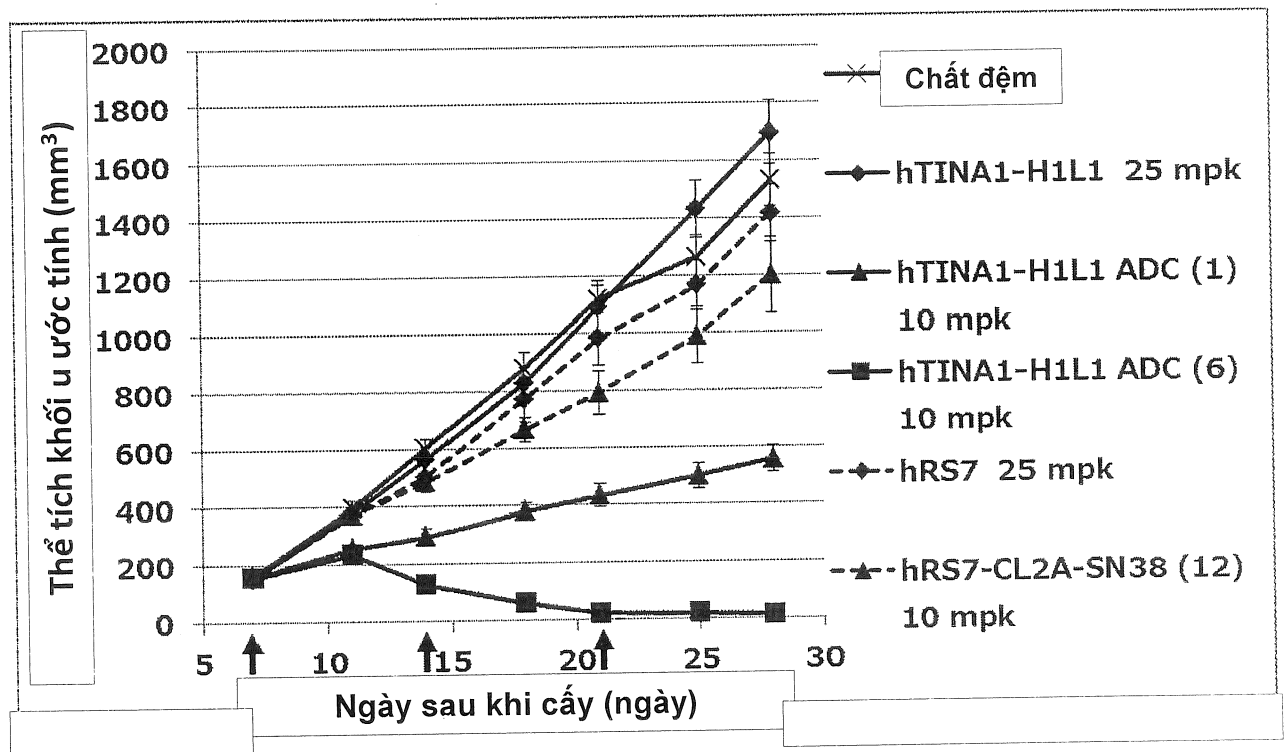


FIG.14

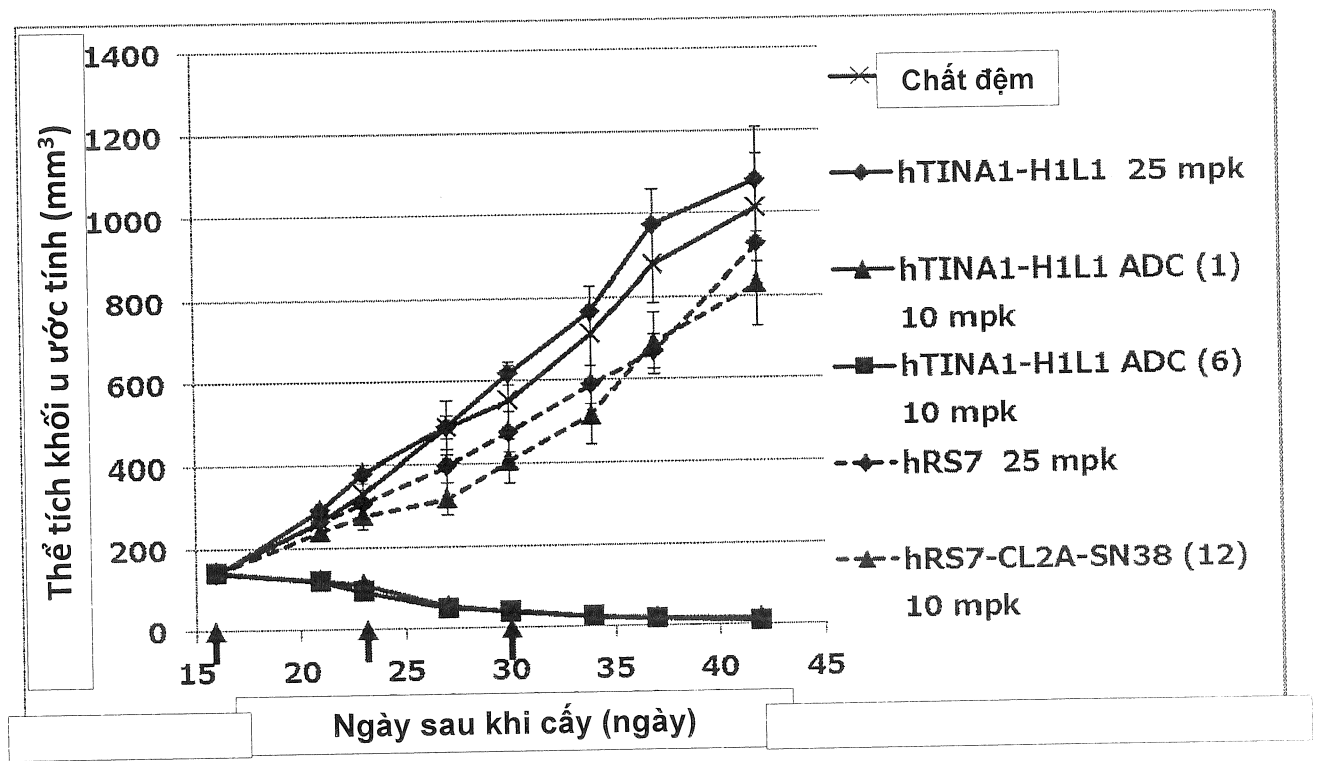




FIG.15

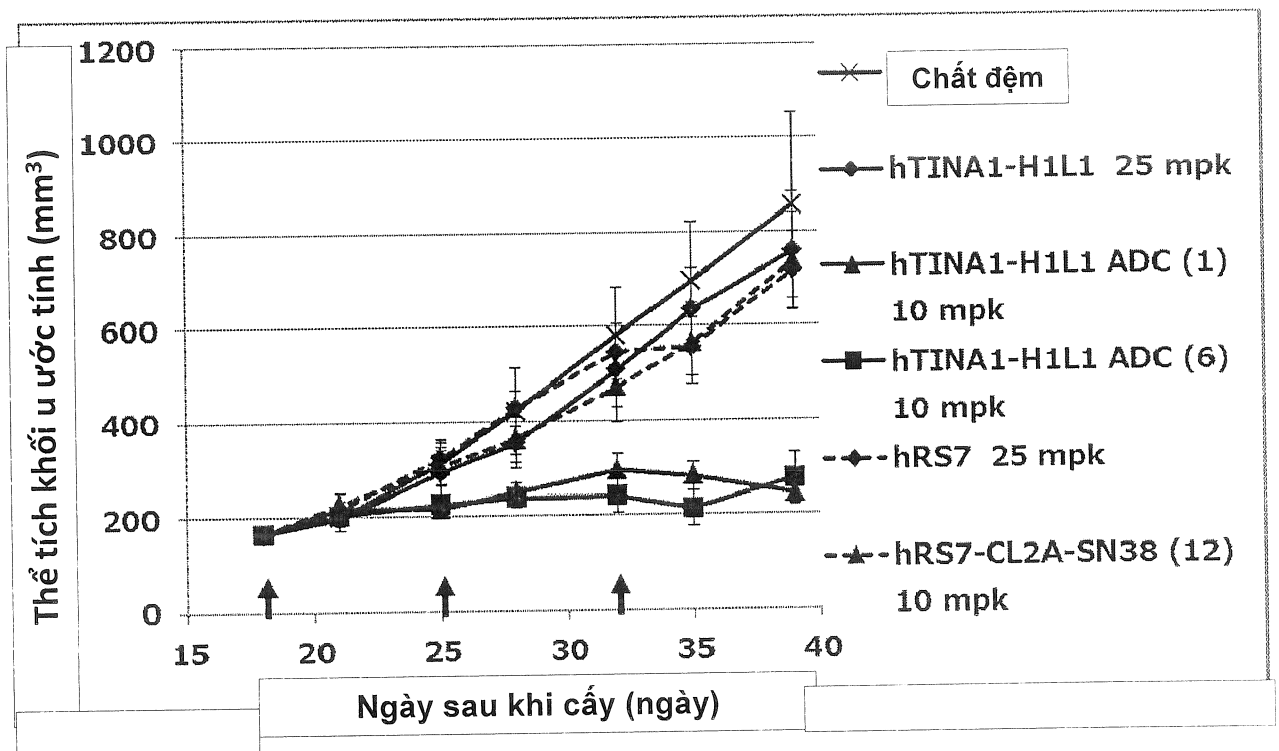


FIG.16

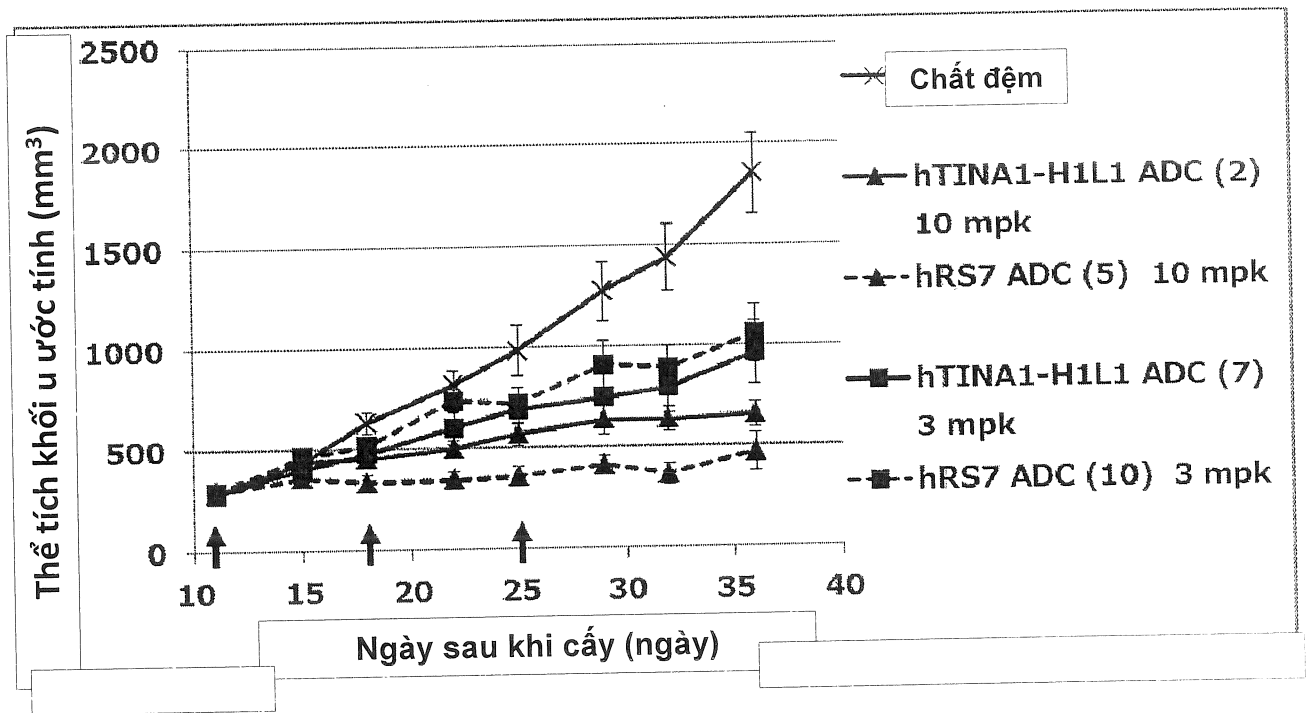


FIG.17

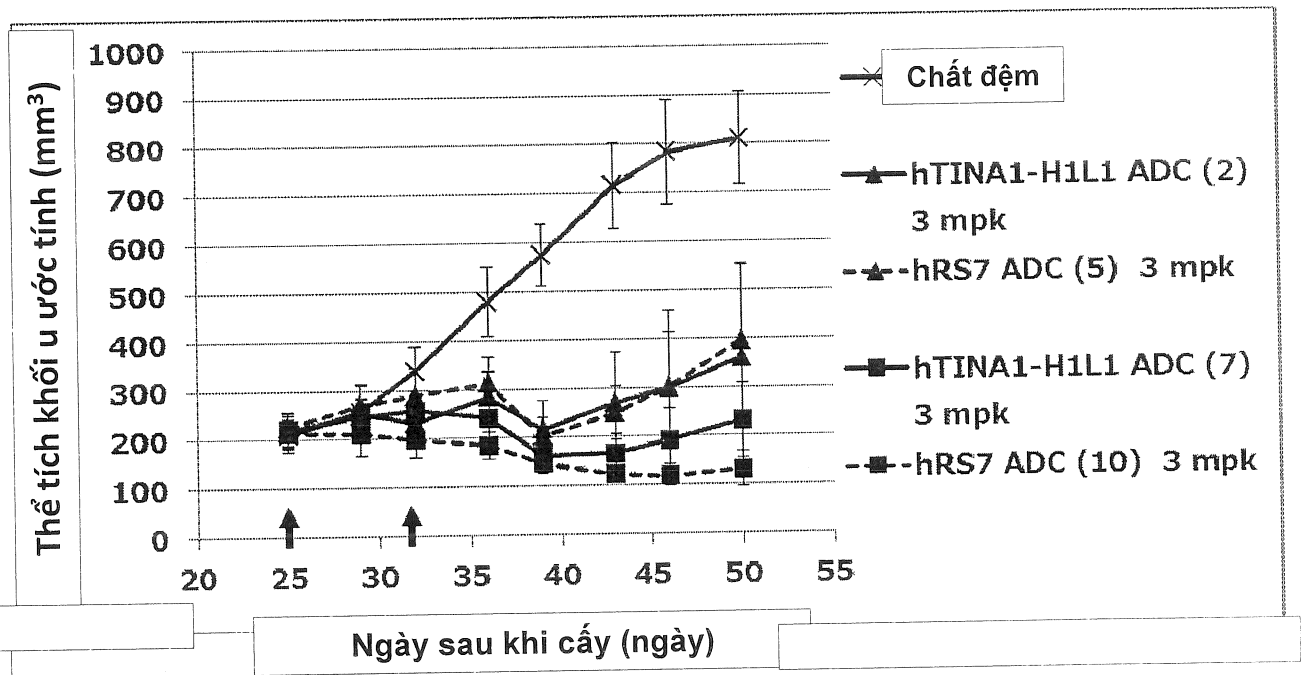


FIG.18

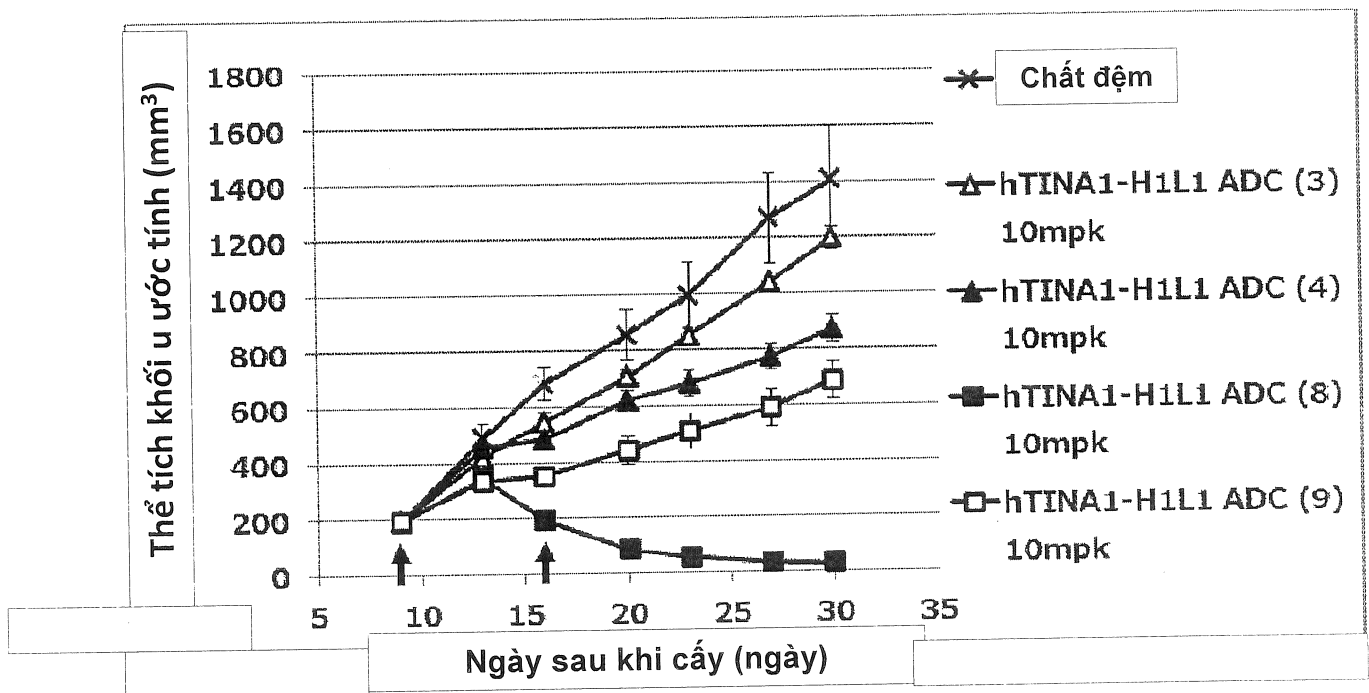


FIG.19

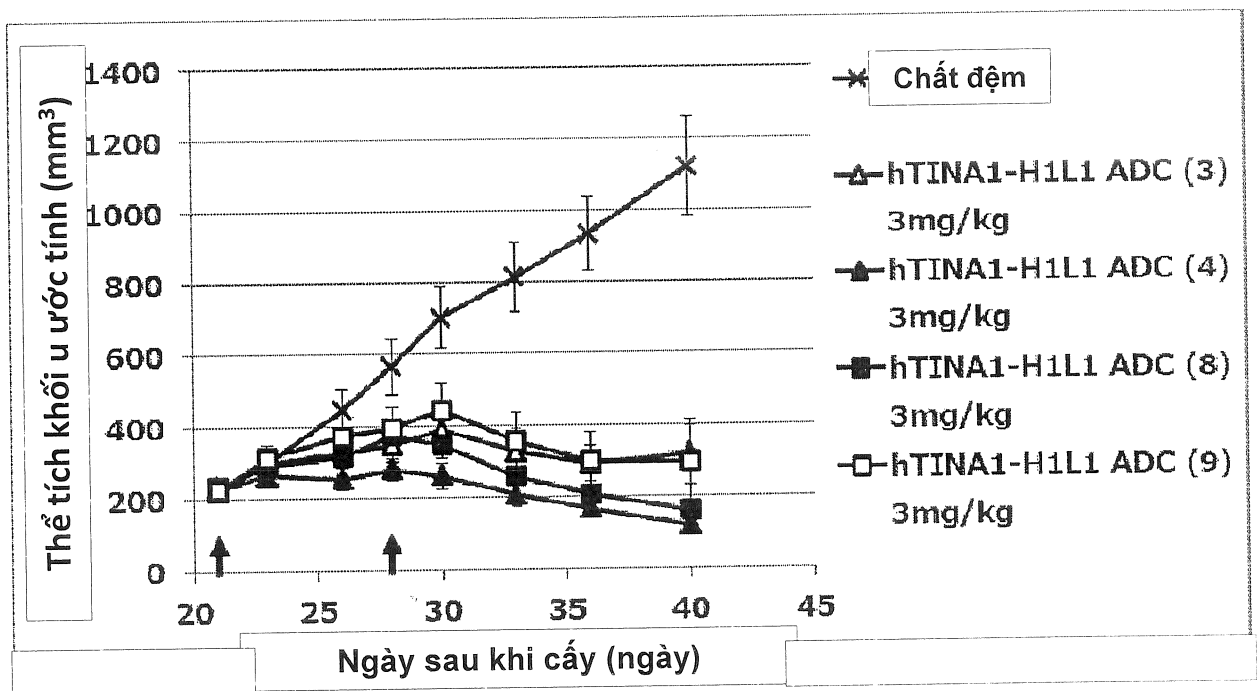


FIG.20

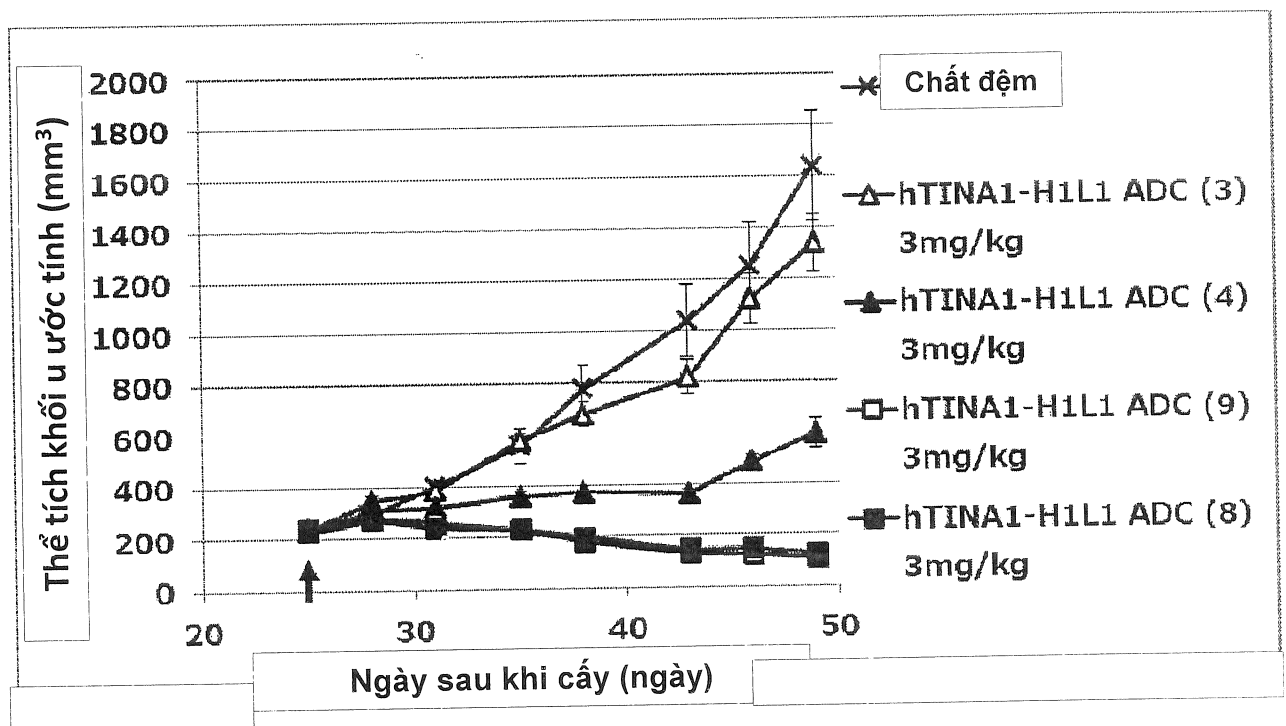


FIG.21

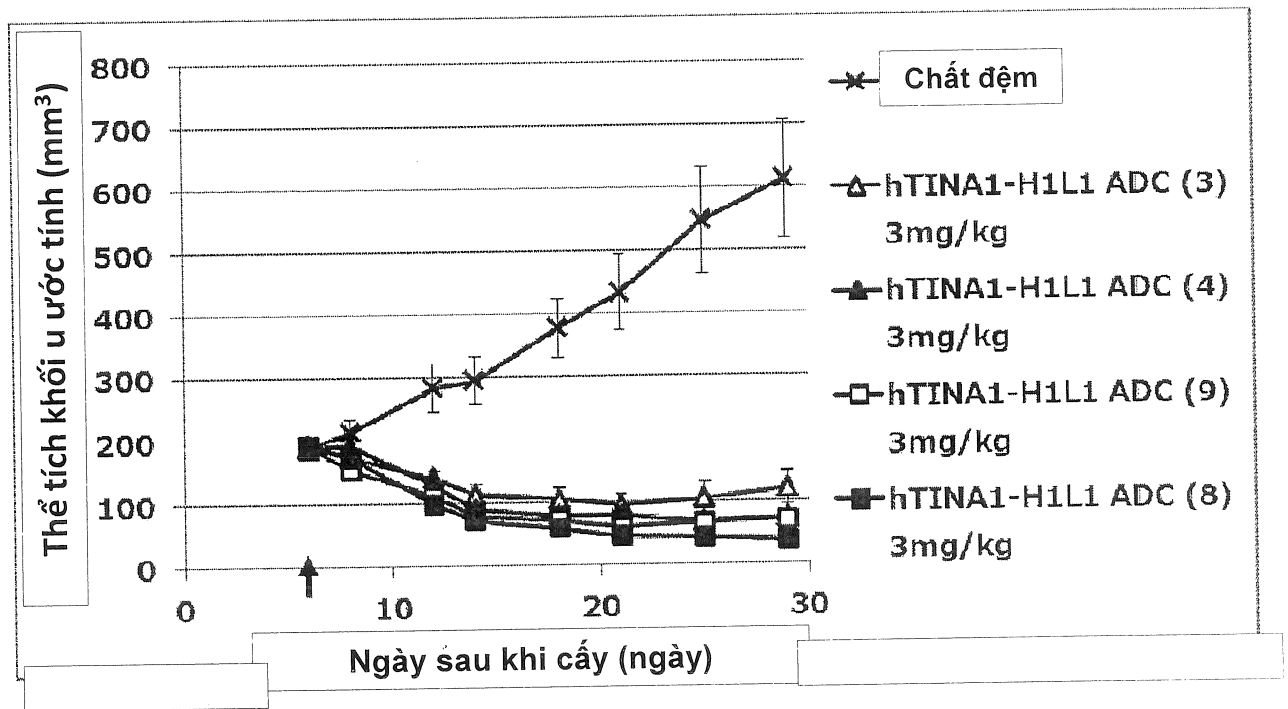


FIG.22

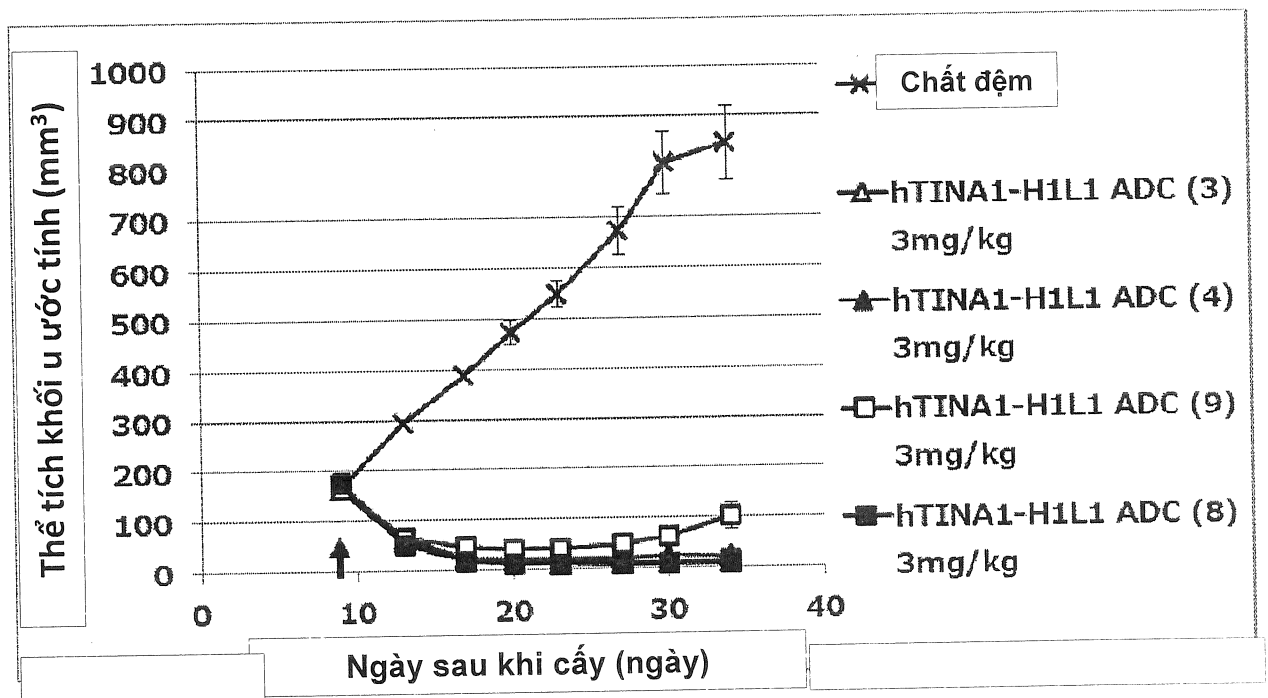




FIG.23

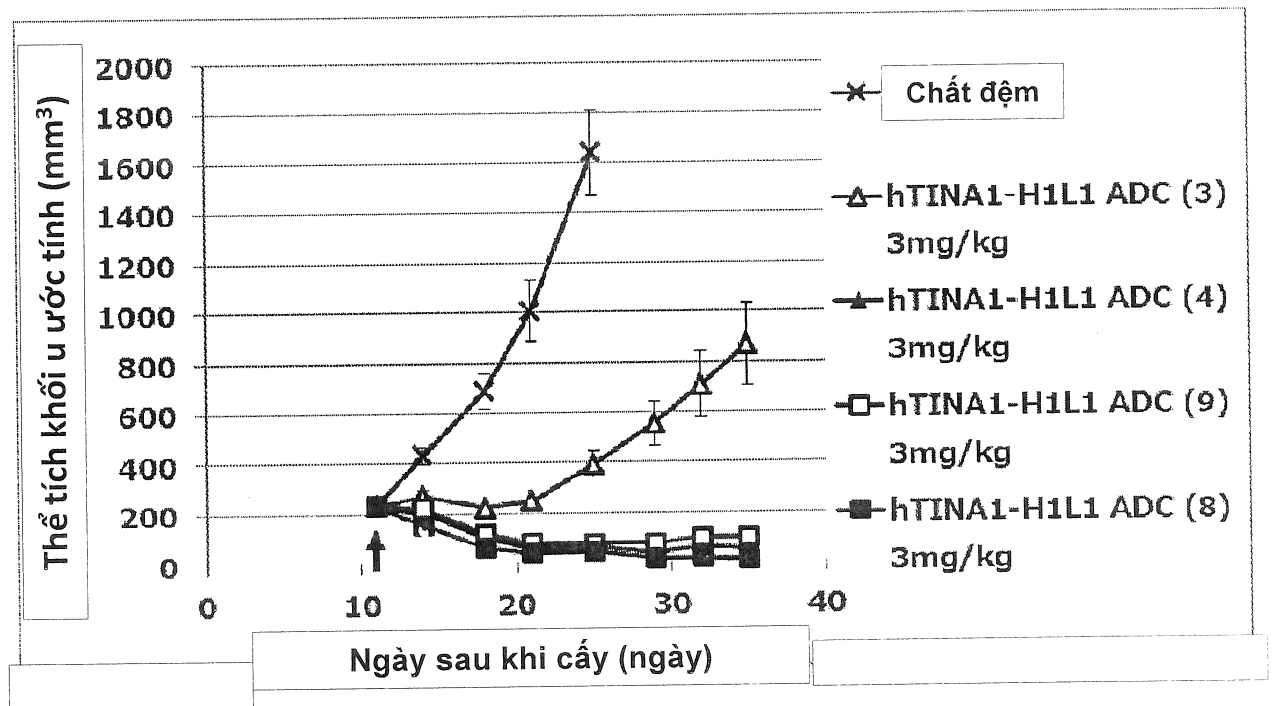


FIG.24

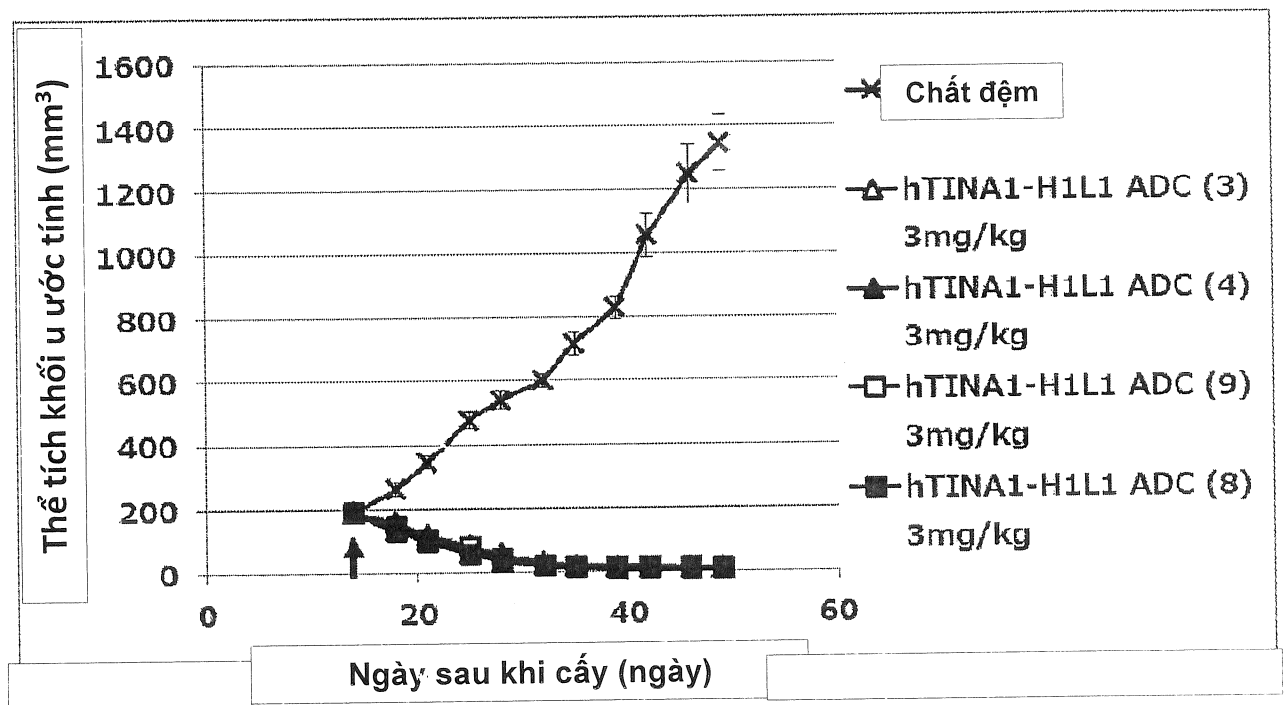


FIG.25

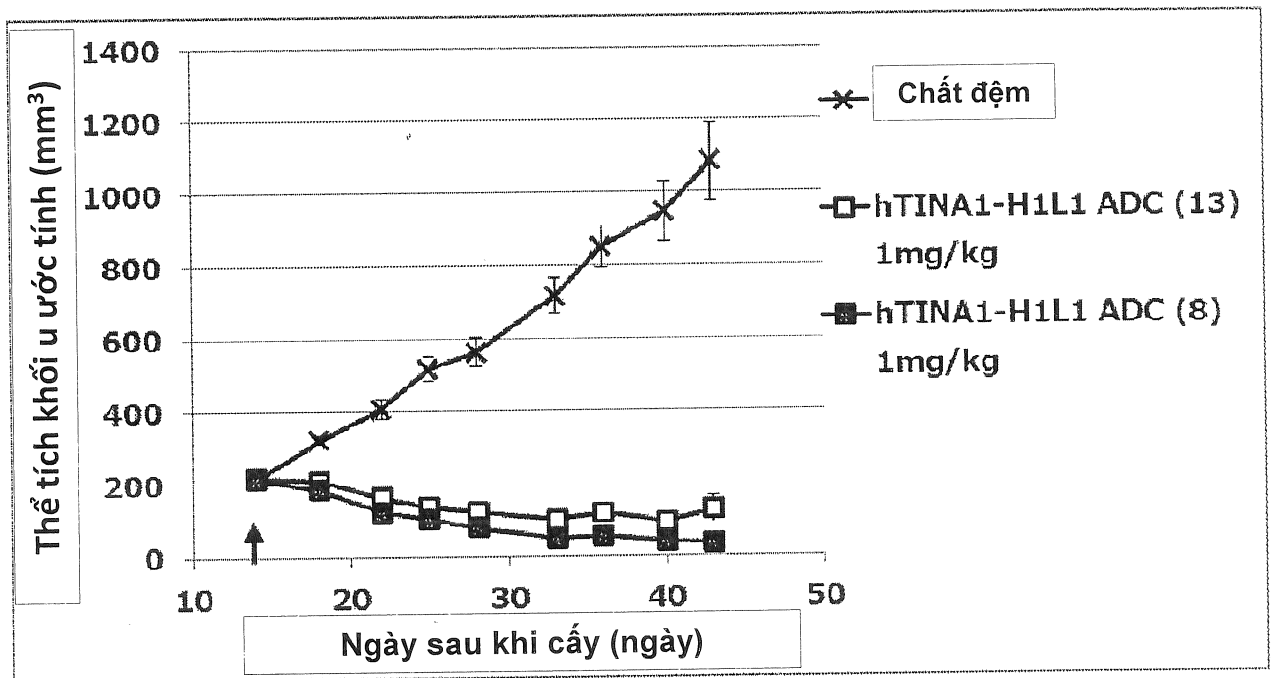


FIG.26

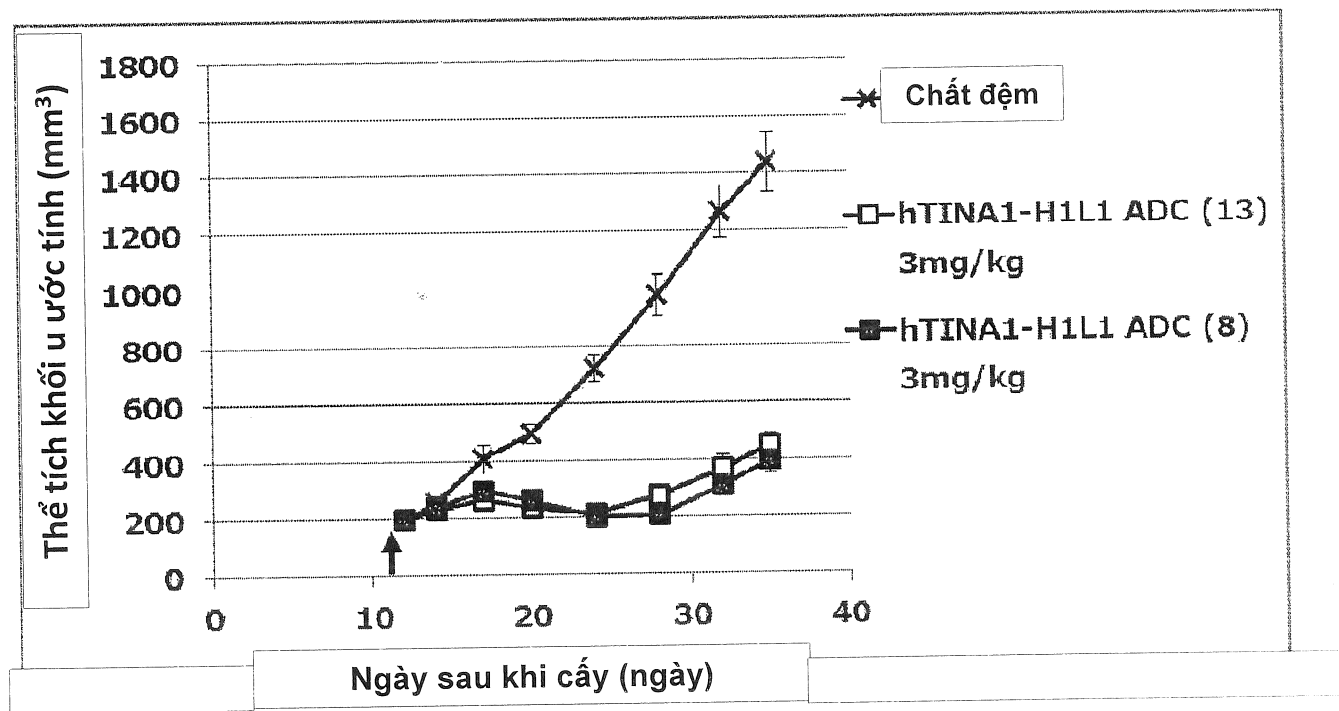
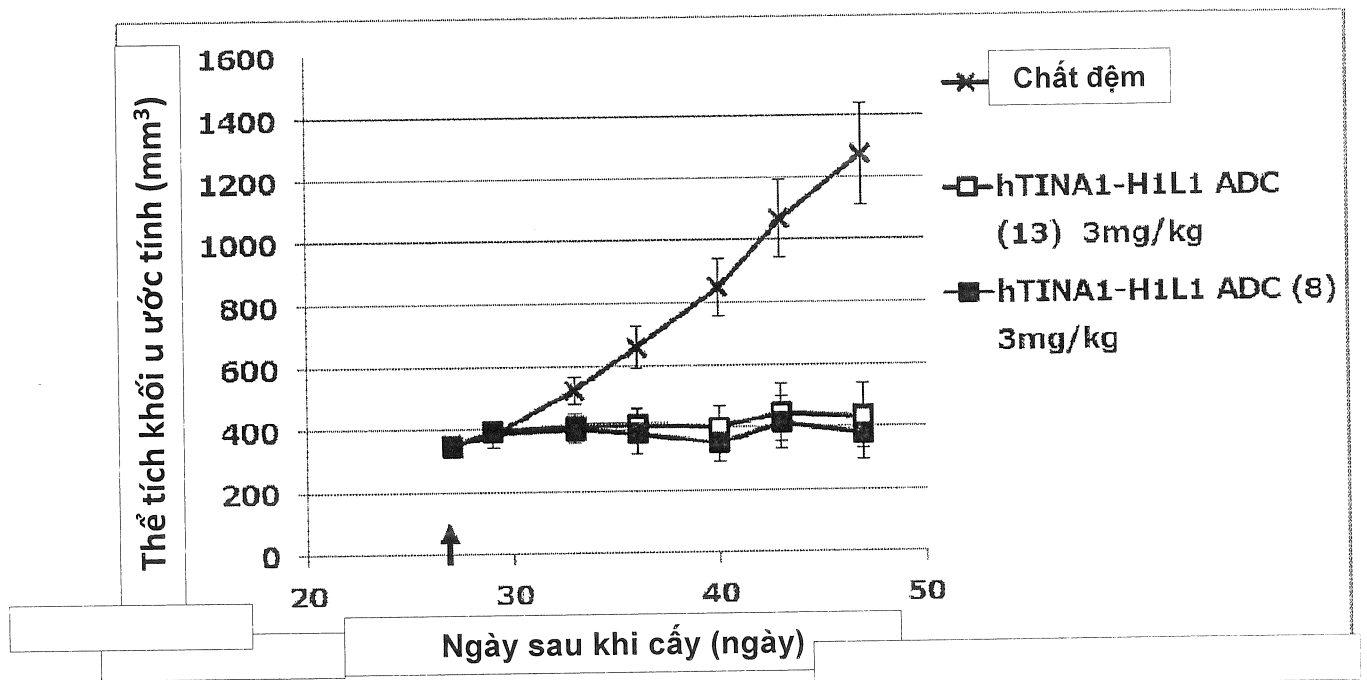


FIG. 27



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ LIÊN HỢP THUỐC-KHÁNG THỂ

<130> PD20-9007WO

<150> JP2013-267548

<151> 2013-12-25

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaggatc | 60  |
| tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca actgctggaa tgcagtgggt gcaaaagatg  | 120 |
| ccaggaaagg gtttgaagtg gattggctgg ataaacaccc actctggagt gccaaaatat  | 180 |
| gcagaagact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcatat  | 240 |
| ttacagataa gcaacctcaa aaatgaggac acgactacgt atttctgtgc gagatcgggg  | 300 |
| ttcggtagta gctactggta cttcgatgtc tggggcgagc ggaccgcggt caccgtctcc  | 360 |
| tca                                                                | 363 |

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 3  
<211> 327  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 3  
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca 120  
ggacaatctc cttaaactgct gatttactcg gcatactacc gctacactgg agtccttgat 180  
cgcttactg gcagtggatc tgggacggct ttcaatttca ccatcagcag tgtgcaggct 240  
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gtccgggtgct 300  
gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327

<210> 4  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala  
100 105

<210> 5  
<211> 449  
<212> ADN  
<213> NGƯỜI

<400> 5  
gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcatct cctgctgct 60  
gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120  
cgtgttcatc ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg 180  
cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct 240  
gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300  
cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360  
cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca ggggggagtg 420  
ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

<210> 6  
<211> 1132  
<212> ADN  
<213> NGƯỜI

<400> 6  
gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttctctctgc tgggtggcagc 60  
tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag 120  
ggcccaagcg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc 180  
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccctgta ccgtgagctg gaactcaggc 240  
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc 300  
ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac 360  
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 420  
aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tgggggggacc ctcagtcttc 480



ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 540  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 600  
 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccc cgaggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 660  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 720  
 aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc 780  
 cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 840  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 900  
 gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccacc ctcccggtgt ggactccgac 960  
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac 1020  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacca gaagagcctc 1080  
 tccctgtctc ccggcaaatg agatatcggg ccggtttaa cgggggaggc ta 1132

<210> 7

<211> 1410

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 7

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
 atccagttgg tgagctctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caggatctcc 120  
 tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaact gctggaatgc agtgggtgca aaagatgcc 180  
 ggaaagggtt tgaagtggat tggctggata aacacccact ctggagtgcc aaaatatgca 240  
 gaagacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcataattta 300  
 cagataagca acctcaaaaa tgaggacacg actacgtatt tctgtgagag atcgggggtc 360  
 ggtagtagct actggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccgcggtcac cgtcagctca 420  
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgtgtcct gcagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
 aaatcttggtg acaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 8

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 8

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Lys Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Lys Trp Ile Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125  
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 9  
<211> 702  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 khảm người-chuột

<400> 9  
atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc

```

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc      120
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca      180
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcatacctacc gctacactgg agtccctgat      240
cgcttcactg gcagtggatc tgggacggct ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct      300
gaagacctgg cagttttatta ctgtcagcaa cattatatta ctccgctcac gttcgggtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa acgggctgtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taactttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt                          702

```

<210> 10

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể TINA1 khâm người-chuột

<400> 10

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1              5              10              15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20              25              30

```

```

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35              40              45

```

```

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50              55              60

```

```

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65              70              75              80

```

```

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85              90              95

```

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 115 120 125

Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 11

<211> 1410

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với người,  
 typ H1

<400> 11

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180

ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacacccaca gcggcggtgcc caaatacgcc 240

gaggacttca agggcagagt gaccatcagc gccgacacca gcacctccac agcctacctg 300

cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360  
 ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420  
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcctgatctc ccggaccctt 840  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccggggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccctcgagaa aaccatctcc 1080  
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacacce tgccccatc ccgggaggag 1140  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 12

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích  
 với người,  
 typ H

<400> 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | His | Leu | Trp | Phe | Phe | Leu | Leu | Leu | Val | Ala | Ala | Pro | Arg | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240



Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 13  
<211> 1410  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với người,  
typ H2

<400> 13  
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaaccag gcgccagcgt gaaggtgtcc 120  
tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgcg ccaggctcct 180  
ggacagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gcggcgtgcc caaatagcc 240  
gaggacttca agggcagagt gaccatcagc ctggacacca gcacctccac cgcctacctg 300  
cagctgagca gcctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360  
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420  
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
ggcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc 540  
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
aaatcttggt acaaaactca cacatgccca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840  
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900  
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020  
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080  
aaagccaaag gccagccccg gyaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 14  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích  
 với người,  
 typ H2

<400> 14

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 15  
 <211> 1410  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích với  
 người,  
 typ H3

<400> 15  
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
 atccagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gcgagagcgt gaaggtgtcc 120  
 tgcaaggcca gcggctacac ctttaccacc gccggcatgc agtgggtgca gcagatgcct 180  
 ggcaagggcc tggaatggat gggctggatc aacaccaca gcggcgtgcc caaatacgcc 240  
 gaggacttca agggcagagt gaccttcagc ctggacacca gcacctccac cgcctacctg 300  
 cagctgagca gctgaagtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag aagcggcttc 360  
 ggacagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccctcgtgac cgtcagctca 420  
 gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc 480  
 ggacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccgt gaccgtgagc 540

tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca 600  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660  
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720  
 aaatcttggt acaaaaactca cacatgccca ccctgcccag cacctgaact cctgggggga 780  
 ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 840  
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 900  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactgggt gaatggcaag 1020  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080  
 aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1140  
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200  
 gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg 1260  
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320  
 cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc 1380  
 cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa 1410

<210> 16

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nặng của TINA1 được làm tương thích  
 với người,  
 typ H3

<400> 16

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Gln Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp  
 115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 17  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo



&lt;220&gt;

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,  
typ L1

&lt;400&gt; 17

```

atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc      60
gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtggggcga cagagtgacc      120
atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctgggtatca gcagaagcct      180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc      240
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaagc tggaatatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt                          702

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,  
typ L1

&lt;400&gt; 18

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20           25           30

```

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35           40           45

```

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 19

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,  
typ L2

<400> 19  
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60  
 gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 120  
 atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctgggtatca gcagaagcct 180  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc 240  
 agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc 300  
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttgccag 360  
 ggcaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420  
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taactttctac 480  
 cccagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540  
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600  
 ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660  
 ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac aggggggaggt gt 702

<210> 20

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người ,  
 typ L2

<400> 20

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 21

<211> 702

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người, typ L3

<400> 21

atgggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

gacatcgtga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtagggcga cagagtgacc 120

atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc acagccgtgg cctggatatca gcagaagccc 180

```

ggcaagcagc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc      240
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac ctttggccag      360
ggcaccaagc tggaatatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc      420
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac      480
cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag      540
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc      600
ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc      660
ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt                          702

```

<210> 22  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của TINA1 được làm tương thích với người,  
 typ L3

<400> 22  
 Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 23  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 23

Thr Ala Gly Met Gln  
1 5

<210> 24  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 24

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 25

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 27

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 28

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 29  
 <211> 1410  
 <212> ADN  
 <213> Người

<400> 29  
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagccag 60  
 gtgcagctgc agcagagcgg cagcgagctg aagaagcctg gcgccagcgt caaggtgtcc 120  
 tgcaaggcca gcggctacac cttcaccaac tacggcatga actgggtgaa gcaggcccca 180

```

ggccagggcc tgaagtggat gggctggatc aacacctaca ccggcgagcc cacctacacc      240
gacgacttca agggccgggt cgccttcagc ctggacacca gcgtgagcac cgcctacctg      300
cagatcagca gcctgaaggc cgacgatacc gccgtgtact tctgcgccag aggcggcttc      360
ggcagcagct actggtactt cgacgtgtgg ggccagggca gcctggtgac cgtgagctca      420
gcctccacca agggcccaag cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggc      480
ggcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gaccgtgagc      540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgctgtcct gcagtcctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      720
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccctgccag cacctgaact cctgggggga      780
ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cccgggagga gcagtacaac      960
agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtcttgacc aggactggct gaatggcaag     1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1080
aaagccaaag gccagccccg ggaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag     1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1200
gccgtggagt gggagagcaa tggccagccc gagaacaact acaagaccac ccctcccgtg     1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1320
cagcagggca acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacc     1380
cagaagagcc tctccctgtc tcccggcaaa                                     1410

```

<210> 30  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Người

<400> 30

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys  
 20 25 30



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Thr | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Lys | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Pro | Thr | Tyr | Thr |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Asp | Asp | Phe | Lys | Gly | Arg | Phe | Ala | Phe | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Val | Ser |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Asp | Asp | Thr | Ala | Val |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |
| Tyr | Phe | Cys | Ala | Arg | Gly | Gly | Phe | Gly | Ser | Ser | Tyr | Trp | Tyr | Phe | Asp |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Ser | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 31  
 <211> 702  
 <212> ADN  
 <213> Người

<400> 31  
 atggtgctgc agaccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60  
 gatatccagc tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgtcc 120  
 atcacatgca aggccagcca ggacgtgtcc attgccgtgg cctgggtatca gcagaagccc 180  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacagc gccagctacc ggtacaccgg cgtgcccagc 240  
 agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300  
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cactacatca cccccctgac cttcggagcc 360  
 ggcaccaagg tggaaatcaa gcgtacggtg gccgccccct ccgtgttcat cttccccccc 420  
 tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa taacttctac 480  
 cccagagagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg gaactcccag 540  
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600  
 ctgagcaaag ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660  
 ctgagctccc ccgtcaccaa gagcttcaac agggggggagt gt 702

<210> 32  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Người

<400> 32

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45

Val Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr  
100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mỗi mG2aVR2

<400> 33

agagttccag gtcaagggtca ctggctcagg

<210> 34

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi mKVR2

<400> 34

agtccaactg ttcaggacgc cattttgtcg

30

<210> 35

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi 3.3-F1

<400> 35

tataccgtcg acctctagct agagcttggc

30

<210> 36

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi 3.3-R1

<400> 36

gctatggcag ggctgccgc cccgacgttg

30

<210> 37

<211> 47

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1H-F

<400> 37

ccagatgggt gctgagccag atccagttgg tgcagtctgg acctgag

47

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1H-R

<400> 38

cttggtggag gctgagctga cggtgaccgc ggtccctgcg ccccagac

48

<210> 39  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1L-F

<400> 39  
atctccggcg cgtacggcga cattgtgatg acccagtctc acaaattc

48

<210> 40  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi TINA1L-R

<400> 40  
ggagggggcg gccacagccc gtttcagctc cagcttggtc ccagc

45

<210> 41  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi EG-Inf-F

<400> 41  
agctcccaga tgggtgctga gc

22

<210> 42  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi EG1-Inf-R

<400> 42  
gggcccttgg tggaggctga gc

22

<210> 43  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi CM-LKF

<400> 43  
ctgtggatct ccggcgcgta cggc

24

<210> 44  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự nucleotit đoạn mồi KCL-Inf-R

<400> 44  
ggagggggcg gccaccgtac g

21