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

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

(11) **1-0051551**

(51)[2021.01] **A61K 47/68**

(13) **B**

(21) 1-2022-03424
(22) 02/03/2017
(62) 1-2018-04229
(86) PCT/US2017/020529 02/03/2017
(87) WO 2017/151979 08/09/2017
(30) 62/302,562 02/03/2016 US
(45) 25/09/2025 450
(43) 25/08/2022 413A
(73) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
6-10 Koishikawa, 4-Chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan
(72) ALBONE, Earl, F. (US); CHENG, Xin (US); CUSTAR, Daniel, W. (US); FURUUCHI, Keiji (JP); LI, Jing (US); MAJUMDER, Utpal (US); UENAKA, Toshimitsu (JP).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT DỰA TRÊN ERIBULIN, DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ LIÊN HỢP NÀY

(21) 1-2022-03424

(57) Sáng chế đề cập đến nhóm liên kết độc tố và thể liên hợp kháng thể-dược chất gắn kết với kháng nguyên ung thư đích của người như thụ thể folat alpha và/hoặc tạo ra hoạt tính dược chất kháng-tubulin. Nhóm liên kết độc tố và thể liên hợp kháng thể-dược chất bao gồm gốc dược chất eribulin và có thể được nội bào hóa vào trong tế bào biểu hiện kháng nguyên đích. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp và chế phẩm để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư bằng cách sử dụng thể liên hợp kháng thể-dược chất được đề xuất ở đây.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp kháng thể dược chất (ADC - antibody drug conjugate) gắn kết đích kháng nguyên ung thư của người như thụ thể folat alpha và/hoặc mang lại hoạt tính dược chất kháng-tubulin. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp và chế phẩm hữu dụng trong điều trị và chẩn đoán bệnh ung thư mà biểu hiện thụ thể folat alpha và/hoặc có vai trò trong điều trị bằng cách làm gián đoạn tubulin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh ung thư nằm trong số những nguyên nhân hàng đầu gây bệnh hoặc tử vong trên toàn thế giới, với xấp xỉ 14 triệu ca mắc bệnh mới và 8,2 triệu trường hợp tử vong liên quan đến ung thư vào năm 2012. Bệnh ung thư gây chết phổ biến nhất là các bệnh ung thư: phổi (1,59 triệu trường hợp tử vong); gan (745.000 trường hợp tử vong); dạ dày (723.000 trường hợp tử vong); trực kết tràng (694.000 trường hợp tử vong); vú (521.000 trường hợp tử vong); và thực quản (400.000 trường hợp tử vong). Số ca ung thư mới được dự đoán là tăng khoảng 70% trong hai thập kỉ tới, đến khoảng 22 triệu ca ung thư mới mỗi năm (Báo cáo thế giới về bệnh ung thư 2014).

Vi cấu trúc hình ống là các protein khung tế bào dạng sợi động học có liên quan đến hàng loạt chức năng tế bào, bao gồm di chuyển và vận chuyển nội bào, truyền tín hiệu tế bào, và duy trì hình dạng tế bào. Các vi cấu trúc hình ống cũng đóng vai trò then chốt trong giai đoạn phân chia gián phân tế bào bằng cách tạo ra thoi gián phân cần phải có để tách nhiễm sắc thể thành hai tế bào con. Chức năng sinh học của vi cấu trúc hình ống trong tất cả các tế bào được điều hòa phần lớn bởi động lực polyme hóa của chúng, điều này xảy ra nhờ sự cộng thuận nghịch, không cộng hóa trị của dime α và β tubulin ở cả hai đầu của các vi cấu trúc hình ống. Phản ứng động học và sự kiểm soát có được trên chiều dài vi cấu trúc hình ống là cần thiết cho việc thực hiện chức năng đúng của thoi gián phân. Thậm chí thay đổi rất nhỏ của động học vi cấu trúc hình ống có thể tham gia vào điểm kiểm soát của thoi,

kìm hãm chu trình tế bào khi nguyên phân, và sau đó dẫn đến chết tế bào (Mukhtar et al. (2014) Mol. Cancer Ther. 13:275-84). Do sự phân chia tế bào nhanh chóng của chúng, các tế bào ung thư thường nhạy cảm hơn với các hợp chất gắn kết với tubulin và làm gián đoạn chức năng thông thường của nó, so với tế bào bình thường. Vì lý do này, các yếu tố ức chế tubulin và các tác nhân hướng đích vi cấu trúc hình ống trở thành nhóm dược chất hứa hẹn để điều trị bệnh ung thư (Dumontet và Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803).

Thụ thể folat alpha (FRA) là một protein màng liên kết glycophosphatidylinositol (GPI) mà protein này gắn kết với folat. Trong khi vai trò của FRA trong sinh học của các mô thông thường và mô ung thư vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn, nó được biểu hiện quá mức rất cao ở một tỷ lệ phần trăm cao của bệnh ung thư buồng trứng có nguồn gốc biểu mô (O'Shannessy et al. (2013) Int. J. Gynecol. Pathol. 32(3):258-68), cũng như ở một tỷ lệ phần trăm caxinom phổi tế bào không nhỏ (Christoph et al. (2014) Clin. Lung Cancer 15(5):320-30). FRA cũng có mức biểu hiện hạn chế ở các mô bình thường. Các đặc điểm này khiến FRA là đích hấp dẫn của liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư.

Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người (*HER2*- human epidermal growth factor receptor 2) của gen ung thư sớm (proto-oncogene) mã hóa thụ thể tyrosin kinaza xuyên màng thuộc họ thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR- epidermal growth factor receptor) của người (King et al. (1985) Science 229:974-6). Sự biểu hiện quá mức HER2 cho phép hoạt hóa kiểu cấu trúc con đường truyền tín hiệu yếu tố phát triển, như con đường PI3K–AKT–mTOR, và bằng cách đó sử dụng như là yếu tố điều khiển bệnh ung thư trong một số kiểu bệnh ung thư, bao gồm khoảng 20% caxinom vú xâm lấn (Slamon et al. (1989) Science 244:707-12; Gajria và Chandarlapaty (2011) Expert Rev. Anticancer Ther. 11:263-75). Cho rằng sự khuếch đại HER2 làm trung gian cho phenotip biến đổi, HER2 là một đích hứa hẹn khác để điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bộc lộ, một phần, hợp chất mới có hoạt tính sinh học chống lại tế bào khối u. Các hợp chất này có thể ức chế sự phát triển khối u ở động vật có vú, và có thể hữu dụng để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh ung thư ở người.

Sáng chế cụ thể hơn đề cập đến hợp chất là thể liên hợp kháng thể-dược chất có khả năng gắn kết, nội bào hóa, và diệt tế bào khối u (ví dụ, tế bào khối u biểu hiện FRA). Hợp chất là thể liên hợp kháng thể-dược chất bao gồm nhóm liên kết gắn gốc dược chất với gốc

kháng thể được bộc lộ. Hợp chất là thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) có thể có công thức I:

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

trong đó Ab là kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích là tế bào khối u;
D là eribulin;
L là nhóm liên kết phân cắt được gắn kiểu cộng hóa trị Ab với D; và
p là số nguyên có giá trị từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là ổn định bên ngoài tế bào, sao cho ADC vẫn nguyên vẹn khi xuất hiện trong điều kiện ngoại bào nhưng có khả năng tách ra khi nội bào hóa trong tế bào, ví dụ, tế bào ung thư. Theo một số phương án, gốc dược chất eribulin được tách ra khỏi gốc kháng thể khi ADC đi vào tế bào biểu hiện kháng nguyên đặc hiệu với gốc kháng thể của ADC, và sự tách sẽ giải phóng dạng chưa biến đổi của eribulin. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm gốc tách được đặt ở vị trí sao cho không phần nào của nhóm liên kết hoặc gốc kháng thể vẫn còn gắn kết với gốc dược chất eribulin khi tách.

Theo một số phương án, gốc tách được trong nhóm liên kết là gốc peptit tách được. Theo một số phương án, ADC bao gồm gốc peptit tách được chứng minh là có mức kết tụ thấp hơn, tỷ lệ kháng thể:dược chất cải thiện, sự diệt đúng đích tế bào ung thư cao hơn, sự diệt sai tế bào đích không bị ung thư giảm đi, và/hoặc lượng mang dược chất (*p*) cao hơn so với ADC bao gồm gốc tách được khác. Theo một số phương án, việc bổ sung gốc tách được làm tăng hiệu lực và/hoặc độc tính tế bào so với nhóm liên kết không tách được. Theo một số phương án, hiệu lực và/hoặc độc tính tế bào tăng lên là ở bệnh ung thư biểu hiện mức độ trung bình kháng nguyên được chọn đích bởi gốc kháng thể của ADC (ví dụ, biểu hiện FRA trung bình). Theo một số phương án, gốc peptit tách được là tách được bởi enzym, và nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym. Theo một số phương án, enzym là cathepsin, và nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi cathepsin. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym (ví dụ, nhóm liên kết phân cắt được bởi cathepsin) biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính cải thiện nêu trên, so với cơ chế tách khác.

Theo một số phương án, gốc peptit tách được trong nhóm liên kết bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm valin-citrullin (Val-Cit). Theo một số phương án, ADC bao gồm Val-Cit chứng minh sự ổn định tăng, sự diệt sai tế bào đích giảm, sự diệt đúng tế bào đích tăng, mức kết tụ giảm, và/hoặc lượng mang dược chất cao hơn so với ADC bao gồm đơn vị axit amin khác hoặc gốc tách được khác.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm ít nhất một đơn vị khoảng cách nối gốc kháng thể với gốc tách được. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết có thể bao gồm ít nhất một gốc polyetylen glycol (PEG). Gốc PEG có thể, ví dụ, bao gồm -$(PEG)_m$-, trong đó *m* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 10. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết bao gồm $(PEG)_2$. Theo một số phương án, ADC bao gồm đơn vị khoảng cách ngắn hơn (ví dụ, $(PEG)_2$) chứng minh mức kết tụ thấp hơn và/hoặc lượng mang dược chất cao hơn so với ADC bao gồm đơn vị khoảng cách dài hơn (ví dụ, $(PEG)_8$) mặc dù chiều dài nhóm liên kết ngắn hơn.

Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết gắn với gốc kháng thể của ADC thông qua gốc maleimit (Mal). Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết được gắn với gốc kháng thể thông qua Mal chứng minh lượng mang dược chất cao hơn so với ADC bao gồm nhóm liên kết gắn với gốc kháng thể thông qua một gốc khác. Theo một số phương án, Mal trong nhóm liên kết là phản ứng với gốc cystein trên gốc kháng thể. Theo một số phương án, Mal trong nhóm liên kết được nối với gốc kháng thể thông qua gốc cystein. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_m$, ví dụ, Mal-$(PEG)_2$. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal gắn gốc kháng thể với gốc tách được trong nhóm liên kết. Theo một số phương án, gốc tách được trong nhóm liên kết là gốc peptit tách được, ví dụ, đơn vị axit amin. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit.

Theo một số phương án, gốc tách được trong nhóm liên kết được nối trực tiếp với gốc dược chất eribulin của ADC, và gốc tách được hoặc được nối trực tiếp với gốc kháng thể hoặc được nối thông qua đơn vị khoảng cách. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách cũng gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với gốc dược chất eribulin. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách mà gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với gốc dược chất eribulin là tự hủy. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách tự hủy có khả năng

giải phóng eribulin chưa biến đổi trong tế bào đích. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách tự hủy bao gồm rượu p-aminobenzylic. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách tự hủy bao gồm p-aminobenzyloxycarbonyl (pAB). pAB trong nhóm liên kết, theo một số phương án, gắn gốc tách được với gốc dược chất eribulin. Theo một số phương án, gốc tách được là gốc peptit tách được, ví dụ, đơn vị axit amin. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Val-Cit-pAB và đơn vị khoảng cách PEG nối nhóm liên kết với gốc kháng thể thông qua Mal.

Theo một số phương án, *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 6, từ 2 đến 5, hoặc tốt hơn là, từ 3 đến 4. Theo một số phương án, *p* bằng 4. Theo một số phương án, một nhóm ADC được đề xuất, và giá trị *p* trung bình trong nhóm này là khoảng 4 (ví dụ, 3,5-4,5, như khoảng 3,8). Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB và *p* bằng 4. Theo một số phương án, một nhóm ADC được đề xuất, trong đó mỗi ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB, và giá trị *p* trung bình trong nhóm là khoảng 4 (ví dụ, 3,5-4,5, như khoảng 3,8).

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa (Ab hoặc gốc Ab) của ADC là kháng thể kháng-thụ thể folat alpha (FRA) hoặc mảnh kháng thể nội bào hóa, và có thể gắn kết tế bào khối u biểu hiện FRA (tức là, ADC chọn đích là các tế bào biểu hiện FRA). Theo một số phương án, ADC bao gồm gốc Ab kháng-FRA và gốc peptit tách được chứng minh mức kết tụ thấp hơn, tỷ lệ kháng thể:dược chất cao hơn, sự diệt đúng đích tế bào ung thư cao hơn, sự diệt sai đích tế bào không bị ung thư giảm đi, lượng mang dược chất cao hơn (*p*), hiệu lực và/hoặc độc tính tế bào, tăng lên so với nhóm liên kết không tách được hoặc cơ chế tách khác. Theo một số phương án, hiệu lực và/hoặc độc tính tế bào tăng lên là ở bệnh ung thư biểu hiện mức độ trung bình kháng nguyên được chọn đích bởi gốc kháng thể của ADC (ví dụ, biểu hiện FRA trung bình). Theo một số phương án, gốc peptit tách được là có thể tách bởi enzym, và nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym. Theo một số phương án, enzym là cathepsin, và nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi cathepsin. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym (ví dụ, nhóm liên kết phân cắt được bởi cathepsin) biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính cải thiện nêu trên, so với cơ chế tách khác. Theo một số phương án, nhóm liên kết là Mal-$(PEG)_m$-Val-Cit-pAB.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với thụ thể folat alpha (FRA) và chọn đích tế bào khối u biểu hiện FRA. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba vùng xác định bổ thể (CDR- complementarity determining region) chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:2, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:3, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:4; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:7, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:8, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:9, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:13, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:14, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:15; và các CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:16, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:17, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:18, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm trình tự vùng khung của người. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:23 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết với cùng epitop giống như kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:23 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với epitop bao gồm axit alanin-histadin-lysin- aspartic (AHKD) (SEQ ID NO:365) (O'Shannessy et al., (2011) Oncotarget 2:1227-43). Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với epitop bao gồm NTSQEAHKDVSYL (SEQ ID NO:366).

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa là kháng thể kháng-FRA nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:2, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID

NO:3, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:4; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:7, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:8, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:9, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:13, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:14, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:15; và các CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:16, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:17, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:18, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT; nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và *p* bằng 4. Theo một số phương án, một nhóm các ADC như vậy được đề xuất và *p* bằng khoảng 4 (ví dụ, khoảng 3,8). Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:23 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết cùng epitop giống như kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:23 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với epitop bao gồm SEQ ID NO:365. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với epitop bao gồm SEQ ID NO:366.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 (her2) của người và chọn đích là tế bào khối u biểu hiện her2. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba vùng xác định bổ thể (CDR) chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:71, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:72, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:73; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:74, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:75, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:76, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:191, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:192, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:193; và CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:194, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:195, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có

SEQ ID NO:196, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm trình tự vùng khung của người. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:27 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết cùng epitop giống như kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:27 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:28.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa là kháng thể kháng-her2 nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:71, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:72, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:73; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:74, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:75, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:76, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:191, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:192, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:193; và các CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:194, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:195, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:196, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT; nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và p bằng 4. Theo một số phương án, một nhóm các ADC như vậy được đề xuất và p bằng khoảng 4 (ví dụ, khoảng 3,8). Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:27 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết cùng epitop giống như kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:27 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:28.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa gắn kết với mesothelin (MSLN) và chọn đích là tế bào khối u biểu hiện MSLN. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba vùng xác định bổ thể (CDR) chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:65, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:66, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:67; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:68, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:69, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:70, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:185, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:186, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:187; và các CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:188, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:189, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:190, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:25 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:26. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết cùng epitop giống như kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:25 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:26.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa là kháng thể kháng-MSLN nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ, trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:65, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:66, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:67; và ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:68, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:69, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:70, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc trong đó các CDR chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:185, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:186, và CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:187; và CDR chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:188, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:189, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:190, như được xác định

bởi hệ thống đánh số IMGT; nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và *p* bằng 4. Theo một số phương án, một nhóm các ADC như vậy được đề xuất và *p* bằng khoảng 4 (ví dụ, khoảng 3,8). Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:25 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:26. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa cạnh tranh về gắn kết và/hoặc gắn kết cùng epitop giống như kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:25 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:26.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm chứa nhiều bản sao của ADC bất kỳ trong số các ADC được mô tả, trong đó lượng mang dược chất trung bình (giá trị *p* trung bình) của ADC trong chế phẩm là nằm trong khoảng từ 3 đến 4, hoặc khoảng từ 3,5 đến khoảng 4,5, hoặc khoảng 4. Theo một số phương án, *p* trung bình nằm trong khoảng từ 3,2 đến 3,8. Theo một số phương án, *p* trung bình nằm trong khoảng từ 3,6 đến 4,4.

Sáng chế cũng đề xuất ở đây chế phẩm chứa -L-D, trong đó D là eribulin; và L là nhóm liên kết phân cắt được mà gắn kiểu cộng hóa trị với D. Theo một số phương án, nhóm liên kết phân cắt được gắn kiểu cộng hóa trị với amin C-35 trên eribulin. Theo một số phương án, nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết phân cắt được bao gồm đơn vị khoảng cách PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa ADC và chất pha loãng, chất mang, và/hoặc tá dược dược dụng.

Phương án khác của sáng chế bao gồm việc sử dụng hợp chất ADC và chế phẩm được mô tả để điều trị và chẩn đoán, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư. Khía cạnh khác bao gồm phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên được chọn đích bởi gốc kháng thể của ADC, như FRA. Theo các phương án khác nhau, các phương pháp được đề xuất để diệt hoặc ức chế sự tăng sinh của tế bào khối u hoặc tế bào ung thư bằng cách sử dụng lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc phác đồ của ADC bất kỳ trong số các ADC được mô tả. Khía cạnh khác bao gồm phương pháp để phát hiện tế bào khối u hoặc tế bào ung thư mà biểu hiện FRA bằng cách sử dụng ADC được bộc lộ, và phương pháp sàng lọc bệnh

nhân ung thư sẽ đáp ứng với việc điều trị bằng ADC được mô tả. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thanh dịch buồng trứng, bệnh ung thư buồng trứng tế bào sáng, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể, bệnh ung thư nội mạc tử cung, caxinom thanh dịch nội mạc tử cung, caxinoit phổi, hoặc sacôm xương. Các phương pháp tạo ra ADC mô tả cũng được bộc lộ.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện một trong các phương pháp luận được sử dụng để điều chế ADC MORAb-003, như được bộc lộ trong một số phương án nhất định. Trong phương pháp này, cystein chưa cặp đôi được tạo ra bằng cách khử một phần với các đương lượng mol hạn chế của tác nhân khử không phải-thiol TCEP. Phương pháp này ưu tiên khử liên kết disulfua giữa các chuỗi mà liên kết chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (một cặp trên mỗi cặp đôi H-L) và hai chuỗi nặng trong vùng bản lề (hai cặp trên mỗi cặp đôi H-H trong trường hợp IgG1 người), trong khi đó vẫn giữ liên kết disulfua trong chuỗi nguyên vẹn.

Fig.2 thể hiện phương pháp tổng hợp maleimit-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin (mal-$(PEG)_2$-VCP-eribulin), như được bộc lộ trong một số phương án nhất định.

Fig.3 thể hiện phép phân tích SDS-PAGE các điều kiện khử của MORAb-003. Các đường được chỉ ra ở bên phải của hình vẽ. Đường M tương ứng với protein chuẩn; đường 1 tương ứng với MORAb-003 không được xử lý; đường 2 tương ứng với MORAb-003 nồng độ 5,3mg/mL được khử trong 70,6µM TCEP; đường 3 tương ứng với MORAb-003 5,3mg/mL được khử trong 141,2µM TCEP; đường 4 tương ứng với MORAb-003 1,5mg/mL được khử trong 20µM TCEP; và đường 5 tương ứng với MORAb-003 1,5mg/mL được khử trong 40µM TCEP. Xác nhận thành phần của mỗi dải được nêu ở phần gel bên phải phía dưới. "H" biểu thị chuỗi nặng. "L" biểu thị chuỗi nhẹ.

Fig.4 thể hiện phân tích SDS-PAGE của các điều kiện khử của MORAb-003. Đường 1 tương ứng với protein chuẩn; đường 2 tương ứng với MORAb-003 không được xử lý; đường 3 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:1; đường 4 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:2; đường 5 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:3; và đường 6 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:4.

Fig.5 thể hiện phân tích SDS-PAGE không khử của ADC MORAb-003 được chọn, bao gồm M-MMAE (đường 2), M-DM1 (đường 3), M-0026 (đường 4), M-0260 (đường 5), M-0267 (đường 6), M-0272 (đường 7), M-0285 (đường 8), M-0292 (đường 9), M-027-0381 (đường 10), và M-0284 (đường 11).

Fig.6A thể hiện kết quả của thử nghiệm độc tính tế bào âm tính kế bên của MORAb-003-maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB-eribulin (M3-VCP-eribulin, hoặc "MORAb-202"). Fig.6B thể hiện kết quả của thử nghiệm độc tính tế bào âm tính kế bên của MORAb-003-maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB-ER-001150828 (M3-ER-61318). Fig.6C thể hiện kết quả của thử nghiệm độc tính tế bào âm tính kế bên của MORAb-003-PEG-pAB-duostatin 3 (M3-027-0285). Thông tin thể hiện trong phần chú giải của hình vẽ tương ứng nêu dòng tế bào:chất được thử nghiệm (dòng tế bào/dòng tế bào được nuôi cấy, mật độ cấy của dòng tế bào thứ nhất/ dòng tế bào thứ hai).

Fig.7A và 7B thể hiện phân bố tỷ lệ dược chất với kháng thể (DAR) của ADC MORAb-003-VCP-eribulin (Fig.7A) và MORAb-003-0285 (Fig.7B) so với MORAb-003 không liên hợp, như được bộc lộ trong một số phương án nhất định. Các con số trên mỗi đỉnh chỉ ra giá trị DAR của mỗi kiểu riêng biệt.

Fig.8 thể hiện kết quả của phân tích độc tính tế bào – sự cạnh tranh của MORAb-003-VCP-eribulin với MORAb-003 không liên hợp (2μM) trong tế bào IGROV1 hoặc SJSA-1.

Fig.9 thể hiện động học trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm chuột CD-1 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của tá dược lỏng (PBS), hoặc MORAb-202 ở liều 10, 20, 40, hoặc 80mg/kg.

Fig.10 thể hiện động học trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm chuột CD-1 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị trong tĩnh mạch với PBS, hoặc với eribulin ở liều 0,4, 0,8, 1,6, hoặc 3,2mg/kg, theo phác đồ liều q4dx3 (các liều sử dụng một lần trong mỗi 4 ngày với tổng cộng 3 liều).

Fig.11 thể hiện động học phát triển khối u của mỗi nhóm chuột CB17-SCID được cấy ghép tế bào hNSCLC NCI-H2110 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) và được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 1, 2,5, hoặc 5mg/kg, hoặc MORAb-003-0285 ở liều 5mg/kg.

Fig.12 thể hiện thể tích khối u của cá thể chuột CB17-SCID được cấy ghép tế bào hNSCLC NCI-H2110, cũng như giá trị trung bình và SEM của nhóm, vào ngày 17. Các nhóm được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 1, 2,5, hoặc 5mg/kg, hoặc MORAb-003-0285 ở liều 5mg/kg.

Fig.13 thể hiện động học trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 1, 2,5, hoặc 5mg/kg, hoặc MORAb-003-0285 ở liều 5mg/kg.

Fig.14 thể hiện động học phát triển khối u của mỗi nhóm chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị trong tĩnh mạch với tá dược lỏng (PBS), hoặc với eribulin ở liều 0,5, 0,2, 0,8, hoặc 1,6mg/kg, theo phác đồ liều q4dx3.

Fig.15 thể hiện thể tích khối u của cá thể chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110, cũng như giá trị trung bình và SEM của nhóm, vào ngày 24. Các nhóm được điều trị trong tĩnh mạch với tá dược lỏng (PBS), hoặc với eribulin ở liều 0,5, 0,2, 0,8, hoặc 1,6mg/kg, theo phác đồ liều q4dx3.

Fig.16 thể hiện động học thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị trong tĩnh mạch với tá dược lỏng (PBS), hoặc với eribulin ở liều 0,5, 0,2, 0,8, hoặc 1,6mg/kg, theo phác đồ liều q4dx3.

Fig.17 thể hiện hiệu lực của MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) trên tế bào IGROV1, OVCAR3, NCI-H2110, A431-A3, và SJSA-1, như đo được bởi thử nghiệm độc tính tế bào Crystal Violet.

Fig.18 thể hiện động học phát triển khối u của mỗi nhóm chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110 (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 1, 2,5, hoặc 5mg/kg.

Fig.19A và 19B thể hiện động học phát triển khối u (Fig.19A) và động học thay đổi trọng lượng cơ thể (Fig.19B) của mỗi nhóm chuột mang khối u NSCLC PDx (LXFA-737) (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của tá

được lỏng (PBS), MORAb-003 ở liều 5mg/kg, hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg.

Fig.20A và 20B thể hiện tỷ lệ thể tích khối u riêng (Fig.20A) và động học thay đổi trọng lượng cơ thể (Fig.20B) của mỗi nhóm chuột mang khối u bệnh ung thư nội mạc tử cung PDx (Endo-12961) (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, eribulin ở liều 0,1 hoặc 3,2mg/kg, hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg. Fig.20C và 20D thể hiện động học phát triển khối u (Fig.20C) và động học thay đổi trọng lượng cơ thể (Fig.20D) của mỗi nhóm chuột mang khối u bệnh ung thư nội mạc tử cung PDx (Endo-10590) (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của PBS, eribulin ở liều 0,1 hoặc 3,2mg/kg, hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg.

Fig.21A thể hiện sự nhuộm màu mô hóa học miễn dịch (IHC - immunohistochemical) của mô khối u ở chuột mang khối u TNBC PDx (OD-BRE-0631) có kháng thể kháng-IgG người. Mô khối u từ chuột được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của tá dược lỏng (bên phải), hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg (bên trái), được thu thập và nhuộm màu 5 ngày sau khi điều trị. Fig.21B thể hiện sự nhuộm màu IHC của mô khối u ở chuột mang khối u TNBC PDx (OD-BRE-0631) có kháng thể α-actin cơ trơn (SMA)-FITC. Mô khối u từ chuột không được xử lý được thu thập 2 ngày trước khi được điều trị (bên trái), trong khi mô khối u từ chuột được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg được thu thập 5 ngày sau khi điều trị (bên phải). Fig.21C thể hiện động học phát triển khối u của mỗi nhóm chuột mang khối u TNBC PDx (OD-BRE-0631) (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được điều trị bởi liều đơn trong tĩnh mạch của tá dược lỏng (PBS), hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg.

Fig.22 thể hiện sự biệt hóa của tế bào gốc trung mô tủy xương (BM-MSC- bone marrow-mesenchymal stem cell) của người khi nuôi cấy với tế bào MKN-74 sau khi điều trị bằng tá dược lỏng (PBS hoặc etanol), eribulin, MORAb-003, hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202), như đo được bởi phân tích đếm tế bào dòng. Stro-1^+/$CD105^+$, $CD34^+$/$CD31^-$, và $NG2^+$ lần lượt là chất đánh dấu của MSC, tế bào tạo mỡ, và tế bào quanh mạch.

Fig.23 thể hiện phân tích khoảng thời gian của mô khối u từ chuột CB17-SCID được cấy ghép NCI-H2110 được điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch chứa tá dược lỏng (PBS), hoặc MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở liều 5mg/kg, nhuộm màu với kháng thể α-actin cơ trơn (SMA)-FITC. Mô khối u được thu thập và nhuộm màu vào ngày 0, và vào các ngày 3, 5, 7 và 9 sau khi điều trị. Trục Y: % = [số tế bào nhuộm màu đếm được / tổng số tế bào đếm được] * 100. Trục X: ngày (tổng số tế bào đếm được).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các chế phẩm và phương pháp bộc lộ có thể được hiểu rõ hơn bằng cách bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết sau đây kết hợp với các hình vẽ đi kèm, đó là một phần của sáng chế. Phải hiểu rằng chế phẩm và phương pháp bộc lộ không giới hạn ở chế phẩm và phương pháp cụ thể được mô tả và/hoặc trình bày trong đây, và rằng thuật ngữ sử dụng trong đây là nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể chỉ theo cách ví dụ và không nhằm hạn chế chế phẩm và phương pháp được yêu cầu bảo hộ.

Trong toàn bộ bản mô tả, các nội dung mô tả đề cập đến chế phẩm và phương pháp để sử dụng chế phẩm này. Khi sáng chế mô tả hoặc yêu cầu bảo hộ một đặc điểm hoặc phương án liên quan đến chế phẩm, đặc điểm hoặc phương án này là có thể áp dụng như nhau với các phương pháp sử dụng chế phẩm này. Tương tự, khi sáng chế mô tả hoặc yêu cầu bảo hộ một đặc điểm hoặc phương án liên quan đến phương pháp sử dụng chế phẩm, các đặc điểm hoặc phương án này là có thể áp dụng như nhau với chế phẩm này.

Khi một khoảng giá trị được biểu thị, nó bao gồm các phương án sử dụng giá trị cụ thể bất kỳ nằm trong khoảng này. Hơn nữa, nhắc đến giá trị nêu trong khoảng bao gồm mỗi và mọi giá trị trong khoảng này. Tất cả các khoảng là bao gồm điểm đầu mút của chúng và có tính liên tục. Khi các giá trị được biểu thị là xấp xỉ, bằng cách sử dụng từ đứng trước là "khoảng," sẽ được hiểu là giá trị cụ thể này tạo ra một phương án khác. Nhắc đến giá trị số cụ thể bao gồm ít nhất giá trị cụ thể này, trừ khi được nêu khác. Việc sử dụng "hoặc" sẽ có nghĩa "và/hoặc" trừ khi được nêu khác. Tất cả các tài liệu tham khảo nêu trong đây được đưa vào đây với mục đích bất kỳ. Khi tài liệu tham khảo và bản mô tả không thống nhất, sẽ áp dụng bản mô tả sáng chế.

Rõ ràng là một số đặc điểm nhất định của chế phẩm và phương pháp được bộc lộ, để rõ ràng, đã được mô tả trong đây trong các phương án riêng biệt, cũng có thể là ở dạng kết hợp vào một phương án đơn lẻ. Ngược lại, nhiều đặc điểm khác nhau của chế phẩm và

phương pháp được bộc lộ mà được, để cho ngắn gọn, mô tả trong một phương án đơn lẻ, cũng có thể được đề xuất riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp phạm vi nhỏ hơn bất kỳ.

Định nghĩa

Các thuật ngữ khác nhau liên quan đến các khía cạnh của phần mô tả được sử dụng trong suốt bản mô tả và yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ này được nêu ý nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực này trừ khi được nêu khác. Các thuật ngữ được nêu cụ thể khác được hiểu theo cách phù hợp với các định nghĩa được nêu trong đây.

Như sử dụng trong đây, dạng số ít bao gồm dạng số nhiều trừ khi nội dung nêu rõ cách khác.

Thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" trong phạm vi giá trị số và khoảng để chỉ các giá trị hoặc khoảng mà xấp xỉ hoặc hoặc gần với giá trị hoặc khoảng được nêu sao cho phương án có thể thực hiện như dự tính, như có một lượng axit nucleic hoặc polypeptit mong muốn trong hỗn hợp phản ứng, như các chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ điều này. Điều này là do, ít nhất một phần, các đặc điểm thay đổi của chế phẩm axit nucleic, độ tuổi, chủng tộc, giới tính, sự thay đổi giải phẫu và sinh lý học và tính không chính xác của hệ sinh học. Do đó, các thuật ngữ này bao gồm các giá trị vượt quá các giá trị do lỗi hệ thống.

Các thuật ngữ “thể liên hợp kháng thể-dược chất,” “thể liên hợp kháng thể,” “thể liên hợp,” “thể liên hợp miễn dịch,” và “ADC” được sử dụng thay thế cho nhau, và để chỉ hợp chất hoặc dẫn xuất của nó được liên kết với kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng-FRA) và được xác định bởi công thức chung: Ab-(L-D)$_p$ (Công thức I), trong đó Ab = gốc kháng thể (tức là, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên), L = gốc liên kết, D = gốc dược chất, và p = số gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng với nghĩa rộng nhất để chỉ một phân tử globulin miễn dịch mà nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với đích, như protein, polypeptit, carbohydrat, polynucleotit, lipit, hoặc hỗn hợp của các các đích nêu trên thông qua ít nhất một vị trí nhận diện kháng nguyên trong vùng biến đổi của phân tử globulin miễn dịch. Chuỗi nặng của kháng thể gồm có miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và miền hằng định chuỗi nặng (C_H). Chuỗi nhẹ gồm có miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và miền hằng định chuỗi nhẹ (C_L). Với mục đích của đơn sáng chế này, mỗi miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành bao gồm ba vùng xác định bổ thể (CDR1, CDR2 và CDR3) trong bốn vùng khung (FR1, FR2, FR3 và FR4) bố trí từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: FR1, CDR1,

FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. "Kháng thể" có thể có trong tự nhiên hoặc nhân tạo, như kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi kỹ thuật lai thông dụng. Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ và kháng thể đa dòng chiều dài đầy đủ, cũng như mảnh kháng thể như Fab, Fab', F(ab')2, Fv, và kháng thể sợi đơn. Một kháng thể có thể là kháng thể bất kỳ thuộc năm nhóm globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, hoặc phân nhóm của nó (ví dụ, isotyp IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Thuật ngữ này còn bao gồm kháng thể người, kháng thể khảm, kháng thể được biến đổi cho phù hợp với người và phân tử globulin miễn dịch biến đổi bất kỳ chứa vị trí nhận diện kháng nguyên, miễn là nó thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng," như sử dụng trong đây, để chỉ kháng thể thu được từ nhóm các kháng thể gần như đồng nhất, tức là, kháng thể riêng lẻ bao gồm các nhóm giống nhau ngoại trừ có thể có các đột biến khả dĩ có trong tự nhiên với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng là đặc hiệu cao, kháng trực tiếp một epitop kháng nguyên. Ngược lại, chế phẩm kháng thể thông dụng (đa dòng) đặc trưng bao gồm vô số kháng thể kháng trực tiếp (hoặc đặc hiệu với) các epitop khác nhau. Thuật ngữ bổ nghĩa "đơn dòng" để chỉ đặc điểm của kháng thể là thu được từ nhóm kháng thể gần như đồng nhất, và không được hiểu là việc tạo ra kháng thể đòi hỏi bởi phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng phù hợp với sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler et al. (1975) Nature 256:495, hoặc có thể được tạo ra bởi phương pháp tái tổ hợp ADN (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,816,567). Kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân tách từ thư viện kháng thể thực khuẩn thể bằng các kỹ thuật được mô tả, ví dụ trong Clackson et al. (1991) Nature 352:624-8, và Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97.

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

Thuật ngữ “kháng thể người,” như sử dụng trong đây, để chỉ kháng thể được tạo ra bởi người hoặc kháng thể có trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi người.

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

Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "kháng thể được biến đổi cho phù hợp với người" để chỉ các dạng kháng thể chứa trình tự từ kháng thể không phải là của người (ví dụ, chuột) cũng như kháng thể người. Các kháng thể như vậy là kháng thể khảm chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Thông thường, kháng thể được biến đổi cho phù hợp với người sẽ bao gồm về cơ bản tất cả ít nhất một, và đặc trưng là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vòng siêu biến đổi tương ứng với các vòng siêu biến đổi của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng khung (FR) là vùng khung của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được biến đổi cho phù hợp với người tùy chọn cũng bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định globulin miễn dịch (Fc), đặc trưng là của globulin miễn dịch của người. Kháng thể được biến đổi cho phù hợp với người có thể được biến đổi tiếp bằng cách thế các gốc, hoặc là trong vùng khung Fv và/hoặc trong các gốc không phải của người bị thay thế để tinh chế và tối ưu hóa tính đặc hiệu, ái lực, và/hoặc hoạt tính của kháng thể.

Thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, như sử dụng trong đây, để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, FRA). Tốt hơn là, mảnh gắn kết kháng nguyên cũng giữ được khả năng nội bào hóa vào trong tế bào biểu hiện kháng nguyên. Theo một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên cũng giữ được hoạt tính gây hiệu ứng miễn dịch. Đã biết rằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể thực hiện chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết bao gồm trong thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh đơn hóa trị gồm có miền V_L, V_H, C_L, và C_{H1}; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu disulfua ở

vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm có miền V_H và C_{H1}; (iv) mảnh Fv gồm có miền V_L và V_H của nhánh đơn của kháng thể; (v) mảnh dAb, bao gồm miền biến đổi đơn, ví dụ, miền V_H (xem, ví dụ, Ward et al. (1989) Nature 341:544-6; và Winter et al., WO 90/05144); và (vi) vùng xác định bổ thể (CDR) phân tách. Hơn nữa, mặc dù hai miền của mảnh Fv, V_L và V_H, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được nối, bằng phương pháp tái tổ hợp, bởi một nhóm liên kết tổng hợp cho phép chúng tạo ra một mạch protein đơn trong đó các vùng V_L và V_H cặp đôi để tạo ra các phân tử đơn hóa trị (được gọi là Fv sợi đơn (scFv-single chain Fv)). *Xem, ví dụ*, Bird et al. (1988) Science 242:423-6; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83. Các kháng thể sợi đơn như vậy cũng được dự tính là nằm trong phạm vi thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, và đã biết trong lĩnh vực này là một dạng ví dụ của mảnh gắn kết có thể nội bào hóa vào trong tế bào khi gắn kết. *Xem, ví dụ*, Zhu et al. (2010) 9:2131-41; He et al. (2010) J. Nucl. Med. 51:427-32; và Fitting et al. (2015) MAbs 7:390-402. Theo một số phương án nhất định, các phân tử scFv có thể được hợp nhất vào trong protein dung hợp. Các dạng khác của kháng thể sợi đơn, như kháng thể kép cũng được dự tính. Kháng thể kép là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép trong đó miền V_H và V_L được biểu hiện trên sợi polypeptit đơn, nhưng bằng cách sử dụng nhóm liên kết quá ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một sợi, do đó ép các miền này cặp đôi với các miền bổ sung của sợi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên (xem ví dụ, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8; và Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-3). Mảnh gắn kết kháng nguyên thu được bằng các kỹ thuật thông dụng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các mảnh gắn kết được sàng lọc để ứng dụng (ví dụ, ái lực gắn kết, nội bào hóa) theo cùng một cách như là các kháng thể nguyên vẹn. Mảnh gắn kết kháng nguyên có thể được điều chế bằng cách cắt protein nguyên vẹn, ví dụ, bằng proteaza hoặc phương pháp cắt hóa học.

"Nội bào hóa" như sử dụng trong đây khi đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên để chỉ một kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có khả năng được hấp thụ qua màng hai lớp lipit của tế bào đến khoang bên trong (tức là, "được nội bào hóa") khi gắn kết với tế bào, tốt hơn là vào trong ngăn thoái biến trong tế bào. Ví dụ, nội bào hóa kháng thể kháng-FRA là kháng thể có khả năng được hấp thu vào trong tế bào sau khi gắn kết với FRA trên màng tế bào.

Thuật ngữ “thụ thể folat alpha” hoặc “FRA,” như sử dụng trong đây, để chỉ dạng tự nhiên bất kỳ của FRA người. Thuật ngữ này bao gồm FRA có chiều dài đầy đủ (ví dụ, trình tự đối chứng NCBI: NP_000793; SEQ ID NO: 19), cũng như dạng bất kỳ của FRA người có được từ quá trình xử lý tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm biến thể có trong tự nhiên của FRA, bao gồm nhưng không giới hạn ở biến thể ghép, biến thể alen, và protein đồng dạng. FRA có thể được phân tách từ người, hoặc có thể được sản xuất tái tổ hợp hoặc bằng các phương pháp tổng hợp.

Thuật ngữ "kháng thể kháng-FRA" hoặc “kháng thể gắn kết đặc hiệu FRA” để chỉ dạng bất kỳ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu FRA, và bao gồm kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể có chức năng sinh học miễn là chúng gắn kết đặc hiệu FRA. Tốt hơn là, kháng thể kháng-FRA sử dụng trong các ADC bộc lộ trong đây là kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh kháng thể nội bào hóa. MORAb-003 là kháng thể kháng-FRA người nội bào hóa ví dụ. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "đặc hiệu," "gắn kết đặc hiệu," và "gắn kết có tính đặc hiệu" để chỉ sự gắn kết chọn lọc của kháng thể với epitop của kháng nguyên đích. Các kháng thể có thể được thử nghiệm về độ đặc hiệu của gắn kết bằng cách so sánh mức gắn kết kháng nguyên thích hợp với mức gắn kết kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không cùng họ trong một số điều kiện được nêu. Nếu kháng thể gắn kết kháng nguyên thích hợp với ái lực lớn hơn ít nhất 2, 5, 7, và tốt hơn là 10 lần so với kháng nguyên hoặc hỗn hợp kháng nguyên không cùng họ, thì được coi là đặc hiệu. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu là một kháng thể chỉ gắn kết kháng nguyên FRA, mà không gắn kết (hoặc thể hiện sự gắn kết rất nhỏ) với kháng nguyên khác.

Thuật ngữ “thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người,” “her2,” hoặc “her2/neu,” như sử dụng trong đây, để chỉ dạng tự nhiên bất kỳ của her2 của người. Thuật ngữ này bao gồm her2 có chiều dài đầy đủ (ví dụ, trình tự đối chứng NCBI: NP_004439.2; SEQ ID NO: 21), cũng như dạng bất kỳ của her2 của người mà thu được từ quá trình xử lý tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm biến thể có trong tự nhiên của her2, bao gồm nhưng không giới hạn ở biến thể ghép, biến thể alen, và protein đồng dạng. Her2 có thể được phân tách từ người, hoặc có thể được sản xuất tái tổ hợp hoặc bằng các phương pháp tổng hợp.

Thuật ngữ “kháng thể kháng-her2” hoặc “kháng thể gắn kết đặc hiệu her2” để chỉ dạng bất kỳ của kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu her2, và bao gồm

kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể có chức năng sinh học miễn là chúng gắn kết đặc hiệu her2. Patent Mỹ số 5,821,337 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) đề xuất trình tự gắn kết- her2 ví dụ, bao gồm trình tự kháng thể kháng-her2 ví dụ. Tốt hơn là, kháng thể kháng-her2 sử dụng trong các ADC bộc lộ trong đây là kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh kháng thể nội bào hóa. Trastuzumab là kháng thể kháng- her2 người nội bào hóa ví dụ.

Thuật ngữ "epitop" để chỉ một phần của kháng nguyên có khả năng được nhận dạng và được gắn kết đặc hiệu bởi kháng thể. Khi kháng nguyên là polypeptit, epitop có thể được tạo ra từ các axit amin liền kề hoặc axit amin không liền kề được đặt cạnh nhau bằng nếp gấp 3 lần polypeptit. Epitop được gắn kết bởi kháng thể có thể được xác định bằng kỹ thuật vẽ bản đồ epitop bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm kỹ thuật tinh thể lọc tia X để xác định epitop bằng cách hiển thị trực tiếp phức kháng nguyên-kháng thể, cũng như theo dõi sự gắn kết của kháng thể với các mảnh hoặc biến thể đột biến của kháng nguyên này, hoặc theo dõi khả năng đi vào với dung môi của các phần khác nhau của kháng thể và kháng nguyên. Chiến lược ví dụ sử dụng để vẽ bản đồ epitop kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quét oligo-peptit dựa trên mảng, thủy phân protein giới hạn, đột biến tại điểm, lập bản đồ đột biến lưu lượng cao, trao đổi hydro-đơteri, và đo phổ khối lượng (xem, ví dụ, Gershoni et al. (2007) 21:145-56; và Hager-Braun và Tomer (2005) Expert Rev. Proteomics 2:745-56).

Gắn kết cạnh tranh và sắp nhóm epitop cũng có thể được sử dụng để xác định kháng thể có chung epitop giống nhau hoặc trùng nhau. Sự gắn kết cạnh tranh có thể được đánh giá bằng thử nghiệm ức chế chéo, như thử nghiệm được mô tả trong "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow và Lane (lần xuất bản thứ nhất năm 1988, lần xuất bản thứ hai năm 2014). Theo một số phương án, sự gắn kết cạnh tranh được xác định khi kháng thể hoặc protein gắn kết thử nghiệm làm giảm sự gắn kết của kháng thể hoặc protein gắn kết đối chứng với kháng nguyên đích như FRA hoặc her2 (ví dụ, protein gắn kết bao gồm CDR và/hoặc miền biến đổi được chọn từ các CDR và/hoặc miền biến đổi xác định trong Bảng 2, 4, và 6), ít nhất là khoảng 50% trong thử nghiệm ức chế chéo (ví dụ, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, hoặc nhiều hơn, hoặc mức phần trăm bất kỳ trong khoảng này), và/hoặc ngược lại. Theo một số phương án, sự gắn kết cạnh tranh có thể là do chung epitop hoặc các epitop giống nhau (ví dụ, trùng nhau một phần), hoặc do sự cản trở không gian trong đó kháng thể hoặc protein gắn kết gắn kết ở các

epitop gần kề. *Xem, ví dụ*, Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ed. (1998) vol. 66, trang 55-66). Theo một số phương án, sự gắn kết cạnh tranh có thể được sử dụng để phân loại các nhóm protein gắn kết có chung các epitop tương tự, ví dụ, các epitop cạnh tranh về gắn kết có thể được "sắp nhóm" thành một nhóm protein gắn kết có epitop trùng nhau hoặc gần nhau, trong khi các protein gắn kết không cạnh tranh được đặt trong một nhóm protein gắn kết riêng mà không có các epitop trùng nhau hoặc gần nhau.

Thuật ngữ "k_{on}" hoặc "k_a" để chỉ hằng số tốc độ kết hợp của phản ứng kết hợp của kháng thể với kháng nguyên để tạo ra phức kháng thể/kháng nguyên. Tốc độ này có thể được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn, như thử nghiệm Biacore hoặc ELISA.

Thuật ngữ "k_{off}" hoặc "k_d" để chỉ hằng số tốc độ phân ly của phản ứng phân ly của kháng thể với phức kháng thể/kháng nguyên. Tốc độ này có thể được xác định bằng các kỹ thuật chuẩn, như thử nghiệm Biacore hoặc ELISA.

Thuật ngữ "K_D" để chỉ hằng số cân bằng phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. K_D được tính toán bởi k_a/k_d. Tốc độ này có thể được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn, như thử nghiệm Biacore hoặc ELISA.

Thuật ngữ "*p*" hoặc "tỷ lệ kháng thể:dược chất" hoặc "tỷ lệ dược chất với kháng thể" hoặc "DAR" để chỉ số gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể, tức là, lượng mang dược chất, hoặc số gốc-L-D trên mỗi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên (Ab) trong ADC có Công thức I. Trong các chế phẩm chứa nhiều bản sao của ADC có công thức I, "*p*" để chỉ số lượng trung bình của gốc- L-D trên mỗi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, cũng được gọi là lượng mang dược chất trung bình.

"Nhóm liên kết" hoặc "gốc liên kết" là gốc hóa học bất kỳ có khả năng nối cộng hóa trị một hợp chất, thường là gốc dược chất như chất hóa trị liệu, với gốc khác như gốc kháng thể. Nhóm liên kết có thể nhạy cảm với hoặc về cơ bản bền với sự cắt do axit, sự cắt do peptidaza, sự cắt do ánh sáng, sự cắt do esteraza, và/hoặc sự cắt liên kết disulfua, ở các điều kiện trong đó hợp chất hoặc kháng thể này vẫn hoạt động.

Thuật ngữ "chất" được sử dụng trong đây để chỉ hợp chất hóa học, hỗn hợp của hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc phần chiết từ vật liệu sinh học. Thuật ngữ "tác nhân điều trị," "dược chất," hoặc "gốc dược chất" để chỉ một chất có khả năng điều biến một quy trình sinh học và/hoặc có hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ "chất hóa trị liệu" hoặc "chất chống ung thư" được sử dụng trong đây để chỉ tất cả các hợp chất hóa học có hiệu quả trong điều trị bệnh ung thư bất kể cơ chế tác dụng. Sự ức chế di căn hoặc sự tăng sinh mạch thường là một đặc điểm của chất hóa trị liệu. Ví dụ không hạn chế về chất hóa trị liệu bao gồm chất alkyl hóa, ví dụ, mù tạc nitơ, hợp chất etylenimin, và alkyl sulphonat; chất chống chuyển hóa, ví dụ, axit folic, chất đối kháng purin hoặc pyrimidin; chất chống gián phân, ví dụ, chất kháng-tubulins như eribulin hoặc eribulin mesylat (Halaven™) hoặc dẫn xuất của chúng, alkaloit dừa cạn, và auristatin; kháng sinh gây độc tế bào; hợp chất phá hủy hoặc gây gián đoạn quá trình biểu hiện hoặc sao chép ADN, ví dụ, chất gắn kết rãnh nhỏ ADN; và chất đối kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng. Ngoài ra, chất hóa trị liệu bao gồm các kháng thể, phân tử sinh học, và phân tử nhỏ. Chất hóa trị liệu có thể là chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Thuật ngữ "chất kìm hãm tế bào" để chỉ chất ức chế hoặc làm chậm sự phát triển tế bào và/hoặc sự nhân lên của tế bào.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" để chỉ một chất gây chết tế bào chủ yếu bằng cách gây gián đoạn hoạt tính biểu hiện và/hoặc quá trình thực hiện chức năng của tế bào. Ví dụ về chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống gián phân, như eribulin, auristatin (ví dụ, monometyl auristatin E (MMAE), monometyl auristatin F (MMAF)), maytansinoid (ví dụ, maytansin), dolastatin, duostatin, cryptophyxin, alkaloit dừa cạn (ví dụ, vincristin, vinblastin), taxan, taxol, và colchicin; anthraxyclin (ví dụ, daunorubixin, doxorubixin, dihydroxyanthracindion); kháng sinh gây độc tế bào (ví dụ, mitomyxin, actinomyxin, duocarmyxin (ví dụ, CC-1065), auromyxin, duomyxin, calicheamixin, endomyxin, phenomyxin); chất alkyl hóa (ví dụ, cisplatin); tác nhân xen kẽ (ví dụ, ethidi bromua); chất ức chế topoisomeraza (ví dụ, etoposide, tenoposide); chất đồng vị phóng xạ, như At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212} hoặc ^{213}, P^{32}, và chất đồng vị hoạt động phóng xạ của luteti (ví dụ, Lu^{177}); và chất độc của vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc nguồn động vật (ví dụ, rixin (ví dụ, chuỗi rixin A), độc tố bạch hầu, ngoại độc tố *Pseudomonas* A (ví dụ, PE40), nội độc tố, mitogellin, combrestatin, restrictoxin, gelonin, alpha-sarcin, abrin (ví dụ, chuỗi abrin A), modecxin (ví dụ, chuỗi modecxin A), curicin, crotin, chất ức chế *Sapaonaria officinalis*, glucocorticoit).

Thuật ngữ "eribulin," như sử dụng trong đây, để chỉ chất tổng hợp tương tự của halichondrin B, hợp chất vòng lớn thường được phân tách từ *Halichondria okadais* bọt biển. Thuật ngữ "gốc dược chất eribulin" để chỉ thành phần của ADC có cấu trúc của

eribulin, và được gắn với nhóm liên kết của ADC thông qua C-35 amin của nó. Eribulin là một chất ức chế động học vi cấu trúc hình ống, là chất được cho là gắn kết tubulin và gây ra kìm hãm chu trình tế bào tại pha G2/M bằng cách ức chế tổng hợp thoi gián phân. Thuật ngữ "eribulin mesylat" để chỉ muối mesylat của eribulin, chất này được bán trên thị trường với tên thương mại là Halaven™.

Thuật ngữ "thể đồng dạng" để chỉ phân tử mà biểu hiện sự tương đồng với phân tử khác, ví dụ do có trình tự của các gốc hóa học là giống hoặc tương tự ở các vị trí tương ứng.

Thuật ngữ "ức chế" hoặc "sự ức chế," như sử dụng trong đây, có nghĩa là làm giảm với lượng có thể đo được, và có thể bao gồm nhưng không bắt buộc sự ngăn cản hoặc ức chế hoàn toàn.

Thuật ngữ "âm tính với đích" hoặc "âm tính với kháng nguyên đích" để chỉ sự không có biểu hiện kháng nguyên đích bởi tế bào hoặc mô. Thuật ngữ "dương tính với đích" hoặc "dương tính với kháng nguyên đích" để chỉ sự có mặt biểu hiện kháng nguyên đích. Ví dụ, tế bào hoặc dòng tế bào không biểu hiện kháng nguyên đích có thể được mô tả là âm tính với đích, trong khi đó tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện kháng nguyên đích có thể mô tả là dương tính với đích.

Thuật ngữ "sự diệt đích âm tính kế bên" hoặc "hiệu ứng diệt đích âm tính kế bên" để chỉ sự diệt tế bào âm tính với đích với sự có mặt của tế bào dương tính với đích, trong đó không quan sát thấy sự diệt tế bào âm tính với đích khi không có tế bào dương tính với đích. Sự tiếp xúc tế bào-tế bào, hoặc ít nhất ở khoảng gần giữa tế bào dương tính với đích và tế bào âm tính với đích, cho phép diệt đích âm tính kế bên. Kiểu diệt này có thể phân biệt với "sự diệt sai đích," là để chỉ sự diệt không phân biệt tế bào âm tính với đích. "Sự diệt sai đích" có thể quan sát thấy khi không có tế bào dương tính với đích.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" để chỉ tình trạng sinh lý ở động vật có vú trong đó một nhóm tế bào có đặc trưng là sự phát triển tế bào không kiểm soát. Ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, caxinom, u lympho, u nguyên bào, sacôm, và bệnh bạch cầu. Ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư như vậy bao gồm bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư tuyến của phổi, caxinom vảy ở phổi, bệnh ung thư phúc mạc, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày ruột non, bệnh ung thư tụy, bệnh u nguyên bào đệm, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư

buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, u gan, bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể), sacôm xương, u melanin, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư áo niêm mạc tử cung (ví dụ, serous) hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, caxinom gan, và các dạng ung thư đầu và cổ khác. Bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể để chỉ ung thư vú mà âm tính với sự biểu hiện gen của thụ thể estrogen (ER), thụ thể progesteron (PR), hoặc Her2/neu.

Thuật ngữ "khối u" và "u tăng sinh" để chỉ khối lượng mô bất kỳ do sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào quá mức, hoặc là lành tính hoặc ác tính, bao gồm các tổn thương tiền ung thư.

Thuật ngữ "tế bào ung thư" và "tế bào khối u" để chỉ đến tế bào riêng biệt hoặc toàn bộ nhóm tế bào có nguồn gốc từ khối u, bao gồm cả tế bào không tạo u và tế bào ung thư mầm. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "tế bào khối u" sẽ được điều chỉnh bởi thuật ngữ "không tạo u" khi chỉ nhắc đến các tế bào khối u không có khả năng tái tạo và biệt hóa để phân biệt với các tế bào khối u từ tế bào ung thư mầm.

Thuật ngữ "đối tượng" và "bệnh nhân" được sử dụng thay thế cho nhau trong đây để chỉ động vật bất kỳ, như động vật có vú, bao gồm nhưng không giới hạn ở, người, động vật linh trưởng không phải là người, loài gặm nhấm, và tương tự. Theo một số phương án, động vật có vú là chuột. Theo một số phương án, động vật có vú là người.

Thuật ngữ "sử dụng đồng thời" hoặc sử dụng "kết hợp với" một hoặc nhiều tác nhân điều trị bao gồm việc sử dụng đồng thời và liên tiếp theo thứ tự bất kỳ.

"Dược phẩm" để chỉ một chế phẩm mà ở dạng sao cho cho phép sử dụng và sau đó mang lại hoạt tính sinh học dự tính của (các) thành phần hoạt động và/hoặc đạt được hiệu quả điều trị, và nó không chứa thành phần khác có độc tính không chấp nhận được cho đối tượng sẽ sử dụng chế phẩm này. Dược phẩm có thể là vô khuẩn.

"Tá dược" bao gồm nguyên liệu như chất phụ trợ, chất mang, chất đệm và điều chỉnh độ pH, chất điều chỉnh độ đẳng trương, chất tạo ẩm, chất bảo quản, và tương tự.

"Dược dụng" có nghĩa là được thông qua hoặc có thể được thông qua bởi một cơ quan quản lý thuộc Liên Bang hoặc chính quyền bang, hoặc được nêu tên trong Dược điển

Mỹ hoặc các dược điển được công nhận nói chung khác, để sử dụng cho động vật, và cụ thể hơn là cho người.

"Lượng có hiệu quả" của ADC như được bộc lộ trong đây là lượng đủ để thực hiện một mục đích được nêu cụ thể, ví dụ để tạo ra hiệu quả điều trị sau khi sử dụng, như làm giảm tốc độ phát triển khối u hoặc thể tích khối u, làm giảm triệu chứng của bệnh ung thư, hoặc một số chỉ tiêu khác của hiệu quả điều trị. Lượng có hiệu quả có thể được xác định theo cách thông thường liên quan đến mục đích được nêu. Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" để chỉ lượng ADC có hiệu quả để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng. Trong trường hợp bệnh ung thư, lượng có hiệu quả điều trị ADC có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư, làm giảm kích thước khối u, ức chế (ví dụ, làm chậm lại hoặc làm dừng) sự di căn của khối u, ức chế (ví dụ, làm chậm lại hoặc làm dừng) sự phát triển khối u, và/hoặc làm giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng. "Lượng có hiệu quả phòng bệnh" để chỉ lượng có hiệu quả, ở liều và trong một giai đoạn thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Thông thường là, do liều phòng bệnh được sử dụng cho đối tượng trước hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, lượng có hiệu quả phòng bệnh sẽ thấp hơn lượng có hiệu quả điều trị.

Như sử dụng trong đây, "điều trị " hoặc "chữa trị" và các thuật ngữ liên quan về mặt ngữ pháp, để chỉ sự cải thiện bất kỳ của kết quả bất kỳ của bệnh, như kéo dài sự sống, giảm tỷ lệ mắc bệnh, và/hoặc giảm bớt tác dụng phụ của các sản phẩm phụ của phương thức điều trị khác. Như hiểu rõ trong lĩnh vực này, việc loại bỏ hoàn toàn bệnh là một lựa chọn ưu tiên nhưng không phải là yêu cầu của việc điều trị. "Việc điều trị" hoặc "điều trị," như sử dụng trong đây, để chỉ việc sử dụng ADC được mô tả cho đối tượng, ví dụ, bệnh nhân. Việc điều trị có thể là chữa trị, làm lành, làm dịu, làm giảm đau, điều chỉnh, khắc phục, làm tốt hơn, giảm bệnh, cải thiện hoặc tác động lên rối loạn, các triệu chứng của rối loạn hoặc xu hướng mắc rối loạn, ví dụ, bệnh ung thư.

Theo một số phương án, ADC được đánh dấu được sử dụng. Các "chất đánh dấu" thích hợp bao gồm nuclit phóng xạ, enzym, cơ chất, đồng yếu tố, chất ức chế, các gốc huỳnh quang, gốc phát quang hóa học, hạt từ tính, và tương tự.

"Protein," như sử dụng trong đây, có nghĩa là ít nhất hai axit amin gắn cộng hóa trị. Thuật ngữ này bao gồm polypeptit, oligopeptit, và peptit. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều axit amin được gắn cộng hóa trị được gắn bởi một liên kết peptit. Protein có thể cấu

tạo từ các axit amin có trong tự nhiên và các liên kết peptit, ví dụ khi protein này được tạo ra kiểu tái tổ hợp bằng các hệ biểu hiện và tế bào chủ. Cách khác, protein có thể bao gồm các axit amin tổng hợp (ví dụ, homophenylalanin, citrullin, ornithin, và norleuxin), hoặc các cấu trúc tương tự peptit, tức là, "chất tương tự peptit hoặc protein," như peptoit. Peptoit là một nhóm ví dụ cho chất tương tự peptit mà các chuỗi bên của nó được gắn vào nguyên tử nitơ của khung peptit, thay vì các α-cacbon (khi chúng ở trong các axit amin), và có đặc điểm liên kết hydro và cấu hình so với peptit khác (xem, ví dụ, Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367). Như vậy, peptoit có thể chống lại sự thủy phân protein hoặc các điều kiện sinh lý hoặc bảo quản khác, và có hiệu quả khi thấm vào màng tế bào. Các axit amin tổng hợp như vậy có thể được kết hợp cụ thể là khi tổng hợp *in vitro* kháng thể bằng các phương pháp thông dụng đã biết rõ trong lĩnh vực này. Ngoài ra, có thể sử dụng kết hợp bất kỳ của chất tương tự peptit, gốc/cấu trúc tổng hợp và có trong tự nhiên. "Axit amin" cũng bao gồm các gốc axit amin imino, như prolin và hydroxyprolin. Axit amin "nhóm R" hoặc "chuỗi bên" có thể ở cấu hình (L) hoặc cấu hình (S). Theo một phương án cụ thể, các axit amin là ở cấu hình (L) hoặc (S).

"Protein tái tổ hợp" là protein tạo ra bởi kỹ thuật tái tổ hợp sử dụng kỹ thuật và phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, tức là, thông qua sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp. Phương pháp và kỹ thuật để sản xuất protein tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Protein "được phân lập" là không đi cùng với ít nhất một số vật liệu mà nó thường đi cùng với vật liệu này ở trạng thái tự nhiên, ví dụ chiếm ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 50% về trọng lượng của toàn bộ protein trong mẫu được nêu. Hiểu rằng protein được phân lập có thể chiếm từ 5 đến 99,9% về trọng lượng của hàm lượng toàn bộ protein phụ thuộc vào từng trường hợp. Ví dụ, protein có thể được tạo ra ở nồng độ cao hơn đáng kể bằng cách sử dụng gen khởi đầu cảm ứng hoặc gen khởi đầu biểu hiện mức độ cao, sao cho protein được tạo ra ở mức nồng độ tăng cao. Định nghĩa này bao gồm cả việc sản xuất kháng thể trong nhiều sinh vật và/hoặc tế bào chủ đã biết trong lĩnh vực này.

Về trình tự axit amin, độ tương đồng và/hoặc độ tương tự trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuật toán độ tương đồng trình tự cục bộ của Smith và Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, thuật toán sắp xếp độ tương đồng trình tự của Needleman và

Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, nghiên cứu về phương pháp xác định độ tương tự của Pearson và Lipman (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2444, các chương trình chạy viết cho máy tính của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), chương trình sắp trình tự Best Fit được mô tả bởi Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12:387-95, tốt hơn là sử dụng các cài đặt mặc định, hoặc bởi cách kiểm soát. Tốt hơn là, phần trăm độ tương đồng được tính bằng FastDB dựa trên các thông số sau: điểm phạt bắt cặp sai bằng 1; điểm phạt khoảng cách bằng 1; điểm phạt kích thước khoảng cách là 0,33; và điểm phạt nối là 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, trang 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

Ví dụ về thuật toán hữu dụng là PILEUP. PILEUP tạo ra nhiều sắp thẳng trình tự từ nhóm các trình tự có liên quan bằng các sắp xếp từng cặp, dần dần. Cũng có thể vẽ một cây đồ thị thể hiện mối quan hệ chùm sử dụng để tạo ra thuật toán này. PILEUP sử dụng phép đơn giản hóa của phương pháp thuật toán liên tục của Feng & Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-60; phương pháp này tương tự với phương pháp được mô tả bởi Higgins và Sharp (1989) CABIOS 5:151-3. Các thông số PILEUP hữu dụng bao gồm khối lượng khoảng cách mặc định là 3,00, khối lượng chiều dài khoảng cách mặc định là 0,10, và các khoảng cách kết thúc được xác định khối lượng.

Ví dụ khác về thuật toán hữu dụng là thuật toán BLAST, được mô tả trong: Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402; và Karin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87. Chương trình BLAST đặc biệt hữu dụng là chương trình WU-BLAST-2 có được từ Altschul et al. (1996) Methods in Enzymology 266:460-80. WU-BLAST-2 sử dụng nhiều thông số tìm kiếm, hầu hết là được thiết lập ở giá trị mặc định. Các thông số có thể điều chỉnh được thiết lập với giá trị như sau: khoảng vượt gối đầu=l, phân số gối đầu=0,125, ngưỡng từ (T)=II. Thông số HSP S và HSP S2 là các giá trị động và được thiết lập bởi chính chương trình phụ thuộc vào cấu tạo của trình tự cụ thể và cấu tạo của cơ sở dữ liệu cụ thể mà trình tự quan tâm được nghiên cứu đến; tuy nhiên, các giá trị này có thể được điều chỉnh để làm tăng độ nhạy.

Một thuật toán hữu dụng khác là BLAST tạo khoảng cách được báo cáo bởi Altschul et al. (1993) Nucl. Acids Res. 25:3389-402. BLAST tạo khoảng cách sử dụng chỉ số thế

BLOSUM-62; thông số T ngưỡng đặt ở 9; phương pháp hai-trúng đích (two-hit) để kích hoạt các đoạn kéo dài chưa có khoảng cách, tính chiều dài khoảng cách của k một giá trị là 10+k; Xu được đặt là 16, và Xg được đặt là 40 cho giai đoạn tra cứu dữ liệu và là 67 cho giai đoạn xuất ra thuật toán. Thuật toán tạo khoảng cách được khởi động bởi điểm số tương ứng với khoảng 22 bit.

Thông thường, độ đồng nhất axit amin, độ tương tự, hoặc độ tương đồng giữa các protein bộc lộ trong đây và các biến thể của nó, bao gồm các biến thể của FRA, biến thể của her2, biến thể của trình tự tubulin, và biến thể của miền biến đổi của kháng thể (bao gồm các biến thể CDR riêng biệt), ít nhất là 80% với trình tự mô tả trong đây, và thông thường hơn là tốt hơn nếu có độ tương đồng hoặc độ tương tự tăng cao ít nhất là 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và gần như 100% hoặc 100%.

Theo cách tương tự, "phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit nucleic" đối với trình tự axit nucleic của kháng thể và các protein khác xác định được trong đây được xác định là phần trăm của các gốc nucleotit trong trình tự nghiên cứu giống hệt với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa của protein gắn kết kháng nguyên. Một phương pháp đặc trưng sử dụng môđun BLASTN của WU-BLAST-2 đặt làm thông số mặc định, với khoảng vượt gối đầu và phân số gối đầu lần lượt được đặt là 1 và 0,125.

Trong khi vị trí hoặc vùng để đưa biến thể trình tự axit amin được xác định trước, thì bản thân đột biến lại không cần xác định trước. Ví dụ, để tối ưu hóa hiệu năng của đột biến ở một vị trí đưa ra, có thể thực hiện đột biến ngẫu nhiên ở codon đích hoặc vùng đích và biến thể CDR protein gắn kết kháng nguyên được biểu hiện được sàng lọc về mặt kết hợp tối ưu của hoạt tính mong muốn. Đã biết rõ kỹ thuật để thực hiện các đột biến thế ở vị trí xác định trước trong ADN có trình tự đã biết, ví dụ, đột biến đoạn mồi MI3 và đột biến PCR.

Thể liên hợp kháng thể-dược chất

Các hợp chất theo sáng chế bao gồm các hợp chất có hoạt tính chống ung thư. Cụ thể, các hợp chất này bao gồm gốc kháng thể (bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) được liên hợp (tức là, được gắn cộng hóa trị bởi nhóm liên kết) với gốc dược chất, trong đó gốc dược chất khi không được liên hợp với gốc kháng thể có hiệu quả gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào. Theo các phương án khác nhau, gốc dược chất biểu hiện độc tính tế bào giảm hoặc không có độc tính tế bào khi gắn kết trong thể liên hợp nhưng lấy lại độc

tính tế bào sau khi tách ra khỏi nhóm liên kết và gốc kháng thể. Theo các phương án khác nhau, gốc dược chất biểu hiện sự diệt đích âm tính kế bên giảm hoặc không có sự diệt đích âm tính kế bên khi gắn kết trong thể liên hợp (ví dụ, sử dụng nhóm liên kết không tách được) nhưng biểu hiện sự diệt đích âm tính kế bên tăng sau khi tách khỏi thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp có gốc tách được Val-Cit có thể tách được).

Sự phát triển và sản xuất ADC để sử dụng làm tác nhân điều trị cho người, ví dụ, là tác nhân chữa bệnh ung thư, có thể đòi hỏi nhiều hơn việc xác định đặc điểm kháng thể có khả năng gắn kết với đích hoặc các đích mong muốn và gắn với dược chất sử dụng trên chính nó để điều trị bệnh ung thư. Sự liên kết kháng thể với dược chất có thể có hiệu quả đáng kể và không dự đoán được trên hoạt tính của một hoặc cả hai thành phần là kháng thể và dược chất, hiệu quả này sẽ thay đổi phụ thuộc vào kiểu nhóm liên kết và/hoặc dược chất được chọn. Theo một số phương án, do đó, các thành phần của ADC được chọn để (i) giữ được một hoặc nhiều đặc điểm chữa bệnh biểu hiện bởi kháng thể và gốc dược chất khi tách rời, (ii) duy trì đặc điểm gắn kết đặc hiệu của gốc kháng thể; (iii) tối ưu hóa lượng mang dược chất và tỷ lệ dược chất với kháng thể; (iv) cho phép phân phối, ví dụ, phân phối trong tế bào, gốc dược chất bằng cách gắn bền vững với gốc kháng thể; (v) giữ được sự ổn định ADC ở dạng thể liên hợp nguyên vẹn cho đến khi vận chuyển hoặc phân phối tới vị trí đích; (vi) tối thiểu hóa sự kết tụ của ADC trước hoặc sau khi sử dụng; (vii) tạo ra hiệu quả điều trị, ví dụ, hiệu quả gây độc tế bào, của gốc dược chất sau khi tách trong môi trường tế bào; (viii) biểu hiện hiệu quả điều trị chống ung thư *in vivo* có thể so sánh được với hoặc vượt trội với hiệu quả của kháng thể và gốc dược chất khi tách riêng biệt; (ix) tối thiểu hóa sự diệt sai đích của gốc dược chất; và/hoặc (x) biểu hiện đặc điểm dược động học và dược lực học mong muốn, đặc tính bào chế, và profin độc tính/miễn dịch. Có thể cần thiết sàng lọc mỗi đặc điểm trong số các đặc tính này để xác định ADC cải tiến sử dụng để điều trị bệnh (Ab et al. (2015) Mol. Cancer Ther. 14:1605-13).

Theo các phương án khác nhau, ADC được bộc lộ trong đây biểu hiện các đặc điểm ưu tiên ở mức không dự đoán được trong một số hoặc mỗi loại được nêu trên. Ví dụ, theo một số phương án, các cấu trúc ADC bao gồm Mal gắn với một kháng thể, đơn vị khoảng cách PEG (tốt hơn là đơn vị khoảng cách PEG ngắn), và/hoặc nhóm liên kết phân cắt được là peptit (ví dụ, nhóm liên kết Val-Cit) biểu hiện một cách ngạc nhiên lượng mang dược chất, profin kết tụ, và/hoặc ổn định được ưu tiên, và/hoặc bảo vệ chức năng gắn kết kháng thể, hoạt tính dược chất, và/hoặc sự diệt đích âm tính kế bên cải thiện, trong khi vẫn làm

giảm sự diệt sai đích, so với các ADC sử dụng các cấu trúc nhóm liên kết không tách được hoặc tách được khác.

Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng-FRA như MORAb-003) biểu hiện đặc điểm được ưu tiên đặc biệt trong các loại được nêu trên, so với nhóm liên kết không tách được hoặc tách được khác nối eribulin với gốc kháng thể. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng-FRA như MORAb-003) biểu hiện đặc điểm diệt đích âm tính kế bên được ưu tiên đặc biệt so với ADC không tách được. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng-FRA như MORAb-003) biểu hiện đặc điểm diệt đích âm tính kế bên ưu tiên đặc biệt so với ADC sử dụng cấu trúc nhóm liên kết phân cắt được khác.

Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với MORAb-003 biểu hiện tỷ lệ dược chất:kháng thể cao hơn và mong muốn hơn (tức là, tỷ lệ khoảng 3-4) so với ADC, ví dụ, bao gồm nhóm liên kết được gắn với kháng thể qua gốc khác (ví dụ, gốc sucxinimit). Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với MORAb-003 biểu hiện tỷ lệ dược chất:kháng thể cao hơn và mong muốn hơn, và/hoặc mức kết tụ thấp hơn, so với ADC, ví dụ, bao gồm đơn vị khoảng cách dài hơn (ví dụ, $(PEG)_8$). Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với MORAb-003 chứng minh tỷ lệ dược chất:kháng thể cao hơn và mong muốn hơn, mức kết tụ thấp hơn, sự diệt đúng đích tăng lên, và/hoặc sự diệt sai đích thấp hơn so với ADC, ví dụ, bao gồm gốc tách được khác (tức là, gốc tách được không phải là peptit, như disulfua hoặc sulfonamit tách được). Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với MORAb-003 chứng minh sự ổn định tăng, sự diệt đúng đích tăng, sự diệt sai đích giảm, mức kết tụ thấp hơn, và/hoặc tỷ lệ dược chất:kháng thể cao hơn và mong muốn hơn so với ADC, ví dụ, bao gồm đơn vị axit amin khác (ví dụ, Ala-Ala-Asn) hoặc gốc tách được khác (ví dụ, disulfua hoặc sulfonamit tách được).

Theo một số phương án, một số hoặc tất cả các đặc điểm mong muốn mô tả trên của các ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với MORAb-003 có thể quan sát được với các ADC bao gồm nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-

eribulin- độc tố được liên hợp với kháng thể kháng-her2 như trastuzumab, hoặc kháng thể kháng-mesothelin.

Các hợp chất ADC theo sáng chế có thể phân phối chọn lọc một lượng có hiệu quả của chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào đến tế bào ung thư hoặc đến mô khối u. Đã phát hiện ra rằng các ADC được bộc lộ có hoạt tính gây độc tế bào và/hoặc kìm hãm tế bào tiềm năng kháng lại các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích tương ứng (ví dụ, FRA hoặc her2). Theo một số phương án, hoạt tính gây độc tế bào và/hoặc kìm hãm tế bào của ADC là phụ thuộc vào mức biểu hiện kháng nguyên đích trong tế bào. Theo một số phương án, các ADC được bộc lộ là đặc biệt hiệu quả trong việc diệt tế bào ung thư biểu hiện mức độ cao kháng nguyên đích, so với tế bào ung thư biểu hiện cùng một kháng nguyên ở mức thấp hơn. Theo một số phương án, ADC được bộc lộ là đặc biệt hiệu quả trong việc diệt tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên đích ở mức trung bình, so với tế bào ung thư biểu hiện cùng một kháng nguyên ở mức thấp. Các bệnh ung thư biểu hiện FRA mức độ cao ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư buồng trứng (ví dụ, bệnh ung thư thanh dịch buồng trứng, bệnh ung thư buồng trứng tế bào sáng), caxinoit phổi, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể, bệnh ung thư nội mạc tử cung, và bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (ví dụ, ung thư tuyến). Các bệnh ung thư biểu hiện FRA mức độ trung bình ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư dạ dày và bệnh ung thư trực kết tràng. Các bệnh ung thư biểu hiện FRA mức độ thấp ví dụ gồm nhưng không giới hạn ở bệnh u melanin và u lympho. Bệnh ung thư biểu hiện her2 mức độ cao bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư buồng trứng, và bệnh ung thư nội mạc tử cung. Bệnh ung thư biểu hiện her2 mức độ trung bình ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư bàng quang.

Theo một số phương án, sự cắt ADC sẽ giải phóng eribulin khỏi gốc kháng thể và nhóm liên kết. Theo một số phương án, sự cắt và giải phóng eribulin làm tăng độc tính tế bào của ADC. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết phân cắt được đặc biệt hiệu quả ở việc diệt tế bào ung thư, bao gồm sự diệt đích âm tính kế bên, so với sự điều trị so sánh được bởi ADC bao gồm nhóm liên kết không tách được. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết phân cắt được (ví dụ, nhóm liên kết Val-Cit) chứng minh sự diệt đúng tế bào đích tăng lên và/hoặc sự diệt sai tế bào đích giảm so với ADC bao gồm nhóm liên kết không tách được (ví dụ, nhóm liên kết $(PEG)_2$ hoặc $(PEG)_4$

không tách được), đặc biệt trong đó các tế bào và/hoặc bệnh ung thư được điều trị bởi ADC không biểu hiện mức độ cao kháng nguyên đích.

Theo một số phương án, các ADC được bộc lộ cũng chứng minh hoạt tính diệt đích âm tính kế bên, nhưng độc tính tế bào sai đích thấp. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, hoạt tính diệt đích âm tính kế bên của ADC có thể đặc biệt có lợi khi sự thấm vào trong khối u rắn bị hạn chế và/hoặc sự biểu hiện kháng nguyên đích giữa các tế bào khối u là không đồng nhất. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết phân cắt được đặc biệt hiệu quả với sự diệt đích âm tính kế bên và/hoặc chứng minh hoạt tính diệt đích âm tính kế bên cải thiện, so với việc điều trị tương đương bằng ADC bao gồm nhóm liên kết không tách được.

Sáng chế đề xuất hợp chất ADC bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (Ab) chọn đích tế bào khối u, gốc dược chất (D), và gốc liên kết (L) gắn kiểu cộng hóa trị Ab với D. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với kháng nguyên liên kết khối u (ví dụ, FRA hoặc her2) với độ đặc hiệu cao và ái lực cao. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được nội bào hóa vào trong tế bào đích khi gắn kết, ví dụ, vào trong ngăn thoái biến trong tế bào. Do đó, các ADC được ưu tiên là các ADC nội bào hóa khi gắn kết với tế bào đích, trải qua sự thoái biến, và giải phóng gốc dược chất để diệt tế bào ung thư. Gốc dược chất có thể giải phóng khỏi kháng thể và/hoặc gốc liên kết của ADC bởi tác dụng của enzym, thủy phân, oxy hóa, hoặc cơ chế khác.

ADC ví dụ có Công thức I:

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

trong đó Ab = gốc kháng thể (tức là, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên), L = gốc liên kết, D = gốc dược chất, và p = số gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể.

Kháng thể

Gốc kháng thể (Ab) có Công thức I bao gồm trong phạm vi của nó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên đích trên tế bào ung thư. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với kháng nguyên đích với hằng số phân ly (K_D) ≤1 mM, ≤100 nM hoặc ≤10 nM, hoặc giá trị bất kỳ trong khoảng

đó, như đo được bởi, ví dụ, phân tích BIAcore®. Theo một số phương án nhất định, giá trị K_D nằm trong khoảng từ 1pM đến 500pM. Theo một số phương án, giá trị K_D nằm trong khoảng từ 500pM đến 1μM, 1μM đến 100nM, hoặc 100mM đến 10nM.

Theo một số phương án, gốc kháng thể là kháng thể bốn chuỗi (cũng được gọi là globulin miễn dịch), bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, gốc kháng thể là bán thể hai chuỗi (một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của globulin miễn dịch.

Theo một số phương án, gốc kháng thể là kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa gắn kết với kháng nguyên ung thư đích được biểu hiện trên bề mặt của tế bào và đi vào tế bào khi gắn kết. Theo một số phương án, gốc dược chất của ADC được giải phóng khỏi gốc kháng thể của ADC sau khi ADC đi vào và được trình diện trong tế bào biểu hiện kháng nguyên ung thư đích (tức là, sau khi ADC đã được nội bào hóa).

Các trình tự axit amin và trình tự axit nucleic của kháng thể ví dụ theo sáng chế được nêu trong Bảng 1-9.

Bảng 1. Kháng thể

mAb	Nhóm/Isotyp	Đích
MORAb-003	được biến đổi cho phù hợp với người	thụ thể folat alpha của người
MORAb-009	khảm chuột-người	mesothelin người
trastuzumab	được biến đổi cho phù hợp với người	her2/neu người
33011-xi	khảm thỏ-người	mesothelin người
33011-zu	được biến đổi cho phù hợp với người	mesothelin người
111B10-xi	khảm thỏ-người	mesothelin người
111B10-zu	được biến đổi cho phù hợp với người	mesothelin người
201C15-xi	khảm thỏ-người	mesothelin người
201C15-zu	được biến đổi cho phù hợp với người	mesothelin người
346C6-xi	khảm thỏ-người	mesothelin người
346C6-zu	được biến đổi cho phù hợp với người	mesothelin người

Ký hiệu viết tắt: xi – khảm; zu – được biến đổi cho phù hợp với người.

Bảng 2. Trình tự axit amin của vùng biến đổi mAb

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit amin
1	MORAb-003	Chuỗi nặng	23	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC SASGFTFSGYGLSWVRQAPGKG LEWVAMISSGGSYTYYADSVK GRFAISRDNAKNTLFLQMDSLR PEDTGVYFCARHGDDPAWFAY WGQGTPVTVSS
2	MORAb-003	Chuỗi nhẹ	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS VSSSISSNNLHWYQQKPGKAPK PWIYGTSNLASGVPSRFSGSGSG TDYTFTISSLQPEDIATYYCQQW SSYPYMYTFGQGTKVEIK
3	MORAb-009	Chuỗi nặng	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISC KASGYSFTGYTMNWVKQSHGK SLEWIGLITPYNGASSYNQKFRG KATLTVDKSSSTAYMDLLSLTS EDSAVYFCARGGYDGRGFDYW GSGTPVTVSS
4	MORAb-009	Chuỗi nhẹ	26	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMHWYQQKSGTSPKR WIYDTSKLASGVPGRFSGSGSG NSYSLTISSVEAEDDATYYCQQ WSKHPLTFGSGTKVEIK
5	trastuzumab	Chuỗi nặng	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSS

6	trastuzumab	Chuỗi nhẹ	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIK
7	33011-xi	Chuỗi nặng	29	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGISLSSDAISWVRQAPGKGLEY IGIINGGGNTYYASWAKGRFTIS KTSTTVDLKITSPTTEDTATYFC ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL WGPGTLVTVSS
8	33011-xi	Chuỗi nhẹ	30	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIK CQASQSISSVLSWYQQKPGQPP KLLIYLASTLASGVPSRFSGSRS GTEFTLTISDLECDDAATYYCQT NYGTSSSNYGFAFGGGTEVVVK
9	33011-zu	Chuỗi nặng	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGISLSSDAISWVRQAPGKGL EYIGIINGGGNTYYASWAKGRF TISRHNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGIQHGGGNSDYYY YGMDLWGQGTLVTVSS
10	33011-zu	Chuỗi nhẹ	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQSISSVLSWYQQKPGKAPK LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQCEDIATYYCQTN YGTSSSNYGFAFGGGTKVEIK

11	111B10-xi	Chuỗi nặng	33	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGFSLNNYAMSWVRQAPGKGL EWIGSISTGGLAFYANWAKGRF TISRTSTTVDLKMTSLTTEDTAT YFCGRNGGGSYIFYYFDLWGQ GTLVTVSS
12	111B10-xi	Chuỗi nhẹ	34	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKC QASQSISSYLSWYQQKPGQPPK LLIYSASTLASGVSSRFKGSGSG TEYTLTISDLECADAATYFCQSY YDIGTSTFGGGTEVVVK
13	111B10-zu	Chuỗi nặng	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSLNNYAMSWVRQAPGK GLEWIGSISTGGLAFYANWAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARNGGGSYIFYYFD LWGQGTLVTVSS
14	111B10-zu	Chuỗi nhẹ	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQSISSYLSWYQQKPGKAPK LLIYSASTLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQCEDAATYYCQSY YDIGTSTFGGGTKVEIK
15	201C15-xi	Chuỗi nặng	37	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCT VSGIDLSSYAMGWFRQAPGKGL EYIGTINIGGRVYYASWAKGRF TISRTSTTVDLKAPSLTAEDTAT YFCARYYNGGSYDIWGPGTLVT VSL

16	201C15-xi	Chuỗi nhẹ	38	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIK CQASESIYRVLAWYQQKPGQPP KLLIYDTSTLASGAPSRFKGSGY GTEFTLTISGVQCEDAATYYCQ GGYYADSYGIAFGGGTEVVVK
17	201C15-zu	Chuỗi nặng	39	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC SASGIDLSSYAMGWVRQAPGK GLEYIGTINIGGRVYYASWAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARYYNGGSYDIWG QGTLVTVSS
18	201C15-zu	Chuỗi nhẹ	40	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC QASESIYRVLAWYQQKPGKAPK LLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQCDDAATYYCQG GYYADSYGIAFGGGTKVEIK
19	346C6-xi	Chuỗi nặng	41	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCT ASGFSLSSYAMIWVRQAPGEGL EWIGTISTGGITYYASWAKGRFT ISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYF CARGGYAASSAYYLPYYFDLW GQGTLVTVSS
20	346C6-xi	Chuỗi nhẹ	42	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC QSSQSVYNNNNLAWFQQKPGQ PPKLLIYLASTLASGVPSRFSGS GSGTQFTLTISGVQCDDAATYY CLGGCDDDADTFAFGGGTEVV VK

21	346C6-zu	Chuỗi nặng	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSLSSYAMIWVRQAPGKG LEWIGTISTGGITYYASWAKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGYAASSAYYLPY YFDLWGQGTLVTVSS
22	346C6-zu	Chuỗi nhẹ	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSQSVYNNNNLAWYQQKPGK VPKLLIYLASTLASGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQCEDAATYYC LGGCDDDADTFAFGGGTKVEIK

Bảng 3. Trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi mAb

	mAb	**Chuỗi IgG**	**SEQ ID NO**	**Trình tự axit nucleic**
1	MORAb-003	Chuỗi nặng	45	GAGGTCCAACTGGTGGAG AGCGGTGGAGGTGTTGTG CAACCTGGCCGGTCCCTGC GCCTGTCCTGCTCCGCATC TGGCTTCACCTTCAGCGGC TATGGGTTGTCTTGGGTGA GACAGGCACCTGGAAAAG GTCTTGAGTGGGTTGCAAT GATTAGTAGTGGTGGTAGT TATACCTACTATGCAGACA GTGTGAAGGGTAGATTTG CAATATCGCGAGACAACG CCAAGAACACATTGTTCCT GCAAATGGACAGCCTGAG ACCCGAAGACACCGGGGT CTATTTTTGTGCAAGACAT GGGGACGATCCCGCCTGG TTCGCTTATTGGGGCCAAG

				GGACCCCGGTCACCGTCTC CTCA
2	MORAb-003	Chuỗi nhẹ	46	GACATCCAGCTGACCCAG AGCCCAAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGTGACAGA GTGACCATCACCTGTAGTG TCAGCTCAAGTATAAGTTC CAACAACTTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGTAAG GCTCCAAAGCCATGGATCT ACGGCACATCCAACCTGG CTTCTGGTGTGCCAAGCAG ATTCAGCGGTAGCGGTAG CGGTACCGACTACACCTTC ACCATCAGCAGCCTCCAG CCAGAGGACATCGCCACC TACTACTGCCAACAGTGG AGTAGTTACCCGTACATGT ACACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
3	MORAb-009	Chuỗi nặng	47	CAGGTACAACTGCAGCAG TCTGGGCCTGAGCTGGAG AAGCCTGGCGCTTCAGTG AAGATATCCTGCAAGGCTT CTGGTTACTCATTCACTGG CTACACCATGAACTGGGT GAAGCAGAGCCATGGAAA GAGCCTTGAGTGGATTGG ACTTATTACTCCTTACAAT GGTGCTTCTAGCTACAACC AGAAGTTCAGGGGCAAGG CCACATTAACTGTAGACA

				AGTCATCCAGCACAGCCT ACATGGACCTCCTCAGTCT GACATCTGAAGACTCTGC AGTCTATTTCTGTGCAAGG GGGGGTTACGACGGGAGG GGTTTTGACTACTGGGGAT CCGGGACCCCGGTCACCG TCTCCTCA
4	MORAb-009	Chuỗi nhẹ	48	GACATCGAGCTCACTCAGT CTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAGGT CACCATGACCTGCAGTGCC AGCTCAAGTGTAAGTTAC ATGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAGGCACCTCCCCC AAAAGATGGATTTATGAC ACATCCAAACTGGCTTCTG GAGTCCCAGGTCGCTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAAA CTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGCGTGGAGGCTGAA GATGATGCAACTTATTACT GCCAGCAGTGGAGTAAGC ACCCTCTCACGTTCGGATC CGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA
5	33011-xi	Chuỗi nặng	49	CAGTCGGTGGAGGAGTCC GGGGGTCGCCTGGTCACG CCTGGGACACCCCTGACA CTCACCTGCACCGTCTCTG GAATCTCCCTCAGTAGCGA TGCAATAAGCTGGGTCCG

				CCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGAATACATCGGAAT CATTAATGGTGGTGGTAAC ACATACTACGCGAGCTGG GCGAAAGGCCGATTCACC ATCTCCAAAACCTCGACCA CGGTGGATCTGAAAATCA CCAGTCCGACAACCGAGG ACACGGCCACCTATTTCTG TGCCAGAGGCATTCAACA TGGTGGTGGTAATAGTGAT TATTATTATTACGGCATGG ACCTCTGGGGCCCAGGCA CCCTGGTCACTGTCTCTTC A

6	33011-xi	Chuỗi nhẹ	50	GAAGTGTTGATGACCCAG ACTCCATCCTCCGTGTCTG CAGCTGTGGGAGACACAG TCACCATCAAGTGCCAGG CCAGTCAGAGCATTAGTA GTGTCTTGTCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGCAGCC TCCCAAGCTCCTGATCTAT CTGGCATCCACTCTGGCAT CTGGGGTCCCATCGCGGTT CAGCGGCAGTAGATCTGG GACAGAGTTCACTCTCACC ATCAGCGACCTGGAGTGT GACGATGCTGCCACTTACT ACTGTCAAACCAATTATGG TACTAGTAGTAGTAATTAT GGTTTTGCTTTCGGCGGAG GGACCGAGGTGGTCGTCA AA
7	33011-zu	Chuỗi nặng	51	GAAGTCCAACTGGTGGAA AGCGGGGGAGGACTGGTG CAGCCGGGCGGATCCCTC CGGCTGTCATGTGCTGCAT CGGGAATTTCCCTCTCCTC CGACGCGATTAGCTGGGT CAGACAGGCCCCCGGAAA GGGGCTGGAGTACATCGG TATCATCAACGGCGGCGG AAACACCTACTACGCCTCC TGGGCCAAGGGCCGCTTC ACCATCTCGCGGCATAATT CCAAGAACACTCTGTACTT

				GCAAATGAACTCCCTGAG GGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCGCGCGG CATCCAGCACGGTGGTGG AAACAGCGACTACTACTA CTATGGGATGGATCTGTGG GGCCAGGGAACTCTTGTG ACCGTGTCGTCA
8	33011-zu	Chuỗi nhẹ	52	GACATTCAGATGACCCAG TCCCCAAGCTCGCTGTCCG CCTCCGTGGGCGACCGCGT GACCATCACGTGCCAGGC GTCCCAGTCAATTAGCAGC GTGCTCTCCTGGTACCAAC AGAAGCCGGGGAAAGCAC CCAAGCTGCTGATCTACTT GGCCTCCACTCTGGCCTCG GGAGTGCCTTCACGGTTCT CCGGATCGGGATCTGGTA CTGATTTCACCCTCACCAT CTCGAGCCTTCAGTGCGAG GACATCGCTACTTACTATT GTCAAACCAACTACGGAA CCTCCAGCTCCAACTACGG CTTTGCCTTCGGTGGCGGG ACCAAGGTCGAAATCAAA
9	111B10-xi	Chuỗi nặng	53	CAGTCGGTGGAGGAGTCC GGGGGTCGCCTGGTCACG CCTGGGACACCCCTGACA CTCACCTGCACAGTCTCTG GATTCTCCCTCAATAACTA TGCAATGAGCTGGGTCCG

				CCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTGGAATGGATCGGATC CATTAGTACTGGTGGTCTC GCATTCTACGCGAACTGG GCAAAAGGCCGATTCACC ATCTCCAGAACCTCGACCA CGGTGGATCTGAAAATGA CCAGTCTGACAACCGAGG ACACGGCCACCTATTTCTG TGGCAGAAATGGTGGTGG TAGTTATATTTTCTATTATT TTGACTTGTGGGGCCAAG GCACCCTCGTCACTGTCTC TTCA
10	111B10-xi	Chuỗi nhẹ	54	GCATTCGAATTGACCCAG ACTCCATCCTCCGTGGAGG CAGCTGTGGGAGGCACAA TCACCATCAAGTGCCAGG CCAGTCAGAGCATTAGTA GTTACTTATCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGCAGCC TCCCAAGCTCCTGATCTAT TCTGCATCCACTCTGGCAT CTGGGGTCTCATCGCGGTT CAAAGGCAGTGGATCTGG GACAGAGTACACTCTCAC CATCAGCGACCTGGAGTG TGCCGATGCTGCCACTTAC TTCTGTCAAAGCTATTATG ATATTGGTACTAGTACTTT CGGCGGAGGGACCGAGGT GGTCGTCAAA

11	111B10-zu	Chuỗi nặng	55	GAAGTGCAGCTGGTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGA GACTGTCTTGTGCCGCCTC CGGCTTCTCCCTGAACAAC TACGCCATGTCCTGGGTGC GACAGGCCCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGATCGGCT CCATCAGCACAGGCGGCC TGGCCTTCTACGCCAATTG GGCCAAGGGCCGGTTCAC CATCAGCCGGGACAACTC CAAGAACACCCTGTACCTC CAGATGAACTCCCTGCGG GCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGTGCCAGAAAC GGCGGAGGCTCCTACATCT TCTACTACTTCGACCTGTG GGGCCAGGGCACCCTCGT GACAGTGTCATCT
12	111B10-zu	Chuỗi nhẹ	56	GATATTCAGATGACCCAGT CCCCCTCCAGCCTGTCCGC TTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTCAGGCC TCCCAGTCCATCTCCTCCT ACCTGTCCTGGTATCAGCA GAAGCCCGGCAAGGCCCC CAAGCTGCTGATCTACTCT GCCTCCACACTGGCCTCCG GCGTGCCCTCTAGATTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACC GACTTTACCCTGACCATCA

				GCTCCCTCCAGTGCGAGG ATGCCGCCACCTACTACTG CCAGTCCTACTACGACATC GGCACCTCCACCTTCGGCG GAGGCACCAAGGTGGAAA TCAAA
13	201C15-xi	Chuỗi nặng	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCC GGGGGTCGCCTGGTCACG CCTGGGACACCCCTGACA CTCACCTGCACAGTCTCTG GAATCGACCTCAGTAGCT ATGCAATGGGCTGGTTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTGGAATACATCGGAAC CATTAATATTGGTGGTCGC GTATATTACGCGAGCTGG GCAAAAGGCCGATTCACC ATCTCCAGAACCTCGACCA CGGTGGATCTGAAAGCGC CCAGTCTGACAGCCGAGG ACACGGCCACCTATTTCTG TGCCAGATATTATAATGGT GGTAGTTATGACATCTGGG GCCCAGGCACCCTGGTCA CCGTCTCTTTA
14	201C15-xi	Chuỗi nhẹ	58	GATGTTGTGATGACCCAG ACTCCAGCCTCCGCGTCTG AACCTGTGGGAGGCACAG TCACCATCAAGTGCCAGG CCAGTGAGAGCATTTATCG CGTATTGGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGCAGCCT

				CCCAAGCTCCTGATCTATG ATACATCCACTCTGGCATC TGGGGCCCCATCGCGGTTC AAAGGCAGTGGATATGGG ACAGAGTTCACTCTCACCA TCAGCGGCGTGCAGTGTG AAGATGCTGCCACTTACTA CTGTCAAGGCGGTTATTAT GCTGATAGTTATGGTATTG CTTTCGGCGGAGGGACCG AGGTGGTGGTCAAA
15	201C15-zu	Chuỗi nặng	59	CAGGTGCAGCTGGTGGAA TCTGGCGGAGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCTCTGA GACTGTCCTGTTCCGCCTC CGGAATCGACCTGTCCTCC TACGCTATGGGCTGGGTGC GACAGGCTCCTGGCAAGG GCCTGGAGTACATCGGCA CCATCAACATCGGCGGCA GAGTGTACTACGCCTCCTG GGCCAAGGGCCGGTTCAC CATCTCCAGAGACAACTCC AAGAACACCCTGTACCTCC AGATGAACTCCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGCGCCCGGTACTA CAACGGCGGCTCCTACGA TATCTGGGGCCAGGGCAC ACTCGTGACCGTGTCCTCT
16	201C15-zu	Chuỗi nhẹ	60	GATATCCAGATGACCCAG TCCCCCTCCACCCTGTCTG

				CCTCTGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCAGGC CTCCGAGTCCATCTACCGG GTGCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCTGGCAAGGCCC CCAAGCTGCTGATCTACGA CACCAGCACACTGGCCTCC GGCGTGCCCTCTAGATTCT CCGGCTCTGGCTCTGGCAC CGAGTTTACCCTGACCATC TCCAGCCTCCAGTGCGACG ACGCCGCCACCTACTATTG TCAGGGCGGCTACTACGC CGACTCCTACGGAATCGCT TTCGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAA
17	346C6-xi	Chuỗi nặng	61	CAGTCGGTGGAGGAGTCC GGCGGTCGCCTGGTAAAG CCTGACGAATCCCTGACAC TCACCTGCACAGCCTCTGG ATTCTCCCTCAGTAGTTAT GCAATGATCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGGAGGGGC TGGAATGGATCGGAACCA TTAGTACTGGTGGTATCAC ATACTACGCGAGCTGGGC GAAAGGCCGATTCACCAT CTCCAAAACCTCGACCAC GGTGGATCTGAAAATCAC CAGTCCGACAACCGAGGA CACGGCCACCTATTTCTGT GCCAGAGGGGGATATGCT

				GCTAGTAGTGCTTATTATC TCCCGTACTACTTTGACTT GTGGGGCCAAGGGACCCT GGTCACCGTCTCCTCA
18	346C6-xi	Chuỗi nhẹ	62	GCAGCCGTGCTGACCCAG ACACCATCACCCGTGTCTG CAGCTGTGGGAGGCACAG TCACCATCAGTTGCCAGTC CAGTCAGAGTGTTTATAAT AATAACAACTTAGCCTGGT TTCAGCAGAAACCCGGGC AGCCTCCCAAGCTTCTGAT CTATCTGGCATCCACTCTG GCATCTGGGGTCCCATCAC GGTTCAGCGGCAGTGGAT CTGGGACACAGTTCACTCT CACCATCAGCGGCGTGCA GTGTGACGATGCTGCCACT TATTACTGTCTAGGTGGTT GTGATGATGATGCTGATAC TTTTGCTTTCGGCGGAGGG ACTGAGGTGGTGGTCAAA
19	346C6-zu	Chuỗi nặng	63	GAAGTGCAGCTGGTGGAA TCTGGCGGCGGACTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGA GACTGTCTTGTGCCGCCTC CGGCTTCTCCCTGTCCTCC TACGCTATGATCTGGGTGC GACAGGCCCCTGGCAAGG GCCTGGAATGGATCGGCA CCATCTCTACCGGCGGAAT TACCTACTACGCCTCCTGG

				GCCAAGGGCCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAACTCC AAGAACACCCTGTACCTCC AGATGAACTCCCTGCGGG CCGAGGACACCGCCGTGT ACTATTGTGCTAGAGGCG GCTACGCCGCCAGCTCCGC TTACTACCTGCCCTACTAC TTCGACCTGTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACAGTGT CATCT
20	346C6-zu	Chuỗi nhẹ	64	GATATTCAGATGACCCAGT CCCCCTCCAGCCTGTCCGC TTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTCAGTCC TCCCAGTCCGTGTATAACA ACAACAACCTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCCGGCA AGGTGCCCAAGCTGCTGA TCTACCTGGCCTCCACACT GGCCTCTGGCGTGCCCTCT AGATTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGACTTTACCCT GACCATCAGCTCCCTCCAG TGCGAGGATGCCGCCACC TACTATTGCCTGGGCGGCT GCGACGACGACGCCGATA CCTTTGCTTTTGGCGGAGG CACCAAGGTGGAAATCAA A

Bảng 4. Trình tự axit amin của các CDR mAb Kabat

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit amin
1	MORAb-003	HC CDR1	2	GYGLS
2	MORAb-003	HC CDR2	3	MISSGGSYTYYADSVKG
3	MORAb-003	HC CDR3	4	HGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	7	SVSSSISSNNLH
5	MORAb-003	LC CDR2	8	GTSNLAS
6	MORAb-003	LC CDR3	9	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	65	GYTMN
8	MORAb-009	HC CDR2	66	LITPYNGASSYNQKFRG
9	MORAb-009	HC CDR3	67	GGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	68	SASSSVSYMH
11	MORAb-009	LC CDR2	69	DTSKLAS
12	MORAb-009	LC CDR3	70	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	HC CDR1	71	DTYIH
14	trastuzumab	HC CDR2	72	RIYPTNGYTRYADSVKG
15	trastuzumab	HC CDR3	73	WGGDGFYAMDY
16	trastuzumab	LC CDR1	74	RASQDVNTAVA
17	trastuzumab	LC CDR2	75	SASFLYS
18	trastuzumab	LC CDR3	76	QQHYTTPPT
19	33011-xi	HC CDR1	77	SDAIS
20	33011-xi	HC CDR2	78	IINGGGNTYYASWAKG
21	33011-xi	HC CDR3	79	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	80	QASQSISSVLS
23	33011-xi	LC CDR2	81	LASTLAS
24	33011-xi	LC CDR3	82	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	HC CDR1	83	SDAIS
26	33011-zu	HC CDR2	84	IINGGGNTYYASWAKG
27	33011-zu	HC CDR3	85	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	LC CDR1	86	QASQSISSVLS
29	33011-zu	LC CDR2	87	LASTLAS

30	33011-zu	LC CDR3	88	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	HC CDR1	89	NYAMS
32	111B10-xi	HC CDR2	90	SISTGGLAFYANWAKG
33	111B10-xi	HC CDR3	91	NGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	LC CDR1	92	QASQSISSYLS
35	111B10-xi	LC CDR2	93	SASTLAS
36	111B10-xi	LC CDR3	94	QSYYDIGTST
37	111B10-zu	HC CDR1	95	NYAMS
38	111B10-zu	HC CDR2	96	SISTGGLAFYANWAKG
39	111B10-zu	HC CDR3	97	NGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	LC CDR1	98	QASQSISSYLS
41	111B10-zu	LC CDR2	99	SASTLAS
42	111B10-zu	LC CDR3	100	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	HC CDR1	101	SYAMG
44	201C15-xi	HC CDR2	102	TINIGGRVYYASWAKG
45	201C15-xi	HC CDR3	103	YYNGGSYDI
46	201C15-xi	LC CDR1	104	QASESIYRVLA
47	201C15-xi	LC CDR2	105	DTSTLAS
48	201C15-xi	LC CDR3	106	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	HC CDR1	107	SYAMG
50	201C15-zu	HC CDR2	108	TINIGGRVYYASWAKG
51	201C15-zu	HC CDR3	109	YYNGGSYDI
52	201C15-zu	LC CDR1	110	QASESIYRVLA
53	201C15-zu	LC CDR2	111	DTSTLAS
54	201C15-zu	LC CDR3	112	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	HC CDR1	113	SYAMI
56	346C6-xi	HC CDR2	114	TISTGGITYYASWAKG
57	346C6-xi	HC CDR3	115	GGYAASSAYYLPYYFDL
58	346C6-xi	LC CDR1	116	QSSQSVYNNNNLA
59	346C6-xi	LC CDR2	117	LASTLAS
60	346C6-xi	LC CDR3	118	LGGCDDDADTFA

61	346C6-zu	HC CDR1	119	SYAMI
62	346C6-zu	HC CDR2	120	TISTGGITYYASWAKG
63	346C6-zu	HC CDR3	121	GGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	LC CDR1	122	QSSQSVYNNNNLA
65	346C6-zu	LC CDR2	123	LASTLAS
66	346C6-zu	LC CDR3	124	LGGCDDDADTFA

Bảng 5. Trình tự axit nucleic mã hóa các CDR mAb Kabat

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit nucleic
1	MORAb-003	HC CDR1	125	GGCTATGGGTTGTCT
2	MORAb-003	HC CDR2	126	ATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGT
3	MORAb-003	HC CDR3	127	CATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	LC CDR1	128	AGTGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAACAACTTGCAC
5	MORAb-003	LC CDR2	129	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
6	MORAb-003	LC CDR3	130	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	HC CDR1	131	GGCTACACCATGAAC
8	MORAb-009	HC CDR2	132	CTTATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGC
9	MORAb-009	HC CDR3	133	GGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	LC CDR1	134	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
11	MORAb-009	LC CDR2	135	GACACATCCAAACTGGCTTCT
12	MORAb-009	LC CDR3	136	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACG
13	33011-xi	HC CDR1	137	AGCGATGCAATAAGC
14	33011-xi	HC CDR2	138	ATCATTAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGC
15	33011-xi	HC CDR3	139	GGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTATTACGGCATGGACCTC

16	33011-xi	LC CDR1	140	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA GTGTCTTGTCC
17	33011-xi	LC CDR2	141	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
18	33011-xi	LC CDR3	142	CAAACCAATTATGGTACTAGTAG TAGTAATTATGGTTTTGCT
19	33011-zu	HC CDR1	143	TCCGACGCGATTAGC
20	33011-zu	HC CDR2	144	ATCATCAACGGCGGCGGAAACA CCTACTACGCCTCCTGGGCCAAG GGC
21	33011-zu	HC CDR3	145	GGCATCCAGCACGGTGGTGGAA ACAGCGACTACTACTACTATGGG ATGGATCTG
22	33011-zu	LC CDR1	146	CAGGCGTCCCAGTCAATTAGCA GCGTGCTCTCC
23	33011-zu	LC CDR2	147	TTGGCCTCCACTCTGGCCTCG
24	33011-zu	LC CDR3	148	CAAACCAACTACGGAACCTCCA GCTCCAACTACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	HC CDR1	149	AACTATGCAATGAGC
26	111B10-xi	HC CDR2	150	TCCATTAGTACTGGTGGTCTCGC ATTCTACGCGAACTGGGCAAAA GGC
27	111B10-xi	HC CDR3	151	AATGGTGGTGGTAGTTATATTTT CTATTATTTTGACTTG
28	111B10-xi	LC CDR1	152	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA GTTACTTATCC
29	111B10-xi	LC CDR2	153	TCTGCATCCACTCTGGCATCT
30	111B10-xi	LC CDR3	154	CAAAGCTATTATGATATTGGTAC TAGTACT
31	111B10-zu	HC CDR1	155	AACTACGCCATGTCC
32	111B10-zu	HC CDR2	156	TCCATCAGCACAGGCGGCCTGG CCTTCTACGCCAATTGGGCCAAG GGC

33	111B10-zu	HC CDR3	157	AACGGCGGAGGCTCCTACATCTT CTACTACTTCGACCTG
34	111B10-zu	LC CDR1	158	CAGGCCTCCCAGTCCATCTCCTC CTACCTGTCC
35	111B10-zu	LC CDR2	159	TCTGCCTCCACACTGGCCTCC
36	111B10-zu	LC CDR3	160	CAGTCCTACTACGACATCGGCAC CTCCACC
37	201C15-xi	HC CDR1	161	AGCTATGCAATGGGC
38	201C15-xi	HC CDR2	162	ACCATTAATATTGGTGGTCGCGT ATATTACGCGAGCTGGGCAAAA GGC
39	201C15-xi	HC CDR3	163	TATTATAATGGTGGTAGTTATGA CATC
40	201C15-xi	LC CDR1	164	CAGGCCAGTGAGAGCATTTATC GCGTATTGGCC
41	201C15-xi	LC CDR2	165	GATACATCCACTCTGGCATCT
42	201C15-xi	LC CDR3	166	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAG TTATGGTATTGCT
43	201C15-zu	HC CDR1	167	TCCTACGCTATGGGC
44	201C15-zu	HC CDR2	168	ACCATCAACATCGGCGGCAGAG TGTACTACGCCTCCTGGGCCAAG GGC
45	201C15-zu	HC CDR3	169	TACTACAACGGCGGCTCCTACGA TATC
46	201C15-zu	LC CDR1	170	CAGGCCTCCGAGTCCATCTACCG GGTGCTGGCC
47	201C15-zu	LC CDR2	171	GACACCAGCACACTGGCCTCC
48	201C15-zu	LC CDR3	172	CAGGGCGGCTACTACGCCGACT CCTACGGAATCGCT
49	346C6-xi	HC CDR1	173	AGTTATGCAATGATC

50	346C6-xi	HC CDR2	174	ACCATTAGTACTGGTGGTATCAC ATACTACGCGAGCTGGGCGAAA GGC
51	346C6-xi	HC CDR3	175	GGGGGATATGCTGCTAGTAGTG CTTATTATCTCCCGTACTACTTTG ACTTG
52	346C6-xi	LC CDR1	176	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAA CAACAACAACCTGGCC
53	346C6-xi	LC CDR2	177	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
54	346C6-xi	LC CDR3	178	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGC TGATACTTTTGCT
55	346C6-zu	HC CDR1	179	TCCTACGCTATGATC
56	346C6-zu	HC CDR2	180	ACCATCTCTACCGGCGGAATTAC CTACTACGCCTCCTGGGCCAAGG GC
57	346C6-zu	HC CDR3	181	GGCGGCTACGCCGCCAGCTCCG CTTACTACCTGCCCTACTACTTC GACCTG
58	346C6-zu	LC CDR1	182	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAA CAACAACAACCTGGCC
59	346C6-zu	LC CDR2	183	CTGGCCTCCACACTGGCCTCT
60	346C6-zu	LC CDR3	184	CTGGGCGGCTGCGACGACGACG CCGATACCTTTGCT

Bảng 6. Trình tự axit amin của các CDR mAb IMGT

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit amin
1	MORAb-003	HC CDR1	13	GFTFSGYG
2	MORAb-003	HC CDR2	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	HC CDR3	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	16	SSISSNN
5	MORAb-003	LC CDR2	17	GTS
6	MORAb-003	LC CDR3	18	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	HC CDR2	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	HC CDR3	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	188	SSVSY
11	MORAb-009	LC CDR2	189	DTS
12	MORAb-009	LC CDR3	190	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	HC CDR1	191	GFNIKDTY
14	trastuzumab	HC CDR2	192	IYPTNGYT
15	trastuzumab	HC CDR3	193	SRWGGDGFYAMDY
16	trastuzumab	LC CDR1	194	QDVNTA
17	trastuzumab	LC CDR2	195	SAS
18	trastuzumab	LC CDR3	196	QQHYTTPPT
19	33011-xi	HC CDR1	197	GISLSSDA
20	33011-xi	HC CDR2	198	INGGGNT
21	33011-xi	HC CDR3	199	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	200	QSISSV
23	33011-xi	LC CDR2	201	LAS
24	33011-xi	LC CDR3	202	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	HC CDR1	203	GISLSSDA
26	33011-zu	HC CDR2	204	INGGGNT
27	33011-zu	HC CDR3	205	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL

28	33011-zu	LC CDR1	206	QSISSV
29	33011-zu	LC CDR2	207	LAS
30	33011-zu	LC CDR3	208	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	HC CDR1	209	GFSLNNYA
32	111B10-xi	HC CDR2	210	ISTGGLA
33	111B10-xi	HC CDR3	211	GRNGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	LC CDR1	212	QSISSY
35	111B10-xi	LC CDR2	213	SAS
36	111B10-xi	LC CDR3	214	QSYYDIGTST
37	111B10-zu	HC CDR1	215	GFSLNNYA
38	111B10-zu	HC CDR2	216	ISTGGLA
39	111B10-zu	HC CDR3	217	ARNGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	LC CDR1	218	QSISSY
41	111B10-zu	LC CDR2	219	SAS
42	111B10-zu	LC CDR3	220	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	HC CDR1	221	GIDLSSYA
44	201C15-xi	HC CDR2	222	INIGGRV
45	201C15-xi	HC CDR3	223	ARYYNGGSYDI
46	201C15-xi	LC CDR1	224	ESIYRV
47	201C15-xi	LC CDR2	225	DTS
48	201C15-xi	LC CDR3	226	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	HC CDR1	227	GIDLSSYA
50	201C15-zu	HC CDR2	228	INIGGRV
51	201C15-zu	HC CDR3	229	ARYYNGGSYDI
52	201C15-zu	LC CDR1	230	ESIYRV
53	201C15-zu	LC CDR2	231	DTS
54	201C15-zu	LC CDR3	232	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	HC CDR1	233	GFSLSSYA
56	346C6-xi	HC CDR2	234	ISTGGIT
57	346C6-xi	HC CDR3	235	ARGGYAASSAYYLPYYFDL

58	346C6-xi	LC CDR1	236	QSVYNNNN
59	346C6-xi	LC CDR2	237	LAS
60	346C6-xi	LC CDR3	238	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	HC CDR1	239	GFSLSSYA
62	346C6-zu	HC CDR2	240	ISTGGIT
63	346C6-zu	HC CDR3	241	ARGGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	LC CDR1	242	QSVYNNNN
65	346C6-zu	LC CDR2	243	LAS
66	346C6-zu	LC CDR3	244	LGGCDDDADTFA

Bảng 7. Trình tự axit nucleic mã hóa các CDR mAb IMGT

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit nucleic
1	MORAb-003	HC CDR1	245	GGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGG
2	MORAb-003	HC CDR2	246	ATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACC
3	MORAb-003	HC CDR3	247	GCAAGACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	LC CDR1	248	TCAAGTATAAGTTCCAACAAC
5	MORAb-003	LC CDR2	249	GGCACATCC
6	MORAb-003	LC CDR3	250	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	HC CDR1	251	GGTTACTCATTCACTGGCTACACC
8	MORAb-009	HC CDR2	252	ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT
9	MORAb-009	HC CDR3	253	GCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	LC CDR1	254	TCAAGTGTAAGTTAC
11	MORAb-009	LC CDR2	255	GACACATCC
12	MORAb-009	LC CDR3	256	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCTCTCACG
13	33011-xi	HC CDR1	257	GGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCA
14	33011-xi	HC CDR2	258	ATTAATGGTGGTGGTAACACA
15	33011-xi	HC CDR3	259	GCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	LC CDR1	260	CAGAGCATTAGTAGTGTC
17	33011-xi	LC CDR2	261	CTGGCATCT

18	33011-xi	LC CDR3	262	CAAACCAATTATGGTACTAGTA GTAGTAATTATGGTTTTGCT
19	33011-zu	HC CDR1	263	GGAATTTCCCTCTCCTCCGACG CG
20	33011-zu	HC CDR2	264	ATCAACGGCGGCGGAAACACC
21	33011-zu	HC CDR3	265	GCGCGCGGCATCCAGCACGGTG GTGGAAACAGCGACTACTACTA CTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	LC CDR1	266	CAGTCAATTAGCAGCGTG
23	33011-zu	LC CDR2	267	TTGGCCTCC
24	33011-zu	LC CDR3	268	CAAACCAACTACGGAACCTCCA GCTCCAACTACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	HC CDR1	269	GGATTCTCCCTCAATAACTATG CA
26	111B10-xi	HC CDR2	270	ATTAGTACTGGTGGTCTCGCA
27	111B10-xi	HC CDR3	271	GGCAGAAATGGTGGTGGTAGTT ATATTTTCTATTATTTTGACTTG
28	111B10-xi	LC CDR1	272	CAGAGCATTAGTAGTTAC
29	111B10-xi	LC CDR2	273	TCTGCATCC
30	111B10-xi	LC CDR3	274	CAAAGCTATTATGATATTGGTA CTAGTACT
31	111B10-zu	HC CDR1	275	GGCTTCTCCCTGAACAACTACG CC
32	111B10-zu	HC CDR2	276	ATCAGCACAGGCGGCCTGGCC
33	111B10-zu	HC CDR3	277	GCCAGAAACGGCGGAGGCTCCT ACATCTTCTACTACTTCGACCTG
34	111B10-zu	LC CDR1	278	CAGTCCATCTCCTCCTAC
35	111B10-zu	LC CDR2	279	TCTGCCTCC
36	111B10-zu	LC CDR3	300	CAGTCCTACTACGACATCGGCA CCTCCACC

37	201C15-xi	HC CDR1	301	GGAATCGACCTCAGTAGCTATG CA
38	201C15-xi	HC CDR2	302	ATTAATATTGGTGGTCGCGTA
39	201C15-xi	HC CDR3	303	GCCAGATATTATAATGGTGGTA GTTATGACATC
40	201C15-xi	LC CDR1	304	GAGAGCATTTATCGCGTA
41	201C15-xi	LC CDR2	305	GATACATCC
42	201C15-xi	LC CDR3	306	CAAGGCGGTTATTATGCTGATA GTTATGGTATTGCT
43	201C15-zu	HC CDR1	307	GGAATCGACCTGTCCTCCTACG CT
44	201C15-zu	HC CDR2	308	ATCAACATCGGCGGCAGAGTG
45	201C15-zu	HC CDR3	309	GCCCGGTACTACAACGGCGGCT CCTACGATATC
46	201C15-zu	LC CDR1	310	GAGTCCATCTACCGGGTG
47	201C15-zu	LC CDR2	311	GACACCAGC
48	201C15-zu	LC CDR3	312	CAGGGCGGCTACTACGCCGACT CCTACGGAATCGCT
49	346C6-xi	HC CDR1	313	GGATTCTCCCTCAGTAGTTATG CA
50	346C6-xi	HC CDR2	314	ATTAGTACTGGTGGTATCACA
51	346C6-xi	HC CDR3	315	GCCAGAGGGGGATATGCTGCTA GTAGTGCTTATTATCTCCCGTAC TACTTTGACTTG
52	346C6-xi	LC CDR1	316	CAGAGTGTTTATAATAATAACA AC
53	346C6-xi	LC CDR2	317	CTGGCATCC
54	346C6-xi	LC CDR3	318	CTAGGTGGTTGTGATGATGATG CTGATACTTTTGCT
55	346C6-zu	HC CDR1	319	GGCTTCTCCCTGTCCTCCTACGC T

56	346C6-zu	HC CDR2	320	ATCTCTACCGGCGGAATTACC
57	346C6-zu	HC CDR3	321	GCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCCCTACTACTTCGACCTG
58	346C6-zu	LC CDR1	322	CAGTCCGTGTATAACAACAACAAC
59	346C6-zu	LC CDR2	323	CTGGCCTCC
60	346C6-zu	LC CDR3	324	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTGCT

Bảng 8. Trình tự axit amin của chuỗi Ig mAb có chiều dài đầy đủ

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit amin
1	MORAb-003	Chuỗi nặng	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC SASGFTFSGYGLSWVRQAPGKG LEWVAMISSGGSYTYYADSVKG RFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPE DTGVYFCARHGDDPAWFAYWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
2	MORAb-003	Chuỗi nhẹ	6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS VSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKP WIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGT DYTFTISSLQPEDIATYYCQQWS SYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

				LSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
3	MORAb- 009	Chuỗi nặng	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCK ASGYSFTGYTMNWVKQSHGKS LEWIGLITPYNGASSYNQKFRGK ATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSED SAVYFCARGGYDGRGFDYWGS GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

4	MORAb-009	Chuỗi nhẹ	326	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMHWYQQKSGTSPKR WIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGN SYSLTISSVEAEDDATYYCQQWS KHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
5	trastuzumab	Chuỗi nặng	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

6	trastuzumab	Chuỗi nhẹ	328	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
7	33011-xi	Chuỗi nặng	329	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGISLSSDAISWVRQAPGKGLEYI GIINGGGNTYYASWAKGRFTISK TSTTVDLKITSPTTEDTATYFCA RGIQHGGGNSDYYYYGMDL WGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

8	33011-xi	Chuỗi nhẹ	330	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIKC QASQSISSVLSWYQQKPGQPPKL LIYLASTLASGVPSRFSGSRSGTE FTLTISDLECDDAATYYCQTNYG TSSSNYGFAFGGGTEVVVKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
9	33011-zu	Chuỗi nặng	331	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGISLSSDAISWVRQAPGKGL EYIGIINGGGNTYYASWAKGRFT ISRHNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGIQHGGGNSDYYYY GMDLWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

10	33011-zu	Chuỗi nhẹ	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQSISSVLSWYQQKPGKAPK LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQCEDIATYYCQTNY GTSSSNYGFAFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
11	111B10-xi	Chuỗi nặng	333	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGFSLNNYAMSWVRQAPGKGL EWIGSISTGGLAFYANWAKGRF TISRTSTTVDLKMTSLTTEDTAT YFCGRNGGGSYIFYYFDLWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

12	111B10-xi	Chuỗi nhẹ	334	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKC QASQSISSYLSWYQQKPGQPPKL LIYSASTLASGVSSRFKGSGSGTE YTLTISDLECADAATYFCQSYYD IGTSTFGGGTEVVVKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
13	111B10-zu	Chuỗi nặng	335	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSLNNYAMSWVRQAPGK GLEWIGSISTGGLAFYANWAKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNGGGSYIFYYFDL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

14	111B10-zu	Chuỗi nhẹ	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQSISSYLSWYQQKPGKAPK LLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQCEDAATYYCQSYY DIGTSTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
15	201C15-xi	Chuỗi nặng	337	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGIDLSSYAMGWFRQAPGKGLE YIGTINIGGRVYYASWAKGRFTI SRTSTTVDLKAPSLTAEDTATYF CARYYNGGSYDIWGPGTLVTVS LASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
16	201C15-xi	Chuỗi nhẹ	338	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIK CQASESIYRVLAWYQQKPGQPP

				KLLIYDTSTLASGAPSRFKGSGY GTEFTLTISGVQCEDAATYYCQG GYYADSYGIAFGGGTEVVVKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
17	201C15-zu	Chuỗi nặng	339	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC SASGIDLSSYAMGWVRQAPGKG LEYIGTINIGGRVYYASWAKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYYNGGSYDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	201C15-zu	Chuỗi nhẹ	340	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC QASESIYRVLAWYQQKPGKAPK LLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGT EFTLTISSLQCDDAATYYCQGGY

				YADSYGIAFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
19	346C6-xi	Chuỗi nặng	341	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTA SGFSLSSYAMIWVRQAPGEGLE WIGTISTGGITYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFC ARGGYAASSAYYLPYYFDLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
20	346C6-xi	Chuỗi nhẹ	342	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC QSSQSVYNNNNLAWFQQKPGQP PKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGS GTQFTLTISGVQCDDAATYYCL GGCDDDADTFAFGGGTEVVVK

				RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
21	346C6-zu	Chuỗi nặng	343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSLSSYAMIWVRQAPGKG LEWIGTISTGGITYYASWAKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGYAASSAYYLPYYF DLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
22	346C6-zu	Chuỗi nhẹ	344	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSQSVYNNNNLAWYQQKPGK VPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQCEDAATYYCL GGCDDDADTFAFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

				VCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Bảng 9. Trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi Ig^+ mAb có chiều dài đầy đủ

	mAb	Chuỗi IgG	SEQ ID NO	Trình tự axit nucleic
1	MORAb-003	Chuỗi nặng	345	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCG GTGGAGGTGTTGTGCAACCTGG CCGGTCCCTGCGCCTGTCCTGCT CCGCATCTGGCTTCACCTTCAG CGGCTATGGGTTGTCTTGGGTG AGACAGGCACCTGGAAAAGGT CTTGAGTGGGTTGCAATGATTA GTAGTGGTGGTAGTTATACCTA CTATGCAGACAGTGTGAAGGGT AGATTTGCAATATCGCGAGACA ACGCCAAGAACACATTGTTCCT GCAAATGGACAGCCTGAGACCC GAAGACACCGGGGTCTATTTTT GTGCAAGACATGGGGACGATCC CGCCTGGTTCGCTTATTGGGGC CAAGGGACCCCGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTG

				GACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
				CTTGTGACAAAACTCACACATG
				CCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
				CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
				TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA
				GGACACCCTCATGATCTCCCGG
				ACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
				TGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
				CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
				TACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
				ATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
				GGAGGAGCAGTACAACAGCAC
				GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
				ACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
				TGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
				CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
				CCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
				TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
				CCGAGAACCACAGGTGTACACC
				CTGCCCCCATCCCGGGATGAGC
				TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
				GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
				TATCCCAGCGACATCGCCGTGG
				AGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
				CGGAGAACAACTACAAGACCA
				CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
				CGGCTCCTTCTTCTTATATTCAA
				AGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
				GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
				TCATGCTCCGTGATGCATGAGG
				CTCTGCACAACCACTACACGCA

				GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAATGA
2	MORAb- 003	Chuỗi nhẹ	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCC CAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGT GGGTGACAGAGTGACCATCACC TGTAGTGTCAGCTCAAGTATAA GTTCCAACAACTTGCACTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCT CCAAAGCCATGGATCTACGGCA CATCCAACCTGGCTTCTGGTGT GCCAAGCAGATTCAGCGGTAGC GGTAGCGGTACCGACTACACCT TCACCATCAGCAGCCTCCAGCC AGAGGACATCGCCACCTACTAC TGCCAACAGTGGAGTAGTTACC CGTACATGTACACGTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTAA

3	MORAb-009	Chuỗi nặng	347	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTG GGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGG CGCTTCAGTGAAGATATCCTGC AAGGCTTCTGGTTACTCATTCA CTGGCTACACCATGAACTGGGT GAAGCAGAGCCATGGAAAGAG CCTTGAGTGGATTGGACTTATT ACTCCTTACAATGGTGCTTCTA GCTACAACCAGAAGTTCAGGGG CAAGGCCACATTAACTGTAGAC AAGTCATCCAGCACAGCCTACA TGGACCTCCTCAGTCTGACATC TGAAGACTCTGCAGTCTATTTCT GTGCAAGGGGGGGTTACGACG GGAGGGGTTTTGACTACTGGGG ATCCGGGACCCCGGTCACCGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCT

				GAACTCCTGGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCCGGGAAATGA
4	MORAb-009	Chuỗi nhẹ	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTC CAGCAATCATGTCTGCATCTCC

				AGGGGAGAAGGTCACCATGAC CTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA AGTTACATGCACTGGTACCAGC AGAAGTCAGGCACCTCCCCCAA AAGATGGATTTATGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCAG GTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGAAACTCTTACTCTCTCACA ATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAG ATGATGCAACTTATTACTGCCA GCAGTGGAGTAAGCACCCTCTC ACGTTCGGATCCGGGACCAAGG TGGAAATCAAACGAACTGTGGC TGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAG CACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTTAA
5	33011-xi	Chuỗi nặng	349	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGG GTCGCCTGGTCACGCCTGGGAC ACCCCTGACACTCACCTGCACC GTCTCTGGAATCTCCCTCAGTA

				GCGATGCAATAAGCTGGGTCCG
				CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTC
				GAATACATCGGAATCATTAATG
				GTGGTGGTAACACATACTACGC
				GAGCTGGGCGAAAGGCCGATTC
				ACCATCTCCAAAACCTCGACCA
				CGGTGGATCTGAAAATCACCAG
				TCCGACAACCGAGGACACGGCC
				ACCTATTTCTGTGCCAGAGGCA
				TTCAACATGGTGGTGGTAATAG
				TGATTATTATTATTACGGCATG
				GACCTCTGGGGCCCAGGCACCC
				TGGTCACTGTCTCTTCAGCATCC
				ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
				CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG
				CACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
				CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
				ACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
				GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG
				ACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
				CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG
				ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
				GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT
				TGGGCACCCAGACCTACATCTG
				CAACGTGAATCACAAGCCCAGC
				AACACCAAGGTGGACAAGAAA
				GTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
				AAACTCACACATGCCCACCGTG
				CCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
				GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
				CCCAAAACCCAAGGACACCCTC
				ATGATCTCCCGGACCCCTGAGG

				TCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCTTATATTCAAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
6	33011-xi	Chuỗi nhẹ	350	GAAGTGTTGATGACCCAGACTC CATCCTCCGTGTCTGCAGCTGT GGGAGACACAGTCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTCAGAGCATTA GTAGTGTCTTGTCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC

				AAGCTCCTGATCTATCTGGCAT CCACTCTGGCATCTGGGGTCCC ATCGCGGTTCAGCGGCAGTAGA TCTGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCAGCGACCTGGAGTGTGA CGATGCTGCCACTTACTACTGT CAAACCAATTATGGTACTAGTA GTAGTAATTATGGTTTTGCTTTC GGCGGAGGGACCGAGGTGGTC GTCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTG A
7	33011-zu	Chuỗi nặng	351	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGCG GGGGAGGACTGGTGCAGCCGG GCGGATCCCTCCGGCTGTCATG TGCTGCATCGGGAATTTCCCTCT CCTCCGACGCGATTAGCTGGGT CAGACAGGCCCCCGGAAAGGG GCTGGAGTACATCGGTATCATC

				AACGGCGGCGGAAACACCTACT
				ACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCG
				CTTCACCATCTCGCGGCATAAT
				TCCAAGAACACTCTGTACTTGC
				AAATGAACTCCCTGAGGGCCGA
				GGACACCGCCGTGTACTACTGC
				GCGCGCGGCATCCAGCACGGTG
				GTGGAAACAGCGACTACTACTA
				CTATGGGATGGATCTGTGGGGC
				CAGGGAACTCTTGTGACCGTGT
				CGTCAGCATCCACCAAGGGCCC
				ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT
				CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
				CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
				GTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
				CGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
				AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
				CACACCTTCCCGGCTGTCCTAC
				AGTCCTCAGGACTCTACTCCCT
				CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
				TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
				CCTACATCTGCAACGTGAATCA
				CAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
				GACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
				CTTGTGACAAAACTCACACATG
				CCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
				CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
				TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA
				GGACACCCTCATGATCTCCCGG
				ACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
				TGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
				CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG

				TACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTTATATTCAA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAATGA
8	33011-zu	Chuỗi nhẹ	352	GACATTCAGATGACCCAGTCCC CAAGCTCGCTGTCCGCCTCCGT GGGCGACCGCGTGACCATCACG TGCCAGGCGTCCCAGTCAATTA GCAGCGTGCTCTCCTGGTACCA ACAGAAGCCGGGGAAAGCACC CAAGCTGCTGATCTACTTGGCC TCCACTCTGGCCTCGGGAGTGC

				CTTCACGGTTCTCCGGATCGGG ATCTGGTACTGATTTCACCCTCA CCATCTCGAGCCTTCAGTGCGA GGACATCGCTACTTACTATTGT CAAACCAACTACGGAACCTCCA GCTCCAACTACGGCTTTGCCTTC GGTGGCGGGACCAAGGTCGAA ATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTG A
9	111B10-xi	Chuỗi nặng	353	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGG GTCGCCTGGTCACGCCTGGGAC ACCCCTGACACTCACCTGCACA GTCTCTGGATTCTCCCTCAATAA CTATGCAATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGATCGGATCCATTAGTA CTGGTGGTCTCGCATTCTACGC GAACTGGGCAAAAGGCCGATTC

				ACCATCTCCAGAACCTCGACCA
				CGGTGGATCTGAAAATGACCAG
				TCTGACAACCGAGGACACGGCC
				ACCTATTTCTGTGGCAGAAATG
				GTGGTGGTAGTTATATTTTCTAT
				TATTTTGACTTGTGGGGCCAAG
				GCACCCTCGTCACTGTCTCTTCA
				GCATCCACCAAGGGCCCATCGG
				TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC
				AAGAGCACCTCTGGGGGCACAG
				CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
				GGACTACTTCCCCGAACCGGTG
				ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG
				CCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
				CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
				CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
				CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
				AGCTTGGGCACCCAGACCTACA
				TCTGCAACGTGAATCACAAGCC
				CAGCAACACCAAGGTGGACAA
				GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
				GACAAAACTCACACATGCCCAC
				CGTGCCCAGCACCTGAACTCCT
				GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
				TTCCCCCCAAAACCCAAGGACA
				CCCTCATGATCTCCCGGACCCC
				TGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
				GACGTGAGCCACGAAGACCCTG
				AGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
				GGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
				GCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
				GAGCAGTACAACAGCACGTACC

				GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTTATATTCAAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGG AAATGA
10	111B10-xi	Chuỗi nhẹ	354	GCATTCGAATTGACCCAGACTC CATCCTCCGTGGAGGCAGCTGT GGGAGGCACAATCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTCAGAGCATTA GTAGTTACTTATCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATTCTGCATC CACTCTGGCATCTGGGGTCTCA TCGCGGTTCAAAGGCAGTGGAT CTGGGACAGAGTACACTCTCAC CATCAGCGACCTGGAGTGTGCC

				GATGCTGCCACTTACTTCTGTCA AAGCTATTATGATATTGGTACT AGTACTTTCGGCGGAGGGACCG AGGTGGTCGTCAAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTTGA
11	111B10-zu	Chuỗi nặng	355	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGCGGACTGGTGCAGCCTGG CGGATCTCTGAGACTGTCTTGT GCCGCCTCCGGCTTCTCCCTGA ACAACTACGCCATGTCCTGGGT GCGACAGGCCCCTGGCAAAGGC CTGGAATGGATCGGCTCCATCA GCACAGGCGGCCTGGCCTTCTA CGCCAATTGGGCCAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACAACT CCAAGAACACCCTGTACCTCCA GATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTG

				CCAGAAACGGCGGAGGCTCCTA
				CATCTTCTACTACTTCGACCTGT
				GGGGCCAGGGCACCCTCGTGAC
				AGTGTCATCTGCATCCACCAAG
				GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
				CACCCTCCTCCAAGAGCACCTC
				TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
				TGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
				CCGAACCGGTGACGGTGTCGTG
				GAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
				GGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
				TCCTACAGTCCTCAGGACTCTA
				CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
				GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA
				CCCAGACCTACATCTGCAACGT
				GAATCACAAGCCCAGCAACACC
				AAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
				CCCAAATCTTGTGACAAAACTC
				ACACATGCCCACCGTGCCCAGC
				ACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
				TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA
				ACCCAAGGACACCCTCATGATC
				TCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
				GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
				CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC
				AACTGGTACGTGGACGGCGTGG
				AGGTGCATAATGCCAAGACAAA
				GCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
				CAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
				GTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
				ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
				CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA

				GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTTAT ATTCAAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCCGGGAAATGA
12	111B10-zu	Chuỗi nhẹ	356	GATATTCAGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGTCCGCTTCTGTG GGCGACAGAGTGACCATCACCT GTCAGGCCTCCCAGTCCATCTC CTCCTACCTGTCCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCAAGGCCCCCA AGCTGCTGATCTACTCTGCCTCC ACACTGGCCTCCGGCGTGCCCT CTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGACTTTACCCTGACCA TCAGCTCCCTCCAGTGCGAGGA TGCCGCCACCTACTACTGCCAG TCCTACTACGACATCGGCACCT CCACCTTCGGCGGAGGCACCAA GGTGGAAATCAAACGAACTGTG

				GCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTTGA
13	201C15-xi	Chuỗi nặng	357	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGG GTCGCCTGGTCACGCCTGGGAC ACCCCTGACACTCACCTGCACA GTCTCTGGAATCGACCTCAGTA GCTATGCAATGGGCTGGTTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATACATCGGAACCATTAATA TTGGTGGTCGCGTATATTACGC GAGCTGGGCAAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAGAACCTCGACCA CGGTGGATCTGAAAGCGCCCAG TCTGACAGCCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGCCAGATATTA TAATGGTGGTAGTTATGACATC TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCA CCGTCTCTTTAGCATCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG

				GCACCCTCCTCCAAGAGCACCT
				CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
				CTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
				CCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
				GGAACTCAGGCGCCCTGACCAG
				CGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
				GTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
				ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
				CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
				ACCCAGACCTACATCTGCAACG
				TGAATCACAAGCCCAGCAACAC
				CAAGGTGGACAAGAAAGTTGA
				GCCCAAATCTTGTGACAAAACT
				CACACATGCCCACCGTGCCCAG
				CACCTGAACTCCTGGGGGGACC
				GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
				AACCCAAGGACACCCTCATGAT
				CTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
				TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
				ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
				CAACTGGTACGTGGACGGCGTG
				GAGGTGCATAATGCCAAGACAA
				AGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
				ACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
				CGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
				GACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
				ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
				AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
				AAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
				GGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
				GTACACCCTGCCCCCATCCCGG
				GATGAGCTGACCAAGAACCAG

				GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTA TATTCAAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGGAAATGA
14	201C15-xi	Chuỗi nhẹ	358	GATGTTGTGATGACCCAGACTC CAGCCTCCGCGTCTGAACCTGT GGGAGGCACAGTCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTGAGAGCATTT ATCGCGTATTGGCCTGGTATCA GCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATGATACAT CCACTCTGGCATCTGGGGCCCC ATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGA TATGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGA AGATGCTGCCACTTACTACTGT CAAGGCGGTTATTATGCTGATA GTTATGGTATTGCTTTCGGCGG AGGGACCGAGGTGGTGGTCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGC

				CAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTGA
15	201C15-zu	Chuỗi nặng	359	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGCTCTCTGAGACTGTCCTGTT CCGCCTCCGGAATCGACCTGTC CTCCTACGCTATGGGCTGGGTG CGACAGGCTCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCACCATCAA CATCGGCGGCAGAGTGTACTAC GCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAACTC CAAGAACACCCTGTACCTCCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCGGTACTACAACGGCGGCTCC TACGATATCTGGGGCCAGGGCA CACTCGTGACCGTGTCCTCTGC ATCCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC

				CTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCT

				CCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTTATATTCAAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGA AATGA
16	201C15-zu	Chuỗi nhẹ	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCC CCTCCACCCTGTCTGCCTCTGTG GGCGACAGAGTGACCATCACCT GTCAGGCCTCCGAGTCCATCTA CCGGGTGCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCA AGCTGCTGATCTACGACACCAG CACACTGGCCTCCGGCGTGCCC TCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTC TGGCACCGAGTTTACCCTGACC ATCTCCAGCCTCCAGTGCGACG ACGCCGCCACCTACTATTGTCA GGGCGGCTACTACGCCGACTCC TACGGAATCGCTTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACA

				GCCTCAGCAGCACCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTTGA
17	346C6-xi	Chuỗi nặng	361	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCG GTCGCCTGGTAAAGCCTGACGA ATCCCTGACACTCACCTGCACA GCCTCTGGATTCTCCCTCAGTA GTTATGCAATGATCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTG GAATGGATCGGAACCATTAGTA CTGGTGGTATCACATACTACGC GAGCTGGGCGAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAAAACCTCGACCA CGGTGGATCTGAAAATCACCAG TCCGACAACCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGCCAGAGGGG GATATGCTGCTAGTAGTGCTTA TTATCTCCCGTACTACTTTGACT TGTGGGGCCAAGGGACCCTGGT CACCGTCTCCTCAGCATCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG

				ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
				GCACCCAGACCTACATCTGCAA
				CGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
				ACCAAGGTGGACAAGAAAGTT
				GAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
				CTCACACATGCCCACCGTGCCC
				AGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
				CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
				AAAACCCAAGGACACCCTCATG
				ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
				CATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
				CCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
				TTCAACTGGTACGTGGACGGCG
				TGGAGGTGCATAATGCCAAGAC
				AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
				CAACAGCACGTACCGTGTGGTC
				AGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
				AGGACTGGCTGAATGGCAAGG
				AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
				CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC
				GAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
				AAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
				AGGTGTACACCCTGCCCCCATC
				CCGGGATGAGCTGACCAAGAAC
				CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
				TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
				CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
				AATGGGCAGCCGGAGAACAAC
				TACAAGACCACGCCTCCCGTGC
				TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
				TTATATTCAAAGCTCACCGTGG
				ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG

				GGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGGAAATGA
18	346C6-xi	Chuỗi nhẹ	362	GCAGCCGTGCTGACCCAGACAC CATCACCCGTGTCTGCAGCTGT GGGAGGCACAGTCACCATCAGT TGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTT ATAATAATAACAACTTAGCCTG GTTTCAGCAGAAACCCGGGCAG CCTCCCAAGCTTCTGATCTATCT GGCATCCACTCTGGCATCTGGG GTCCCATCACGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACACAGTTCAC TCTCACCATCAGCGGCGTGCAG TGTGACGATGCTGCCACTTATT ACTGTCTAGGTGGTTGTGATGA TGATGCTGATACTTTTGCTTTCG GCGGAGGGACTGAGGTGGTGGT CAAACGAACTGTGGCTGCACCA TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTG

				AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTTGA
19	346C6-zu	Chuỗi nặng	363	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGCGGACTGGTGCAGCCTGG CGGATCTCTGAGACTGTCTTGT GCCGCCTCCGGCTTCTCCCTGTC CTCCTACGCTATGATCTGGGTG CGACAGGCCCCTGGCAAGGGCC TGGAATGGATCGGCACCATCTC TACCGGCGGAATTACCTACTAC GCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAACTC CAAGAACACCCTGTACCTCCAG ATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTATTGTGC TAGAGGCGGCTACGCCGCCAGC TCCGCTTACTACCTGCCCTACTA CTTCGACCTGTGGGGCCAGGGC ACCCTCGTGACAGTGTCATCTG CATCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAG

				AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTTATATTCAAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAG

				AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGA AATGA
20	346C6-zu	Chuỗi nhẹ	364	GATATTCAGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGTCCGCTTCTGTG GGCGACAGAGTGACCATCACCT GTCAGTCCTCCCAGTCCGTGTA TAACAACAACAACCTGGCCTGG TATCAGCAGAAACCCGGCAAGG TGCCCAAGCTGCTGATCTACCT GGCCTCCACACTGGCCTCTGGC GTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTC TGGCTCTGGCACCGACTTTACC CTGACCATCAGCTCCCTCCAGT GCGAGGATGCCGCCACCTACTA TTGCCTGGGCGGCTGCGACGAC GACGCCGATACCTTTGCTTTTG GCGGAGGCACCAAGGTGGAAA TCAAACGAACTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTCACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

[+] Trình tự axit nucleic nêu trong đây không bao gồm trình tự dẫn đầu.

Theo các phương án khác nhau, ADC được bộc lộ trong đây có thể bao gồm bộ bất kỳ của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nêu trong các bảng trên (ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ MORAb-003, hoặc miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trastuzumab), hoặc bộ sáu trình tự CDR từ bộ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, ADC còn bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người hoặc mảnh của nó. Ví dụ, ADC có thể bao gồm miền hằng định chuỗi nặng của IgG người (như IgG1) và miền hằng định chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda của người. Theo các phương án khác nhau, gốc kháng thể của ADC được mô tả bao gồm miền hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch G phân typ 1 (IgG1) của người với miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa người.

Theo các phương án khác nhau, kháng nguyên ung thư đích đối với ADC là thụ thể folat alpha ("FRA").

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ như sau: CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) gồm có SEQ ID NO:2, CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) gồm có SEQ ID NO:3, CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) gồm có SEQ ID NO:4; CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) gồm có SEQ ID NO:7, CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) gồm có SEQ ID NO:8, và CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) gồm có SEQ ID NO:9, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 và 1991))).

Theo một số phương án, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ như sau: CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:13, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:14, CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:15; CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:16, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:17, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:18, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:24. Theo một

số phương án, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO:23 và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:24, hoặc trình tự giống ít nhất 95% với trình tự nêu trên. Theo một số phương án, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:23 và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:24.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người với miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa của người.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO:1 hoặc trình tự giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:1, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:6 hoặc trình tự giống ít nhất 95% với SEQ ID NO:6. Theo phương án cụ thể, kháng thể bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO:1 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:6, hoặc trình tự giống ít nhất 95% với trình tự nêu trên. Theo một số phương án, kháng thể kháng-FRA có trình tự axit amin của chuỗi nặng giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:1 và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nhẹ giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:6. Theo một số phương án, kháng thể kháng-FRA bao gồm chuỗi nặng được mã hóa bởi trình tự nucleotit SEQ ID NO:11 (có các nucleotit mã hóa trình tự dẫn đầu), hoặc SEQ ID NO:345 (không có nucleotit mã hóa trình tự dẫn đầu); và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi trình tự nucleotit SEQ ID NO:12 (có các nucleotit mã hóa trình tự dẫn đầu), hoặc SEQ ID NO:346 (không có các nucleotit mã hóa trình tự dẫn đầu). Theo một số phương án, trình tự axit amin của chuỗi nặng thiếu lysin ở đầu tận cùng C. Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA có trình tự axit amin của kháng thể tạo ra bởi dòng tế bào được lưu trữ theo quy định phù hợp với hiệp định Budapest về ATCC (American Type Culture Collection (Bộ sưu tập nuôi cấy kiểu Mỹ), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209) vào ngày 24, tháng 4, năm 2006, với số lưu trữ PTA-7552, hoặc các trình tự như vậy thiếu lysin ở đầu tận cùng C chuỗi nặng. Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA là MORAb-003 (USAN name: farletuzumab) (Ebel et al. (2007) Cancer Immunity 7:6), hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo các phương án khác nhau khác, kháng nguyên ung thư đích đối với ADC là thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người ("her2").

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ như sau: CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) gồm có SEQ ID NO:71, CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) gồm có SEQ ID NO:72, CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) gồm có SEQ ID NO:73; CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) gồm có SEQ ID NO:74, CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) gồm có SEQ ID NO:75, và CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) gồm có SEQ ID NO:76, như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ như sau: CDR1 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:191, CDR2 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:192, CDR3 chuỗi nặng gồm có SEQ ID NO:193; CDR1 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:194, CDR2 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:195, và CDR3 chuỗi nhẹ gồm có SEQ ID NO:196, như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO:27 và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO:28, hoặc trình tự giống ít nhất 95% với trình tự nêu trên. Theo một số phương án, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:27 và/hoặc trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:28.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-her2 bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa của người.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-her2 bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO:327 hoặc trình tự giống hệt ít nhất 95% với SEQ ID NO:327, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:328 hoặc trình tự giống ít nhất 95% với

SEQ ID NO:328. Theo các phương án cụ thể, kháng thể bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO:327 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:328, hoặc trình tự giống ít nhất 95% với trình tự nêu trên. Theo một số phương án, kháng thể kháng-her2 có trình tự axit amin của chuỗi nặng giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:327 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ giống ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:328. Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-her2 là trastuzumab, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể kháng-FRA hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của MORAb-003 hoặc trong đó các CDR bao gồm không quá một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu axit amin thêm, xóa hoặc thế của HCDR1 (SEQ ID NO:2 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:13 theo IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO:3 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:14 theo IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO:4 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:15 theo IMGT); LCDR1 (SEQ ID NO:7 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:16 theo IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO:8 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:17 theo IMGT), và LCDR3 (SEQ ID NO:9 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:18 theo IMGT).

Theo các phương án khác nhau khác, kháng thể kháng-her2 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của trastuzumab hoặc trong đó CDR bao gồm không nhiều hơn một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu axit amin thêm, xóa hoặc thế của HCDR1 (SEQ ID NO:71 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:191 theo IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO:72 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:192 theo IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO:73 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:193 theo IMGT); LCDR1 (SEQ ID NO:74 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:194 theo IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO:75 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:195 theo IMGT), và LCDR3 (SEQ ID NO:76 theo Kabat, hoặc SEQ ID NO:196 theo IMGT).

Theo các phương án khác nhau, các axit amin thế là các gốc đơn. Các axit amin chèn vào thường sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 20 gốc axit amin, mặc dù các đoạn chèn vào tương đối lớn hơn có thể được dung nạp miễn là giữ được chức năng sinh học (ví dụ, chức năng gắn kết với FRA hoặc her2). Các đoạn xóa thường nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 20 gốc axit amin, mặc dù trong một số trường hợp các đoạn xóa có thể lớn hơn nhiều. Thế, xóa, chèn axit amin, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng có thể được sử dụng để đạt được biến thể hoặc dẫn xuất cuối cùng. Thông thường, các thay đổi được

thực hiện trên một số ít axit amin để tối thiểu hóa sự biến đổi của phân tử, đặc biệt là độ gây miễn dịch và tính đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên. Tuy nhiên, các thay đổi lớn hơn có thể được dung nạp trong một số trường hợp. Các đoạn thế bảo tồn thường được thực hiện phù hợp với sơ đồ được nêu như trong Bảng 10.

Bảng 10

Gốc ban đầu	Gốc thế ví dụ
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Các thay đổi cơ bản về chức năng hoặc độ tương đồng miễn dịch được thực hiện bằng cách chọn các axit amin thế mà ít bảo tồn hơn so với các gốc được trình bày trong Bảng 10. Ví dụ, các axit amin thế có thể thực hiện có tác động đáng kể hơn: cấu trúc của khung polypeptit trong vùng biến đổi, ví dụ cấu trúc xoắn kiểu alpha hoặc cấu trúc phiến beta; điện tích hoặc độ kỵ nước của phân tử ở vị trí đích; hoặc độ lớn của chuỗi bên. Các

axit amin thế thường được dự tính là tạo ra các thay đổi lớn nhất trong đặc điểm polypeptit là các axit amin thế trong đó (a) gốc thân nước, ví dụ, seryl hoặc threonyl, được thế cho (hoặc bởi) gốc kỵ nước, ví dụ, leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl hoặc alanyl; (b) cystein hoặc prolin được thế cho (hoặc bằng) gốc khác bất kỳ; (c) gốc có chuỗi bên có điện tích dương, ví dụ, lysyl, arginyl, hoặc histidyl, được thế cho (hoặc bằng) gốc có điện tích âm, ví dụ, glutamyl hoặc aspartyl; hoặc (d) gốc có chuỗi bên lớn, ví dụ, phenylalanin, được thế cho (hoặc bằng) gốc không có chuỗi bên, ví dụ, glyxin.

Theo các phương án khác nhau khi sử dụng các trình tự kháng thể biến thể trong ADC, các biến thể đặc trưng biểu hiện hoạt tính sinh học có chất lượng tương đương và sẽ thể hiện đáp ứng miễn dịch tương tự , mặc dù các biến thể cũng có thể được chọn để biến đổi các đặc điểm của protein gắn kết kháng nguyên khi cần. Cách khác, biến thể có thể được thiết kế sao cho hoạt tính sinh học của protein gắn kết kháng nguyên thay đổi. Ví dụ, vị trí glycosyl hóa có thể thay đổi hoặc loại bỏ, như bàn luận trong đây.

Các kháng thể khác nhau có thể được sử dụng với các ADC được sử dụng trong đây để chọn đích tế bào ung thư. Như trình bày dưới đây, nhóm liên kết-độc tố trong các ADC được bộc lộ trong đây có hiệu quả đặc biệt với các kháng thể chọn đích khối u kháng nguyên khác nhau. Các kháng nguyên thích hợp được biểu hiện trên tế bào khối u nhưng không trên các tế bào khỏe mạnh, hoặc được biểu hiện trên tế bào khối u với mức độ cao hơn trên tế bào khỏe mạnh, đã biết trong lĩnh vực này, là các kháng thể kháng trực tiếp các kháng nguyên này. Các kháng thể có thể sử dụng với nhóm liên kết và độc tố (ví dụ, eribulin) được bộc lộ trong đây. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích là FRA. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích FRA là MORAb-003. Theo một số phương án, trong khi các nhóm liên kết được bộc lộ và toxin (eribulin) có hiệu quả ngạc nhiên với nhiều kháng thể chọn đích khối u khác nhau, thì các gốc kháng thể chọn đích FRA như MORAb-003 mang lại tỷ lệ dược chất:kháng thể tăng đặc biệt, chọn đích khối u, sự diệt đích âm tính kế bên, hiệu quả điều trị, và sự diệt sai đích giảm. Hiệu quả điều trị tăng có thể được đo *in vitro* hoặc *in vivo*, và có thể bao gồm tốc độ phát triển khối u giảm và/hoặc thể tích khối u giảm.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng các đích kháng nguyên khác được sử dụng và mang lại ít nhất một số đặc điểm chức năng ưu tiên của ADC bao gồm gốc kháng thể chọn đích FRA như MORAb-003 (ví dụ, tỷ lệ dược chất:kháng thể tăng,

hiệu quả điều trị tăng, sự diệt sai đích giảm, v.v..). Theo một số phương án, quan sát thấy một số hoặc tất cả các đặc điểm chức năng được ưu tiên này khi nhóm liên kết được bộc lộ và toxin (eribulin) được liên hợp với gốc kháng thể chọn đích her2 như trastuzumab. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích her2. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích her2 là trastuzumab. Theo một số phương án, quan sát thấy một số hoặc tất cả các đặc điểm chức năng được ưu tiên này khi nhóm liên kết được bộc lộ và toxin (eribulin) được liên hợp với gốc kháng thể chọn đích MSLN như MORAb-009. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích MSLN. Theo một số phương án, gốc kháng thể chọn đích MSLN là MORAb-009.

Nhóm liên kết

Theo các phương án khác nhau, nhóm liên kết trong ADC là ổn định ở ngoại bào theo cách đủ để có hiệu quả điều trị. Theo một số phương án, nhóm liên kết là ổn định bên ngoài tế bào, sao cho ADC vẫn giữ được nguyên vẹn khi trình diện trong các điều kiện ngoại bào (ví dụ, trước khi được vận chuyển hoặc phân phối vào trong tế bào). Thuật ngữ "nguyên vẹn," sử dụng trong phạm vi ADC, có nghĩa là gốc kháng thể vẫn gắn với gốc dược chất. Như sử dụng trong đây, "ổn định," trong phạm vi nhóm liên kết hoặc ADC chứa nhóm liên kết, có nghĩa là không quá 20%, không quá khoảng 15%, không quá khoảng 10%, không quá khoảng 5%, không quá khoảng 3%, hoặc không quá khoảng 1% của nhóm liên kết (hoặc phần trăm bất kỳ trong khoảng này) trong mẫu ADC là bị cắt (hoặc trong trường hợp toàn bộ ADC là không nguyên vẹn theo cách khác) khi ADC được trình diện trong điều kiện ngoại bào.

Có thể xác định liệu nhóm liên kết có ổn định ngoại bào hay không, ví dụ, bằng cách đưa ADC vào trong huyết tương trong một khoảng thời gian xác định trước (ví dụ, 2, 4, 6, 8, 16, hoặc 24 giờ) và sau đó định lượng lượng gốc dược chất tự do có trong huyết tương. Độ ổn định có thể cho phép ADC một thời gian để định vị vào tế bào khối u gốc và ngăn cản sự giải phóng sớm dược chất, điều mà có thể làm giảm chỉ số điều trị của ADC bằng cách phá hủy không phân biệt cả mô bình thường và mô khối u. Theo một số phương án, nhóm liên kết là ổn định bên ngoài tế bào đích và giải phóng gốc dược chất khỏi ADC khi ở bên trong tế bào, sao cho gốc dược chất có thể gắn kết với đích của nó (ví dụ, với vi cấu trúc hình ống). Do đó, nhóm liên kết có hiệu quả sẽ: (i) duy trì đặc tính gắn kết đặc hiệu của gốc kháng thể; (ii) cho phép phân phối, ví dụ, phân phối trong tế bào, gốc dược chất

thông qua sự gắn ổn định với gốc kháng thể; (iii) vẫn ổn định và nguyên vẹn cho đến khi ADC được vận chuyển hoặc phân phối đến vị trí đích của nó; và (iv) cho phép đạt hiệu quả điều trị, ví dụ, tác dụng gây độc tế bào, của gốc dược chất sau khi cắt.

Nhóm liên kết có thể ảnh hưởng đến đặc điểm vật lý – hóa học của ADC. Do nhiều chất gây độc tế bào là kỵ nước trong tự nhiên, việc liên kết chúng với kháng thể có gốc kỵ nước khác có thể gây ra kết tụ. Các khối kết tụ ADC là không tan và thường làm hạn chế lượng mang dược chất có thể đạt được trên kháng thể, điều này có thể tác động tiêu cực đến hiệu lực của ADC. Các khối kết tụ protein trong sinh học, thông thường, cũng có liên quan đến độ gây miễn dịch tăng. Như trình bày sau đây, các nhóm liên kết được bộc lộ trong đây dẫn đến việc các ADC có mức kết tụ thấp và mức lượng mang dược chất mong muốn.

Nhóm liên kết có thể "có thể tách được" hoặc "không tách được" (Ducry và Stump, Bioconjugate Chem. (2010) 21:5-13). Nhóm liên kết phân cắt được được thiết kế để giải phóng dược chất khi đưa vào các yếu tố môi trường nhất định, ví dụ, khi được nội bào hóa vào trong tế bào đích, trong khi nhóm liên kết không tách được thường dựa vào sự phân hủy chính gốc kháng thể.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết không tách được. Theo một số phương án, gốc dược chất của ADC được giải phóng bởi sự phân hủy gốc kháng thể. Nhóm liên kết không tách được có xu hướng vẫn giữ được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một axit amin của kháng thể và dược chất khi nội bào hóa bởi tế bào đích và khi phân hủy trong tế bào đích. Nhóm liên kết không tách được thường bao gồm mối liên kết thioete, mối liên kết này được điều chế bằng cách liên hợp nhóm thiol trên dược chất hoặc kháng thể lần lượt với nhóm maleimit hoặc haloaxetamit trên kháng thể hoặc dược chất (Goldmacher et. al., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Nhóm liên kết không tách được ví dụ bao gồm thioete, xyclohexyl, N-sucxinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1 carboxylat (SMCC), N-hydroxysucxinimit (NHS), hoặc một hoặc nhiều gốc polyetylen glycol (PEG), ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết không tách được bao gồm $(PEG)_2$. Theo các phương án khác, nhóm liên kết không tách được bao gồm $(PEG)_4$.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được. Nhóm liên kết phân cắt được để chỉ nhóm liên kết bất kỳ bao gồm gốc tách được. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "gốc tách được" để chỉ liên kết hóa học bất kỳ có thể tách được. Liên kết hóa học có thể tách được thích hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, liên kết axit yếu, liên kết proteaza/peptidaza yếu, liên kết không bền với ánh sáng, liên kết disulfua, và các liên kết esteraza. Nhóm liên kết bao gồm gốc tách được có thể cho phép giải phóng gốc dược chất khỏi ADC thông qua sự cắt ở vị trí cụ thể trong nhóm liên kết. Theo các phương án khác nhau, sự cắt kháng thể khỏi độc tố đã liên kết sẽ hoạt hóa hoặc làm tăng tác dụng của độc tố. Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết phân cắt được (ví dụ, nhóm liên kết Val-Cit) chứng minh sự diệt đúng tế bào đích tăng và/hoặc sự diệt sai tế bào đích giảm, so với ADC bao gồm nhóm liên kết không tách được (ví dụ, nhóm liên kết $(PEG)_2$ hoặc $(PEG)_4$ không tách được). Theo một số phương án, ADC bao gồm nhóm liên kết phân cắt được biểu hiện hiệu quả điều trị tăng so với ADC bao gồm nhóm liên kết không tách được khi tế bào và/hoặc bệnh ung thư được điều trị bởi ADC không biểu hiện các mức cao của kháng nguyên đích (ví dụ, FRA hoặc her2). Theo một số phương án, đòi hỏi phải có sự cắt kháng thể khỏi độc tố được liên kết để đạt hiệu quả điều trị tăng của ADC, như đo được *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là có thể tách được trong các điều kiện nội bào, sao cho sự cắt nhóm liên kết là đủ giải phóng gốc dược chất khỏi gốc kháng thể trong môi trường nội bào để hoạt hóa dược chất và/hoặc mang lại cho dược chất hiệu quả điều trị. Theo một số phương án, gốc dược chất không được tách khỏi gốc kháng thể cho đến khi ADC đi vào trong tế bào biểu hiện kháng nguyên đặc hiệu với gốc kháng thể của ADC, và gốc dược chất được tách ra khỏi gốc kháng thể khi đi vào tế bào này. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm gốc tách được có vị trí sao cho không có phần nào của nhóm liên kết hoặc gốc kháng thể còn gắn kết với gốc dược chất khi cắt. Nhóm liên kết phân cắt được ví dụ bao gồm nhóm liên kết là axit yếu, nhóm liên kết nhạy với proteaza/peptidaza, nhóm liên kết không bền với ánh sáng, nhóm liên kết chứa dimetyl, disulfua, hoặc sulfonamit.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết nhạy với độ pH, và nhạy với sự thủy phân ở một số giá trị pH. Đặc trưng, nhóm liên kết nhạy với pH là có thể tách được trong điều kiện axit. Chiến thuật cắt này thường tận dụng lợi thế của độ pH thấp hơn trong thể nhân (độ pH ~ 5–6) và thể tiêu thể (độ pH ~ 4,8) trong các khoang tế bào, so với

dịch bào tương (độ pH ~ 7,4), để khởi động sự thủy phân nhóm axit yếu trong nhóm liên kết, như hydrazon (Jain et al. (2015) Pharm Res 32:3526-40). Theo một số phương án, nhóm liên kết là axit yếu và/hoặc nhóm liên kết có thể thủy phân. Ví dụ, nhóm liên kết là axit yếu có thể thủy phân trong thể tiêu thể, và chứa nhóm axit yếu (ví dụ, hydrazon, semicarbazon, thiosemicarbazon, cis-aconitic amit, orthoeste, axetal, ketal, hoặc tương tự) có thể được sử dụng. *Xem, ví dụ*, Patent Mỹ số 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik và Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al. (1989) Biol. Chem. 264:14653-61. Các nhóm liên kết là tương đối ổn định trong điều kiện độ pH trung hòa, như điều kiện trong máu, nhưng lại không ổn định ở độ pH thấp 5,5 hoặc 5,0, độ pH xấp xỉ với thể tiêu thể. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết có thể thủy phân là nhóm liên kết thioete (như, ví dụ, thioete gắn với tác nhân điều trị qua liên kết axylhydrazon). *Xem, ví dụ*, Patent Mỹ số 5,622,929.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là có thể tách được trong các điều kiện khử. Theo một số phương án, nhóm liên kết là có thể tách được trong sự có mặt của tác nhân khử, như glutathion hoặc dithiothreitol. Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết disulfua có thể tách được hoặc nhóm liên kết sulfonamit có thể tách được.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết disulfua có thể tách được. Nhiều nhóm liên kết disulfua đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, các nhóm liên kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng SATA (N-sucxinimidyl-5-axetylthioaxetat), SPDP (N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat), SPDB (N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrat) và SMPT (N-sucxinimidyloxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-pyridyl-dithio)toluen), SPDB và SMPT. *Xem, ví dụ*, Thorpe et al. (1987) Cancer Res. 47:5924-31; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Cũng xem Patent Mỹ số 4,880,935. Nhóm liên kết disulfua đặc trưng được sử dụng để tận dụng sự tích lũy của thiol trong tế bào, điều này có thể tạo thuận lợi cho sự cắt liên kết disulfua của chúng. Các nồng độ trong tế bào của mức tích lũy cao nhất của thiol trong tế bào, glutathion giảm, thường nằm trong khoảng từ 1-10nM, mức này cao hơn khoảng 1.000 lần so với mức tích lũy cao nhất của thiol phân tử thấp trong máu (tức là, cystein) ở khoảng 5μM (Goldmacher et. al., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Các enzym nội bào của họ protein disulfua isomeraza cũng có thể góp phần vào sự cắt nội bào nhóm liên kết

disulfua. Như sử dụng trong đây, nhóm liên kết disulfua có thể tách được để chỉ nhóm liên kết bất kỳ bao gồm gốc disulfua có thể tách được. Thuật ngữ "gốc disulfua có thể tách được" để chỉ liên kết disulfua có thể tách và/hoặc khử, ví dụ, bởi thiol hoặc enzym. Theo một số phương án, gốc disulfua có thể tách được là disulfidyl-dimetyl.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết sulfonamit có thể tách được. Như sử dụng trong đây, nhóm liên kết sulfonamit có thể tách được để chỉ nhóm liên kết bất kỳ bao gồm gốc sulfonamit có thể tách được. Thuật ngữ "gốc sulfonamit có thể tách được" để chỉ nhóm sulfonamit, tức là, nhóm sulfonyl được nối với nhóm amin, trong đó liên kết lưu huỳnh-nitơ có thể được tách.

Theo một số phương án, nhóm liên kết có thể là nhóm liên kết kiểu phân nhánh để gắn cộng hóa trị nhiều hơn một gốc dược chất với gốc kháng thể thông qua gốc liên kết phân nhánh, đa chức. Xem, ví dụ, Sun et al. (2002) Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:2213-5; Sun et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11:1761-8. Nhóm liên kết phân nhánh có thể làm tăng tỷ lệ mol của dược chất với kháng thể, tức là, lượng mang dược chất, điều này liên quan đến hiệu lực của ADC. Do đó, khi gốc kháng thể chỉ mang một nhóm cystein thiol phản ứng, ví dụ, vô số gốc dược chất có thể được gắn qua một nhóm liên kết phân nhánh. Theo một số phương án, gốc liên kết hoặc gốc liên kết-dược chất có thể gắn với kháng thể thông qua phương pháp hóa học tạo cầu disulfua khử hoặc kỹ thuật sử dụng lysin giới hạn. *Xem*, *ví dụ*, Công bố quốc tế số WO2013173391 và WO2013173393.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là có thể tách được bởi chất gây tách, ví dụ, enzym, có trong môi trường nội bào (ví dụ, trong thể tiêu thể hoặc thể nhân hoặc các hốc). Nhóm liên kết có thể là, ví dụ, nhóm liên kết peptit có thể được tách bởi enzym peptidaza hoặc proteaza nội bào, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, proteaza thể tiêu thể hoặc thể nhân. Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết peptit có thể tách được. Như sử dụng trong đây, nhóm liên kết peptit có thể tách được để chỉ nhóm liên kết bất kỳ chứa gốc peptit tách được. Thuật ngữ "gốc peptit tách được" để chỉ liên kết hóa học bất kỳ liên kết các axit amin (dẫn xuất axit amin tự nhiên hoặc tổng hợp) có thể tách bởi một chất có trong môi trường nội bào. Ví dụ, nhóm liên kết có thể bao gồm trình tự alanin-alanin-asparagin (Ala-Ala-Asn) hoặc trình tự valin-citrullin (Val-Cit) là có thể tách được bởi peptidaza như cathepsin, ví dụ, cathepsin B.

Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym và gốc peptit tách được trong nhóm liên kết là có thể tách được bởi enzym này. Theo một số phương án, gốc peptit tách được là có thể tách được bởi enzym thể tiêu thể, ví dụ, cathepsin. Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết phân cắt được bởi cathepsin. Theo một số phương án, gốc peptit tách được trong nhóm liên kết là có thể tách được bởi cystein cathepsin thể tiêu thể, như cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, hoặc W. Theo một số phương án, gốc peptit tách được là có thể tách được bởi cathepsin B. Dipeptit ví dụ có thể được tách bởi cathepsin B là valin-citrullin (Val-Cit) (Dubowchik et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:855-69). Theo một số phương án, ADC bao gồm gốc peptit tách được chứng minh mức kết tụ thấp hơn và/hoặc lượng mang dược chất cao hơn (*p*) so với ADC bao gồm gốc tách được khác (ví dụ, gốc disulfua có thể tách được hoặc gốc sulfonamit có thể tách được).

Theo một số phương án, nhóm liên kết hoặc gốc peptit tách được trong nhóm liên kết bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, đơn vị axit amin cho phép cắt nhóm liên kết bởi proteaza, bằng cách đó tạo thuận lợi giải phóng gốc dược chất khỏi ADC khi tiếp xúc với một hoặc nhiều proteaza trong tế bào, như một hoặc nhiều enzym thể tiêu thể (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-84; Dubowchik and Walker (1999) Pharm. Therapeutics 83:67-123). Đơn vị axit amin ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, và pentapeptit. Dipeptit ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, valin-citrullin (Val-Cit), alanin-asparagin (Ala-Asn), alanin-phenylalanin (Ala-Phe), phenylalanin-lysin (Phe-Lys), alanin-lysin (Ala-Lys), alanin-valin (Ala-Val), valin-alanin (Val-Ala), valin-lysin (Val-Lys), lysin-lysin (Lys-Lys), phenylalanin-citrullin (Phe-Cit), leuxine-citrullin (Leu-Cit), isoleuxine-citrullin (Ile-Cit), tryptophan-citrullin (Trp-Cit), và phenylalanin-alanin (Phe-Ala). Tripeptit ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alanin-alanin-asparagin (Ala-Ala-Asn), glyxin-valin-citrullin (Gly-Val-Cit), glyxin-glyxin-glyxin (Gly-Gly-Gly), phenylalanin-phenylalanin-lysin (Phe-Phe-Lys), và glyxin-phenylalanin-lysin (Gly-Phe-Lys). Đơn vị axit amin khác ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Phe-N^9-tosyl-Arg, và Phe-N^9-Nitro-Arg, như mô tả trong, ví dụ, Patent Mỹ số 6,214,345. Theo một số phương án, đơn vị axit amin trong nhóm liên kết bao gồm Val-Cit. Theo một số phương án, đơn vị axit amin trong nhóm liên kết bao gồm Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, ADC bao gồm Val-Cit chứng minh sự diệt sai tế bào đích giảm, sự diệt đúng tế bào đích tăng, mức kết tụ thấp hơn, và/hoặc lượng mang

dược chất cao hơn (*p*) so với ADC bao gồm đơn vị axit amin khác hoặc gốc tách được khác. Đơn vị axit amin có thể bao gồm gốc axit amin có trong tự nhiên và/hoặc các axit amin phụ và/hoặc chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên, như citrullin. Các đơn vị axit amin có thể được thiết kế và tối ưu hóa cho sự cắt bằng enzym bởi enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u, proteaza thể tiêu thể như cathepsin B, C, D, hoặc S, hoặc plasmin proteaza.

Theo một số phương án, nhóm liên kết trong ADC bất kỳ được bộc lộ trong đây có thể bao gồm ít nhất một đơn vị khoảng cách nối gốc kháng thể với gốc dược chất. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách nối vị trí cắt (ví dụ, gốc peptit tách được) trong nhóm liên kết với gốc kháng thể. Theo một số phương án, nhóm liên kết, và/hoặc đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết, về cơ bản là ưa nước. Nhóm liên kết ưa nước có thể được sử dụng để làm giảm mức độ mà dược chất có thể bị bơm ra ngoài tế bào ung thư kháng thuốc do cơ chế đa kháng thuốc (MDR- multiple drug resistance) hoặc kênh vận chuyển có chức năng tương tự. Theo một số khía cạnh, nhóm liên kết bao gồm một hoặc nhiều gốc polyetylen glycol (PEG), ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết là nhóm liên kết PEG ngắn hơn, và mang lại độ ổn định cao hơn và mức kết tụ thấp hơn so với nhóm liên kết PEG dài hơn.

Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết bao gồm một hoặc nhiều gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm -$(PEG)_m$-, và *m* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 10. Theo một số phương án, *m* nằm trong khoảng từ 1 đến 10; từ 2 đến 8; từ 2 đến 6; từ 2 đến 5; từ 2 đến 4; hoặc từ 2 đến 3. Theo một số phương án, *m* bằng 8. Theo một số phương án, *m* bằng 4. Theo một số phương án, *m* bằng 3. Theo một số phương án, *m* bằng 2. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm $(PEG)_2$, $(PEG)_4$, $(PEG)_8$, $(PEG)_9$, $(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$, $(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$, hoặc dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$. Theo một số phương án ưu tiên, đơn vị khoảng cách bao gồm $(PEG)_2$. Theo một số phương án, ADC bao gồm đơn vị khoảng cách ngắn hơn (ví dụ, $(PEG)_2$) chứng minh mức kết tụ thấp hơn và/hoặc lượng mang dược chất cao hơn (*p*) so với ADC bao gồm đơn vị khoảng cách dài hơn (ví dụ, $(PEG)_8$).

Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách trong nhóm liên kết bao gồm gốc alkyl. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm -$(CH_2)_n$-, và *n* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 10 (tức là, *n* có thể bằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10). Theo một số phương

án, *n* bằng 5. Theo một số phương án, ADC bao gồm đơn vị khoảng cách ngắn hơn (ví dụ, $(CH_2)_5$) chứng minh mức kết tụ thấp hơn và/hoặc lượng mang dược chất cao hơn (*p*) so với ADC bao gồm đơn vị khoảng cách dài hơn (ví dụ, $(PEG)_8$).

Đơn vị khoảng cách có thể được sử dụng, ví dụ, để liên kết gốc kháng thể với gốc dược chất, hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách liên kết gốc kháng thể trực tiếp với gốc dược chất. Theo một số phương án, gốc kháng thể và gốc dược chất được gắn qua đơn vị khoảng cách bao gồm một hoặc nhiều gốc PEG (ví dụ, $(PEG)_2$ hoặc $(PEG)_4$). Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách liên kết gốc kháng thể với gốc dược chất một cách gián tiếp. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách liên kết gốc kháng thể với gốc dược chất gián tiếp qua gốc tách được (ví dụ, peptit có thể tách được, disulfua có thể tách được, hoặc sulfonamit có thể tách được) và/hoặc gốc gắn để nối đơn vị khoảng cách với gốc kháng thể, ví dụ, gốc maleimit.

Đơn vị khoảng cách, theo các phương án khác nhau, gắn với gốc kháng thể (tức là, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên) qua một gốc maleimit (Mal). Theo một số phương án, ADC mà bao gồm nhóm liên kết gắn với gốc kháng thể thông qua gốc maleimit chứng minh lượng mang dược chất cao hơn (*p*) so với ADC mà bao gồm nhóm liên kết gắn với gốc kháng thể thông qua gốc gắn khác như gốc sucxinimit.

Đơn vị khoảng cách gắn với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua Mal được gọi trong đây là "đơn vị khoảng cách-Mal." Thuật ngữ "gốc maleimit," như sử dụng trong đây, có nghĩa là hợp chất chứa nhóm maleimit và nó phản ứng với nhóm sulfhydryl, ví dụ, nhóm sulfhydryl của gốc cystein trên gốc kháng thể. Các nhóm chức khác phản ứng với nhóm sulfhydryl (thiol) bao gồm, nhưng không giới hạn ở, iodoaxetamit, bromoaxetamit, vinyl pyridin, disulfua, pyridyl disulfua, isoxyanat, và isothioxyanat. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal phản ứng với gốc cystein trên kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal được nối với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua gốc cystein. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal bao gồm gốc alkyl.

Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và gốc peptit tách được. Theo một số phương án, gốc peptit tách được bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm Val-Cit. Theo một số phương án,

đơn vị axit amin bao gồm Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$ và Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_m$ và Val-Cit, trong đó m nằm trong khoảng từ 2 đến 8 hoặc từ 2 đến 5, hoặc bằng 2, 3, 4, hoặc 5. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_8$ và Val-Cit. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(CH_2)_5$ và Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$ và Ala-Ala-Asn.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và gốc disulfua có thể tách được. Theo một số phương án, gốc disulfua có thể tách được là disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$ và disulfidyl-dimetyl.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal và gốc sulfonamit có thể tách được. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$ và sulfonamit.

Theo các phương án khác nhau, đơn vị khoảng cách gắn với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua một gốc sucxinimit (OSu). Đơn vị khoảng cách mà gắn với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên qua OSu được gọi trong đây là "đơn vị khoảng cách-OSu." Thuật ngữ "gốc sucxinimit," như sử dụng trong đây, có nghĩa là hợp chất chứa hợp chất sucxinimit mà phản ứng với nhóm amin, ví dụ, nhóm amin của gốc lysin trên gốc kháng thể. Gốc sucxinimit ví dụ là N-hydroxysucxinimit (NHS). Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-OSu là phản ứng với gốc lysin trên kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-OSu được nối với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua gốc lysin. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-OSu bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-OSu bao gồm gốc alkyl.

Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu và gốc peptit tách được. Theo một số phương án, gốc peptit tách được bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm Val-Cit. Theo một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm

đơn vị khoảng cách-OSu và Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$ và Val-Cit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_9$ và Val-Cit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(CH_2)_5$ và Val-Cit. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ và Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu và Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$ và Ala-Ala-Asn.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu và gốc disulfua có thể tách được. Theo một số phương án, gốc disulfua có thể tách được là disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu và disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ và disulfidyl-dimetyl. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$ và disulfidyl-dimetyl.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu và gốc sulfonamit có thể tách được. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$ và sulfonamit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$ và sulfonamit.

Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu gắn gốc kháng thể (tức là, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên) với gốc tách được trong nhóm liên kết. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu gắn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên với gốc peptit tách được. Theo một số phương án, gốc peptit tách được bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-đơn vị axit amin hoặc đơn vị khoảng cách-OSu-đơn vị axit amin. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu bao gồm gốc alkyl. Theo một số phương án, đơn vị axit amin bao gồm Val-Cit. Theo các phương án khác, đơn vị axit amin bao gồm Ala-Ala-Asn.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm cấu trúc: đơn vị khoảng cách-Mal-Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm cấu trúc: Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm cấu trúc: Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên

kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn.

Theo các phương án khác nhau, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu gắn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên với gốc disulfua có thể tách được. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-disulfua hoặc đơn vị khoảng cách-OSu-disulfua. Theo một số phương án, disulfua là disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-disulfidyl-dimetyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl.

Theo một số phương án nhất định, đơn vị khoảng cách-Mal hoặc đơn vị khoảng cách-OSu gắn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên với gốc sulfonamit có thể tách được. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-sulfonamit hoặc đơn vị khoảng cách-OSu-sulfonamit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit.

Theo các phương án khác nhau, gốc tách được trong nhóm liên kết được nối trực tiếp với gốc dược chất. Theo các phương án khác, đơn vị khoảng cách khác được sử dụng để gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với gốc dược chất. Theo các phương án khác nhau, gốc dược chất là eribulin. Theo các phương án khác nhau, eribulin được gắn với gốc tách được trong nhóm liên kết bởi một đơn vị khoảng cách. Theo một số phương án,

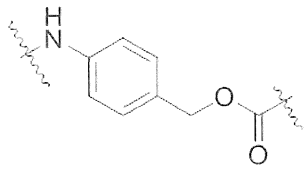
eribulin được gắn với gốc tách được trong nhóm liên kết bởi một đơn vị khoảng cách tự hủy. Theo một số phương án nhất định, eribulin được gắn với gốc tách được trong nhóm liên kết bởi đơn vị khoảng cách tự hủy, gốc tách được bao gồm Val-Cit, và đơn vị khoảng cách khác bao gồm PEG nối gốc tách được với gốc kháng thể. Theo một số phương án nhất định, eribulin được nối với kháng thể kháng-FRA thông qua đơn vị khoảng cách-Mal trong nhóm liên kết được nối với gốc tách được Val-Cit và đơn vị khoảng cách tự hủy pAB. Theo một số phương án khác, eribulin được nối với kháng thể kháng-her2 thông qua đơn vị khoảng cách-Mal trong nhóm liên kết được nối với gốc tách được Val-Cit và đơn vị khoảng cách tự hủy pAB.

Đơn vị khoảng cách có thể "tự hủy" hoặc "không tự hủy". Đơn vị khoảng cách "không tự hủy" là đơn vị khoảng cách trong đó một phần hoặc toàn bộ đơn vị khoảng cách vẫn gắn kết với gốc dược chất khi có sự cắt nhóm liên kết. Ví dụ về đơn vị khoảng cách không tự hủy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đơn vị khoảng cách glyxin và đơn vị khoảng cách glyxin-glyxin. Đơn vị khoảng cách không tự hủy cuối cùng có thể phân hủy theo thời gian nhưng không dễ dàng giải phóng dược chất tự nhiên đã được liên kết hoàn toàn trong điều kiện tế bào. Đơn vị khoảng cách "tự hủy" cho phép giải phóng gốc dược chất tự nhiên trong các điều kiện nội bào. "Dược chất tự nhiên" là dược chất mà không còn phần nào của đơn vị khoảng cách hoặc sự biến đổi hóa học khác sau khi cắt/phân hủy đơn vị khoảng cách.

Hóa học tự hủy là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được chọn dễ dàng cho ADC được bộc lộ. Theo các phương án khác nhau, đơn vị khoảng cách mà gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với gốc dược chất (ví dụ, eribulin) là tự hủy, và trải qua quá trình tự hủy đồng thời với hoặc ngay trước/sau khi cắt gốc tách được trong các điều kiện nội bào.

Theo một số phương án nhất định, đơn vị khoảng cách tự hủy trong nhóm liên kết bao gồm đơn vị p-aminobenzyl. Theo một số phương án, rượu p-aminobenzylic (pABOH) được gắn với đơn vị axit amin hoặc gốc tách được khác trong nhóm liên kết thông qua liên kết amit, và carbamat, metylcarbamat, hoặc cacbonat được tạo ra giữa pABOH và gốc dược chất (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15:1087-103). Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách tự hủy là hoặc bao gồm p-aminobenzyloxycarbonyl (pAB). Không bị giới hạn bởi lý thuyết, người ta cho rằng sự tự hủy của pAB có liên quan đến phản ứng tách tại vị trí 1,6 tự phát (Jain et al. (2015) Pharm Res 32:3526-40).

Theo các phương án khác nhau, cấu trúc của p-aminobenzyloxycarbonyl (pAB) sử dụng trong ADC bộc lộ được thể hiện sau đây:



p-amino-benzyloxycarbonyl

Theo các phương án khác nhau, đơn vị khoảng cách tự hủy gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với amin ở C-35 trên eribulin. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách tự hủy là pAB. Theo một số phương án, pAB gắn gốc tách được trong nhóm liên kết với amin ở C-35 trên eribulin. Theo một số phương án, pAB trải qua phản ứng tự hủy khi cắt gốc tách được, và eribulin được giải phóng khỏi ADC ở dạng hoạt động, tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể kháng-FRA (ví dụ, MORAb-003) được nối với amin ở C-35 của eribulin bởi nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. Theo các phương án khác, kháng thể kháng-her2 (ví dụ, trastuzumab) được nối với amin ở C-35 của eribulin bởi nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

Theo một số phương án, pAB trải qua phản ứng tự hủy khi cắt gốc peptit tách được trong nhóm liên kết. Theo một số phương án, gốc peptit tách được bao gồm đơn vị axit amin. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, đơn vị axit amin là Val-Cit. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Val-Cit-pAB (VCP). Theo một số phương án nhất định, đơn vị axit amin là Ala-Ala-Asn. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Ala-Ala-Asn-pAB.

Theo một số phương án, pAB trải qua phản ứng tự hủy khi cắt gốc disulfua có thể tách được trong nhóm liên kết. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm disulfua-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm disulfidyl-dimetyl-pAB.

Theo một số phương án, pAB trải qua phản ứng tự hủy khi cắt gốc sulfonamit có thể tách được trong nhóm liên kết. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm sulfonamit-pAB.

Theo các khía cạnh khác nhau, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal, đơn vị axit amin có thể tách được, và pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách

bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc alkyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm, Mal-$(PEG)_8$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(CH_2)_5$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB.

Theo các phương án khác nhau, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-disulfua-pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfua-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl-pAB.

Theo một số phương án, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-Mal-sulfonamit-pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_4$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit-pAB.

Theo một số khía cạnh, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc alkyl. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB. Theo các phương án khác, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm, OSu-$(PEG)_9$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(CH_2)_5$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-đơn vị axit amin-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-Val-Cit-pAB.

Theo một số phương án, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-disulfua-pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfua-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$-disulfua-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$-disulfidyl-dimetyl-pAB.

Theo một số phương án, gốc kháng thể của ADC được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết, trong đó nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách-OSu-sulfonamit-pAB. Theo một số phương án, đơn vị khoảng cách bao gồm gốc PEG. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-$(PEG)_3$-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit-pAB. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm OSu-dibenzylxycloocten-triazol-$(PEG)_3$-sulfonamit-pAB.

Theo các phương án khác nhau, nhóm liên kết được thiết kế để thúc đẩy sự diệt đích âm tính kế bên (sự diệt các tế bào bên cạnh) thông qua sự cắt sau khi nội bào hóa tế bào và khuếch tán nhóm liên kết-gốc dược chất và/hoặc gốc dược chất đơn độc vào tế bào bên cạnh. Theo một số phương án, nhóm liên kết thúc đẩy sự nội bào hóa tế bào. Theo một số phương án, nhóm liên kết được thiết kế để tối thiểu hóa sự cắt trong môi trường ngoại bào và bằng cách đó làm giảm độc tính cho các mô xa đích (ví dụ, mô không phải ung thư), trong khi đó vẫn duy trì sự gắn kết ADC với mô đích và diệt đích âm tính kế bên các mô bị ung thư mà không biểu hiện kháng nguyên được chọn đích bởi gốc kháng thể của ADC, nhưng các mô này nằm bao quanh mô ung thư đích biểu hiện kháng nguyên này. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm gốc maleimit (Mal), gốc polyetylen glycol (PEG), valin-citrullin (Val-Cit hoặc "vc"), và pAB tạo ra các đặc điểm chức năng này. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB đặc biệt hiệu quả trong việc tạo ra các đặc điểm chức năng này, ví dụ, khi nối gốc kháng thể kháng-FRA như MORAb-003 và gốc dược chất như eribulin. Theo một số phương án, cũng có thể quan sát thấy ít nhất một số trong số các đặc điểm chức năng này mà không có gốc kháng thể kháng-FRA, và/hoặc không có MORAb-003. Ví dụ, theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB là có hiệu quả trong việc tạo ra một số hoặc tất cả đặc điểm

chức năng này, ví dụ, khi nối gốc kháng thể kháng-her2 như trastuzumab và gốc dược chất như eribulin.

Theo một số phương án, gốc kháng thể được liên hợp với gốc dược chất thông qua nhóm liên kết bao gồm gốc maleimit (Mal), gốc polyetylen glycol (PEG), valin citrullin (Val-Cit hoặc "vc"), và pAB. Theo các phương án này, gốc maleimit gắn kiểu cộng hóa trị nhóm liên kết-gốc dược chất với gốc kháng thể, và pAB có tác dụng là đơn vị khoảng cách tự hủy. Nhóm liên kết như vậy có thể được gọi là nhóm liên kết "m-vc-pAB", nhóm liên kết "Mal-VCP", nhóm liên kết "Mal-$(PEG)_2$-VCP", hoặc nhóm liên kết "Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB". Theo một số phương án, gốc dược chất là eribulin. Cấu trúc của Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin được nêu trong Bảng 46. pAB của nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB được gắn với amin ở C-35 trên eribulin.

Đã phát hiện ra rằng các ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin chứng minh sự kết hợp cụ thể của các đặc tính mong muốn, đặc biệt khi được ghép đôi với kháng thể kháng-FRA như MORAb-003 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Các đặc tính này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mức hiệu quả của lượng mang dược chất ($p \sim 4$), mức kết tụ thấp, độ ổn định trong các điều kiện bảo quản hoặc khi tuần hoàn trong cơ thể (ví dụ, độ ổn định trong huyết thanh), ái lực giữ được đối với tế bào biểu hiện đích so với kháng thể không liên hợp, độc tính tế bào tiềm năng chống lại tế bào biểu hiện đích, mức diệt sai tế bào đích thấp, mức diệt đích âm tính kế bên cao, và/hoặc tác dụng chống ung thư *in vivo* hiệu quả, tất cả so với ADC sử dụng nhóm liên kết-độc tố và/hoặc gốc kháng thể khác. Trong khi đã biết vô số các lựa chọn nhóm liên kết và sự kết hợp các đơn vị khoảng cách và vị trí cắt trong lĩnh vực này và có thể mang lại lợi ích nhất định trong một hoặc nhiều phân nhóm chức năng này, sự kết hợp cụ thể của nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với gốc kháng thể như kháng thể kháng-FRA (ví dụ, MORAb-003) có thể mang lại các đặc điểm tốt hoặc vượt trội trên một phổ các đặc điểm chức năng mong muốn của ADC điều trị. Theo một số phương án, có thể quan sát thấy đặc điểm chức năng tốt hoặc vượt trội mang lại bởi sự kết hợp cụ thể của nhóm liên kết Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB nối eribulin với gốc kháng thể với nhóm liên kết-độc tố được liên hợp với, ví dụ, kháng thể kháng-her 2 như trastuzumab.

Theo một số phương án, ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin và gốc kháng thể bao gồm kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó giữ

được khả năng hướng đích và nội bào hóa vào trong tế bào khối u. Theo một số phương án, ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin và kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện FRA. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện FRA bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:2 (HCDR1), SEQ ID NO:3 (HCDR2), và SEQ ID NO:4 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:7 (LCDR1), SEQ ID NO:8 (LCDR2), và SEQ ID NO:9 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2), và SEQ ID NO:15 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2), và SEQ ID NO:18 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện FRA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện FRA bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa.

Theo một số phương án, ADC có Công thức I:

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

trong đó:

(i) Ab là kháng thể kháng-thụ thể folat alpha (FRA) nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:2 (HCDR1), SEQ ID NO:3 (HCDR2), và SEQ ID NO:4 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:7 (LCDR1), SEQ ID NO:8 (LCDR2), và SEQ ID NO:9 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:13 (HCDR1), SEQ ID NO:14 (HCDR2), và SEQ ID NO:15 (HCDR3);

và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:16 (LCDR1), SEQ ID NO:17 (LCDR2), và SEQ ID NO:18 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

(ii) D là eribulin;

(iii) L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

(iv) *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa là MORAb-003. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 8, hoặc từ 1 đến 6. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 2 đến 8, hoặc từ 2 đến 5. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 3 đến 4. Theo một số phương án, *p* bằng 4.

Theo các phương án khác, ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin và kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện her2. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện her2 bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:71 (HCDR1), SEQ ID NO:72 (HCDR2), và SEQ ID NO:73 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:74 (LCDR1), SEQ ID NO:75 (LCDR2), và SEQ ID NO:76 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:191 (HCDR1), SEQ ID NO:192 (HCDR2), và SEQ ID NO:193 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:194 (LCDR1), SEQ ID NO:195 (LCDR2), và SEQ ID NO:196 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện her2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó chọn đích tế bào khối u biểu hiện her2 bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa.

Theo một số phương án, ADC có Công thức I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

trong đó:

(i) Ab là kháng thể kháng-thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người (her2) nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:71 (HCDR1), SEQ ID NO:72 (HCDR2), và SEQ ID NO:73 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:74 (LCDR1), SEQ ID NO:75 (LCDR2), và SEQ ID NO:76 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:191 (HCDR1), SEQ ID NO:192 (HCDR2), và SEQ ID NO:193 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:194 (LCDR1), SEQ ID NO:195 (LCDR2), và SEQ ID NO:196 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

(ii) D là eribulin;

(iii) L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

(iv) *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 20.

Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa là trastuzumab. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 1 đến 8, hoặc từ 1 đến 6. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 2 đến 8, hoặc từ 2 đến 5. Theo một số phương án, *p* có giá trị nằm trong khoảng từ 3 đến 4. Theo một số phương án, *p* bằng 4.

Theo các phương án khác, ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin và kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện mesothelin (MSLN). Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện MSLN bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit

amin SEQ ID NO:65 (HCDR1), SEQ ID NO:66 (HCDR2), và SEQ ID NO:67 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:68 (LCDR1), SEQ ID NO:69 (LCDR2), và SEQ ID NO:70 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:185 (HCDR1), SEQ ID NO:186 (HCDR2), và SEQ ID NO:187 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:188 (LCDR1), SEQ ID NO:189 (LCDR2), và SEQ ID NO:190 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện MSLN bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:26. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó mà chọn đích tế bào khối u biểu hiện MSLN bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa.

Theo một số phương án, ADC có Công thức I:

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

trong đó:

(i) Ab là kháng thể kháng-mesothelin nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:65 (HCDR1), SEQ ID NO:66 (HCDR2), và SEQ ID NO:67 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:68 (LCDR1), SEQ ID NO:69 (LCDR2), và SEQ ID NO:70 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:185 (HCDR1), SEQ ID NO:186 (HCDR2), và SEQ ID NO:187 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:188 (LCDR1), SEQ ID NO:189 (LCDR2), và SEQ ID NO:190 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

(ii) D là eribulin;

(iii) L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

(iv) p là số nguyên có giá trị từ 1 đến 20.

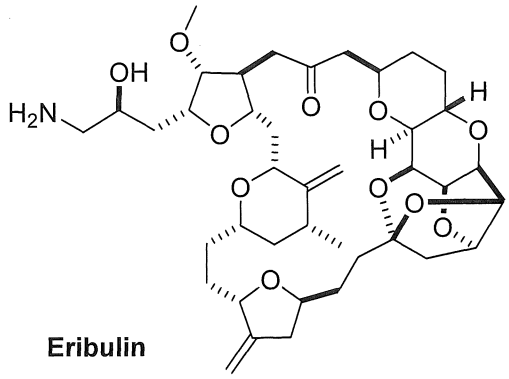
Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:26. Theo một số phương án, kháng thể nội bào hóa là MORAb-003, MORAb-009, hoặc trastuzumab. Theo một số phương án, p có giá trị từ 1 đến 8, hoặc 1 đến 6. Theo một số phương án, p có giá trị từ 2 đến 8, hoặc 2 đến 5. Theo một số phương án, p có giá trị từ 3 đến 4. Theo một số phương án, p bằng 4.

Gốc dược chất

Gốc dược chất (D) của ADC mô tả trong đây có thể là chất hóa trị liệu bất kỳ. Các nhóm hữu dụng của chất hóa trị liệu bao gồm, ví dụ, chất kháng-tubulin. Theo một số phương án nhất định, gốc dược chất là chất kháng-tubulin. Ví dụ về chất kháng-tubulin bao gồm cryptophyxin và eribulin. Gốc dược chất được ưu tiên để sử dụng trong các ADC được mô tả là eribulin.

Theo các phương án khác nhau, gốc dược chất là eribulin. Theo các phương án này, nhóm liên kết của ADC được gắn thông qua amin ở C-35 trên eribulin.

Theo các phương án khác nhau, dạng tự nhiên của eribulin sử dụng để nối với nhóm liên kết và gốc kháng thể được thể hiện như sau:



Eribulin

Theo một số phương án nhất định, chất trung gian, là tiền chất của nhóm liên kết, được cho phản ứng với gốc dược chất trong các điều kiện thích hợp. Theo một số phương án nhất định, các nhóm phản ứng được sử dụng trên dược chất và/hoặc chất trung gian hoặc nhóm liên kết. Sản phẩm của phản ứng giữa dược chất và chất trung gian, hoặc dược chất được tạo dẫn xuất, sau đó được cho phản ứng với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên trong các điều kiện thích hợp. Cách khác, đầu tiên nhóm liên kết hoặc chất trung

gian có thể được cho phản ứng với kháng thể hoặc kháng thể được tạo dẫn xuất, và sau đó cho phản ứng với dược chất hoặc dược chất đã tạo dẫn xuất.

Một số phản ứng khác nhau là đã có sẵn để gắn kết cộng hóa trị dược chất và/hoặc nhóm liên kết với gốc kháng thể. Nó thường được thực hiện bởi phản ứng của một hoặc nhiều gốc axit amin của phân tử kháng thể, bao gồm nhóm amin của lysin, nhóm axit carboxylic tự do của axit glutamic và axit aspartic, nhóm sulfhydryl của cystein, và các gốc khác nhau của axit amin thơm. Ví dụ, sự gắn kết cộng hóa trị không đặc hiệu có thể xảy ra bằng cách sử dụng phản ứng carbodiimit để liên kết nhóm carboxy (hoặc amino) trên hợp chất với nhóm amino (hoặc carboxy) trên gốc kháng thể. Ngoài ra, chất hai nhóm chức như dialdehyt hoặc imidoeste cũng có thể được sử dụng để liên kết nhóm amino trên một hợp chất với nhóm amino trên gốc kháng thể. Cũng có thể gắn kết dược chất với tác nhân gắn kết là phản ứng bazơ Schiff. Phương pháp này bao gồm bước oxy hóa bằng periodat dược chất chứa nhóm glycol hoặc hydroxy, do đó tạo ra một aldehyt sau đó được cho phản ứng với tác nhân gắn kết. Việc gắn xảy ra thông qua sự hình thành bazơ Schiff với các nhóm amino của tác nhân gắn kết. Isothioxyanat cũng có thể được sử dụng làm chất kết hợp để gắn kết cộng hóa trị dược chất với tác nhân gắn kết. Các kỹ thuật khác đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và nằm trong phạm vi sáng chế.

Lượng mang dược chất

Lượng mang dược chất được thể hiện là giá trị *p*, và cũng được gọi trong đây là tỷ lệ dược chất với kháng thể (DAR). Lượng mang dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20 gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể. Theo một số phương án, *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 20. Theo một số phương án, *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 10, từ 1 đến 9, từ 1 đến 8, từ 1 đến 7, từ 1 đến 6, từ 1 đến 5, từ 1 đến 4, từ 1 đến 3, hoặc từ 1 đến 2. Theo một số phương án, *p* là số nguyên có giá trị từ 2 đến 10, từ 2 đến 9, từ 2 đến 8, từ 2 đến 7, từ 2 đến 6, từ 2 đến 5, từ 2 đến 4, hoặc từ 2 đến 3. Theo một số phương án, *p* là số nguyên có giá trị từ 3 đến 4. Theo các phương án khác, *p* bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6, tốt hơn là 3 hoặc 4.

Lượng mang dược chất có thể bị hạn chế bởi số lượng vị trí gắn trên gốc kháng thể. Theo một số phương án, gốc liên kết (L) của ADC gắn với gốc kháng thể thông qua nhóm hoạt động hóa học trên một hoặc nhiều gốc axit amin trên gốc kháng thể. Ví dụ, nhóm liên kết có thể được gắn với gốc kháng thể thông qua nhóm amino, imino, hydroxyl, thiol, hoặc

carboxyl tự do (ví dụ, với đầu tận cùng N- hoặc C-, với nhóm amin epsilon của một hoặc nhiều gốc lysin, với nhóm axit carboxylic tự do của một hoặc nhiều gốc axit glutamic hoặc axit aspartic, hoặc với nhóm sulfhydryl của một hoặc nhiều gốc cystein). Vị trí mà nhóm liên kết được gắn vào đó có thể là một gốc tự nhiên trong trình tự axit amin của gốc kháng thể, hoặc nó có thể được đưa vào trong gốc kháng thể, ví dụ, bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN (ví dụ, bằng cách đưa góc cystein vào trong trình tự axit amin) hoặc bằng kỹ thuật hóa sinh protein (ví dụ, bằng cách khử, điều chỉnh độ pH, hoặc thủy phân).

Theo một số phương án, số lượng gốc dược chất có thể được liên hợp với gốc kháng thể là bị hạn chế bởi số lượng gốc cystein tự do. Ví dụ, khi gốc gắn là nhóm cystein thiol, kháng thể có thể chỉ có một hoặc một số ít nhóm cystein thiol, hoặc có thể chỉ có một hoặc một số ít nhóm thiol đủ phản ứng mà qua đó nhóm liên kết có thể được gắn. Thông thường, các kháng thể không chứa nhiều nhóm cystein thiol tự do và phản ứng có thể được liên kết với gốc dược chất. Thật vậy, hầu hết các gốc cystein thiol trong kháng thể tồn tại ở dạng cầu disulfua. Việc gắn quá nhiều nhóm liên kết-độc tố với kháng thể có thể làm mất ổn định kháng thể bằng cách khử gốc cystein đang có để tạo ra cầu disulfua. Do đó, tỷ lệ dược chất:kháng thể tối ưu sẽ làm tăng hiệu lực của ADC (bằng cách làm tăng số lượng gốc dược chất được gắn trên mỗi kháng thể) mà không làm mất ổn định gốc kháng thể. Theo một số phương án, tỷ lệ tối ưu có thể nằm trong khoảng 3-4.

Theo một số phương án, nhóm liên kết được gắn với gốc kháng thể thông qua gốc Mal mang lại tỷ lệ là khoảng 3-4. Theo một số phương án, nhóm liên kết được gắn với gốc kháng thể thông qua gốc khác (ví dụ, gốc OSu) có thể mang lại tỷ lệ tối ưu thấp hơn (ví dụ, tỷ lệ thấp hơn, như khoảng 0-3). Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách ngắn (ví dụ, đơn vị khoảng cách ngắn PEG như $(PEG)_2$ hoặc $(PEG)_4$, hoặc đơn vị khoảng cách alkyl ngắn như $(CH_2)_5$) mang lại tỷ lệ khoảng 3-4. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm đơn vị khoảng cách dài hơn (ví dụ, $(PEG)_8$) có thể mang lại tỷ lệ tối ưu thấp hơn (ví dụ, tỷ lệ thấp hơn, như khoảng 0-3). Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm peptit gốc tách được mang lại tỷ lệ là khoảng 3-4. Theo một số phương án, nhóm liên kết bao gồm gốc tách được khác (ví dụ, disulfua có thể tách được hoặc sulfonamit có thể tách được) có thể mang lại tỷ lệ tối ưu thấp hơn (ví dụ, tỷ lệ thấp hơn, như khoảng 0-3). Theo một số phương án, ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin được nối với kháng thể như kháng thể kháng-FRA (ví dụ, MORAb-003) có tỷ lệ là khoảng 3-4. Theo một số phương án, quan sát thấy tỷ lệ là khoảng 3-4 với ADC bao gồm

Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin được nối với kháng thể khác, như kháng thể kháng-her2 (ví dụ, trastuzumab). Theo một số phương án, tỷ lệ tối ưu quan sát được với ADC bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin nhóm liên kết-độc tố là độc lập với kháng thể.

Theo một số phương án, gốc kháng thể được tiếp xúc với các điều kiện khử trước khi liên hợp để tạo ra một hoặc nhiều gốc cystein tự do. Một kháng thể, theo một số phương án, có thể được khử bởi tác nhân khử như dithiothreitol (DTT) hoặc tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP), trong điều kiện khử hoàn toàn hoặc một phần, để tạo ra nhóm cystein thiol phản ứng. Cystein chưa cặp đôi có thể được tạo ra qua phản ứng khử một phần bởi các đương lượng mol hạn chế của TCEP, chất này ưu tiên khử liên kết disulfua giữa các chuỗi mà nối chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (một cặp trên mỗi cặp đôi H-L) và hai chuỗi nặng trong vùng bản lề (hai cặp trên mỗi cặp đôi H-H trong trường hợp IgG1 người) trong khi vẫn giữ sự nguyên vẹn của liên kết disulfua trong chuỗi (Stefano et al. (2013) Methods Mol. Biol. 1045:145-71). Theo các phương án, liên kết disulfua bên trong các kháng thể được khử kiểu điện hóa, ví dụ, bằng cách sử dụng điện cực hoạt động mà điện cực này áp dụng điện áp khử và oxy hóa khác. Phương pháp này có thể cho phép kết hợp trực tuyến phản ứng khử liên kết disulfua với thiết bị phân tích (ví dụ, thiết bị phát hiện điện hóa, phổ kế NMR, hoặc phổ kế khối lượng) hoặc thiết bị tách hóa học (ví dụ, sắc ký lỏng (ví dụ, HPLC) hoặc thiết bị điện di (xem, ví dụ, Công bố đơn Mỹ số 20140069822)). Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đưa vào các điều kiện biến tính để phát hiện các nhóm ái nhân phản ứng trên gốc axit amin, như lysin hoặc cystein.

Lượng mang dược chất của ADC có thể được kiểm soát theo các cách khác nhau, ví dụ, bằng cách: (i) hạn chế số dư mol của chất trung gian dược chất-nhóm liên kết hoặc chất phản ứng là nhóm liên kết so với kháng thể; (ii) hạn chế thời gian hoặc nhiệt độ của phản ứng liên hợp; (iii) điều kiện khử hạn chế hoặc khử một phần để biến đổi cystein thiol; và/hoặc (iv) thao tác di truyền bằng kỹ thuật tái tổ hợp trình tự axit amin của kháng thể sao cho số lượng và vị trí của gốc cystein được biến đổi để kiểm soát số lượng và/hoặc vị trí của các phần gắn nhóm liên kết-dược chất.

Theo một số phương án, gốc cystein tự do được đưa vào trong trình tự axit amin của gốc kháng thể. Ví dụ, có thể điều chế các kháng thể được thao tác di truyền trên cystein trong đó một hoặc nhiều axit amin của kháng thể gốc được thay thế bởi axit amin cystein.

Dạng bất kỳ của kháng thể có thể cũng được thao tác di truyền, tức là gây đột biến. Ví dụ, mảnh kháng thể Fab gốc có thể được thao tác di truyền để tạo ra Fab được thao tác di truyền trên cystein được gọi là "ThioFab." Tương tự, kháng thể đơn dòng gốc có thể được thao tác di truyền để tạo ra "ThioMab." Di truyền một vị trí tạo ra một gốc cystein được thao tác di truyền đơn trong ThioFab, trong khi đó một đột biến một vị trí thu được hai gốc cystein được thao tác di truyền trong ThioMab, do bản chất dime của kháng thể IgG. ADN mã hóa trình tự axit amin biến thể của polypeptit gốc có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, phương pháp mô tả trong WO2006/034488). Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, điều chế bằng phương pháp đột biến tại điểm (hoặc qua oligonucleotit), đột biến PCR, và đột biến cátxét ADN sản sinh sớm mã hóa polypeptit. Biến thể của kháng thể tái tổ hợp cũng có thể được xây dựng cấu trúc bằng thao tác đoạn giới hạn hoặc bằng phương pháp PCR mở rộng chồng lấp với các oligonucleotit tổng hợp. ADC có Công thức I bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể có 1, 2, 3, hoặc 4 axit amin cystein được thao tác di truyền (Lyon et al. (2012) Methods Enzymol. 502:123-38). Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc cystein tự do cũng có sẵn trong gốc kháng thể, mà không sử dụng thao tác di truyền, trong trường hợp này các gốc cystein tự do có thể được sử dụng để liên hợp gốc kháng thể với gốc dược chất.

Theo một số phương án, lượng mang dược chất cao hơn (ví dụ, $p > 5$) có thể gây ra sự kết tụ, tính không hòa tan, độc tính, hoặc giảm tính thấm tế bào của thể liên hợp kháng thể-dược chất. Lượng mang dược chất cao hơn cũng có thể ảnh hưởng tiêu cực đến dược động học (ví dụ, độ thanh thải) của một số ADC. Theo một số phương án, lượng mang dược chất thấp hơn (ví dụ, $p < 3$) có thể làm giảm hiệu lực của một số ADC kháng lại tế bào biểu hiện đích và/hoặc tế bào âm tính kế bên. Theo một số phương án, lượng mang dược chất của ADC theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 8; từ khoảng 2 đến khoảng 6; từ khoảng 2 đến khoảng 5; từ khoảng 3 đến khoảng 5; hoặc từ khoảng 3 đến khoảng 4.

Khi nhiều hơn một nhóm ái nhân phản ứng với chất trung gian dược chất-nhóm liên kết hoặc chất phản ứng là gốc liên kết sau đó là với chất phản ứng là gốc dược chất, trong hỗn hợp phản ứng bao gồm nhiều bản sao của gốc kháng thể và gốc liên kết, thì sản phẩm thu được có thể là hỗn hợp của các hợp chất ADC với sự phân bố của một hoặc nhiều gốc dược chất được gắn với mỗi bản sao của gốc kháng thể trong hỗn hợp này. Theo một số phương án, lượng mang dược chất trong hỗn hợp của các ADC thu được từ phản ứng liên

hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 20 gốc dược chất gắn với mỗi gốc kháng thể. Số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể (tức là, lượng mang dược chất trung bình, hoặc *p* trung bình) có thể được tính bằng phương pháp thông dụng bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách đo phổ khối lượng (ví dụ, LC-MS pha đảo), và/hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (ví dụ, HIC-HPLC). Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể được xác định bởi sắc ký tương tác kỵ nước-sắc ký lỏng hiệu năng cao (HIC-HPLC- hydrophobic interaction chromatography-high performance liquid chromatography). Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể được xác định bởi sắc ký lỏng pha đảo-đo phổ khối lượng (LC-MS- liquid chromatography-mass spectrometry). Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể nằm trong khoảng từ 3 đến khoảng 4; từ khoảng 3,1 đến khoảng 3,9; từ khoảng 3,2 đến khoảng 3,8; từ khoảng 3,2 đến khoảng 3,7; từ khoảng 3,2 đến khoảng 3,6; từ khoảng 3,3 đến khoảng 3,8; hoặc từ khoảng 3,3 đến khoảng 3,7. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể nằm trong khoảng từ 3,2 đến khoảng 3,8. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là khoảng 3,8. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ 3 đến 4; từ 3,1 đến 3,9; từ 3,2 đến 3,8; từ 3,2 đến 3,7; từ 3,2 đến 3,6; từ 3,3 đến 3,8; hoặc từ 3,3 đến 3,7. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ 3,2 đến 3,8. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là 3,8.

Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ khoảng 3,5 đến khoảng 4,5; từ khoảng 3,6 đến khoảng 4,4; từ khoảng 3,7 đến khoảng 4,3; từ khoảng 3,7 đến khoảng 4,2; hoặc từ khoảng 3,8 đến khoảng 4,2. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ khoảng 3,6 đến khoảng 4,4. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là khoảng 4,0. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ 3,5 đến 4,5; từ 3,6 đến 4,4; từ 3,7 đến 4,3; từ 3,7 đến 4,2; hoặc từ 3,8 đến 4,2. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là từ 3,6 đến 4,4. Theo một số phương án, số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể là 4,0.

Theo các phương án khác nhau, thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng đối với số lượng trung bình của gốc dược chất trên mỗi gốc kháng thể có nghĩa là +/- 10%.

Các hợp chất ADC cụ thể, hoặc "kiểu," có thể được xác định trong hỗn hợp bởi phổ khối lượng và được tách bởi UPLC hoặc HPLC, ví dụ sắc ký tương tác kỵ nước (HIC-HPLC). Theo một số phương án nhất định, ADC đồng nhất hoặc gần như đồng nhất có giá trị lượng mang đơn có thể được tách từ hỗn hợp liên hợp, ví dụ, bằng phương pháp điện di hoặc sắc ký.

Theo một số phương án, lượng mang dược chất và/hoặc lượng mang dược chất trung bình là khoảng 4 mang lại các đặc tính có lợi. Theo một số phương án, lượng mang dược chất và/hoặc lượng mang dược chất trung bình nhỏ hơn khoảng 4 có thể tạo ra kiểu kháng thể không liên hợp với mức độ cao không thể chấp nhận, kiểu này có thể cạnh tranh với ADC về gắn kết với kháng nguyên đích và/hoặc gây giảm hiệu quả điều trị. Theo một số phương án, lượng mang dược chất và/hoặc lượng mang dược chất trung bình lớn hơn khoảng 4 có thể tạo ra sản phẩm không đồng nhất và/hoặc kết tụ ADC với mức độ cao không thể chấp nhận. Lượng mang dược chất và/hoặc lượng mang dược chất trung bình nhiều hơn khoảng 4 cũng có thể ảnh hưởng đến sự ổn định của ADC, do mất một hoặc nhiều liên kết hóa học đòi hỏi để ổn định gốc kháng thể.

Theo một số phương án, ADC có Công thức I:

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

trong đó:

(i) Ab là kháng thể kháng-thụ thể folat alpha nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:24;

(ii) D là eribulin;

(iii) L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

(iv) *p* là số nguyên có giá trị từ 3 đến 4.

Theo các phương án khác, ADC có Công thức I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

trong đó:

(i) Ab là kháng thể kháng-thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28;

(ii) D là eribulin;

(iii) L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

(iv) *p* là số nguyên có giá trị từ 3 đến 4.

Theo một số phương án, *p* bằng 4.

Sáng chế bao gồm phương pháp sản xuất ADC được mô tả. Ngắn gọn, ADC bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên là gốc kháng thể, gốc dược chất, và nhóm liên kết mà nối gốc dược chất và gốc kháng thể. Theo một số phương án, ADC có thể được sử dụng bằng cách sử dụng nhóm liên kết có các nhóm chức hoạt động để gắn cộng hóa trị với gốc dược chất và với gốc kháng thể. Ví dụ, theo một số phương án, cystein thiol của gốc kháng thể có thể tạo ra một liên kết với nhóm chức hoạt động của nhóm liên kết hoặc chất trung gian dược chất-nhóm liên kết (ví dụ, gốc maleimit) để tạo ra ADC. Việc tạo ra ADC có thể được thực hiện bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, ADC được tạo ra bằng cách cho gốc kháng thể tiếp xúc với nhóm liên kết và gốc dược chất theo cách tuần tự, sao cho đầu tiên gốc kháng thể được liên kết cộng hóa trị với nhóm liên kết, và sau đó chất trung gian kháng thể-nhóm liên kết đã tạo ra trước được phản ứng với gốc dược chất. Chất trung gian kháng thể-nhóm liên kết có thể có hoặc có thể không được đưa vào bước tinh chế trước khi cho tiếp xúc với gốc dược chất. Theo các phương án khác, ADC được tạo ra bằng cách cho gốc kháng thể tiếp xúc với hợp chất nhóm liên kết - dược chất đã tạo ra trước bằng cách cho nhóm liên kết phản ứng với gốc dược chất. Hợp chất nhóm liên kết-dược chất đã được tạo ra trước có thể được hoặc có thể không được đưa vào bước tinh chế trước khi cho tiếp xúc với gốc kháng thể.

Theo các phương án khác, gốc kháng thể tiếp xúc với nhóm liên kết và gốc dược chất trong một hỗn hợp phản ứng, cho phép hình thành đồng thời các liên kết cộng hóa trị giữa gốc kháng thể và nhóm liên kết, và giữa nhóm liên kết và gốc dược chất. Phương pháp tạo ra ADC có thể bao gồm một phản ứng, trong đó gốc kháng thể tiếp xúc với gốc kháng thể trước khi bổ sung nhóm liên kết vào hỗn hợp phản ứng, và ngược lại. Theo một số phương án nhất định, ADC được tạo ra bằng cách cho gốc kháng thể phản ứng với nhóm liên kết được nối với gốc dược chất, như Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-eribulin, trong các điều kiện cho phép liên hợp.

Các ADC điều chế theo phương pháp mô tả trên có thể được đưa vào bước tinh chế. Bước tinh chế có thể bao gồm các phương pháp hóa sinh bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để tinh chế protein, hoặc các cách kết hợp bất kỳ các phương pháp này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lọc dòng tiếp xúc (TFF- tangential flow filtration), sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký dựa trên điểm đẳng điện hoặc điện tích bất kỳ, sắc ký kiểu phối hợp, ví dụ, CHT (hydroxyapatit gốm- ceramic hydroxyapatite), sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký loại trừ kích thước, phép thẩm tách, lọc, kết tủa chọn lọc, hoặc các cách kết hợp bất kỳ của chúng.

Sử dụng điều trị và chế phẩm

Sáng chế bộc lộ các phương pháp sử dụng ADC được bộc lộ để điều trị một rối loạn bệnh, ví dụ, bệnh ung thư ở đối tượng. ADC có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai, và có thể được sử dụng trong chế phẩm dược dụng bất kỳ, liều, và phác đồ liều. ADC hiệu quả điều trị có thể được đánh giá về độc tính cũng như các chỉ báo về hiệu lực và được điều chỉnh theo đó. Các chỉ số đo hiệu lực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hiệu quả kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào quan sát *in vitro* hoặc *in vivo*, thể tích khối u giảm, sự ức chế phát triển khối u, và/hoặc tuổi thọ kéo dài.

Các phương pháp để xác định liệu ADC có thể hiện hiệu quả kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào trên tế bào hay không đã được biết rõ. Ví dụ, hoạt tính gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào của ADC có thể được đo bằng cách: cho tiếp xúc tế bào động vật có vú biểu hiện protein đích của ADC trong môi trường nuôi cấy tế bào; nuôi cấy tế bào trong khoảng thời gian từ khoảng 6 giờ đến khoảng 5 ngày; và đánh giá tỷ lệ sống của tế bào. Các thử nghiệm dựa trên tế bào *in vitro* cũng có thể được sử dụng để đánh giá khả năng

sống (tăng sinh), độc tính tế bào, và khả năng gây chết tế bào theo chương trình (hoạt hóa caspaza) của ADC.

Để xác định liệu thể liên hợp kháng thể-dược chất có thể hiện tác dụng kìm hãm tế bào hay không, có thể sử dụng thử nghiệm hợp nhất thymidin. Ví dụ, tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên đích ở mật độ 5.000 tế bào/lỗ của đĩa 96 lỗ có thể được nuôi cấy trong giai đoạn 72-giờ và cho tiếp xúc với 0,5μCi ^{3}H-thymidin trong 8 giờ cuối cùng của giai đoạn 72-giờ. Việc hợp nhất ^{3}H-thymidin vào trong tế bào nuôi cấy được đo trong sự có mặt và không có mặt ADC.

Để xác định độc tính tế bào, sự hoại tử hoặc diệt tế bào theo chương trình (sự gây chết tế bào theo chương trình) có thể được đánh giá. Sự hoại tử đặc trưng được thực hiện do tính thấm màng huyết tương tăng lên; sưng tế bào, và đứt vỡ màng huyết tương. Sự diệt tế bào theo chương trình thường có đặc trưng là sự phồng màng, cô đặc chất tế bào, và hoạt hóa endonucleaza nội sinh. Việc xác định các tác dụng bất kỳ nêu trên lên tế bào ung thư chỉ ra rằng ADC là hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư.

Tỷ lệ sống của tế bào có thể được đo, ví dụ, bằng cách xác định trong tế bào mức hấp thu chất nhuộm màu như đỏ trung tính, xanh trypan, Crystal Violet, hoặc xanh ALAMAR™ (xem, ví dụ, Page et al. (1993) Intl. J. Oncology 3:473-6). Trong thử nghiệm như vậy, tế bào được ủ trong môi trường chứa chất nhuộm màu, các tế bào được rửa, và chất nhuộm màu còn dư, phản ánh sự hấp thu vào tế bào của chất nhuộm màu, được đo bằng phổ quang kế. Theo một số phương án nhất định, hiệu lực *in vitro* của các ADC được điều chế được đánh giá bằng thử nghiệm Crystal Violet. Crystal Violet là chất nhuộm màu triarylmetan tích tụ trong nhân của các tế bào sống. Trong thử nghiệm này, các tế bào được cho tiếp xúc với ADC hoặc chất đối chứng trong một khoảng thời gian xác định, sau đó, các tế bào được nhuộm màu bởi thuốc nhuộm tím tinh thể, rửa bằng nhiều nước, sau đó được hòa tan bằng 1% SDS và đọc bằng phổ quang kế. Thuốc nhuộm sulforhodamin B (SRB) gắn kết protein cũng có thể được sử dụng để đánh giá độc tính tế bào (Skehan et al. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

Sự diệt tế bào theo chương trình có thể được định lượng, ví dụ, bằng cách đo mức phân mảnh ADN. Phương pháp quang trắc đã có trên thị trường để định lượng *in vitro* mức phân mảnh ADN là có sẵn. Ví dụ về các thử nghiệm như vậy, bao gồm TUNEL (thử nghiệm phát hiện sự hợp nhất của nucleotit được đánh dấu trong ADN đã phân mảnh) và thử

nghiệm dựa trên ELISA, được mô tả trong Biochemica (1999) No. 2, trang 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Sự diệt tế bào theo chương trình cũng có thể được xác định bằng cách đo sự thay đổi hình thái trong tế bào. Ví dụ, như với sự hoại tử, mất tính nguyên vẹn của màng huyết tương có thể được xác định bằng cách đo mức hấp thu của một số chất nhuộm màu nhất định (ví dụ, chất nhuộm màu huỳnh quang như, ví dụ, cam acridin hoặc ethidi bromua). Phương pháp để đo số tế bào chết theo chương trình đã được mô tả bởi Duke và Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds. (1992) trang 3.17.1-3.17.16). Các tế bào cũng được đánh dấu bởi chất nhuộm màu ADN (ví dụ, cam acridin, ethidi bromua, hoặc propidium iođua) và các tế bào quan sát thấy về sự cô đặc chất nhiễm sắc và sự bám vào rìa dọc theo màng bên trong nhân. Các thay đổi hình thái khác có thể được đo để xác định sự diệt tế bào theo chương trình bao gồm, ví dụ, sự cô đặc chất tế bào, sự phồng màng tăng, và sự co tế bào.

Các ADC được bộc lộ cũng có thể được đánh giá hoạt tính diệt đích âm tính kế bên. Hoạt tính diệt đích âm tính kế bên có thể được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm sử dụng hai dòng tế bào, một dòng dương tính với kháng nguyên đích và một dòng âm tính với kháng nguyên đích. Các dòng tế bào này tốt hơn là được đánh dấu để phân biệt chúng. Ví dụ, tế bào IGROV1 (FRA+) được đánh dấu bằng Nuclight™ Green (NLG) và HL-60 (FRA-) được đánh dấu bởi Nuclight™ Red (NLR) có thể được nuôi cấy đồng thời, được điều trị bởi ADC kháng-FRA sau đó theo dõi độc tính tế bào. Sự diệt các tế bào âm tính với kháng nguyên đích khi được trộn với tế bào dương tính với kháng nguyên đích là chỉ thị cho sự diệt đích âm tính kế bên, trong khi đó việc diệt các tế bào âm tính với kháng nguyên đích khi không có các tế bào dương tính với kháng nguyên đích là chỉ thị cho việc diệt sai đích.

Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp diệt, ức chế hoặc điều biến sự phát triển của, hoặc gây gián đoạn sự chuyển hóa của, tế bào ung thư hoặc mô ung thư bằng cách làm gián đoạn tubulin. Phương pháp này có thể được sử dụng đối với đối tượng bất kỳ mà sự gây gián đoạn tubulin mang lại lợi ích điều trị. Đối tượng có thể có được lợi ích từ việc làm gián đoạn tubulin bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng (ví dụ, bệnh ung thư thanh dịch buồng trứng), bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ), bệnh

ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể), bệnh ung thư nội mạc tử cung (ví dụ, caxinom thanh dịch nội mạc tử cung), sacôm xương, sacôm Kaposi, bệnh ung thư tế bào mầm tinh hoàn, bệnh bạch cầu, u lympho (ví dụ, bệnh Hodgkin, u lympho không phải Hodgkin), bệnh u tủy, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào đệm), bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư trực kết tràng, và/hoặc bệnh ung thư da (ví dụ, u melanin), hoặc các dạng di căn của chúng (Dumontet và Jordan (2010) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803). Theo các phương án khác nhau, các ADC được bộc lộ có thể được sử dụng trong tế bào hoặc mô bất kỳ biểu hiện FRA, như tế bào ung thư hoặc mô ung thư biểu hiện FRA. Phương án ví dụ bao gồm phương pháp ức chế tế bào truyền tín hiệu qua FRA hoặc phương pháp diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng với tế bào hoặc mô bất kỳ biểu hiện FRA, như tế bào ung thư hoặc tổn thương do di căn. Ví dụ không hạn chế về bệnh ung thư biểu hiện FRA bao gồm bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thanh dịch buồng trứng, bệnh ung thư buồng trứng tế bào sáng, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư trực kết tràng, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể, bệnh ung thư nội mạc tử cung, caxinom thanh dịch nội mạc tử cung, caxinoit phổi, và sacôm xương. Ví dụ không hạn chế về tế bào biểu hiện FRA bao gồm tế bào caxinom buồng trứng ở người IGROV1 và OVCAR3, tế bào caxinom phổi tế bào không nhỏ người NCI-H2110, và tế bào chứa axit nucleic tái tổ hợp mã hóa FRA hoặc một phần của nó.

Theo các phương án khác nhau khác, các ADC được bộc lộ có thể được sử dụng trong tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện her2, như tế bào ung thư hoặc mô ung thư biểu hiện her2. Một phương án ví dụ bao gồm phương pháp ức chế sự truyền tín hiệu tế bào do her2 hoặc phương pháp diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng với tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện her2, như tế bào ung thư hoặc tổn thương do di căn. Ví dụ không hạn chế về bệnh ung thư biểu hiện her2 bao gồm bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào đường niệu, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư nội mạc tử cung, và bệnh ung thư buồng trứng (English et al. (2013) Mol. Diagn. Ther. 17:85-99). Ví dụ không hạn chế về tế bào biểu hiện her2 bao gồm tế bào caxinom dạ dày của người NCI-N87-luc, tế bào caxinom ống tuyến vú của người ZR75 và BT-474, và các tế bào chứa axit nucleic tái tổ hợp mã hóa her2 hoặc một phần của nó.

Theo các phương án khác nhau khác, các ADC được bộc lộ có thể được sử dụng trong tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện mesothelin (MSLN), như tế bào ung thư hoặc mô ung thư biểu hiện MSLN. Phương án ví dụ bao gồm phương pháp ức chế truyền tín hiệu tế bào do MSLN hoặc phương pháp diệt tế bào. Phương pháp này có thể được sử dụng với tế bào hoặc mô bất kỳ mà biểu hiện MSLN, như tế bào ung thư hoặc tổn thương do di căn. Ví dụ không hạn chế của bệnh ung thư biểu hiện MSLN bao gồm bệnh u trung biểu mô, bệnh ung thư tụy (ví dụ, ung thư tuyến tụy), bệnh ung thư buồng trứng, và bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư tuyến phổi) (Wang et al. (2012) PLoS ONE 7:e33214). Ví dụ không hạn chế về tế bào biểu hiện MSLN bao gồm tế bào caxinom buồng trứng của người OVCAR3, tế bào nội mạc tử cung của người HEC-251, tế bào u trung biểu mô tế bào có vảy phổi của người H226, và tế bào chứa axit nucleic tái tổ hợp mã hóa MSLN hoặc một phần của nó.

Các phương pháp ví dụ bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với ADC, như mô tả trong đây, với lượng có hiệu quả, tức là, lượng đủ để diệt tế bào này. Phương pháp này có thể được sử dụng trên các tế bào trong môi trường nuôi cấy, ví dụ *in vitro, in vivo, ex vivo,* hoặc *in situ.* Ví dụ, các tế bào biểu hiện FRA, her2, và/hoặc MSLN (ví dụ, tế bào được thu thập bằng sinh thiết khối u hoặc tổn thương do di căn; tế bào từ dòng tế bào ung thư đã có sẵn; hoặc tế bào tái tổ hợp), có thể được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường nuôi cấy và bước tiếp xúc có thể được thực hiện bằng cách bổ sung ADC vào môi trường nuôi cấy. Phương pháp này sẽ gây diệt tế bào biểu hiện FRA, her2, và/hoặc MSLN, cụ thể bao gồm tế bào khối u biểu hiện FRA, her2, và/hoặc MSLN. Cách khác, ADC có thể được sử dụng cho đối tượng bởi đường dùng thích hợp bất kỳ (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc tiếp xúc trực tiếp với mô khối u) để có hiệu quả *in vivo*.

Hiệu quả *in vivo* của chế phẩm điều trị ADC được bộc lộ có thể được đánh giá trong mô hình động vật thích hợp. Ví dụ, có thể sử dụng mô hình ung thư khác loại, trong đó mảnh cấy ung thư hoặc mô ghép ngoại lai chuyển đoạn được đưa vào trong động vật tổn thương miễn dịch, như chuột thiếu hụt miễn dịch hoặc SCID (Klein et al. (1997) Nature Med. 3:402-8). Hiệu lực có thể được dự đoán bằng cách sử dụng các thử nghiệm đo sự ức chế việc hình thành khối u, làm giảm khối u hoặc làm giảm di căn, và tương tự.

Các thử nghiệm *in vivo* đánh giá sự thúc đẩy sự diệt tế bào theo chương trình cũng có thể được sử dụng. Theo một phương án, các mô ghép ngoại lai từ chuột mang khối u

được điều trị bởi chế phẩm điều trị có thể được kiểm tra sự có mặt của ổ bệnh chết theo chương trình và so sánh với chuột mang mô ghép ngoại lai đối chứng không được điều trị. Mức độ mà ổ bệnh chết theo chương trình được thấy trong các khối u của chuột được điều trị là chỉ số cho hiệu lực điều trị của chế phẩm.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư. ADC được bộc lộ trong đây có thể được sử dụng cho động vật có vú không phải là người hoặc đối tượng người với mục đích điều trị bệnh. Phương pháp điều trị đòi hỏi việc sử dụng cho động vật có vú có khối u một lượng có hiệu quả sinh học của ADC bao gồm chất hóa trị liệu được chọn (ví dụ, eribulin) liên kết với kháng thể đích mà gắn kết với kháng nguyên được biểu hiện, điều này cho phép gắn kết, hoặc được giới hạn vị trí trên bề mặt tế bào ung thư. Phương án ví dụ là phương pháp phân phối chất hóa trị liệu đến tế bào biểu hiện FRA, bao gồm việc liên hợp chất hóa trị liệu với kháng thể mà gắn kết miễn dịch đặc hiệu với epitop FRA và tiếp xúc tế bào với ADC. Tế bào khối u ví dụ mà biểu hiện FRA mà ADC theo sáng chế được chỉ định cho nó bao gồm các tế bào từ bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thanh dịch buồng trứng, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư trực kết tràng, ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể), caxinoit phổi, sacôm xương, bệnh ung thư nội mạc tử cung, và caxinom áo niêm mạc tử cung có mô học huyết thanh.

Phương án ví dụ khác là phương pháp phân phối chất hóa trị liệu cho tế bào biểu hiện her2, bao gồm liên hợp chất hóa trị liệu với kháng thể mà gắn kết miễn dịch đặc hiệu với epitop her2 và tiếp xúc tế bào với ADC. Tế bào khối u ví dụ mà biểu hiện her2 mà ADC theo sáng chế được chỉ định cho nó bao gồm các tế bào từ bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào đường niệu, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư nội mạc tử cung, và bệnh ung thư buồng trứng.

Phương án ví dụ khác là phương pháp phân phối chất hóa trị liệu cho tế bào biểu hiện MSLN, bao gồm liên hợp chất hóa trị liệu với kháng thể gắn kết miễn dịch đặc hiệu với epitop MSLN và tiếp xúc tế bào với ADC. Tế bào khối u ví dụ mà biểu hiện MSLN mà ADC theo sáng chế được chỉ định dùng cho nó bao gồm các tế bào từ bệnh u trung biểu mô, bệnh ung thư tụy (ví dụ, bệnh ung thư tuyến tụy), bệnh ung thư buồng trứng, và bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư tuyến phổi).

Phương án ví dụ khác là phương pháp điều trị bệnh nhân có hoặc có nguy cơ mắc bệnh ung thư mà biểu hiện kháng nguyên đích của gốc kháng thể của ADC, như FRA, her2, hoặc MSLN, bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân một lượng có hiệu quả điều trị của ADC theo sáng chế. Theo một số phương án, bệnh nhân là không đáp ứng hoặc đáp ứng kém với việc điều trị bằng kháng thể kháng-FRA khi sử dụng đơn độc, và/hoặc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Theo các phương án khác, bệnh nhân là không đáp ứng hoặc đáp ứng kém với việc điều trị bằng kháng thể kháng-her2 khi sử dụng đơn độc, và/hoặc việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Theo các phương án khác, bệnh nhân là không đáp ứng hoặc đáp ứng kém với việc điều trị bằng kháng thể kháng-MSLN khi sử dụng đơn độc, và/hoặc việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Theo các phương án khác, bệnh nhân là không dung nạp với việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Ví dụ, bệnh nhân có thể đòi hỏi các liều eribulin để điều trị bệnh ung thư dẫn đến độc tính toàn thân, điều này có thể khắc phục bằng cách phân phối tại đích của bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích của gốc kháng thể của ADC như FRA, her2, hoặc MSLN, bằng cách đó làm giảm sự diệt sai đích.

Phương án ví dụ khác là phương pháp làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u biểu hiện-kháng nguyên đích (ví dụ, khối u biểu hiện-FRA, khối u biểu hiện her2, hoặc khối u biểu hiện MSLN), bao gồm việc sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của ADC. Theo một số phương án, việc điều trị là đủ để làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u của bệnh nhân, làm giảm số lượng hoặc kích thước tổn thương do di căn, làm giảm lượng khối u, làm giảm lượng khối u nguyên phát, làm giảm sự xâm lấn, kéo dài thời gian sống, và/hoặc duy trì hoặc cải thiện chất lượng cuộc sống. Theo một số phương án, khối u là kháng hoặc chống lại việc điều trị bằng kháng thể kháng-FRA khi sử dụng đơn độc, và/hoặc việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Theo các phương án khác, khối u là kháng hoặc chống lại việc điều trị bằng kháng thể kháng-her2 khi sử dụng đơn độc, và/hoặc việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc. Theo một số phương án, khối u là kháng hoặc chống lại việc điều trị bằng kháng thể kháng-MSLN khi sử dụng đơn độc, và/hoặc việc điều trị bằng gốc dược chất (ví dụ, eribulin) khi sử dụng đơn độc.

Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật có vú không phải là người biểu hiện kháng nguyên mà với kháng nguyên này ADC có khả năng gắn kết

với mục đích chữa bệnh thú y hoặc ở dạng mô hình động vật mắc bệnh của người. Liên quan đến mô hình động vật mắc bệnh ở người, mô hình động vật như vậy có thể hữu dụng để đánh giá hiệu lực điều trị của các ADC được bộc lộ (ví dụ, thử nghiệm liều và khoảng thời gian sử dụng).

Sáng chế còn đề xuất trong đây sử dụng điều trị của các ADC được bộc lộ. Phương án ví dụ là sử dụng ADC để điều trị bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, bệnh ung thư biểu hiện FRA, bệnh ung thư biểu hiện her2, hoặc bệnh ung thư biểu hiện MSLN). ADC để sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, bệnh ung thư biểu hiện FRA, bệnh ung thư biểu hiện her2, hoặc bệnh ung thư biểu hiện MSLN) cũng được biểu hiện. Các phương pháp để xác định đối tượng có mắc bệnh ung thư biểu hiện FRA, her2, và/hoặc MSLN đã biết trong lĩnh vực này và có thể sử dụng để xác định bệnh nhân thích hợp để việc điều trị bởi ADC được bộc lộ.

Phương án ví dụ khác là sử dụng ADC trong phương pháp sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, bệnh ung thư biểu hiện FRA, bệnh ung thư biểu hiện her2, hoặc bệnh ung thư biểu hiện MSLN).

Chế phẩm điều trị sử dụng trong việc thực hành các phương pháp nêu trên có thể được bào chế thành dược phẩm chứa chất mang dược dụng thích hợp cho phương pháp phân phối mong muốn. Phương án ví dụ là dược phẩm chứa ADC theo sáng chế và chất mang dược dụng. Chất mang thích hợp bao gồm nguyên liệu bất kỳ mà, khi kết hợp với chế phẩm điều trị, giữ được chức năng chống-khối u của chế phẩm điều trị và thường không phản ứng với hệ miễn dịch của bệnh nhân. Chất mang dược dụng bao gồm tất cả và bất kỳ trong số dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất chống nấm và chống vi khuẩn, chất gây đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và các chất tương tự mà tương thích về mặt sinh lý. Ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều trong số nước, nước muối, nước muối đệm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol, muối mesylat, và chất tương tự, cũng như hỗn hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, có thể ưu tiên chứa chất gây đẳng trương, ví dụ, đường, rượu polyhydric như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm này. Chất mang dược dụng có thể chứa thêm lượng nhỏ của chất hỗ trợ như chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, chất bảo quản hoặc chất đệm, các chất này làm tăng thời gian sử dụng hoặc hiệu lực của ADC.

Các chế phẩm điều trị có thể được hòa tan và sử dụng thông qua đường bất kỳ có khả năng phân phối chế phẩm điều trị đến vị trí khối u. Đường dùng có hiệu quả tiềm năng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trong tĩnh mạch, ngoài đường tiêu hóa, trong màng bụng, trong cơ, trong khối u, trong da, trong cơ quan, đúng vị trí, và tương tự. Chế phẩm protein điều trị có thể được làm đông khô và bảo quản ở dạng bột vô khuẩn, tốt hơn là trong chân không, và sau đó được hoàn nguyên trong nước kìm vi khuẩn (ví dụ chứa, chất bảo quản rượu benzylic) hoặc trong nước vô khuẩn trước khi tiêm. Chế phẩm điều trị có thể bao gồm ADC hoặc muối dược dụng của nó, ví dụ, muối mesylat.

ADC được bộc lộ trong đây có thể được sử dụng ở liều nằm trong khoảng từ 0,2mg/kg đến khoảng 10mg/kg cho bệnh nhân cần sử dụng nó. Theo một số phương án, ADC được sử dụng cho bệnh nhân hàng ngày, hai tháng một lần, hoặc khoảng thời gian bất kỳ giữa hai mốc thời gian này. Liều và quy trình sử dụng để điều trị bệnh ung thư bằng phương pháp nêu trên sẽ thay đổi theo phương pháp và bệnh ung thư đích, và thường sẽ phụ thuộc vào một số yếu tố khác đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Nhiều hệ phân phối khác nhau đã biết và có thể dùng để sử dụng một hoặc nhiều ADC theo sáng chế. Các phương pháp sử dụng ADC bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), đường dùng trên màng cứng, đường dùng trong khối u, và đường dùng tại niêm mạc (ví dụ, đường trong mũi và miệng). Ngoài ra, có thể sử dụng đường dùng tại phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng ống hít hoặc máy khí dung, và chế phẩm có chất sol khí hóa. Xem, ví dụ, chế phẩm và phương pháp để sử dụng tại phổi được mô tả trong Patent Mỹ số 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, và 4,880,078; và Đơn PCT số WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, và WO 99/66903. ADC có thể được sử dụng bởi đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm liều lớn, hoặc bằng cách hấp thu qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.). Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ.

Các chế phẩm điều trị được bộc lộ trong đây có thể vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Theo một số phương án, một hoặc nhiều ADC, hoặc dược phẩm, được cung cấp ở dạng bột vô khuẩn đông khô hoặc dạng cô không chứa nước trong vật chứa được đóng kín và có thể được hoàn nguyên (ví dụ, bằng nước hoặc nước muối)

đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Tốt hơn là, một hoặc nhiều tác nhân điều trị hoặc dược phẩm phòng hoặc điều trị bệnh được cung cấp ở dạng bột vô khuẩn đông khô trong vật chứa được đóng kín ở liều đơn vị ít nhất 5 mg, ít nhất 10 mg, ít nhất 15 mg, ít nhất 25 mg, ít nhất 35 mg, ít nhất 45 mg, ít nhất 50 mg, ít nhất 75 mg, hoặc ít nhất 100 mg, hoặc lượng bất kỳ trong khoảng đó. Theo một số phương án, ADC hoặc dược phẩm đông khô được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2˚C đến 8˚C trong vật chứa ban đầu. Theo một số phương án, một hoặc nhiều ADC hoặc dược phẩm mô tả trong đây được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa được đóng kín, ví dụ, vật chứa nêu rõ lượng và nồng độ của chất này. Theo một số phương án, dạng lỏng của chế phẩm được sử dụng được cung cấp trong vật chứa được đóng kín chứa ít nhất 0,25mg/mL, ít nhất 0,5mg/mL, ít nhất 1mg/mL, ít nhất 2,5mg/mL, ít nhất 5mg/mL, ít nhất 8mg/mL, ít nhất 10mg/mL, ít nhất 15mg/mL, ít nhất 25mg/mL, ít nhất 50mg/mL, ít nhất 75mg/mL, hoặc ít nhất 100mg/mL ADC. Dạng lỏng có thể được bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2˚C đến 8˚C trong vật chứa ban đầu.

Theo một số phương án, các ADC được bộc lộ có thể được hợp nhất thành dược phẩm thích hợp cho đường dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch tiêm được có thể gồm có dạng liều lỏng hoặc đông khô trong ống đá silic hoặc ống thủy tinh màu hổ phách, ống tiêm, hoặc bơm tiêm nạp sẵn thuốc, hoặc các thiết bị phân phối hoặc bảo quản thuốc đã biết khác.

Các chế phẩm mô tả trong đây có thể ở rất nhiều dạng. Chúng bao gồm, ví dụ, dạng liều lỏng, bán rắn, và rắn, như dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm được và truyền được), hệ phân tán hoặc hỗn dịch, viên nén, viên tròn, thuốc bột, liposom, và thuốc đạn. Dạng được ưu tiên phụ thuộc vào kiểu dùng và ứng dụng điều trị dự tính.

Theo các phương án khác nhau, việc điều trị bao gồm sử dụng lặp lại hoặc liều lớn một lần chế phẩm ADC thông qua một đường dùng được chấp nhận.

Bệnh nhân có thể được đánh giá về mức kháng nguyên đích trong mẫu đưa ra (ví dụ, mức tế bào biểu hiện kháng nguyên đích) để hỗ trợ trong việc xác định phác đồ liều hiệu quả nhất, v.v.. Phương án ví dụ là phương pháp xác định liệu một bệnh nhân sẽ đáp ứng với việc điều trị bằng ADC theo sáng chế hay không, bao gồm cung cấp một mẫu sinh học từ bệnh nhân và cho tiếp xúc mẫu sinh học này với ADC. Mẫu sinh học ví dụ bao gồm mô hoặc dịch cơ thể, như dịch viêm, máu, huyết thanh, dịch ruột, mẫu phân, hoặc mẫu sinh

thiết khối u (ví dụ, mẫu sinh thiết khối u có nguồn gốc từ bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh ung thư biểu hiện kháng nguyên đích, ví dụ, bệnh ung thư biểu hiện FRA, bệnh ung thư biểu hiện her2, hoặc bệnh ung thư biểu hiện MSLN). Theo một số phương án, có thể thu được mẫu (ví dụ, mô và/hoặc dịch cơ thể) từ đối tượng, và phương pháp miễn dịch thích hợp có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo mức biểu hiện protein của kháng nguyên đích (ví dụ, FRA, her2, hoặc MSLN). Các đánh giá như vậy cũng được sử dụng với mục đích theo dõi trong quá trình điều trị, và hữu dụng để đánh giá sự thành công của điều trị kết hợp với việc đánh giá các thông số khác.

Theo một số phương án, hiệu lực của ADC có thể được đánh giá bằng cách cho mẫu khối u từ đối tượng tiếp xúc với ADC và đánh giá tốc độ hoặc thể tích phát triển khối u. Theo một số phương án, khi ADC đã được xác định là có hiệu quả, nó có thể được sử dụng cho đối tượng.

Phương pháp điều trị trên có thể được kết hợp với phác đồ bất kỳ trong số một loạt phác đồ phẫu thuật, hóa trị liệu, hoặc liệu pháp xạ trị khác.

Sáng chế cũng bộc lộ trong đây việc sử dụng một hoặc nhiều ADC được bộc lộ trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư, ví dụ, theo phương pháp được mô tả trên. Theo một số phương án, các ADC được bộc lộ trong đây được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, ví dụ, theo phương pháp mô tả trên.

Theo các phương án khác nhau, kit để sử dụng trong các ứng dụng phòng thí nghiệm và ứng dụng điều trị mô tả trong đây là nằm trong phạm vi sáng chế. Các kit như vậy có thể bao gồm chất mang, vật bao gói, hoặc vật chứa được chia thành từng phần để chứa một hoặc nhiều vật chứa như ống thủy tinh, ống, và tương tự, mỗi vật chứa bao gồm một thành phần riêng biệt được sử dụng trong phương pháp được bộc lộ trong đây, cùng với nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm hướng dẫn sử dụng, như việc sử dụng mô tả trong đây. Kit có thể bao gồm vật chứa bao gồm gốc dược chất. Sáng chế cũng bộc lộ một hoặc nhiều ADC, hoặc dược phẩm chứa nó, được bao gói trong vật chứa được đóng kín, như ống thuốc tiêm hoặc dạng gói, nêu rõ lượng của chất.

Kit có thể bao gồm vật chứa mô tả trên và một hoặc nhiều vật chứa khác kết hợp trong đó bao gồm các nguyên liệu mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm chất đệm, chất pha loãng, giấy lọc, kim tiêm, bơm tiêm; chất mang, vật bao

gói, vật chứa, nhãn trên ống thủy tinh và/hoặc ống nêu rõ các thành phần và/hoặc hướng dẫn sử dụng, và tờ hướng dẫn sử dụng với hướng dẫn để sử dụng.

Nhãn có thể ở trên hoặc cùng với vật chứa để chỉ ra chế phẩm được sử dụng cho ứng dụng điều trị cụ thể hoặc không phải chữa bệnh, như tiên lượng, phòng bệnh, chẩn đoán, hoặc sử dụng cho phòng thí nghiệm. Nhãn cũng có thể nêu chỉ dẫn để sử dụng *in vivo* hoặc *in vitro*, như được mô tả trong đây. Các chỉ dẫn và hoặc thông tin khác cũng có thể được đưa vào (các) tờ hướng dẫn sử dụng hoặc (các) nhãn, được đưa vào cùng hoặc trên kit. Nhãn có thể ở trên hoặc đi kèm cùng vật chứa. Nhãn có thể ở trên vật chứa khi chữ số, số, hoặc các ký tự khác tạo ra nhãn là đúc hoặc được khắc vào chính vật chứa. Nhãn có thể đi kèm với vật chứa khi nó được thể hiện trong đồ chứa hoặc chất mang cũng có thể giữ vật chứa, ví dụ, ở dạng tờ hướng dẫn sử dụng. Nhãn có thể nêu rõ chế phẩm được sử dụng để chẩn đoán hoặc điều trị tình trạng bệnh, như bệnh ung thư mô tả trong đây.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ là các phương án biến đổi và điều chỉnh thích hợp khác của các phương pháp theo sáng chế mô tả trong đây là hiển nhiên và có thể thực hiện bằng các phương án tương đương thích hợp mà không vượt quá phạm vi của sáng chế hoặc các phương án được bộc lộ trong đây. Với mô tả chi tiết sáng chế, sáng chế sẽ được hiểu rõ ràng hơn nhờ các ví dụ sau, được đưa vào chỉ với mục đích minh họa và không nhằm hạn chế sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

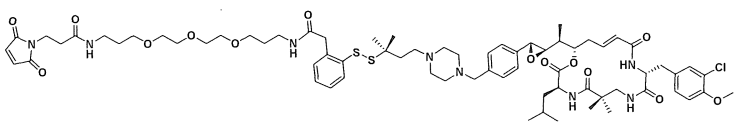
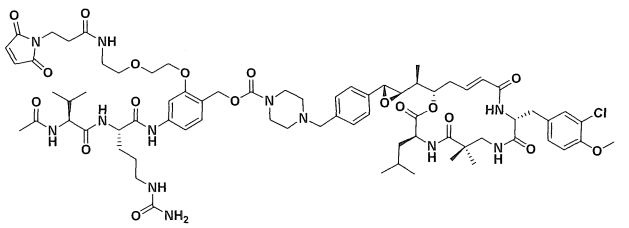
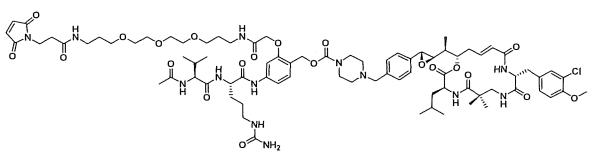
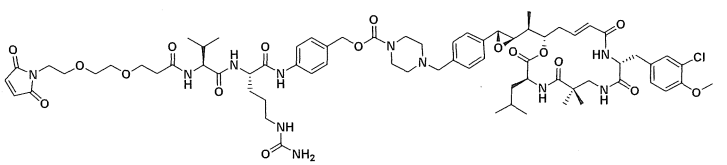
1. Nguyên liệu và phương pháp

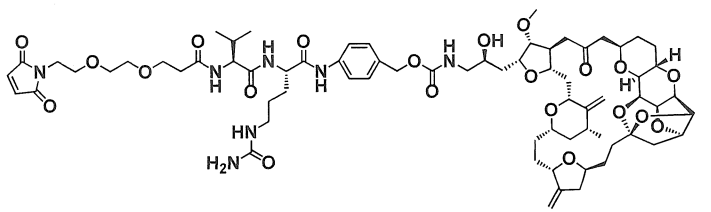
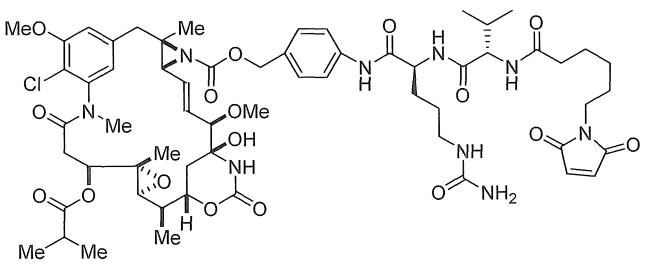
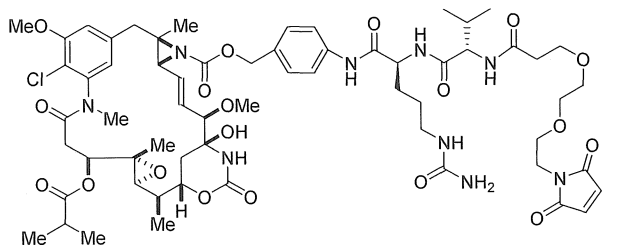
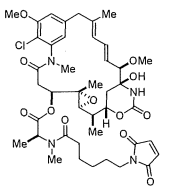
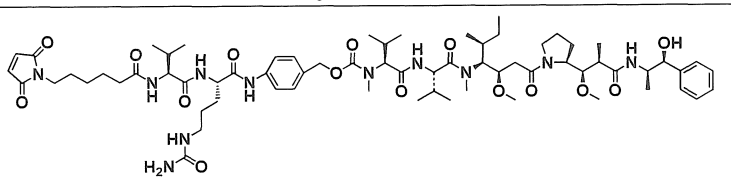
MORAb-003 sử dụng để điều chế ADC là từ Lot #AA0312.

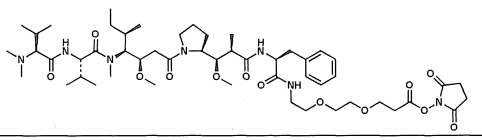
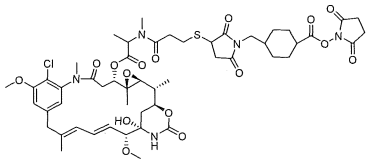
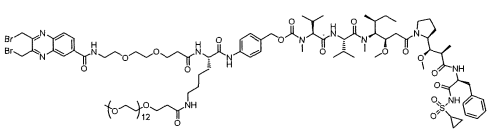
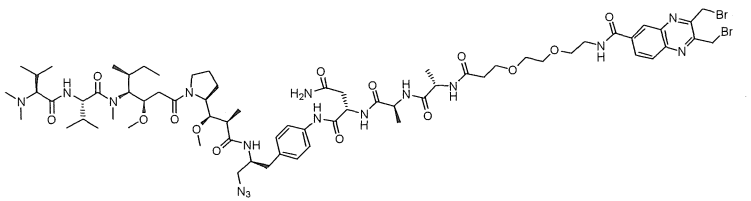
1.1. Độc tố tế bào

Cấu trúc của các độc tố tế bào có thể liên hợp được trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11. Độc tố tế bào có thể liên hợp

Tên hợp chất	Nhóm liên kết	Độc tố tế bào	Khả năng tách được	Cấu trúc
PEG3-Bz-disulfidyl-dimetyl-cryptophyxin	maleimido-PEG3-benzyl-disulfidyl-dimetyl	cryptophyxin	có	
LL2-cryptophyxin	LL2	cryptophyxin	có	
LL3-cryptophyxin	LL3	cryptophyxin	có	
VCP-cryptophyxin	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	cryptophyxin	có	

VCP-eribulin (ER-001159569)	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	eribulin	có	
ER-001161318	maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maytanzin-P3)	có	
ER-001161319	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maytanzin-P3)	có	
ER-001159200	maleimido-$(CH_2)_5$	maytanzin DM1	Không	
M-MMAE	maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	monometyl auristatin E	có	

NHS-PEG2-AuF	NHS-PEG2	auristatin F	không	
M-DM1	SMCC	maytansin DM1	không	
M-0285	PEG-pAB	duostatin 3	có	Hóa học tạo cầu disulfua khử 
M-0115	Asn-Ala	duostatin-5	có	
M-172	xyclohexyl	duostatin 3	không	Hóa học liên kết disulfua khử
M-174	xyclohexyl	duostatin 3	không	Hóa học liên kết disulfua khử
M-158	PEG-pAB	duostatin 10	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0384	PEG-thioete	duostatin 14	không	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0302	PEG-Asn	duostatin 14	không	Hóa học liên kết disulfua khử

M-292	PEG-Asn	duostatin 14	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0026	PEG	duostatin 14	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0267	PEG-thioete	duomycin 7	không	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0272	Asn-Ala	duomycin 7	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0260	PEG-pAB	duomycin 7	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-0276	Asn-Ala	duomycin 7	có	Hóa học liên kết disulfua khử
M-015-0913	xyclohexyl	duostatin 3	không	Sử dụng lysin hạn chế
M-030-0132	PEG-pAB	duostatin 6	có	Sử dụng lysin hạn chế
M-0161	xyclohexyl	duostatin 10	không	Sử dụng lysin hạn chế
M-0157	PEG-pAB	duostatin 10	có	Sử dụng lysin hạn chế
M-027-0381	thioete	duostatin 14	không	Sử dụng lysin hạn chế
M-0025	PEG	duostatin 14	không	Sử dụng lysin hạn chế
M-0301	PEG-Asn	duostatin 14	không	Sử dụng lysin hạn chế
M-030-0011	PEG-pAB	duostatin 14	có	Sử dụng lysin hạn chế
M-030-0291	PEG-Asn	duostatin 14	có	Sử dụng lysin hạn chế
M-0114	PEG-pAB	duostatin-5	có	Hóa học tạo cầu disulfua khử

Ký hiệu viết tắt: Ala, alanin; Asn, asparagin; Cit, citrullin; NHS, N-hydroxysucxinimit; pAB, p-aminobenzyloxycarbonyl; PEG, polyetylen glycol; SMCC, sucxinimidyl 4-(N-maleimidometyl)xyclohexan-1-carboxylat; Val, valin; VCP, Val-Cit-pAB.

51551

1.2. Sự liên hợp kháng thể-dược chất

1.2.1. Khử một phần bằng TCEP

Các điều kiện khử một phần của MORAb-003 được thiết lập bằng cách thay đổi nồng độ của tác nhân khử không phải-thiol tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP), nồng độ kháng thể, và thời gian khử. MORAb-003 được trao đổi đệm vào trong nước muối đệm phosphat của Dulbecco (DPBS -Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline) chứa axit etylendiamintetraaxetic 1mM (EDTA), sau đó cô đến 10mg/mL bằng phương pháp cô ly tâm với bộ lọc ly tâm ngưỡng trọng lượng phân tử 10kD (MWCO- molecular weight cut-off). Các kháng thể được pha loãng đến nồng độ thích hợp và TCEP được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng được chỉ định, và trộn nhẹ nhàng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. TCEP được loại bỏ bằng cách khử muối bằng 5 hoặc 10mL cột khử muối kiểu quay Zeba™ với DPBS/1mM EDTA là chất đệm (Thermo Fisher, 40 kD MWCO), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu được phân tích về hàm lượng thiol tự do bằng kit định lượng huỳnh quang Thiol (Abcam), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phân tích SDS-PAGE trong các điều kiện không khử được tiến hành để xác định mức độ và vị trí đứt gãy liên kết disulfua, như mô tả trong mục 1.3.3. Trong một số trường hợp, các MAb đã khử muối được đưa đến nồng độ 1-2mg/mL bằng cách pha loãng trong DPBS và được đưa vào phản ứng biotin hóa để xác định độ liên hợp và tỷ lệ dược chất-với-kháng thể (DAR). 10mM maleimido-PEG2-biotin (Thermo Fisher) trong dimetylsulfoxit (DMSO) được bổ sung vào kháng thể (mAb) ở tỷ lệ mol là 10:1 và ủ ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ đồng thời khuấy nhẹ. Sau khi liên hợp, hợp chất không phản ứng được loại bỏ bằng cách khử muối bằng cột khử muối kiểu quay Zeba™ (Thermo Fisher). Các mẫu sau đó được phân tích bằng LC-MS để xác định DAR, như nêu chi tiết trong mục 1.3.4.

1.2.2. Liên hợp độc tố tế bào

Kháng thể đã được khử một phần được đưa đến nồng độ 2,5mg/mL trong 0,5X DPBS, EDTA 0,5mM, và trộn kỹ. Các đồng dung môi hữu cơ, nếu được sử dụng, sau đó được bổ sung và trộn kỹ. Các đồng dung môi cần kiểm tra là propylen glycol (nồng độ cuối 20% và 50%), dimetylsulfoxit (DMSO) (10%), *N,N*-dimetylformamit (20%), *N,N*-dimetylaxetamit (20%), và *N,N*-dimetylpropionamit (20%). Độc tố tế bào được biến đổi bởi maleimido (dung dịch lưu trữ 6mM trong DMSO) được bổ sung vào các kháng thể ở tỷ lệ mol là 1:6 (mAb:hợp chất) và trộn kỹ. Sự liên hợp xảy ra ở nhiệt độ phòng trong 3,5

giờ, bằng cách trộn nhẹ. Propylen glycol 50% ở 50% được chọn làm chất điều biến hữu cơ cuối cùng và được sử dụng trong tất cả các phản ứng liên hợp tiếp theo.

1.2.3. Tinh chế

Kháng thể đã liên hợp được tinh chế bằng cách sử dụng cột khử muối 26/10 HiTrap® (s) (GE Healthcare) với phép sắc ký thực hiện trên sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC) (GE Healthcare), để loại maleimido-độc tố tế bào chưa phản ứng và propylen glycol. ADC MORAb-003, bao gồm MORAb-003-mal-VCP-eribulin (MORAb-202), được tạo ra trong DPBS (đệm điều chế được sử dụng làm đệm chạy trong phép sắc ký FPLC).

1.3. Xác định đặc điểm sinh lý

1.3.1. Thử nghiệm BCA

Thuốc thử axit bicinchoninic (BCA) điều chế được (200µL) được bổ sung vào 25µL ADC pha loãng dần hoặc chất chuẩn gamma globin bò (Thermo Fisher) 2mg/mL, và các mẫu được trộn kỹ. Các mẫu được ủ ở 37°C trong 20 phút. Các đĩa được đọc ở 595nm trên máy đọc đĩa SpectraMax® M5 (Molecular Devices). Số liệu được phân tích bằng SoftMax® Pro (ver 3.2) với mô hình hiệu chỉnh 4-thông số.

1.3.2. Phân tích SEC-HPLC

Kháng thể kết tụ được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, loại trừ kích thước (SEC-HPLC) sử dụng Agilent 1100. mAb được pha loãng đến 1mg/mL trong DPBS. Kháng thể (20µL) được bơm lên trên cột bảo vệ TSKgel® SuperSW (4,6mm x 3,5cm, cỡ lỗ 4µm, Tosoh Bioscience), sau đó là cột TSKgel® SuperSW3000 (4,6mm x 30cm, cỡ lỗ 4µm), rửa giải từ cột bằng natri phosphat 0,1M chứa NaCl 0,15M và NaN_3 0,05%, ở độ pH =7,4, ở tốc độ dòng là 0,3mL/phút trong 20 phút. Tất cả số liệu được phân tích bằng phần mềm Agilent ChemStation. Phần trăm kết tụ được tính toán là $[PA_{kết\ tụ}/PA_{tổng\ cộng}]*100$, trong đó PA = diện tích đỉnh hợp nhất.

1.3.3. Phân tích SDS-PAGE

Các mẫu protein (0,1-10µg) được đưa đến nồng độ 1X bằng chất đệm mẫu lithi dodexylsulfat (LDS). Đối với các mẫu không được khử, việc ủ được tiến hành ở nhiệt độ

phòng trong 10 phút trước khi điện di. Đối với các mẫu khử, dithiothreitol (DTT) được bổ sung vào ở nồng độ cuối là 20mM và các mẫu được gia nhiệt đến 95°C trong 10 phút và đặt trên đá trước khi điện di. Các mẫu được nạp lên gel 10-, 12-, hoặc 15-lỗ Bis-Tris SDS-PAGE (Thermo Fisher) với 1X MOPS hoặc 1X MES là chất đệm chạy. Việc điện di được được tiến hành ở 185 V (điện áp ổn định) trong 1 giờ. Gel được nhuộm màu với dung dịch nhuộm màu InstantBlue (Expedeon) và rửa màu trong nước. Việc ghi chép được tiến hành trên hệ thống thông tin UltraLum gel sử dụng phễu lọc cam 600nm.

1.3.4. Phân tích UPLC/ESI-MS tỷ lệ dược chất với kháng thể (DAR)

ADC được khử glycosyl hóa bằng PNGaza F (New England BioLabs). Đệm G7 (10µL) và PNGaza F (2µL) được bổ sung vào mAb (90µL, 1mg/mL trong DPBS). Phản ứng được ủ trong lò vi sóng Discover (CEM) trong 2 chu kỳ: (1) năng lượng vi sóng 10W, 37°C, 10 phút, sau đó nghỉ 5 phút; (2) năng lượng vi sóng 2W, 37°C, 10 phút. Một phần của mẫu được khử bằng cách bổ sung DTT vào nồng độ cuối là 20mM, sau đó ủ ở 60°C trong 3 phút. Các mẫu sau đó được phân tích bằng cách sử dụng sắc ký lỏng siêu hiệu năng Waters Acquity (UPLC- Ultra Performance Liquid Chromatography) và phổ kế khối lượng thời gian bay tứ cực Premier (Q-Tof- quadrupole time of flight). Các mẫu (mỗi mẫu 0,5-2µg) được bơm lên trên cột khử muối MassPrep™ micro ở 65°C, rửa giải từ cột bằng cách cân bằng 5 phút trong 95% pha động A, 10 phút građient (5-90% B), và cân bằng lại 10 phút trong 95% pha động A, ở tốc độ 0,05mL/phút. Pha động A là axit formic 0,1% trong nước. Pha động B là axit formic 0,1% trong axetonitril. Phổ kế khối lượng Q-Tof được chạy trong kiểu-V, ion dương, và phát hiện trong khoảng 500-4000 m/z. Các thông số nguồn điện như sau: điện áp mao dẫn, 2,25 kV (kháng thể nguyên vẹn)-2,50 kV (kháng thể đã khử); điện áp phễu lấy mẫu, 65,0 V (kháng thể nguyên vẹn) hoặc 50,0 V (kháng thể đã khử); nhiệt độ nguồn, 100°C; nhiệt độ khử solvat hóa, 250°C; dòng khí khử solvat hóa, 550L/giờ. Đỉnh protein được được tháo cuộn bằng hàm MassLynx® MaxEnt 1. Mật độ tỷ đối của khối lượng mỗi chuỗi nặng và nhẹ không được liên hợp, liên hợp đơn, và liên hợp nhiều lần được kết hợp để tính toán DAR tổng thể bằng công thức:

$$2[[I_{LC+1} + 2(I_{LC+2}) + 3(I_{LC+3}) + \ldots n(I_{LC+n})]/\Sigma I_{LC}tot] + 2[[I_{HC+1} + 2(I_{HC+2}) + 3(I_{HC+3}) + \ldots n(I_{HC+n})]/\Sigma I_{HC}tot]$$

trong đó I_{LC+1} là mật độ khối lượng của chuỗi nhẹ được liên hợp với một độc tố tế bào, I_{LC+2} là mật độ khối lượng của chuỗi nhẹ được liên hợp với hai độc tố tế bào, v.v. I_{HC} là các mật độ từ các chuỗi nặng được liên hợp tương ứng, và ΣI_{LC}tot và ΣI_{HC}tot là lần lượt mật độ kết hợp của tất cả các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng không được liên hợp và được liên hợp.

1.3.5. Phân tích HIC-HPLC DAR

Ngoài phân tích DAR bằng phân tích UPLC/ (ESI)-MS (electrospray ionization - ion hóa tia điện), DAR của MORAb-003-vcp-eribulin và DAR của MORAb-003-0285 cũng được phân tích bằng HPLC tương tác kỵ nước (HIC-HPLC). Các mẫu được bơm lên trên TSKgel® Ether-5 PW, 7,5mm ID x 7,5cm, cỡ lỗ 10µM, và rửa giải từ cột bằng cách cân bằng 3 phút trong 100% pha động A, gradient 15 phút (0-100% B), giữ 5 phút trong 100% B, thay đổi 1 phút thành 100% A, và cân bằng lại 5 phút trong 100% pha động A, ở nồng độ 0,7 mL/phút. Pha động A là natri phosphat 25mM, amoni sulfat 1,5M, độ pH= 7,0. Pha động B là natri phosphat 25mM, isopropanol 25%, độ pH =7,0. Việc phát hiện được thực hiện ở bước sóng 280nm (đối chứng ở bổ sung sóng 320nm). DAR được xác định bởi công thức:

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

trong đó AUC_{+1} là diện tích dưới đường cong của đỉnh mAb tương ứng với ADC được liên hợp với một độc tố tế bào, AUC_{+2} là diện tích dưới đường cong của đỉnh mAb tương ứng với ADC được liên hợp với hai độc tố tế bào, v.v. ΣAUC_{tot} là diện tích dưới đường cong kết hợp của tất cả các đỉnh.

1.4. Phân tích độc tính tế bào

1.4.1. Thử nghiệm Crystal Violet (tím tinh thể)

Tế bào IGROV1 (FR^{hi}) và SJSA-1 (FR^{neg}) được nuôi cấy dưới dòng và cấy ở mật độ 10.000 tế bào/lỗ trong trong môi trường phát triển hoàn toàn trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ, ủ ở 37°C, 5% CO_2 qua đêm (16 giờ). Đặc trưng, các chất phản ứng thử nghiệm được pha loãng dần tỷ lệ 1:4 trong đĩa pha loãng có lỗ sâu thể tích 2mL, bắt đầu từ 1µM (tổng cộng 10 nồng độ pha loãng). 100µL các mẫu đã pha loãng được bổ sung vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử nghiệm là 500nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO_2

thêm trong 48 giờ. Môi trường được bỏ đi, các đĩa được rửa một lần bằng 200µL DPBS, nhuộm màu với 50µL dung dịch Crystal Violet 0,2% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và sau đó được rửa hoàn toàn bằng nước vòi. Các đĩa được để khô trong không khí, và Crystal Violet được hòa tan với 200µL dung dịch 1% SDS. Các đĩa được đọc ở 570nm. Số liệu được phân tích bằng thuật toán GraphPad Prism 6. Các thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng mật độ cấy 1.000 tế bào trên mỗi lỗ và sự tiếp xúc với hợp chất tổng cộng là 5 ngày. Khi mong muốn sự tiếp xúc với thời gian ngắn hơn, môi trường chứa chất gây độc tế bào được loại bỏ sau 4 giờ và thay thế bằng môi trường tăng trưởng sạch trước khi ủ 5 ngày. Đối với OVCAR3, CaOV3, và NCI-H2110, các tế bào được cấy ở mật độ 3.000 tế bào/lỗ và ủ trong 5 ngày với ADC. Với các thử nghiệm cạnh tranh, ADC chuẩn độ được ủ trước với MORAb-003 không liên hợp 2µM (cuối) trước khi ủ với tế bào.

1.4.2. Thử nghiệm diệt đích âm tính kế bên

Ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu, tế bào Nuclight™ Green (NLG) IGROV1 được cấy ở mật độ 5.000 tế bào/lỗ vào trong đĩa đáy tròn 96-lỗ, sau đó ly tâm ở tốc độ 1.000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng để đảm bảo tạo ra viên tế bào. Đĩa này được đặt trong bình Incucyte Zoom® (EssenBio science) và ủ ở 37°C/5% CO_2 qua đêm. Chương trình này được thiết lập để thu được ảnh về sự phát triển của tế bào, và để xác định số lượng tổng cộng của các tế bào được nhuộm xanh lá nhân và nhuộm đỏ nhân cũng như mật độ pha của tế bào trong mỗi hai giờ. Ngày làm thử nghiệm, ADC MORAb-003 hoặc dược chất tự do được pha loãng trong môi trường RPMI hoàn toàn và pha loãng dần, bắt đầu ở 400nM. 50µL dung dịch độc tố tế bào được bổ sung vào tế bào NLG-IGROV1 và ủ trong 30 phút. Trong giai đoạn ủ, tế bào Nuclight™ Red (NLR) HL-60 (FR^{neg}) được pha loãng đến $2x10^5$, $1x10^5$ hoặc $5x10^4$ tế bào/mL bằng môi trường sạch. 50µL hỗn dịch tế bào NLR-HL60 hoặc môi trường đơn độc được bổ sung vào các lỗ NLG-IGROV1, sau đó ly tâm ở tốc độ 1.000 vòng/phút trong 3 phút ở nhiệt độ phòng để đảm bảo tạo lại viên tế bào. Đĩa được đặt lại trong bình Incucyte Zoom (EssenBio science) và ủ ở 37°C/5% CO_2 trong đến 5 ngày. Sự phát triển tế bào tương đối của NLG-IGROV1 được xác định bằng cách so sánh với các mẫu không có ADC hoặc được bổ sung dược chất đơn độc bằng cách đếm tế bào màu xanh lá. Sự phát triển tế bào tương đối của HL60 được thực hiện tương tự, ngoại trừ xác định đếm tế bào màu đỏ. Việc xác định giá trị IC_{50} của cả NLG-IGROV1 và NLR-HL-60 được sử dụng bằng Prism (GraphPad).

1.4.3. Thử nghiệm độ ổn định trong huyết thanh

20µL ADC MORAb-003 được trộn kỹ với 80µL DPBS, huyết thanh người được phân nhóm bình thường (Bioreclamation, Lot BRH552911), hoặc huyết thanh chuột được phân nhóm bình thường (Bioreclamation, Lot MSE152591), và ủ ở 37°C trong 0, 4, 24, và 48 giờ. Sau khi ủ, các mẫu được làm lạnh và bảo quản ở -20°C cho đến khi đánh giá trong thử nghiệm gắn và thử nghiệm độc tính tế bào. Để phân tích độc tính tế bào, các mẫu được đánh giá trên tế bào IGROV1 và SJSA-1, như nêu chi tiết trong mục 1.4.1. Để đánh giá sự gắn kết, các mẫu được đánh giá bằng thử nghiệm MSD ECL dựa trên dung dịch. Các mẫu được ủ với thụ thể folat alpha biotin hóa và kháng-MORAb-003 đuôi-sulfo trước khi bắt giữ trên đĩa streptavidin và phát hiện bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang với máy chụp ảnh MSD Sector Imager 2400.

2. Kết quả

2.1. Điều chế ADC MORAb-003

Để lựa chọn cách kết hợp tối ưu nhất của nhóm liên kết và độc tố tế bào để liên hợp với MORAb-003, ADC được điều chế bằng ba phương pháp. Theo chiến thuật liên hợp nêu trong Fig.1, các cystein chưa cặp đôi được tạo ra thông qua cách khử một phần bằng các đương lượng mol hạn chế của tác nhân khử không phải-thiol TCEP. Chiến lược này ưu tiên khử liên kết disulfua giữa các chuỗi mà liên kết này liên kết chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (một cặp trên mỗi cặp đôi H-L) và hai chuỗi nặng trong vùng bản lề (hai cặp trên mỗi cặp đôi H-H trong trường hợp IgG1 người), trong khi vẫn để lại liên kết disulfua trong chuỗi nguyên vẹn.

Chiến lược liên hợp thứ hai để bào chế ADC MORAb-003 sử dụng phương pháp hóa học tạo cầu disulfua khử. Hóa học tạo cầu disulfua khử sẽ tạo cầu lại các thiol tự do của các gốc cystein đã gắn kết trong quy trình khử một phần, bắt chước vai trò của liên kết disulfua và do đó giữ được sự ổn định và chức năng của ADC.

Chiến lược liên hợp thứ ba để điều chế ADC MORAb-003 sử dụng lysin hạn chế. Phương pháp sử dụng lysin hạn chế tạo ra sự liên hợp của một số lượng rất hạn chế các lysin được tiếp xúc với khoảng 70+ dung môi có sẵn trên phân tử IgG người đặc trưng, và có thể có khả năng thu được hỗn hợp của sản phẩm ADC có độ đồng nhất thấp hơn so với các chiến lược liên quan đến cystein biến đổi.

2.1.1 Điều chế VCP-eribulin cho ADC MORAb-003

Eribulin (**1**) (10mg, 14µmol) (Fig.2) được hòa tan trong *N,N*-dimetylformamit (DMF) (1mL), và trộn kỹ. *N,N*-diisopropyletylamin (Hunig's Base hoặc *i*Pr$_2$NEt) (3,6µL, 21µmol) và Fmoc-Val-Cit-*para*-aminobenzyl-*para*-nitrophenol (Fmoc-VCP-PNP) (**2**) (16mg, 21µmol, Concortis Biosystems, cat# VC1003) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4-16 giờ, theo dõi bằng kit thử nghiệm ninhydrin (Anaspec, cat# 25241) cho đến khi phản ứng hoàn thành. Dietylamin (Et$_2$NH) (0,014mL, 0,14mmol) sau đó được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, khuấy trong 2 giờ ở 18-25°C để loại nhóm bảo vệ Fmoc. Phản ứng được theo dõi bằng kit thử nghiệm ninhydrin. Khi hoàn thành, dung môi được bốc hơi trong điều kiện chân không để thu được VCP-eribulin thô (**3**) (16mg), tinh chế bằng cột ZOBAX SB-C18 (cỡ lỗ 5µm, 9,4 x 150mm) trên hệ Waters Alliance e2695 HPLC trong pha động là H$_2$O-CH$_3$CN chứa axit formic 0,1%, qua građient 15-70%B. VCP-eribulin (**3**) (16mg) được hòa tan trong DMF (1mL). Bazơ Hunig (7,2µL, 41µmol) và maleimido-PEG$_2$-NHS (**4**) (9,7mg, 27µmol) được bổ sung. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 18-25°C trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng được tinh chế bằng HPLC (H$_2$O-CH$_3$CN) chứa axit formic 0,1%) thông qua građient 15-70%B. Loại dung môi bằng cách làm đông khô để thu được mal-(PEG)$_2$-Val-Cit-p-aminobenzyloxycarbonyl (pAB)-eribulin (mal-(PEG)$_2$-VCP-eribulin) (**5**).

2.1.2 Tối ưu hóa điều kiện khử

ADC MORAb-003 được điều chế bằng cách tạo ra các cystein chưa cặp đôi qua việc khử một phần bằng các đương lượng mol hạn chế của tác nhân khử không phải-thiol tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP). Nghiên cứu ban đầu được tiến hành trên MORAb-003, theo đó nồng độ kháng thể, nồng độ TCEP, và thời gian ủ được thay đổi, với mục đích để tạo ra một khoảng trung bình của 4 vị trí liên hợp được trên mỗi phân tử kháng thể. Số lượng vị trí thiol tự do được xác định bằng thử nghiệm định lượng thiol bằng huỳnh quang. Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 12. Mức độ đứt gãy liên kết H-H và H-L sau thời gian ủ 10 phút, 30 phút, 60 phút, hoặc 120 phút cũng được phân tích bằng SDS-PAGE (Fig.3). Đối với phân tích này, các mẫu không khử và đã khử được nạp lên trên gel SDS-PAGE và tiến hành điện di ở 185V trong 1 giờ. Trong Fig.3, đường M tương ứng với protein chuẩn. Đường 1 tương ứng với MORAb-003 không khử, không

được điều trị. Đường 2 tương ứng với MORAb-003 (5,3mg/mL) được khử trong 70,6 µM TCEP. Đường 3 tương ứng với MORAb-003 (5,3mg/mL) được khử trong 141,2µM TCEP. Đường 4 tương ứng với MORAb-003 (1,5mg/mL) được khử trong 20µM TCEP. Đường 5 tương ứng với MORAb-003 (1,5mg/mL) được khử trong 40µM TCEP. Cường độ của mỗi dải được nêu rõ trên gel dưới bên phải. "H" là chỉ chuỗi nặng, trong khi đó "L" là chỉ chuỗi nhẹ.

Bảng 12. Tối ưu hóa các điều kiện khử của MORAb-003

		10 phút		30 phút		60 phút		120 phút	
Nồng độ MORAb-003 µM (mg/ml)	Nồng độ TCEP µM	Thiol tự do µM	Liên kết disulfua được khử trên mỗi MAb	Thiol tự do µM	Liên kết disulfua được khử trên mỗi MAb	Thiol tự do µM	Liên kết disulfua được khử trên mỗi MAb	Thiol tự do µM	Liên kết disulfua được khử trên mỗi MAb
35,3 (5,3)	70,6	215	3,0	247,5	3,5	297,6	4,2	266,8	3,8
35,3 (5,3)	141,2	339	4,8	372,8	5,3	384,2	5,4	479,8	6,8
10 (1,5)	20	13,3	0,7	14,7	0,7	15,2	0,8	14,6	0,7
10 (1,5)	40	21,8	1,1	25,6	1,3	26,9	1,3	27,4	1,4

Phân tích SDS-PAGE và hàm lượng thiol gợi ý rằng việc ủ trong 60 phút mAb 5,3mg/mL với tỷ lệ mol TCEP gấp 4 lần so với mAb mang lại điểm bắt đầu hợp lý, do dường như xuất hiện sự khử hạn chế disulfua trong phân tử (như xác định bởi hàm lượng thiol tự do), và còn lại rất ít mAb không được khử (mAb không được khử sẽ có tác dụng như là chất ức chế cạnh tranh trong các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* sử dụng ADC điều chế). Các nghiên cứu mở rộng được tiến hành với MORAb-003 ở các nồng độ bắt đầu là 5,0mg/mL để khẳng định tỷ lệ mol TCEP với mAb được tối ưu hóa này sử dụng phân tích SDS-PAGE (Fig.4). Trong Fig.4, đường 1 tương ứng với protein chuẩn. Đường 2 tương ứng với MORAb-003 không khử, không được điều trị. Đường 3 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:1. Đường 4 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:2. Đường 5 tương ứng với MORAb-003 được

xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:3. Đường 6 tương ứng với MORAb-003 được xử lý ở tỷ lệ MORAb-003:TCEP là 1:4. Sự liên hợp sử dụng maleimido-PEG2-biotin cũng được tiến hành sau khi khử và loại TCEP, để mô phỏng sự liên hợp của độc tố tế bào đối với chế phẩm ADC. Phân tích DAR được tiến hành bằng cách sử dụng LC-MS. Kết quả của các nghiên cứu này được nêu trong Bảng 13.

Bảng 13. Tối ưu hóa các điều kiện khử của MORAb-003 – mức liên hợp với maleimido-PEG2-biotin

TCEP		**MORAb-003**		
TCEP:mAb	TCEP (µM)	LC	HC	DAR
1	33,3	0,29	0,34	1,26
2	66,7	0,48	0,83	2,62
3	100	0,63	1,21	3,68
4	133,2	0,73	1,70	4,86

LC, mức biotin của chuỗi nhẹ; HC, mức biotin của chuỗi nặng; DAR, biotin trên mỗi mAb [DAR = 2(LC) + 2(HC)].

Sau khi liên hợp biotin, phân tích thiol tự do chỉ ra rằng không có thiol tự do trong MORAb-003-biotin. Điều này chỉ ra là, sau khi khử liên kết disulfua, sự liên hợp đặc trưng xảy ra ở cả hai thiol được tạo ra, và các disulfua khử, không được liên hợp bất kỳ trải qua sự oxy hóa lại để tạo lại liên kết disulfua. Các điều kiện cuối được chọn để khử để tạo ra ADC là nồng độ kháng thể là 5,0mg/mL, nồng độ TCEP là 110µM, và thời gian ủ là 60 phút. Điều này khiến cho mAb có DAR là 4 sau khi liên hợp.

2.1.3. Tối ưu hóa sự liên hợp ADC

Khi độc tố tế bào đầu tiên được sử dụng để điều chế ADC là cryptophyxin, đây là hợp chất kỵ nước, thử nghiệm tối ưu hóa sự liên hợp đầu tiên được tiến hành với kháng thể kháng-mesothelin người "thay thế" có hai cystein chưa cặp đôi sẵn sàng để liên hợp (một

trên mỗi chuỗi nhẹ) ở vị trí xác định. Điều này tạo thuận lợi lớn cho việc phân tích hiệu lực liên hợp bằng cách đo phổ khối lượng, do chỉ cần phải phân tích chuỗi nhẹ. Việc chuẩn độ propylen glycol trong quá trình liên hợp của maleimido-LL3-cryptophyxin với kháng thể thay thế được tiến hành sau đó phân tích hiệu lực liên hợp của chuỗi nhẹ bằng LC-MS (Bảng 14).

Bảng 14. Tối ưu hóa nồng độ propylen glycol trong phản ứng liên hợp

Propylen glycol (%)	**LC Ab được liên hợp (%)**
0	8 %
20	48 %
50	100 %

Khối lượng LC: không được liên hợp, 23536 Da; được liên hợp, 24367 Da.

Propylen glycol 50% dẫn đến sự chiếm hoàn toàn các vị trí sẵn có, và được chọn là nồng độ cuối được sử dụng. Không quan sát thấy sự giảm gắn kết của mAb sau khi liên hợp (số liệu không được nêu), chỉ ra rằng propylen glycol không có ảnh hưởng bất lợi đến kháng thể. Do đó, các điều kiện phản ứng liên hợp cuối cùng được chọn là mAb 2,5mg/mL cuối cùng, tỷ lệ mol 6:1 của maleimido-nhóm liên kết-độc tố tế bào:mAb trong DPBS 0,5X (nồng độ cuối sau khi bổ sung propylen glycol), EDTA 0,5 mM, propylen glycol 50%, độ pH =7,2 trong 3,5-4 giờ ở nhiệt độ phòng. Trong các phản ứng này, propylen glycol được bổ sung trước khi bổ sung maleimido-nhóm liên kết-độc tố tế bào.

2.1.4. Điều chế ADC và xác định đặc điểm sinh lý

Các điều kiện khử và liên hợp được thiết lập, được mô tả trong mục 2.1.2, được sử dụng để điều chế 10 ADC MORAb-003 đầu tiên được nêu trong Bảng 15. Các ADC còn lại được điều chế hoặc bằng cách tạo cầu disulfua khử hoặc sử dụng lysin hạn chế, ngoại trừ M-MMAE và M-DM1. M-MMAE và M-DM1 được điều chế bởi Concortis Biosystems, Inc., và được nhận ở dạng đã liên hợp.

Hóa học tạo cầu disulfua khử sẽ tạo cầu qua các thiol tự do tạo ra trong quá trình khử một phần, tạo ra một độc tố tế bào trên mỗi disulfua khử. Về lý thuyết, một kháng thể có DAR = 4 sẽ có cả hai H-L và disulfua ở bản lề được tạo cầu lại, mang lại ADC có sự ổn định tăng và độ đồng nhất cao hơn so với các phương pháp liên hợp truyền thống. Việc sử

dụng lysin hạn chế dẫn đến sự liên hợp của một số lượng rất hạn chế của lysin tiếp xúc với khoảng 70+ dung môi có sẵn trên phân tử IgG người đặc trưng. Các thể liên hợp MORAb-003 được điều chế bằng phương pháp này có DAR là 2,0, gợi ý rằng một lysin được sử dụng trên mỗi cặp H-L.

Tất cả các ADC được tinh chế bằng phép sắc ký khử muối HiPrep 26/10 và pha chế trong DPBS. Phân tích DAR được tiến hành trên tất cả các ADC điều chế được bằng LC-MS và mức kết tụ được xác định bằng SEC-HPLC. Các kết quả của DAR và phân tích kết tụ được nêu trong Bảng 15 bên cạnh ADC tương ứng.

Bảng 15. Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003

	Tên hợp chất	**DAR**	**Kết tụ (%)**
1	PEG3-Bz-disulfidyl-dimetyl-cryptophyxin	3,7 - 3,9	29
2	LL2-cryptophyxin	3,2	18 - 36
3	LL3-cryptophyxin	3,2 - 3,7	22 - 36
4	VCP-cryptophyxin	3,4	50
5	VCP-eribulin	3,6	0 - 2,6
6	ER-001161318	3,5	3,2
7	ER-001161319	3,5	3,1
8	ER-001159200	2,8	
9	M-MMAE	4,0	2
10	NHS-PEG2-AuF	5,0	
11	M-DM1	3,6	1,8
12	M-0285	4,0	1,2
13	M-0115	4,0	0,4
14	M-172	3,1	3,6
15	M-174	2,8	4,4
16	M-158	4,5	3,8
17	M-0384	4,2	4,2
18	M-0302	4,3	3,3
19	M-292	4,0	4,5

20	M-0026	4,2	3,3
21	M-0267	4,0	2,9
22	M-0272	3,3	1,5
23	M-0260	3,2	1
24	M-0276	4,6	6,2
25	M-015-0913	2,0	<1
26	M-030-0132	2,0	<1
27	M-0161	2,1	2,4
28	M-0157	2,0	<1
29	M-027-0381	2,0	<1
30	M-0025	2,0	1,7
31	M-0301	2,0	1,4
32	M-030-0011	2,0	<1
33	M-030-0291	2,0	<1
34	M-0255	3,6	5,9
35	M-0114	4,0	3,9

Giá trị DAR của tất cả các ADC là nằm trong khoảng đã xác định (DAR nằm trong khoảng từ 3 đến 4). Mức kết tụ của ADC dựa trên cryptophyxin cao hơn đáng kể so với mong đợi (>10%), trong khi đó tất cả các maleimido-nhóm liên kết-độc tố tế bào dựa trên eribulin (VCP-eribulin) và dựa trên maytansin (ER-001161318, ER-001161319, và M-MMAE) chứng minh mức kết tụ chấp nhận được. Một nghiên cứu vào các đồng dung môi hữu cơ khác được tiến hành trên các phản ứng liên hợp với MORAb-003 sử dụng VCP-cryptophyxin. Các đồng dung môi thử nghiệm là DMSO (10%), *N,N*-dimetylformamit (20%), *N,N*-dimetylaxetamit (20%), và *N,N*-dimetylpropionamit (20%). Mức kết tụ sau khi liên hợp sử dụng tất cả các đồng dung môi này là bằng với, hoặc cao hơn, propylen glycol 50%.

Phân tích SDS-PAGE không khử được tiến hành trên tập hợp con của ADC (Fig.5). Do DAR của tất cả các ADC này được xác định là 4, cho rằng các ADC này sẽ dịch chuyển như IgG nguyên vẹn ~ 160 kD, do cả hai H-L và cả hai disulfua trong bản lề sẽ được tạo cầu lại. Tập hợp con này của ADC bao gồm M-MMAE (đường 2), M-DM1 (đường 3), M-

0026 (đường 4), M-0260 (đường 5), M-0267 (đường 6), M-0272 (đường 7), M-0285 (đường 8), M-292 (đường 9), M-027-0381 (đường 10), và M-0384 (đường 11) (Fig.5). Trong Fig.5, đường 1 tương ứng với protein chuẩn.

Từ phân tích này, rõ ràng là, đối với ADC hóa học tạo cầu disulfua khử (đường 4-9, 11), có kiểu H-L đơn hóa trị (80kD), ngoài ADC nguyên vẹn. Điều này chỉ ra rằng có sự tạo cầu disulfua bản lề trong chuỗi đáng kể, ngoài sự tạo cầu bản lề giữa các chuỗi. Phân tích SEC-HPLC chỉ ra rằng các ADC di chuyển ở dạng IgG đơn nguyên vẹn, chỉ ra rằng đối với các ADC có sự tạo cầu H-H trong chuỗi, các chuỗi nặng được kết nối kiểu không cộng hóa trị trong ADC cuối cùng.

2.2. Phân tích hiệu lực *in vitro* của ADC MORAb-003

2.2.1 Độc tính tế bào trên tế bào IGROV1 và SJSA-1

Hiệu lực *in vitro* của các ADC điều chế được được đánh giá bằng thử nghiệm Crystal Violet như nêu chi tiết trong mục 1.4.1.

Sàng lọc ban đầu tất cả ADC MORAb-003 được tiến hành trên tế bào IGROV1 ($FR^{hi(+++)}$) và SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$). Tế bào IGROV1 là thuộc gốc caxinom biểu mô buồng trứng người và thể hiện mức cao thụ thể folat alpha (FR), kháng nguyên đích của MORAb-003. Tế bào SJSA-1 là dòng tế bào khối u sacôm xương người mà âm tính với thụ thể folat alpha. Việc sàng lọc các ADC đã chọn cũng được tiến hành trong các tế bào CaOV3 (caxinom buồng trứng người, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (caxinom phổi tế bào không nhỏ người, $FR^{med(++)}$), và/hoặc OVCAR3 (caxinom buồng trứng người, $FR^{med(++)}$). Kết quả của sàng lọc này được nêu trong Bảng 16.

Bảng 16. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 trên các dòng tế bào khối u khác nhau

Tên hợp chất	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
PEG3-Bz-disulfidyl-dimetyl-cryptophyxin	0,067	0,41			
LL2-cryptophyxin	0,023	4,7	0,33		
LL3-cryptophyxin	0,086	12,7	0,19		0,094

VCP-cryptophyxin	0,03	~100	0,02		
VCP-eribulin	0,054	>100	3,7	0,73	0,16
ER-001161318	0,26	>100	3,1		
ER-001161319	0,49	>100	11,3		
ER-001159200	6,5	>100	9,2		
M-MMAE	0,2	253			
NHS-PEG2-AuF	0,2	>500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0,3	>100		14	8,8
M-0115	0,54	>100			
M-172	>500	>500			
M-174	>500	>500			
M-158	>500	>500			
M-0384	2,25	2,45			
M-0302	330	>500			
M-292	1,7	>500			
M-0026	1,38	540			
M-0267	0,029	0,028			
M-0272	0,252	1,02			
M-0260	0,383	0,036			
M-0276	0,43	30			
M-015-0913	>500	>500			
M-030-0132	>500	17,3			
M-0161	>500	>500			
M-0157	>500	>500			
M-027-0381	14,5	28			
M-0025	>500	>500			
M-0301	>500	>500			
M-030-0011	61,6	>500			
M-030-0291	>500	105			
M-0255	0,12	0,46			

M-0114	144	>100			

Tất cả các giá trị là giá trị IC_{50} đơn vị nM, và là giá trị trung bình của các thử nghiệm lặp lại, khi được tiến hành.

ADC VCP-eribulin là có hiệu lực (54pM) trên tế bào IGROV1 và có sự diệt nhẹ trên tế bào SJSA-1. Đối với các dòng tế bào này, ADC VCP-eribulin chứng minh hiệu lực và tính đặc hiệu cao hơn so với các ADC có giá trị DAR tương đương, như M-MMAE và M-DM1. ADC VCP-eribulin cũng chứng minh độc tính tế bào tiềm năng trên các dòng tế bào khối u biểu hiện FR khác của buồng trứng (CaOV3 và OVCAR3) và gốc caxinom phổi tế bào không nhỏ (NC-H2110).

ADC VCP-eribulin, LL2-cryptophyxin, LL3-cryptophyxin, VCP-cryptophyxin, ER-001161318, ER-001161319, và ER-001159200 biểu hiện độc tính tế bào đặc hiệu (> 2-log của độ đặc hiệu) trong tế bào CaOV3 ($FR^{med(++)}$). Một số các ADC này biểu hiện mức hiệu lực dưới nanomol. Thể liên hợp cryptophyxin cũng biểu hiện mức hiệu lực (23 pM – 86 pM) trong tế bào IGROV1, nhưng, ngoại trừ VCP-cryptophyxin, cũng chứng minh độc tính tế bào đo được trên tế bào SJSA-1. Thể liên hợp maytansin có thể tách được ER-001161318 và ER-001161319 có hiệu lực trung bình trên IGROV1 (0,26nM và 0,49nM), và sự diệt sai đích nhẹ trên tế bào SJSA-1.

Tất cả thể liên hợp sử dụng lysin hạn chế chứng minh không có tính đặc hiệu và không được đánh giá tiếp. Thể liên hợp có thể tách được sử dụng kỹ thuật tạo cầu disulfua khử của duostatin-3 (M-0285), duostatin-5 (M-0115), và duostatin-14 (M-292 và M-0026) tất cả đều chứng minh độc tính tế bào đặc hiệu trên dòng tế bào IGROV1, có độc tính tế bào nhẹ trên dòng tế bào SJSA-1. Thể liên hợp duostatin-3 và duostatin-5, dẫn xuất của auristatin, có hiệu lực cao hơn rất ít so với thể liên hợp duostatin-14, đây là dẫn xuất maytansin. Hiệu lực và tính đặc hiệu là có thể so sánh với thể liên hợp M-MMAE đối chứng, mà nó sử dụng nhóm liên kết Val-Cit-pAB (VCP) gắn với monometyl E. Tất cả các thể liên hợp hóa học disulfua khử không tách được hoặc không có hiệu lực đủ hoặc không có tính đặc hiệu đủ, và không được phân tích tiếp.

2.2.2. Độc tính tế bào trên dòng tế bào ung thư buồng trứng người biểu hiện thụ thể folat CaOV3

Hiệu lực của ADC MORAb-003 được chọn cũng được xác định trên dòng tế bào khối u buồng trứng người OVCAR3 và CaOV3, cũng như dòng tế bào NSCLC người NCI-H2110 (Bảng 16). Trên dòng tế bào buồng trứng người CaOV3, các thể liên hợp cryptophyxin chứng minh hiệu lực cao hơn có thể đo được so với thể liên hợp VCP-eribulin, không giống như quan sát được trong tế bào IGROV1. Điều này có thể do mức biểu hiện thấp hơn của thụ thể folat alpha trên tế bào CaOV3 so với IGROV1, hoặc hiệu lực cao hơn của cryptophyxin trên các tế bào này, so với eribulin. Tất cả các thể liên hợp dựa trên maytansin ER-001161318, ER-001161319, và ER-001159200 có hiệu lực tương đương, hoặc thấp hơn, VCP-eribulin.

2.3. Sự diệt đích âm tính kế bên của VCP-eribulin, ER-001161318, và M-0285

Để đánh giá hoạt tính diệt đích âm tính kế bên, thử nghiệm được thiết kế sử dụng hai dòng tế bào đánh dấu. Trong thử nghiệm này, tế bào IGROV1 (FR^{hi}) được đánh dấu bởi Nuclight™ Green và HL-60 (FR^{neg}) được đánh dấu bởi Nuclight™ Red được nuôi cấy đồng thời với tỷ lệ số tế bào khác nhau, và được điều trị bởi các độ chuẩn ADC MORAb-003 VCP-eribulin, ER-001161318, hoặc M-0285. VCP-eribulin là ADC dựa trên eribulin bao gồm nhóm liên kết phân cắt được maleimido-PEG_2-Val-Cit-pAB, trong khi ER-001161318 là ADC dựa trên maytansin bao gồm nhóm liên kết phân cắt được maleimido-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB và M-0285 là ADC dựa trên duostatin bao gồm nhóm liên kết phân cắt được PEG-pAB. Độc tính tế bào được theo dõi bởi bộ tạo ảnh tế bào Incucyte Zoom®. Kết quả của thử nghiệm độc tính tế bào âm tính kế bên được trình bày trong Bảng 17 và Fig.6A-C.

Bảng 17. Hoạt tính diệt đích âm tính kế bên của VCP-eribulin trên dòng tế bào âm tính với FR và dương tính với FR nuôi cấy đồng thời

EC_{50} (nM)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (nuôi cấy đồng thời với IGROV-1)	HL-60 (eribulin)
0,0005972	39,74	0,2399	0,1702

Khi tế bào HL-60 (FR^{neg}) được nuôi cấy với tỷ lệ 2:1 so với tế bào IGROV1 (FR^{hi}), việc điều trị bằng MORAb003-VCP-eribulin làm tăng giá trị 2-log của mức diệt tế bào HL-60, so với tế bào HL-60 đơn độc (Bảng 17 và Fig.6A). Các số liệu này gợi ý rằng các tế bào âm tính với đích là thụ thể folat alpha (FR) bị diệt hiệu quả hơn bởi MORAb003-VCP-eribulin khi được nuôi cấy đồng thời với tế bào dương tính với đích FR, ở đây gọi là sự diệt đích âm tính kế bên. Sự diệt đích âm tính kế bên là phân biệt được với sự diệt sai đích, được xác định là sự diệt chính các tế bào âm tính với đích, trong sự không có mặt tế bào dương tính với đích và độc lập việc nuôi cấy đồng thời tế bào dương tính với đích. Việc tăng sự diệt đích âm tính kế bên quan sát được cũng gần giống với sự tăng quan sát được sau khi điều trị tế bào HL-60 với eribulin tự do, chỉ ra cơ chế tiềm năng của hiệu ứng diệt đích âm tính kế bên. Không bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, MORAb003-VCP-eribulin có thể tách được trong hoặc gần các tế bào FR-dương tính IGROV1, các tế bào này cũng trải qua sự diệt tế bào theo chương trình và giải phóng eribulin tự do vào môi trường nuôi cấy. Độc tố tế bào được giải phóng có thể diệt tế bào FR-âm tính HL-60.

Ngược lại, chỉ quan sát thấy một sự dịch chuyển nhẹ của MORAb003-ER-001161318 (Fig.6B), và không quan sát thấy sự chuyển dịch nào với MORAb003-0285 (Fig.6C). Khi tỷ lệ HL-60:IGROV1 được hạ thấp từ 2:1 xuống 1:2, quan sát thấy sự diệt tế bào HL-60 ở mức đo được, so với tế bào HL-60 đơn độc, đối với MORAb003-ER-001161318, trong khi hiệu ứng diệt đích âm tính kế bên vẫn thấp, mặc dù có thể phát hiện được, của MORAb003-0285. Các số liệu này gợi ý rằng, về mặt diệt đích âm tính kế bên, ADC MORAb-003 được đánh giá là có thể xếp loại là VCP-eribulin > ER-001161318 > M-0285.

2.4. Phân tích độ ổn định trong huyết thanh

Tạo ra thời gian bán thải trong tuần hoàn dài *in vivo* của ADC và độc tính tiềm năng nếu độc tố tế bào được giải phóng trong tuần hoàn, ADC sẽ chứng minh độ ổn định trong huyết thanh. ADC MORAb-003 VCP-eribulin, ER-001161319, và M-0285 được ủ trước trong huyết thanh người hoặc chuột ở 37°C trong đến 48 giờ, sau đó được đánh giá trong thử nghiệm độc tính tế bào với tế bào IGROV1 và SJSA-1. ER-001161319 là ADC dựa trên maytansin bao gồm nhóm liên kết phân cắt được giống như VCP-eribulin, maleimido-PEG_2-Val-Cit-pAB. PBS và đối chứng huyết thanh được đưa vào để hiệu chỉnh tác dụng

bất kỳ của huyết thanh lên hiệu suất thử nghiệm. Kết quả của nghiên cứu này được trình bày trong Bảng 18.

Bảng 18. Độ ổn định trong huyết thanh của các ADC MORAb-003 được chọn

		Thử nghiệm độc tính tế bào dựa trên tế bào, EC_{50}, nM								
		MORAb003-VCP Eribulin			MORAb003-ER001161319			MORAb003-0285		
	Thời gian	PBS	Huyết thanh người	Huyết thanh chuột	PBS	Huyết thanh người	Huyết thanh chuột	PBS	Huyết thanh người	Huyết thanh chuột
IGROV1	0 giờ-PBS	0,021	0,013	0,02	0,28	0,15	0,2	0,074	0,089	ND
	0 giờ-Huyết thanh	0,022	0,014	0,01	0,15	0,15	0,2	0,063	0,078	0,049
	4 giờ	0,03	0,018	0,019	0,14	0,17	0,25	0,065	0,075	0,049
	24 giờ	0,024	0,019	ND	ND	0,27	0,9	0,059	0,074	0,044
	48 giờ	0,022	0,021	0,03	0,21	0,73	2,56	0,043	0,05	0,051
SJSA-1	0 giờ-PBS	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	0 giờ-Huyết thanh	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	4 giờ	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	24 giờ	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	48 giờ	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Ô màu xám mờ chỉ sự giảm hiệu lực đáng kể so với mẫu T=0.

Trong khi VCP-eribulin và M-0285 là ổn định trong ít nhất 48 giờ trong huyết thanh, ER-001161319 chứng minh sự giảm hiệu lực đáng kể sau 48 giờ. Điều này có thể là do mối liên kết aziridino-carbamat với maytansin, mối liên kết này chưa được mô tả trong tài liệu trước đây. Dạng của hợp chất giải phóng có thể không có hiệu lực cao, do không thấy sự tăng độc tính tế bào lên tế bào SJSA-1.

2.5. Các nghiên cứu *in vitro* với MORAb003-VCP-eribulin

2.5.1. Phân tích HIC-HPLC về DAR và sự không đồng nhất của sản phẩm

MORAb003-VCP-eribulin và MORAb003-0285 được phân tích bằng HIC-HPLC để đánh giá DAR bằng phương pháp thay thế và kiểm tra về sự không đồng nhất của sản phẩm và hàm lượng của kháng thể không liên hợp (chất cạnh tranh). MORAb003-VCP-eribulin được thể hiện là có kiểu DAR là 0, 2, 4, và 6, là phù hợp với phương pháp sử dụng để khử và liên hợp (Fig.7A). Quan sát thấy các lượng rất thấp của kiểu DAR = 0. DAR tổng cộng, dựa trên tính toán AUC, là 3,80, phù hợp với các giá trị xác định được bởi LC-MS. MORAb003-0285 di chuyển ở dạng một đỉnh bởi HIC-HPLC, chỉ ra rằng kiểu DAR đơn (Fig.7B). Giá trị này được gán là DAR 4.0.

2.5.2. Tính đặc hiệu theo thử nghiệm cạnh tranh

Tính đặc hiệu kháng nguyên của độc tính tế bào MORAb-003-VCP-eribulin được chứng minh đối với thể liên hợp VCP-eribulin bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm cạnh tranh (Fig.8). Trong thử nghiệm này, các độ chuẩn của MORAb-003-VCP-eribulin (nồng độ bắt đầu 100nM) được ủ đồng thời với 2μM MORAb-003 không liên hợp. MORAb-003 không liên hợp tạo ra sự chuyển dịch giá trị 2-log của hiệu lực trên tế bào IGROV1, tương tự như kết quả thu được với IMGN853, ADC maytansin kháng-thụ thể folat alpha của người từ Immunogen hiện trong các thử nghiệm lâm sàng Pha II, trên tế bào KB (Moore *et al.*, 2015 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Abstract 5518).

2.5.3. Độc tính tế bào trên tế bào NCI-H2110 NSCLC

Độc tính tế bào của cả MORAb003-VCP-eribulin và MORAb003-0285 trên dòng tế bào NSCLC người NCI-H2110 được tiến hành bằng thử nghiệm Crystal Violet. Các kết

quả của thử nghiệm này được trình bày trong Bảng 16. MORAb003-VCP-eribulin có giá trị IC_{50} là 0,73nM, trong khi MORAb003-0285 có giá trị IC_{50} là 14nM.

2.6. Các nghiên cứu *in vivo*

2.6.1. Liều dung nạp tối đa (MTD- maximum tolerated dose) của MORAb-003-VCP-eribulin (MORAb-202) ở chủng chuột CD-1

Chuột CD-1 chưa từng thử nghiệm được tiêm trong tĩnh mạch với 200µL MORAb-202 theo biểu đồ trong Bảng 19. Trọng lượng cơ thể được đo trước khi dùng thuốc vào ngày dùng thuốc, 24 giờ sau khi dùng thuốc, và ba lần một tuần sau đó. Động vật được quan sát về hành vi lâm sàng trong suốt quá trình nghiên cứu. Hai tuần sau khi dùng thuốc, trọng lượng cơ thể cuối cùng được đo và ghi chép. Chuột được cho chết nhẹ nhàng vào cuối nghiên cứu (và nếu chuột được chết nhẹ nhàng bất kỳ hoặc thấy bị chết trong nghiên cứu) được cho xét nghiệm xác. Các cơ quan được kiểm tra dấu hiệu của sự phá hủy mô.

Bảng 19. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	3	Tá dược lỏng*	0	Một liều lớn	Trong tĩnh mạch
2		MORAb-202	10		
3			20		
4			40		
5			80		

Không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể đáng kể ở các nhóm chuột bất kỳ so với nhóm đối chứng được điều trị bằng PBS, hoặc kết quả lâm sàng bất kỳ chỉ ra độc tính trong quá trình điều trị. Trọng lượng cơ thể của mỗi cá thể chuột được thể hiện trong Bảng 20, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 21. Động học thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được trình bày trong Fig.9. MORAb-202 ở các liều lên đến 80mg/kg qua đường dùng trong tĩnh mạch liều lớn không gây ra độc tính. Do đó, MTD là trên 80mg/kg.

Bảng 20

Số ngày sau khi Rx	Đối chứng PBS			MORAb-202 10 mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
X	A-Y1	A-Y2	A-Y3	B-Y1	B-Y2	B-Y3	C-Y1	C-Y2	C-Y3	D-Y1	D-Y2	D-Y3	E-Y1	E-Y2	E-Y3
0	22,50	20,60	21,20	22,60	23,50	21,80	27,40	26,20	21,00	23,80	23,30	21,70	21,80	26,50	25,80
1	23,60	21,50	22,00	22,80	23,80	23,00	28,80	27,50	21,40	23,60	23,50	21,60	23,10	27,80	27.80
2	23,30	21,90	22,00	23,30	24,00	22,90	29,30	29,00	22,10	23,60	24,60	21,80	23,30	28,30	28,30
4	23,30	21,90	22,00	23,30	23,90	23,30	30,20	31,00	23,00	24,40	24,10	22,70	23,50	29,50	28,60
7	23,90	23,10	22,70	24,80	25,20	24,90	29,60	32,00	24,00	25,10	25,50	23,40	23,30	30,40	30,10
9	24,60	22,50	22,80	24,90	25,30	25,00	30,80	31,70	23,40	25,80	25,20	23,70	23,60	31,00	30,20
11	24,20	23,40	23,20	24,30	25,10	24,30	31,00	32,40	23,80	25,30	25,00	23,80	23,10	29,10	29,40
14	24,00	23,50	24,40	25,80	25,60	25,70	33,20	32,40	24,10	25,70	25,30	26,30	21,70	28,40	28,90

51551

Bảng 21

Số ngày sau khi tiêm	PBS			MORAb-202 10mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n
0	21,4	0,6	3	22,6	0,5	3	24,9	2,0	3	22,9	0,6	3	24,7	1,5	3
1	22,4	0,6	3	23,2	0,3	3	25,9	2,3	3	22,9	0,7	3	26,2	1,6	3
2	22,4	0,5	3	23,4	0,3	3	26,8	2,4	3	23,3	0,8	3	26,6	1,7	3
4	22,4	0,5	3	23,5	0,2	3	28,1	2,5	3	23,7	0,5	3	27,2	1,9	3
7	23,2	0,4	3	25,0	0,1	3	28,5	2,4	3	24,7	0,6	3	27,9	2,3	3
9	23,3	0,7	3	25,1	0,1	3	28,6	2,6	3	24,9	0,6	3	28,3	2,3	3
11	23,6	0,3	3	24,6	0,3	3	29,1	2,7	3	24,7	0,5	3	27,2	2,1	3
14	24,0	0,3	3	25,7	0,1	3	29,9	2,9	3	25,8	0,3	3	26,3	2,3	3

51551

2.6.2. Liều dung nạp tối đa của eribulin ở chuột CD-1

Chuột CD-1 chưa từng thử nghiệm được tiêm trong tĩnh mạch 200µL eribulin theo biểu đồ trong Bảng 22. Trọng lượng cơ thể được đo ba lần mỗi tuần bao gồm trước khi dùng thuốc vào mỗi ngày dùng thuốc và 24 giờ sau mỗi liều thuốc. Động vật được quan sát về biểu hiện lâm sàng trong suốt quá trình nghiên cứu (hai tuần sau liều cuối cùng). Trọng lượng cơ thể cuối cùng được đo và ghi chép. Chuột được cho chết nhẹ nhàng vào cuối nghiên cứu (và và nếu chuột chết nhẹ nhàng bất kỳ hoặc thấy bị chết trong nghiên cứu) được cho xét nghiệm xác. Các cơ quan được kiểm tra dấu hiệu của sự phá hủy mô.

Bảng 22. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	3	PBS	0	q4dx3	Trong tĩnh mạch
2		Eribulin	0,4		
3			0,8		
4			1,6		
5			3,2		

Không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể đáng kể hoặc các kết quả lâm sàng chỉ ra độc tính ở động vật sử dụng eribulin ở các liều lên đến 1,6mg/kg, sử dụng phác đồ liều q4dx3 (một lần mỗi bốn ngày với tổng cộng 3 liều). Việc sử dụng 3,2mg/kg với cùng biểu đồ gây ra sự dựng lông ở cả ba con chuột sau liều thuốc thứ hai. Quan sát thấy sự giảm trọng lượng mạnh (23% giảm ở một chuột, #552, sau liều thứ hai; 17% và 8% ở các con còn lại, #551 và #552, sau liều thứ ba), so với đối chứng điều trị bằng PBS. Không thấy sự thay đổi mạnh nào trong các cơ quan của chuột khi khám nghiệm xác. Trọng lượng cơ thể của các cá thể chuột được trình bày trong Bảng 23, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 24. Động học thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được trình bày trong Fig.10.

Eribulin ở các liều lên đến 1,6mg/kg, sử dụng phác đồ liều q4dx3, không gây ra độc tính, trong khi liều 3,2mg/kg gây ra sự giảm trọng lượng mạnh. Do đó, MTD của eribulin, trong nghiên cứu này, là 1,6mg/kg, q4dx3.

Bảng 23

Ngày	PBS			Eribulin 0,4mg/kg			Eribulin 0,8mg/kg			Eribulin 1,6mg/kg			Eribulin 3,2mg/kg		
X	A-Y1	A-Y2	A-Y3	B-Y1	B-Y2	B-Y3	C-Y1	C-Y2	C-Y3	D-Y1	D-Y2	D-Y3	E-Y1	E-Y2	E-Y3
0	26,50	24,40	23,40	22,40	24,60	23,10	23,90	25,50	25,10	21,90	24,40	23,70	24,30	25,00	22,00
1	28,13	25,11	24,36	21,84	24,02	22,43	23,03	23,60	24,46	21,13	24,10	24,15	22,31	23,47	20,57
4	25,60	25,10	24,40	22,70	24,00	24,00	23,80	24,40	24,50	21,70	24,10	23,30	20,90	22,20	17,50
5	26,40	24,80	24,50	22,30	24,10	23,40	24,10	24,00	24,80	21,50	24,50	24,10	20,90	22,70	16,90
8	27,50	25,70	24,50	23,30	23,70	25,20	24,00	24,80	25,90	21,90	24,50	24,20	21,80	23,90	*9003, 00"*
9	27,50	25,50	24,40	22,90	23,40	25,40	24,00	24,70	25,30	21,80	24,80	24,30	20,20	23,00	
11	27,50	25,60	24,40	22,60	23,90	25,60	24,70	25,10	26,00	22,20	25,70	24,70	20,00	23,30	
13	27,40	26,80	25,40	23,70	23,90	26,50	25,30	25,60	26,60	22,80	25,80	25,20	21,40	23,70	
16	27,30	26,80	26,20	24,70	24,10	26,70	25,40	25,80	26,40	23,40	26,70	26,10	23,60	24,30	
18	27,00	27,40	27,30	24,30	24,90	27,90	26,20	28,00	27,90	24,70	27,90	26,20	25,90	25,90	
20	28,10	27,60	26,50	26,10	25,70	28,50	25,40	28,20	28,10	25,40	29,00	26,00	26,80	26,00	

Mỗi cột thể hiện mỗi cá thể động vật.

*9003: được cho chết nhẹ nhàng có sự giảm trọng lượng >20%.

51551

Bảng 24

Số ngày sau khi tiêm	PBS			Eribulin 0,4mg/kg			Eribulin 0,8mg/kg			Eribulin 1,6mg/kg			Eribulin 3,2mg/kg		
	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	n
0	24,8	0,9	3	23,4	0,6	3	24,8	0,5	3	23,3	0,7	3	23,8	0,9	3
1	25,9	1,2	3	22,8	0,7	3	23,7	0,4	3	23,1	1,0	3	22,1	0,8	3
4	25,0	0,3	3	23,6	0,4	3	24,2	0,2	3	23,0	0,7	3	20,2	1,4	3
5	25,2	0,6	3	23,3	0,5	3	24,3	0,3	3	23,4	0,9	3	20,2	1,7	3
8	25,9	0,9	3	24,1	0,6	3	24,9	0,6	3	23,5	0,8	3	22,9	0,9	2
9	25,8	0,9	3	23,9	0,8	3	24,7	0,4	3	23,6	0,9	3	21,6	1,1	2
11	25,8	0,9	3	24,0	0,9	3	25,3	0,4	3	24,2	1,0	3	21,7	1,3	2
13	26,5	0,6	3	24,7	0,9	3	25,8	0,4	3	24,6	0,9	3	22,6	0,9	2
16	26,8	0,3	3	25,2	0,8	3	25,9	0,3	3	25,4	1,0	3	24,0	0,3	2
18	27,2	0,1	3	25,7	1,1	3	27,4	0,6	3	26,3	0,9	3	25,9	0,0	2
20	27,4	0,5	3	26,8	0,9	3	27,2	0,9	3	26,8	1,1	3	26,4	0,3	2

2.6.3. Đánh giá liều thấp nhất có hiệu quả của MORAb003-VCP-eribulin (MORAb-202) trong mô hình hNSCLC NCI-H2110 ở chuột CB17-SCID

Tế bào NSCLC người, NCI-H2110, đoạn chuyển 47 được cấy ghép dưới da ở 30 chuột CB17 SCID (cái, từ 5 đến 6 tuần tuổi, nặng 20 gam). Sau 14 ngày sau khi cấy ghép, chuột được chọn ngẫu nhiên thành 5 nhóm. Thể tích khối u trung bình ở mỗi nhóm vào ngày điều trị (Ngày 0) nằm trong khoảng từ 154-175 mm^3 (Bảng 27). Chuột đã đánh số được điều trị bằng MORAb003-VCP-eribulin (MORAb-202) (Lot# NB2900-87E 10/07/15) ở liều 1, 2,5, hoặc 5mg/kg, bằng MORAb-003-0285 (Lot# 042-150-002) là đối chứng ở liều 5mg/kg, hoặc bằng PBS, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 25). Mỗi nhóm được loại ra khỏi nghiên cứu khi thể tích khối u ở con vật bất kỳ trong nhóm >2000 mm^3. Nhóm cuối cùng được kết thúc vào Ngày 61.

Bảng 25. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# chuột	Cách điều trị	Liều(mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	5	PBS	0	tiêm một liều lớn	Trong tĩnh mạch
2	5	MORAb-003-VCP-eribulin	1		
3	5	MORAb-003-VCP-eribulin	2,5		
4	4[1]	MORAb-003-VCP-eribulin	5		
5	5	MORAb003-0285	5		

Thể tích khối u ở các cá thể chuột được trình bày trong Bảng 26, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 27. Động học phát triển khối u của mỗi

[1] Bốn chuột trong nhóm này. Một con bị loại khỏi nhóm do lỗi tiêm khi điều trị, điều này được xác nhận bởi việc không có hợp chất trong huyết thanh của con vật dựa trên số liệu thử nghiệm miễn dịch phát quang điện hóa (ECLIA -electrochemiluminenscent immunoassay).

nhóm (giá trị trung bình của nhóm và độ lệch chuẩn của giá trị trung bình, SEM) được trình bày trong Fig.11, và thể tích khối u ở các cá thể chuột, cũng như giá trị trung bình và SEM của nhóm, được trình bày trong Fig.12. Dựa trên thể tích khối u ngày 17 (khi quan sát thấy thể tích khối u đầu tiên >2000 mm^3), MORAb-202 gây ra mức ức chế phát triển khối u (TGI) là 47% ở liều 1mg/kg (p = 0,002 so với nước muối), giá trị TGI là 96% ở liều 2,5mg/kg (p < 0,0001 so với nước muối). Tuy nhiên, các khối u bị giảm kích thước sẽ phát triển lại một đến hai tuần sau khi kết thúc điều trị. Không phát hiện thấy khối u nào ở chuột được điều trị bằng 5mg/kg MORAb-202. Các con chuột này vẫn không có khối u sau quá 60 ngày sau khi điều trị một liều đơn. MORAb-003-0285 gây ra giá trị TGI là 89,7% ở 5mg/kg (p < 0,0001 so với nước muối).

Trọng lượng cơ thể của các cá thể chuột được trình bày trong Bảng 28, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 29. Động học thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được trình bày trong Fig.13.

Không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể đáng kể ở nhóm điều trị bất kỳ so với nhóm đối chứng.

MORAb-202 thể hiện tác dụng đáng kể trên sự phát triển khối u NCI-H2110. Đạt được sự giảm khối u bằng cách điều trị tiêm một liều lớn ở mức 2,5mg/kg với TGI là 94% (so với PBS). Do đó, liều thấp nhất có hiệu quả của MORAb-202 là 2,5mg/kg, được thử nghiệm trong mô hình này. Sự diệt hoàn toàn khối u đạt được bằng liều đơn ở liều 5mg/kg. Không quan sát thấy sự phát triển khối u trong hơn 60 ngày.

Bảng 26. Thể tích khối u

Số ngày sau khi phân chia ngẫu nhiên	PBS					MORAb-202 1mg/kg					MORAb-202 2,5 mg/kg					MORab-202 5mg/kg					003-0285 5mg/kg				
0	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236	110	202	159	146	65	208	241	243	97
3	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148	40	115	68	68	83	259	358	292	164
5	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56	14	52	22	37	54	160	168	239	105
6	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57	7	28	25	20	43	197	235	247	129
7	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57	8	48	16	20	52	192	255	266	128
10	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71	0	0	0	0	39	155	240	181	86
12	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69	0	0	0	0	32	106	206	223	83
14	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89	0	0	0	0	31	115	235	157	79
17	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161	0	0	0	0	28	114	346	251	74
19						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282	0	0	0	0	27	144	438	359	94
24											102	37	197	0	702	0	0	0	0	46	391	1244	824	187
26											168	102	319	0	790	0	0	0	0	103	564	1470	1030	287
28											269	54	474	9	990	0	0	0	0	125	703	1898	1112	375
31											362	105	558	13	1187	0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657
33											496	124	588	9	1461	0	0	0	0					
35											573	212	669	16	1847	0	0	0	0					
38											764	348	952	20	2367	0	0	0	0					
40																0	0	0	0					
42																0	0	0	0					
45																0	0	0	0					
47																0	0	0	0					
52																0	0	0	0					
54																0	0	0	0					
59																0	0	0	0					
61																0	0	0	0					

Mỗi cột thể hiện một cá thể động vật.

51551

Bảng 27

Số ngày sau khi phân chia ngẫu nhiên	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2,5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-0285 5mg/kg		
	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình (g)	Độ lệch chuẩn	N
0	175,2	36,41527	5	159,4	17,68781	5	164,8	25,8917	5	154,25	16,95792	4	170,8	37,46065	5
3	363,6	69,3831	5	162,2	24,14101	5	104,6	17,7581	5	72,75	13,88661	4	231,2	48,4055	5
5	367,6	66,21275	5	149,4	26,13343	5	50,8	7,242607	5	31,25	7,500133	4	145,2	31,14683	5
6	587	108,7468	5	232,4	37,74183	5	52,2	5,005179	5	20	4,140008	4	170,2	37,81015	5
7	705,6	109,7441	5	289,6	55,74694	5	52,8	4,611415	5	23	7,76666	4	178,6	40,08123	5
10	1002,8	122,532	5	444,6	85,61518	5	36,4	9,499597	5	0	0	4	140,2	35,30937	5
12	1176,8	100,25	5	578	95,18355	5	38	10,62087	5	0	0	4	130	36,5513	5
14	1237,6	138,8994	5	676,2	109,4307	5	39,4	14,30871	5	0	0	4	123,4	34,69758	5
17	1583,4	146,0629	5	840	76,78507	5	60,8	27,09899	5	0	0	4	162,6	58,96373	5
19				855,8	72,16584	5	93	49,35207	5	0	0	4	212,4	79,06236	5
24							207,6	127,8177	5	0	0	4	538,4	219,5123	5
26							275,8	138,3498	5	0	0	4	690,8	249,2466	5
28							359,2	177,874	5	0	0	4	842,6	310,8641	5
31							445	208,4929	5	0	0	4	1173,2	373,2365	5

	33							535,6	255,2269	5	0	0	4											
	35							663,4	318,1881	5	0	0	4											
	38							890,2	402,5237	5	0	0	4											
	40										0	0	4											
	42										0	0	4											
	45										0	0	4											
	47										0	0	4											
	52										0	0	4											
	54										0	0	4											
	59										0	0	4											
	61										0	0	4											

Bảng 28

Số ngày sau khi phân chia ngẫu nhiên	PBS					MORAb-202 1mg/kg					MORAb-202 2,5mg/kg					MORAb-202 5mg/kg					MORAb-003-0285 5mg/kg				
0	19,1	18,2	18,4	18,9	18,8	19,1	18,6	19,3	20,6	18,4	17,8	18,1	18	19,8	16,3	17,6	18,7	16,1	19,7	20,5	17,4	18	17,4	18,8
3	19,6	18,2	18,9	18,9	19,3	19,3	18,4	20,2	20,9	18,6	18,4	19,1	18,6	19,9	16,4	17,5	18,8	15,9	19,9	20,8	17	18,1	16,3	18,5
6	19,7	18,4	18,4	19,1	19,1	19	18,3	20,3	21,3	19	18,5	19,4	18,7	20	16,4	17,5	19,3	16,3	19,6	20,8	17,7	18,2	16,8	18,7
7	19,7	18	18,9	18,8	18,9	18,9	18	20	21,2	18,9	18,7	18,7	18,7	19,7	16,5	17,4	19,4	16,5	19,2	20,6	17,7	18,5	16,8	19

51551

10	19,7	18	19,2	18,5	19,1	18,4	18	20,1	20,9	19	19,3	19,7	18,8	19,8	16,6		17,6	19,4	16,7	20	20,5	18,2	18,6	17,5	20,3
12	19,8	17,7	19,1	18,4	19	18,3	17,8	20,5	20,9	19,5	18,9	20	19,7	20,2	17,2		17,9	19,6	16,9	20,2	20,4	18,3	18,8	18,1	20,4
14	18,8	17,4	18,4	18,2	17,5	17,9	17,7	20,3	21,2	19,9	18,8	19,6	19	19,3	17		17,5	19,3	17	19,2	20	18,2	18,9	18,4	19,7
17	18,8	17,2	18,3	17,5	17,2	17,4	17,7	20,4	20,7	19,2	18,8	19,8	19,7	19,2	17,3		17,9	20	17,3	19,7	19,8	17,9	18,9	18,6	19,5
19						16,7	17,2	19,9	20,7	18,9	18,3	19,8	18,7	19,5	16,8		18,1	20	17,1	20,2	19,7	18	19,3	18,4	19,6
24											18,8	20,2	19,2	19,9	16,9		18,5	20,7	17,5	20,2	20,1	18,5	20	19,1	18,9
26											18,9	19,6	18,9	19,5	16,5		18,3	20,7	17,6	19,7	20,6	18,4	19,9	18,6	19,1
28											18,8	19,6	19,5	19,6	16,6		18,6	21,3	17,6	20,1	20,8	18,5	19,9	18,8	19,5
31											18,9	20,1	19,6	20,7	17		18,6	20,4	17,9	20,9	20,7	18,2	20,9	19,6	19,5
33											18,9	19,8	19,4	21,2	17,6		18,8	19,6	18,2	21,3					
35											19,2	19,7	19,5	20,7	17,4		18,7	20,2	18,1	19,6					
38											19,6	20	19,7	20,6	18		18,8	20,4	19	17,2					
40																	19,4	20,4	18,7	19,3					
42																	19,9	20,4	18,8	20,6					
45																	19,8	21	18,3	21,7					
47																	19,7	20,7	18,3	21,1					
52																	20,2	21,1	18,5	21,9					
54																	20,3	21,4	18,6	22,6					
59																	20	21,6	18,8	21,7					
61																	20,5	22,1	19,2	21,3					

Bảng 29

Số ngày sau khi phân chia ngẫu nhiên	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2,5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-durostatin 5mg/kg		
	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N
0	18,68	0,165239	5	19,2	0,385328	5	18	0,554902	5	18,025	0,689078	4	18,42	0,578982	5
3	18,98	0,234959	5	19,48	0,47393	5	18,48	0,579842	5	18,025	0,769253	4	18,14	0,76975	5
6	18,94	0,245739	5	19,58	0,537015	5	18,6	0,609665	5	18,175	0,694839	4	18,44	0,667108	5
7	18,86	0,268971	5	19,4	0,549488	5	18,46	0,525953	5	18,125	0,628577	4	18,52	0,638721	5
10	18,9	0,29444	5	19,28	0,537015	5	18,84	0,585996	5	18,425	0,68618	4	19,02	0,590063	5
12	18,8	0,352933	5	19,4	0,600608	5	19,2	0,545849	5	18,65	0,678513	4	19,2	0,502108	5
14	18,06	0,267112	5	19,4	0,685817	5	18,74	0,454832	5	18,25	0,523801	4	19,04	0,352368	5
17	17,8	0,320373	5	19,08	0,673649	5	18,96	0,451533	5	18,725	0,592675	4	18,94	0,33497	5
19				18,68	0,764423	5	18,62	0,527655	5	18,85	0,670634	4	19	0,338521	5
24							19	0,579498	5	19,225	0,663539	4	19,32	0,313137	5

51551

26							18,68	0,563279	5	19,075	0,621135	4	19,32	0,41086	5
28							18,82	0,573795	5	19,4	0,728103	4	19,5	0,407939	5
31							19,26	0,636533	5	19,45	0,638148	4	19,78	0,484329	5
33							19,38	0,585826	5	19,475	0,60047	4			
35							19,3	0,536644	5	19,15	0,416401	4			
38							19,58	0,430983	5	18,85	0,584918	4			
40										19,45	0,314619	4			
42										19,925	0,359691	4			
45										20,2	0,665164	4			
47										19,96	0,549137	4			
52										20,425	0,651414	4			
54										20,725	0,758819	4			
59										20,525	0,620064	4			
61										20,775	0,552051	4			

2.6.4. Đánh giá liều thấp nhất có hiệu quả của eribulin trong mô hình hNSCLC NCI-H2110 ở chuột CB17-SCID

Tế bào NSCLC người, H2110, đoạn chuyển 46 được cấy ghép dưới da ở 30 con chuột CB17 SCID (cái, từ 5 đến 6 tuần tuổi, nặng 20 gam). Sau 11 ngày sau khi cấy ghép, chuột được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm. Loại bỏ 5 con chuột có thể tích khối u bị lệch nhất với giá trị trung bình. Thể tích khối u trung bình trong mỗi nhóm vào ngày điều trị (Ngày 0) nằm trong khoảng từ 87,6-89,4 mm^3 (Bảng 32). Chuột đã đánh số được điều trị bởi eribulin (Lot# N1201193) ở liều 0,05, 0,2, 0,8, hoặc 1,6mg/kg, hoặc bằng PBS, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 30). Mỗi nhóm được kết thúc, lần lượt, khi lần đầu tiên quan sát thấy thể tích khối u >2000 mm^3 trong nhóm. Nghiên cứu này được kết thúc vào Ngày 38 (30 ngày sau liều cuối cùng).

Bảng 30. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# Chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	5	PBS	0	q4dx3	Trong tĩnh mạch
2		Eribulin	0,05		
3			0,2		
4	4*		0,8		
5	5		1,6		

Thể tích khối u ở các cá thể chuột được trình bày trong Bảng 31, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 32. Động học phát triển khối u của mỗi nhóm (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được trình bày trong Fig.14, và thể tích khối u của các cá thể chuột, cũng như giá trị trung bình và SEM của nhóm vào Ngày 24 (khi quan sát thấy thể tích khối u >2000mm^3 ở chuột được điều trị bằng PBS), được trình bày trong Fig.15. Eribulin khiến cho giá trị TGI là 50,5% (không quan sát thấy sự làm giảm khối u) ở liều 0,05mg/kg (p = 0,0026 so với nước muối); TGI là ~ 99% ở liều 0,2, 0,8, hoặc 1,6mg/kg (giá trị p là < 0,0001 của 3 nhóm khi so sánh với nhóm nước muối). Liều thấp nhất có hiệu quả gây ra sự giảm khối u là 0,2mg/kg. Tuy nhiên, phần lớn các khối u giảm

kích thước ở các con chuột (3/5 ở nhóm 0,2mg/kg, 4/5 ở nhóm 0,8mg/kg, và 2/5 ở nhóm 1,6mg/kg) sẽ phát triển lại hoặc vẫn đo được trong suốt quá trình nghiên cứu (30 ngày sau liều cuối cùng).

Trọng lượng cơ thể của các cá thể chuột được trình bày trong Bảng 33, và giá trị trung bình và SEM của nhóm được trình bày trong Bảng 34. Động học thay đổi trọng lượng cơ thể của mỗi nhóm (giá trị trung bình và SEM của nhóm) được trình bày trong Fig.16.

Không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể đáng kể ở bất kỳ nhóm chuột điều trị nào so với nhóm đối chứng nước muối. Không quan sát thấy kết quả lâm sàng nào chỉ ra độc tính trong khi điều trị.

Eribulin, ở liều 0,2mg/kg và cao hơn, được sử dụng theo phác đồ q4dX3 trong tĩnh mạch, thể hiện hiệu quả đáng kể lên sự phát triển khối u H2110. Đạt được sự làm giảm khối u. Khi sử dụng liều thấp hơn (0,05mg/kg), không đạt được sự làm giảm khối u. Do đó, liều thấp nhất có hiệu quả được thử nghiệm trong nghiên cứu này là 0,2mg/kg.

Bảng 31

Số ngày sau liều đầu tiên	Tá dược lỏng					eribulin 0,05mg/kg					eribulin 0,2mg/kg					eribulin 0,8mg/kg					eribulin 1,6mg/kg				
0	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	13	17	38	0	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

Bảng 32

Số ngày sau liều đầu tiên	PBS			Eribulin 0,05mg/kg			Eribulin 0,2mg/kg			Eribulin 0,8mg/kg			Eribulin 1,6mg/kg		
	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N
0	89,4	9,34	5	87,6	8,18	5	88,2	12,56	5	88,6	10,02	5	88,4	8,11	5
3	173,8	30,31	5	133,2	19,74	5	64,4	4,45	5	46,6	4,31	5	45,8	1,20	5
5	262,2	56,43	5	201,8	24,37	5	61,8	7,43	5	32,4	2,83	5	25,4	1,72	5
7	380,4	67,55	5	229,2	43,40	5	46	1,79	5	24,4	2,83	5	17,6	3,62	5
10	528,6	85,83	5	317	43,21	5	36,6	3,17	5	16,8	3,07	5	11,6	5,42	5
12	631,8	101,42	5	347,4	70,14	5	22	5,07	5	18	2,34	5	5,4	3,30	5
17	936,4	70,46	5	628,2	48,40	5	2,6	2,60	5	16,2	7,39	5	0	0,00	5
19	1030,8	80,29	5	765,4	84,75	5	28	3,65	5	13	5,50	5	3,8	3,79	5
24	2095,8	195,76	5	1036,8	149,24	5	13,6	3,94	5	13,4	6,26	5	7,4	4,53	5
26							9,8	4,54	5	10,2	2,83	5	5	3,37	5
28							20,8	15,74	5	13,4	3,48	5	3,2	3,19	5
31							11,4	5,77	5	16	5,29	5	5,6	3,55	5

51551

33							12,4	5,53	5	16,6	7,45	5	7,2	5,42	5
35							15,4	7,72	5	17	9,22	5	6,2	3,82	5
38							15,6	8,25	5	18,2	9,25	5	6,2	4,05	5

51551

Bảng 33

Số ngày sau liều đầu tiên	Tá dược lỏng					Eribulin 0,05mg/kg					Eribulin 0,2mg/kg					Eribulin 0,8mg/kg					Eribulin 1,6mg/kg				
0	18,5	16,7	19,1	20,4	19,6	19,1	16,4	18,6	20,1	17,9	18,2	18,5	16,7	19,8	18,9	18,6	17,8	18,4	17,8	18,1	18,2	18,3	19,4	16,3	19,0
3	18,8	16,6	19,6	20,9	20,0	19,4	17,1	18,5	20,4	18,7	18,6	18,5	16,9	19,6	19,8	18,8	18,0	18,4	18,1	19,0	17,8	18,3	20,1	15,8	19,6
5	18,8	16,8	19,3	21,2	20,0	19,4	16,5	18,4	20,4	19,4	18,5	19,1	16,9	20,2	20,1	18,9	18,1	18,5	17,6	18,2	18,1	18,1	19,5	16,0	19,3
7	18,6	16,5	19,3	21,2	19,8	19,4	16,3	18,7	20,3	19,1	18,5	18,5	17,1	19,6	20,7	19,1	18,1	19,0	17,8	19,0	18,1	18,2	19,5	16,3	19,4
8	18,3	16,7	18,8	21,1	19,6	19,3	16,3	18,4	20,4	19,4	18,6	19,1	17,0	19,6	19,9	19,2	18,0	19,0	17,7	18,8	18,0	18,3	20,1	16,2	19,4
9	18,4	16,4	18,5	21,0	19,5	18,8	16,1	18,6	19,9	19,1	18,3	20,0	16,8	19,5	19,5	19,2	17,7	18,5	17,5	18,5	17,4	18,0	19,6	15,8	19,4
10	19,0	17,2	19,2	21,6	20,3	19,7	16,3	19,4	20,5	20,0	18,7	19,4	17,1	20,0	20,1	19,0	17,7	18,9	17,8	19,1	18,1	18,5	21,0	16,1	20,0
12	19,0	15,9	18,5	21,3	19,2	18,8	15,9	18,6	19,6	19,7	18,3	19,3	16,9	19,7	19,9	18,9	17,8	19,0	17,8	19,0	18,0	18,8	20,5	16,3	20,1
17	18,8	15,5	17,8	20,4	18,3	17,5	16,0	18,5	18,0	19,7	19,0	19,3	17,4	20,5	20,0	19,2	18,0	18,8	18,1	19,1	19,0	19,2	21,0	16,4	19,4
19	18,9	15,6	17,2	20,6	18,1	17,8	16,3	18,4	18,0	19,4	19,1	19,0	17,1	21,1	21,0	19,1	17,7	19,4	18,7	19,1	19,1	19,5	21,1	16,3	19,8
24	18,2	15,8	17,4	20,3	18,2	18,8	16,5	18,8	17,4	18,0	19,3	20,2	18,8	21,7	22,0	20,1	18,5	20,3	19,1	20,3	19,4	20,6	21,7	18,1	20,7
26											19,8	20,9	18,6	22,0	20,4	20,3	18,1	19,9	19,3	20,9	19,5	20,7	21,6	18,3	20,6
28											20,1	20,6	18,1	21,5	21,0	20,3	17,8	20,2	19,6	20,6	19,6	20,3	21,2	17,6	21,1
31											18,7	20,1	18,7	22,0	21,2	20,1	18,2	20,3	19,5	20,7	19,8	20,4	21,9	18,1	21,9
33											20,0	20,3	18,4	22,2	21,8	20,2	18,3	21,0	19,2	20,2	20,1	19,9	21,7	17,9	20,7
35											19,5	20,1	18,7	22,1	21,4	20,1	17,8	21,0	19,3	20,3	20,3	18,2	21,8	18,2	20,9
38											19,8	20,8	18,3	21,6	21,6	20,4	18,1	21,4	19,4	21,2	20,0	21,0	21,9	18,4	20,3

Mỗi cột thể hiện một cá thể động vật.

51551

Bảng 34

Số ngày sau liều đầu tiên	PBS			Eribulin 0,05mg/kg			Eribulin 0,2mg/kg			Eribulin 0,8mg/kg			Eribulin 1,6mg/kg		
	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N	Trung bình	Độ lệch chuẩn	N
0	18,9	0,62	5	18,4	0,62	5	18,4	0,51	5	18,1	0,16	5	18,2	0,53	5
3	19,2	0,73	5	18,8	0,54	5	18,7	0,51	5	18,5	0,19	5	18,3	0,75	5
5	19,2	0,73	5	18,8	0,66	5	19,0	0,60	5	18,3	0,22	5	18,2	0,62	5
7	19,1	0,77	5	18,8	0,67	5	18,9	0,60	5	18,6	0,27	5	18,3	0,58	5
10	18,9	0,72	5	18,8	0,69	5	18,8	0,51	5	18,5	0,29	5	18,4	0,67	5
12	18,8	0,76	5	18,5	0,65	5	18,8	0,59	5	18,3	0,30	5	18,0	0,69	5
17	19,5	0,73	5	19,2	0,74	5	19,1	0,55	5	18,5	0,32	5	18,7	0,84	5
19	18,8	0,86	5	18,5	0,68	5	18,8	0,56	5	18,5	0,28	5	18,7	0,77	5
24	18,2	0,79	5	17,9	0,60	5	19,3	0,53	5	18,6	0,24	5	19,0	0,73	5
26							19,5	0,74	5	18,8	0,30	5	19,2	0,79	5
28							20,4	0,63	5	19,7	0,36	5	20,1	0,62	5
31							20,3	0,56	5	19,7	0,48	5	20,1	0,57	5
33							20,3	0,59	5	19,7	0,50	5	20,0	0,66	5
35							20,1	0,66	5	19,8	0,43	5	20,4	0,71	5
38							20,5	0,68	5	19,8	0,47	5	20,1	0,62	5

51551

Ví dụ 2

1. Nguyên liệu và phương pháp

MORAb003-VCP-eribulin (MORAb-202) được tổng hợp bằng cách liên hợp MORAb-003 (kháng-thụ thể folat alpha của người được biến đổi cho phù hợp với người) với hợp chất MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569) được mô tả trong mục 1.1 của Ví dụ 3. Phương pháp liên hợp được mô tả trong mục 1.4.1 của Ví dụ 4.

1.1. Mô hình khối u

Dòng tế bào khối u người sử dụng trong việc đánh giá *in vitro* bổ sung MORAb-202 bao gồm IGROV1 (caxinom buồng trứng người, $FR^{hi\,(+++)}$), OVCAR3 (caxinom buồng trứng người, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (caxinom phổi tế bào không nhỏ của người, $FR^{med(++)}$), A431-A3 (A431 dòng tế bào gốc được chuyển nạp ổn định với mesothelin người, $FR^{lo(+/-)}$), SJSA-1 (sacôm xương của người, $FR^{neg(-)}$), và HL-60 (bệnh bạch cầu ở người, $FR^{neg(-)}$). Tất cả các dòng tế bào được thu trực tiếp từ American Type Culture Collection (ATCC). Đối với các nghiên cứu *in vivo*, mô hình chuột ghép ngoại lai có nguồn gốc từ bệnh nhân bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể, và bệnh ung thư nội mạc tử cung lần lượt được thiết lập và duy trì tại Oncotest GmbH (Freiburg, Germany), Oncodesign (Dijon, France), và EPO Berlin-Buch GmbH (Berlin, Germany).

1.2. Phân tích độc tính tế bào *in vitro*

1.2.1. Thử nghiệm Crystal Violet

Tế bào IGROV1 ($FR^{hi\,(+++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$), và SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$)được nuôi cấy dưới dòng và cấy ở mật độ 10.000 tế bào/lỗ trong trong môi trường phát triển hoàn toàn trong đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ, ủ ở 37°C, 5% CO_2 qua đêm (16 giờ). Đặc trưng, thuốc thử của thử nghiệm được pha loãng dần tỷ lệ 1:4 trong đĩa pha loãng có lỗ sâu dung tích 2mL, bắt đầu từ 1µM (tổng 10 nồng độ pha loãng). 100µL mẫu đã pha loãng được bổ sung vào đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của các mẫu thử nghiệm ở 100nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO_2 trong thêm 48 giờ. Môi trường được bỏ đi, các đĩa được rửa một lần với 200µL DPBS, nhuộm màu với 50µL dung dịch Crystal Violet 0,2% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và sau đó rửa sạch bằng nước vòi. Các đĩa được để khô trong không khí, và Crystal Violet

được hòa tan với 200µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở 570nm. Số liệu được phân tích bằng thuật toán GraphPad Prism 6. Đối với OVCAR3 ($FR^{med(++)}$) và NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), các tế bào được cấy ở mật độ 3.000 tế bào/lỗ và ủ trong 5 ngày với MORAb-202.

1.3. Các nghiên cứu *in vivo*

1.3.1. Mô hình ghép ngoại lai NCI-H2110

Chuẩn bị động vật: Chuột CB17 SCID (cái, 6 tuần tuổi) được nuôi giữ mức 5 con chuột trong mỗi buồng thông gió. Các hạt thức ăn vô khuẩn và nước chai là để sẵn, tự do, cho các con vật. Các con vật được cho thích nghi trong 5-7 ngày trước khi cấy ghép khối u.

Nuôi cấy tế bào: Tế bào NCI-H2110 người được rã đông từ nguồn bảo quản đông lạnh (NB2813-65) và nuôi cấy trong môi trường RPMI-1640 được cung cấp 10% huyết thanh bào thai bò (FBS- fetal bovine serum) trong 5% CO_2 ở 37°C. Sau hai lần chuyển, khi đạt được mức hợp dòng xấp xỉ 70%, các tế bào được thu hoạch bằng cách sử dụng dung dịch phân chia tế bào, rửa hai lần bằng môi trường không có huyết thanh, và đếm.

Cấy ghép khối u: Huyền phù tế bào trong môi trường không có huyết thanh được trộn với matrigel đá lạnh ở tỷ lệ 1:1 (thể tích:thể tích) đến nồng độ cuối là 1,0 x 10^8 tế bào/mL. Mỗi chuột được tiêm dưới da 100µL hỗn hợp ở liều 1,0 x 10^7 tế bào/chuột. Kim tiêm 27G được sử dụng cho tất cả các lần tiêm. Chuột được theo dõi về biểu hiện lâm sàng và khối u được đo bằng thước kẹp kỹ thuật số ba lần mỗi tuần, bắt đầu từ Ngày 3 sau khi cấy ghép. Thể tích khối u (mm^3) được tính toán theo công thức: W (mm) × L (mm) × D (mm) × π/6. Khi khối u đạt mức ~100 mm^3 (trung bình >70 đến ~130 mm^3), các con vật được chia ngẫu nhiên thành 4-5 con trên mỗi nhóm. 5 con vật có thể tích khối u cách xa giá trị trung bình nhất được loại bỏ.

Thiết kế nghiên cứu: Chuột thí nghiệm đã được đánh số được tiêm trong tĩnh mạch 200µL tá dược lỏng hoặc MORAb-202 ở liều 1,0, 2,5, và 5mg/kg, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 35), vào ngày phân chia ngẫu nhiên. Trọng lượng cơ thể được đo trước khi dùng thuốc, và hai lần mỗi tuần trong nghiên cứu. Vào cuối nghiên cứu, trọng lượng cơ thể cuối cùng được đo và ghi chép. Các con vật được được cho chết nhẹ nhàng khi thể tích khối u của từng cá thể vượt quá 2000 mm^3. Tiêu chí chấm dứt sớm trước khi đạt thể tích khối u

tối đa cho phép bao gồm: (1) khối u loét lớn hơn 50% khối u (thể tích:thể tích); (2) liệt; (3) giảm trọng lượng cơ thể >20%; và (4) 50% số con vật trong nhóm đã chấm dứt nghiên cứu. Chuột cho chết nhẹ nhàng bất kỳ hoặc bị chết trong khi nghiên cứu được xử lý theo quy trình cuối cùng mô tả trên.

Bảng 35. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# Chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	5	Tá dược lỏng	0	tiêm một liều lớn	trong tĩnh mạch
2		MORAb-202	1		
3			2,5		
4			5		

1.3.2. Mô hình ghép ngoại lai có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDx)

1.3.2.1. Mô hình PDx bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC): LXFA-737 (Oncotest)

Cấy ghép khối u: Các mảnh khối u NSCLC được lấy từ mô ghép ngoại lai của khối u LXFA-737 đã chuyển đoạn dần ở chuột thiếu hụt miễn dịch. Sau khi lấy ra khỏi chuột cho mô ghép, khối u được cắt thành các mảnh (chiều dài cạnh 3-4mm) và đặt trong nước muối đệm phosphat (PBS) chứa 10% penixillin/streptomyxin. Động vật nhận được được gây mê bằng cách hít isofluran và được cấy dưới da khối u vào một bên hoặc hai bên sườn. Mô ghép ngoại lai của khối u được cấy ghép với một hoặc hai khối u trên mỗi chuột với tỷ lệ nhận < 65%. Trong trường hợp cấy hai bên, một trong các khối u được cấy trước khi phân chia ngẫu nhiên. Các con vật và khối u cấy ghép được theo dõi hàng ngày cho đến khi phát hiện được sự phát triển khối u rắn ở một số lượng đủ con vật. Khi phân chia ngẫu nhiên, thể tích của khối u phát triển được xác định. Động vật đáp ứng đủ tiêu chuẩn phân chia ngẫu nhiên (tức là mang khối u là 50-250mm^3, tốt hơn là 80-200mm^3) được chia thành các nhóm thí nghiệm gồm có 5-6 con trong mỗi nhóm, mục đích là trung vị so sánh được và thể tích khối u trung bình của nhóm xấp xỉ 100-120mm^3. Động vật không được sử dụng

cho thử nghiệm bị được cho chết nhẹ nhàng. Ngày phân chia ngẫu nhiên được đánh dấu là Ngày 0 của thử nghiệm.

Thiết kế nghiên cứu: Chuột thí nghiệm đã được đánh số được tiêm trong tĩnh mạch tá dược lỏng, MORAb-003 ở liều 5mg/kg, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 36), vào ngày phân chia ngẫu nhiên. Trọng lượng cơ thể được đo trước khi dùng thuốc vào mỗi ngày dùng thuốc, và hai lần mỗi tuần trong suốt nghiên cứu. Vào cuối nghiên cứu, trọng lượng cơ thể cuối cùng được đo và ghi chép. Các con vật bị được cho chết nhẹ nhàng khi thể tích khối u của mỗi cá thể vượt quá 2000mm^3.

Bảng 36. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# Chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	6	Tá dược lỏng	0	tiêm một liều lớn	trong tĩnh mạch
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

1.3.2.2. Mô hình PDx bệnh ung thư vú âm tính với ba thụ thể (TNBC): OD-BRE-0631 (Oncodesign)

Cấy ghép khối u: Chín con chuột cái thiếu hụt miễn dịch SWISS được tiêm dưới da vào sườn phải các mảnh khối u TNBC có nguồn gốc từ bệnh nhân. Chuột mang khối u được cho chết nhẹ nhàng khi thể tích khối u đạt mức 500-1000mm^3, và khối u được phẫu thuật cắt bỏ. Các mảnh khối u (30-50 mg) được được cấy ghép đúng vị trí vào trong phần khối mỡ sau bánh chè thuộc vú của 34 con chuột cái thiếu hụt miễn dịch SWISS từ 24 đến 72 giờ sau khi chiếu xạ toàn thân với nguồn tia gamma (2 Gy, 60Co, BioMEP, France). Khi khối u đạt thể tích trung bình là 200-300 mm^3, 24 trong số 34 tổng số con vật được phân chia ngẫu nhiên thành hai nhóm (n=12 con vật) theo thể tích khối u riêng của chúng bằng phần mềm Vivo Manager® (Biosystemes, Couternon, France). Kiểm tra thống kê (phân tích phương sai) được tiến hành để đánh giá độ đồng nhất giữa các nhóm. Ngày phân chia ngẫu nhiên được ký hiệu là Ngày 0 của thử nghiệm.

Thiết kế nghiên cứu: Vào Ngày 1 (một ngày sau khi phân chia ngẫu nhiên và hai ngày trước khi điều trị), 3 chuột từ mỗi nhóm trong số hai nhóm không được điều trị được kết thúc nghiên cứu. Các con chuột thí nghiệm còn lại được tiêm trong tĩnh mạch tá dược lỏng hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 37), vào Ngày 3. Vào Ngày 8 (năm ngày sau khi điều trị), 3 chuột từ mỗi nhóm trong số hai nhóm được điều trị được kết thúc nghiên cứu. Ngay sau khi kết thúc nghiên cứu, mô khối u được thu thập và cố định trong formalin được đệm trung hòa 4% trong 24 đến 48 giờ, và sau đó cố định mô trong parafin (Histosec®, Merck, Darmstadt, Germany). Các mẫu đã cố định mô trong parafin được bảo quản ở nhiệt độ phòng để phân tích mô hóa học miễn dịch sau đó.

Bảng 37. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# Chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
1	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	Tá dược lỏng	0	tiêm một liều lớn	trong tĩnh mạch
2	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	MORAb-202	5	tiêm một liều lớn	trong tĩnh mạch

Phân tích mô hóa học miễn dịch (IHC): Tiến hành nhuộm màu IHC mô khối u đã được cố định formalin, cố định mô trong paraffin để đánh giá cả sự chiếm MORAb-202 và sự biểu hiện nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư. Trước khi nhuộm màu, phiến mô được khử sáp và kháng nguyên được thu hồi trong môđun PT Lab Vision™ (Thermo Scientific), trong đệm xitrat (độ pH = 6,0) làm ấm trước đến 85°C, sử dụng chương trình sau: làm ấm đến 97°C; ủ ở 97°C trong 30 phút; và làm mát đến 60°C. Phiến mô sau đó được chuyển vào nước cất hai lần ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Tiến hành nhuộm trong thiết bị Lab Vision™ Autostainer 360 (Thermo Scientific). Ngắn gọn, phiến mô được rửa hai lần trong 1X nước muối đệm Tris/Tween-20 (TBST) trong 6 phút/lần rửa. Các tiêu bản mô sau đó được ủ trong đệm phong bế (300µL) (10% huyết thanh dê (Jackson Immunoresearch Laboratory Inc., Số danh mục 005-000-121) được pha loãng trong 3% albumin huyết thanh bò (BSA) - nước muối đệm phosphat (PBS)) trong 1 giờ, ủ trong kháng thể đã liên hợp (200µL) (Bảng 38) trong 1 giờ, và rửa năm lần trong 1X TBST trong

6 phút/lần rửa. Phiến mô được nhuộm màu đối nghịch bằng DAPI trong môi trường gắn, và phiến mô đã được đậy bảo vệ được để cho cứng trong 30 phút. Phiến mô được xử lý trên máy quét Panoramic MIDI (3DHISTECH), và các ảnh IHC được phân tích bằng phần mềm Halo (Indica Labs). Các kháng thể sử dụng trong phân tích này chọn đích α-actin cơ trơn (SMA), là chất đánh dấu đặc hiệu cho nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư, và IgG người, là chất có thể phát hiện sự có mặt của MORAb-202.

Bảng 38. Kháng thể IHC

Kháng thể	Được liên hợp	Nhà cung cấp	Số catalog	Lô	Dung dịch bảo quản	Dung dịch thao tác
α-actin cơ trơn (SMA)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2,0mg/mL	5,0 µg/mL
IgG1chuột, isotyp đối chứng κ	AF488	Biolegend	400129	B128493	0,2mg/mL	1:1000
IgG dê kháng-người	AF555	Mol. Probes	A21433	1709318	n/a	1:200

1.3.2.3. Mô hình PDx bệnh ung thư nội mạc tử cung: Endo-12961 và Endo-10590 (EPO Berlin)

Cấy ghép khối u: Các mảnh khối u nội mạc tử cung của bệnh ung thư vú được thu lấy từ mô ghép ngoại lai của khối u Endo-12961 và Endo-10590 được chuyển đoạn lần lượt, và được lưu trữ ở dạng bảo quản trong nitơ lỏng. Các mảnh khối u được cấy ghép dưới da vào sườn trái 40 NMRI nu/nu chuột cái, và thể tích khối u được theo dõi. Chuột có thể tích khối u nằm trong khoảng từ 100-160 mm^3 được phân chia ngẫu nhiên vào một trong bốn nhóm (Nhóm A-D, Bảng 39). Chuột đi kèm để phân chia ngẫu nhiên được đưa

vào nhóm thứ năm (Nhóm E, Bảng 39). Mỗi nhóm gồm có 8 con vật. Ngày phân chia ngẫu nhiên được ký hiệu là Ngày 0 của thử nghiệm.

Thiết kế nghiên cứu: Chuột thí nghiệm đã được đánh số được tiêm trong tĩnh mạch PBS, eribulin ở liều 3,2mg/kg hoặc 0,1mg/kg, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg, theo thiết kế nghiên cứu (Bảng 39), vào ngày phân chia ngẫu nhiên. Sự phát triển khối u được đánh giá bằng cách đo hai đường kính vuông góc hai lần mỗi tuần, và thể tích khối u (TV), thể tích tương đối của khối u (RTV) và chỉ số điều trị/đối chứng (T/C) được tính toán. Trọng lượng cơ thể cũng được đánh giá hai lần mỗi tuần là một thông số về độc tính, với việc tính trọng lượng cơ thể trong mỗi nhóm và sự thay đổi trọng lượng cơ thể (BWC) so với khi bắt đầu điều trị. Động vật bị giết khi các thể tích khối u riêng biệt vượt quá 1 cm^3, hoặc vào cuối nghiên cứu.

Bảng 39. Thiết kế nghiên cứu

Nhóm	# Chuột	Điều trị	Liều (mg/kg)	Phác đồ	Đường dùng
A	8	PBS	0	tiêm một liều lớn	trong tĩnh mạch
B		Eribulin	3,2		
C		Eribulin	0,1		
D		MORAb-202	5		
E		n/a	n/a	n/a	n/a

1.4. Cơ chế tác dụng

1.4.1. Hệ nuôi cấy đồng thời ba chiều (3D) trong zPredicta

Tất cả thử nghiệm nuôi cấy đồng thời 3D chứa tế bào mầm trung mô (MSC-mesenchymal stem cell) được tiến hành trong zPredicta, sử dụng các hệ nền ngoại bào 3D đặc hiệu với cơ quan như rStomach™. Tế bào mầm trung mô tủy xương (BM-MSCs) trong rStomach™ được nuôi cấy đồng thời với dòng tế bào ung thư dạ dày Nuc Red Light MKN-74 làm bốn bản lặp trong định dạng 48 lỗ trong 12 ngày. Tế bào MKN-74 trước đây đã thể hiện là biểu hiện thụ thể folat alpha (FR) đủ đối với việc điều trị MORAb-202 để gây ra sự diệt tế bào theo chương trình. Trước khi nuôi cấy, các BM-MSC được đánh giá về sự biểu

hiện kháng nguyên đích và về chất đánh dấu sự biệt hóa MSC (Bảng 40) bằng phương pháp đo dòng tế bào.

Bảng 40. Chất đánh dấu cho sự biệt hóa MSC

Nhóm tế bào	**Chất đánh dấu**
Tế bào mầm trung mô (MSC)	Stro-1^+/$CD105^+$
Tiền tế bào tạo mỡ	$CD34^+$/$CD31^-$
Tế bào tạo mỡ	Mỡ đỏ
Nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư (CAF)	actin cơ trơn alpha (αSMA), vimentin
Tiền tế bào quanh mạch/tế bào quanh mạch	$NG2^+$, $CD13^+$, $CD146^+$
Tất cả	FRA

Sản phẩm nuôi cấy rStomach™ được điều trị bởi hoặc MORAb-202, kháng thể không liên hợp MORAb-003, eribulin, hoặc đối chứng, như mô tả trong Bảng 41. Các đối chứng bao gồm sản phẩm nuôi cấy không được điều trị và điều trị bằng tá dược lỏng (PBS và DMSO). Sự biệt hóa MSC được theo dõi bằng phương pháp hiển vi quang học. Khi quan sát thấy sự biệt hóa khả kiến, các mẫu được thu hoạch để nhuộm màu và phân tích đếm tế bào dòng.

Bảng 41. Cách các điều trị sản phẩm nuôi cấy đồng thời

Chất	Nồng độ thao tác
MORAb-202	10 nM
MORAb-003 (kháng thể không liên hợp)	10 nM
Eribulin	1,7nM và 0,2nM
PBS	
DMSO	0,1%
Đối chứng không được điều trị	

1.4.2. Phân tích khoảng thời gian hiệu quả MORAb-202 trên nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư

Chuột mang khối u ghép ngoại lai H2110 dưới da được chuẩn bị như mô tả trong mục 1.3.1. Các mẫu khối u được thu hoạch vào Ngày 0, 3, 5, 7, và 9 sau khi sử dụng tá dược lỏng, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg. Các mẫu khối u thu thập được được xử lý trên phiến mô, và sự biểu hiện nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư được phân tích bằng IHC như mô tả trong mục 1.3.2.2.

2. Kết quả

2.1. Phân tích độc tính tế bào *in vitro*

2.1.1. Độc tính tế bào của MORAb-202

Hiệu lực *in vitro* của MORAb-202 được đánh giá bằng thử nghiệm Crystal Violet, như nêu chi tiết trong mục 1.2.1. Việc sàng lọc được tiến hành trên tế bào IGROV1 ($FR^{hi(+++)}$), OVCAR3 ($FR^{med(++)}$), NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$), và SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$). Các kết quả của sàng lọc này được nêu trong Fig.17 và Bảng 42.

Bảng 42. Sàng lọc độc tính tế bào (EC_{50}) của MORAb-202 trên các dòng tế bào khối u khác nhau

EC_{50} (nM)				
IGROV I (FR+++)	OVCAR3 (FR++)	NCI-H2110 (FR++)	A431-A3 (FR+/-)	SJSA-1 (FR-)
0,01	0,16	0,74	23	> 100

MORAb-202 biểu hiện độc tính tế bào phụ thuộc vào mức biểu hiện thụ thể folat alpha – chống lại dòng tế bào khối u, và mức diệt sai đích thấp. MORAb-202 chứng minh mức hiệu lực cao (0,01nM) trên tế bào IGROV1, với độc tính tế bào yếu (> 100nM) trên tế bào SJSA-1 âm tính với thụ thể folat alpha. Quan sát hiệu lực trung bình ở tế bào OVCAR3 và NCI-H2110 (0,16nM và 0,74nM).

2.2. Các nghiên cứu *in vivo*

2.2.1. Hiệu lực của MORAb-202 trong mô hình ghép ngoại lai NC1-H2110

Chuột mang khối u H2110 dưới da được tiêm trong tĩnh mạch tá dược lỏng hoặc MORAb-202 ở liều 1, 2,5, và 5mg/kg. Quan sát thấy sự làm giảm khối u đáng kể sau liều đơn MORAb-202 ở liều 5mg/kg (Fig.18 và Bảng 43). Sử dụng mô hình ghép ngoại lai này với mức biểu hiện thụ thể folat alpha cao và các lần sử dụng liều đơn, cửa sổ điều trị của MORAb-202 được thấy là 1mg/kg để kìm hãm sự phát triển khối u (với bệnh ổn định) và ≥ 2,5mg/kg để làm giảm khối u. Trong nghiên cứu này, MORAb-202 ở liều 2,5mg/kg gây ra đáp ứng một phần, và MORAb-202 ở liều 5mg/kg gây ra đáp ứng hoàn toàn.

Bảng 43. Hoạt tính chống-khối u của MORAb-202 ở mô hình ghép ngoại lai NC1-H2110

	Thể tích khối u, mm^3 (ức chế phát triển khối u, %)	
	Ngày 17	Ngày 31
Tá dược lỏng (n=5)	1583,4 ± 146,1 (100)	n/a
MORAb-202, 1mg/kg, liều đơn (n=5)	840,0 ± 76,8 (53,1)	n/a
MORAb-202, 2,5mg/kg, liều đơn (n=5)	60,8 ± 27,1 (3,8)	1173,2 ± 373,2
MORAb-202, 5mg/kg, liều đơn (n=4)	0,0 (0,0)	0 (0,0)

2.2.2. Hiệu lực của MORAb-202 trong mô hình PDx NSCLC: LXFA-737

Chuột mang khối u NSCLC PDx dưới da được tiêm trong tĩnh mạch tá dược lỏng, MORAb-003 ở liều 5mg/kg, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg. Liều đơn của MORAb-202 (5mg/kg) gây ra sự làm giảm khối u đáng kể trong mô hình này, ngược với liều đơn kháng thể không liên hợp MORAb-003 (5mg/kg), không chứng minh hoạt tính chống-khối u đáng kể (Fig.19A). Năm trong số tổng cộng sáu con chuột được điều trị bởi MORAb-202 được cho là không có khối u vào Ngày 32 của nghiên cứu (Bảng 44), và bốn con vẫn không có khối u cho đến Ngày 74 (ngày kết thúc nghiên cứu). Ngoài ra, không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể đáng kể ở nhóm điều trị so với nhóm đối chứng được điều trị bằng tá dược lỏng, chỉ ra là không có độc tính trong việc điều trị (Fig.19B).

Bảng 44. Hoạt tính chống-khối u của MORAb-202 trong mô hình NSCLC PDx

	Thể tích khối u, mm^3 (ức chế phát triển khối u, %)		
	Ngày 21	Ngày 32	Ngày 74
Tá dược lỏng (n=6)	1004,5 (100)	1561,3 (100)	n/a

MORAb-003, 5mg/kg, liều đơn (n=6)	860,7 (85,7)	1572,1 (100,7)	n/a
MORAb-202, 5mg/kg, liều đơn (n=6)	22,9 (2,3)	4,7 (0,3)	418,3 (4/6 không có khối u)

2.2.3. Hiệu lực tương đối của MORAb-202 và eribulin trong mô hình PDx bệnh ung thư nội mạc tử cung : Endo-12961 và Endo-10590

Mô ghép ngoại lai Endo-12961 và Endo-10590 biểu hiện mức độ cao thụ thể folat alpha. Chuột mang khối u bệnh ung thư nội mạc tử cung PDx dưới da được tiêm trong tĩnh mạch PBS, eribulin ở liều 3,2mg/kg hoặc 0,1mg/kg, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg. Liều dung nạp tối đa (MTD) của eribulin trong mô hình này là 3,2mg/kg, trong khi đó 0,1mg/kg là tương đương với liều eribulin cung cấp bởi MORAb-202 sử dụng ở liều 5mg/kg. Trong suốt thời gian đầu của nghiên cứu, quan sát thấy hoạt tính chống-khối u đáng kể sau khi điều trị bằng MORAb-202 (5mg/kg) và liều MTD của eribulin (3,2mg/kg) ở cả hai mô hình động vật, trong khi đó không quan sát thấy hoạt tính chống-khối u đáng kể sau khi điều trị bằng eribulin ở liều 0,1mg/kg (Fig.20A và 20C). Tuy nhiên, các khối u giảm kích thước ở chuột được điều trị bởi eribulin ở liều 3,2mg/kg bắt đầu phát triển trở lại trong quá trình nghiên cứu, trong khi đó không ghi chép thấy sự phát triển khối u trở lại đáng kể ở chuột được điều trị bởi MORAb-202. Trong nghiên cứu này, MORAb-202 được thấy là có hiệu lực đáng kể hơn so với eribulin. Việc điều trị bằng eribulin cũng ảnh hưởng tạm thời đến trọng lượng cơ thể ở tuần đầu tiên sau khi điều trị (Fig. 20B và 20D). Ngược lại, không quan sát thấy sự giảm trọng lượng cơ thể ở động vật được điều trị bởi MORAb-202.

2.3. Cơ chế tác dụng của MORAb-202

2.3.1. IHC và hiệu lực của MORAb-202 trong mô hình PDx TNBC: OD-BRE-0631

Chuột mang khối u TNBC PDx dưới da được tiêm trong tĩnh mạch tá dược lỏng hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg. Mô khối u được thu thập từ chuột trong mỗi nhóm trước

khi điều trị (Ngày 1) và sau khi điều trị (Ngày 8). Phân tích IHC của được thu thập mô khối u bộc lộ rằng MORAb-202 chiếm lấy tế bào khối u biểu hiện thụ thể folat alpha năm ngày sau khi điều trị (Ngày 8), sau khi sử dụng vào Ngày 3 ở dạng liều đơn (5mg/kg). Sự chiếm tế bào này được đánh giá bằng kháng thể kháng-IgG người (Fig.21A). Việc điều trị MORAb-202 cũng thể hiện là làm nhỏ lại cấu trúc của nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư, như thể hiện bởi nhuộm màu IHC với kháng thể kháng-α-actin cơ trơn (SMA)-FITC (Fig.21B). Về mặt hiệu lực, việc điều trị MORAb-202 làm giảm khối u tối đa vào thời điểm 11 ngày sau khi điều trị, được đo bằng thể tích tương đối của khối u (RTV) là 0,62 (Fig.21C).

2.3.2. Hiệu quả của MORAb-202, MORAb-003, và eribulin lên hệ nuôi cấy đồng thời 3D

Tế bào mầm trung mô tủy xương (BM-MSCs) trong rStomach™ (zPredicta) được nuôi cấy đồng thời với dòng tế bào ung thư dạ dày MKN-74 trong 12 ngày. Trước khi nuôi cấy, các BM-MSC được đánh giá về mức biểu hiện thụ thể folat alpha và về chất đánh dấu của sự biệt hóa MSC bằng phương pháp đo dòng tế bào. Sản phẩm nuôi cấy rStomach™ sau đó được điều trị bởi hoặc MORAb-202, kháng thể không liên hợp MORAb-003, eribulin, hoặc đối chứng. Khi quan sát thấy sự biệt hóa MSC khả kiến bằng hiển vi quang học, các mẫu được thu hoạch để nhuộm màu và phân tích đếm tế bào dòng. Các kết quả của nghiên cứu này được trình bày trong Fig.22.

Tổng thời gian điều trị 7 ngày, cùng với sự bổ sung điều trị trong giai đoạn này, là đủ để tạo ra hiệu quả đo được trên sự biệt hóa BM-MSC người trong sản phẩm nuôi cấy với tế bào MKN-74. So với đối chứng tá dược lỏng, việc điều trị bằng MORAb-202 (10 nM) gây ra sự tăng MSC và nhóm tế bào tạo mỡ, và sự giảm nhóm tế bào quanh mạch (Bảng 45). Các số liệu này chỉ ra rằng MORAb-202 có thể có hiệu quả đáng kể lên vi môi trường của khối u.

Bảng 45. Hiệu quả của MORAb-202, MORAb-003, và eribulin trên hệ nuôi cấy đồng thời 3D

	Phần trăm tế bào sống		
Điều trị	**MSC**	**Tế bào tạo mỡ**	**Tế bào quanh mạch**
PBS	32,3%	0,72%	14,6%
MORAb-202	43,7%	22,6%	11,4%
MORAb-003	37,1%	0,69%	24,0%
Eribulin	29,9%	2,68%	25,8%

2.3.3. Phân tích khoảng thời gian hiệu lực của MORAb-202 trên nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư

Các mẫu khối u được thu hoạch từ chuột mang khối u ghép ngoại lai H2110 dưới da ở các Ngày 0, 3, 5, 7, và 9 sau khi sử dụng tá dược lỏng, hoặc MORAb-202 ở liều 5mg/kg. Các mẫu khối u thu thập được được xử lý trên phiến mô, và sự biểu hiện nguyên bào sợi liên quan đến bệnh ung thư (CAF) được phân tích bằng IHC. Cấu trúc mạng CAF, như đánh giá được và định lượng bằng cách nhuộm màu với kháng thể kháng-α-actin cơ trơn (SMA)-FITC, là nổi bật vào Ngày 3 và Ngày 5, sau khi sử dụng liều đơn MORAb-202 ở liều 5mg/kg (Fig.23). Tuy nhiên, vào Ngày 7, phần lớn cấu trúc này bị làm nhỏ lại đáng kể.

Ví dụ 3

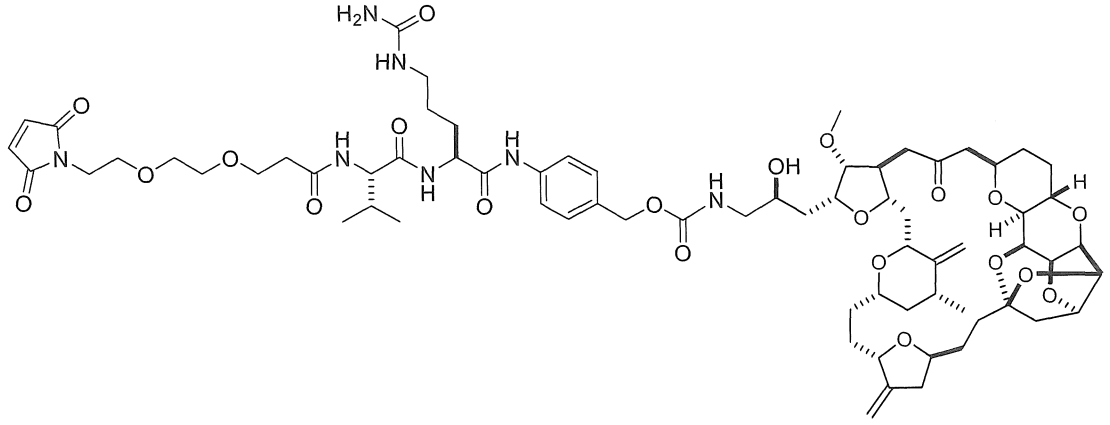
1. Nguyên liệu và phương pháp

Các hợp chất eribulin có thể liên hợp có cấu trúc được trình bày trong Bảng 46 được tổng hợp theo các quy trình sau, và sử dụng trong việc điều chế ADC (Ví dụ 4).

Tất cả các dung môi sử dụng trong phản ứng tổng hợp là ở mức độ khan (EMD Millipore). Tất cả các dung môi sử dụng để thao tác hoặc tinh chế là ở mức độ sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (EMD Millipore). Trừ khi được nêu khác, tất cả các hóa chất là có sẵn trên thị trường. Phép sắc ký cột được tiến hành bằng cách sử dụng Biotage® SP4. Việc loại dung môi được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị bốc hơi kiểu quay (Büchi

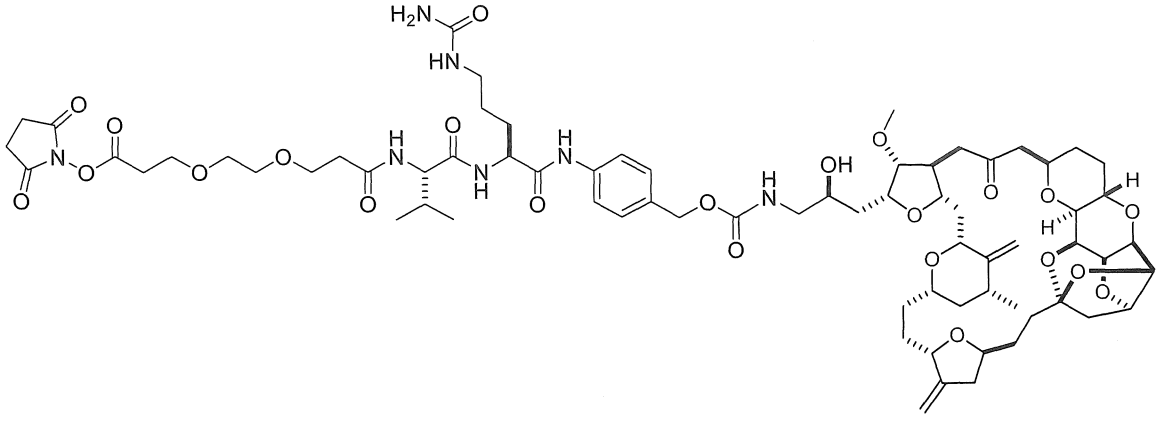
Labortechik AG), hoặc thiết bị bốc hơi ly tâm (Genevac, SP scientific). Sắc ký lỏng điều chế-đo phổ khối lượng (LC/MS) được tiến hành bằng cách sử dụng hệ Waters AutoPurification và cột XTerra MS C18 (5µm, 19mm x 100mm) trong điều kiện pha động axit. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được thực hiện bằng cách sử dụng đơtơri hóa cloroform ($CDCl_3$) trừ khi được nêu khác, và được ghi lại ở 400 hoặc 500 MHz bằng thiết bị Varian (Agilent Technologies). Phổ khối lượng được thực hiện bằng cách sử dụng LC/MS siêu hiệu năng Waters Acquity. Như sử dụng trong đây, thuật ngữ "trơ hóa" để chỉ việc thay thế không khí trong bình protein (ví dụ, bình phản ứng, lọ, bình phản ứng thủy tinh) bằng một khí trơ, về cơ bản không chứa ẩm, như nitơ hoặc argon. Tính đa bội được chỉ rõ bằng các cách viết tắt sau: s=vạch đơn, d=vạch đôi, t=vạch ba, q=vạch bốn, quint=vạch năm, sxt=vạch sáu, m=nhiều vạch, dd=vạch đôi của vạch đôi, ddd=vạch đôi của vạch đôi của vạch đôi, dt=vạch đôi của vạch ba, br s=một vạch đơn rộng.

Bảng 46. Các hợp chất eribulin liên hợp được



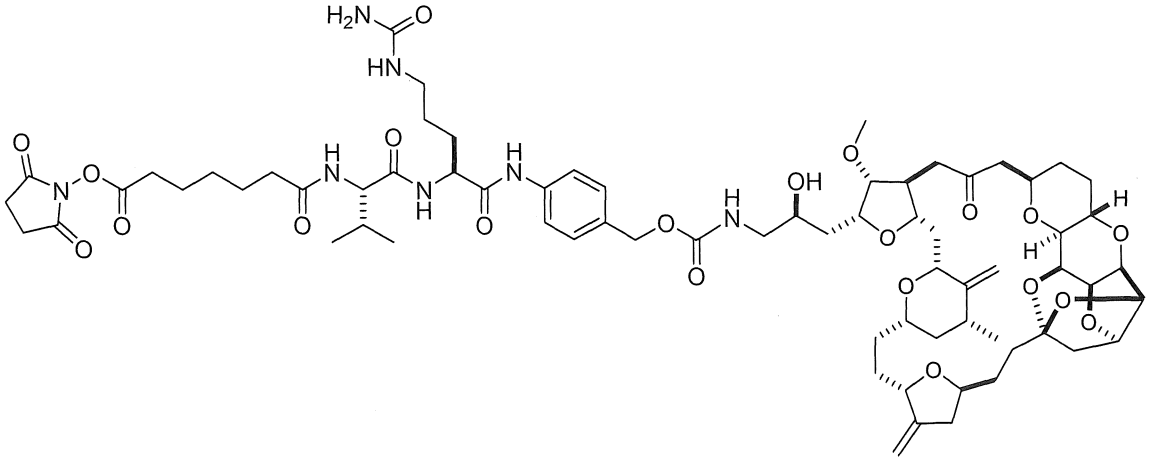
MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001159569)



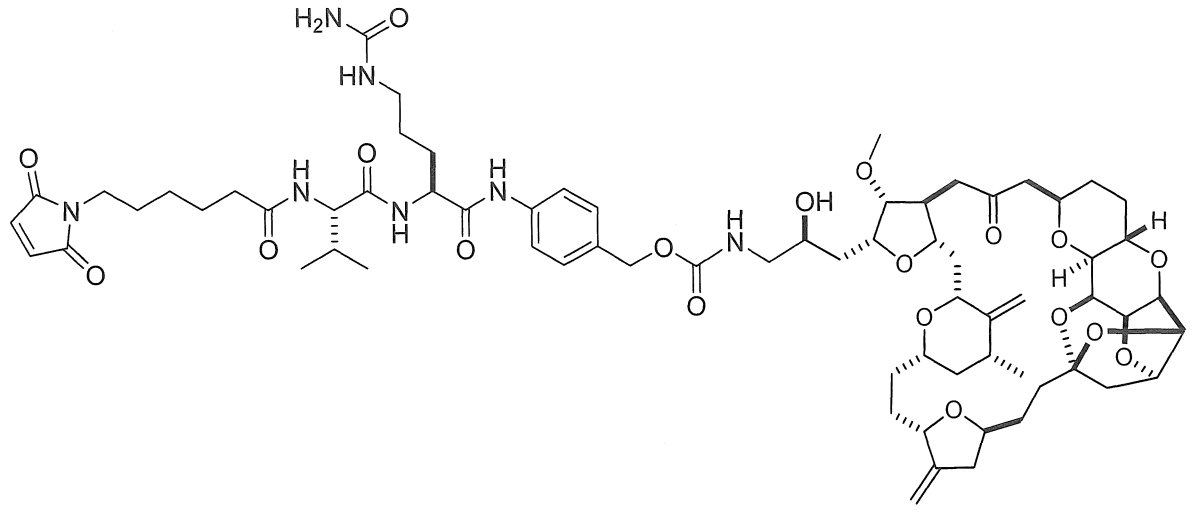
NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001236940)



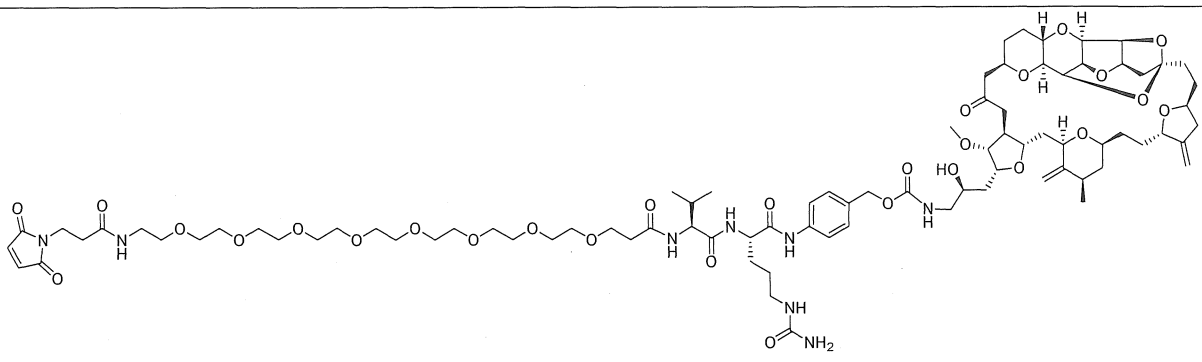
NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001236941)



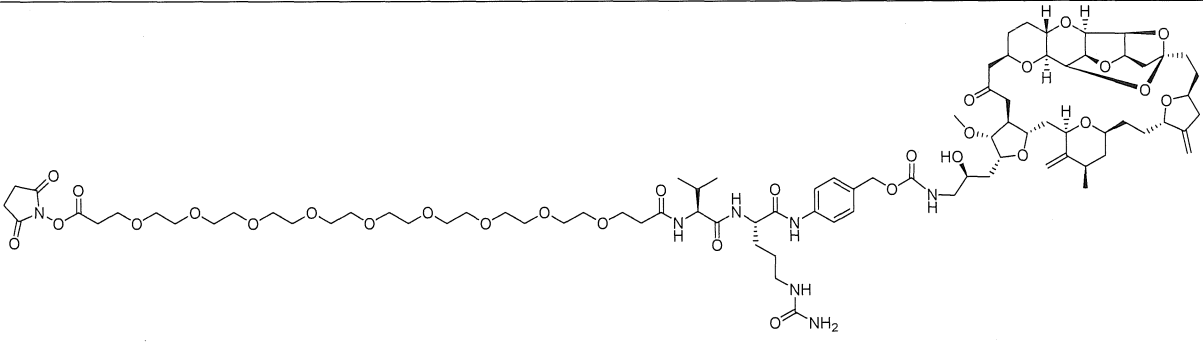
Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001235638)



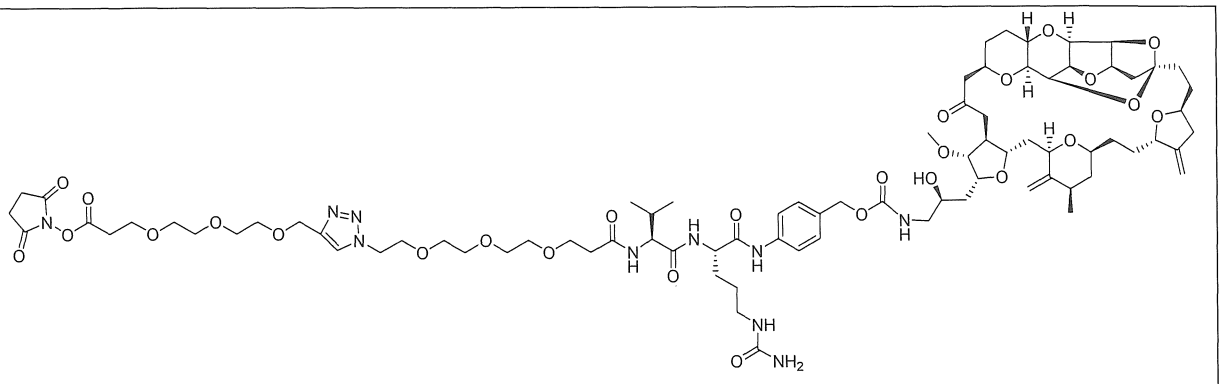
Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001242287)



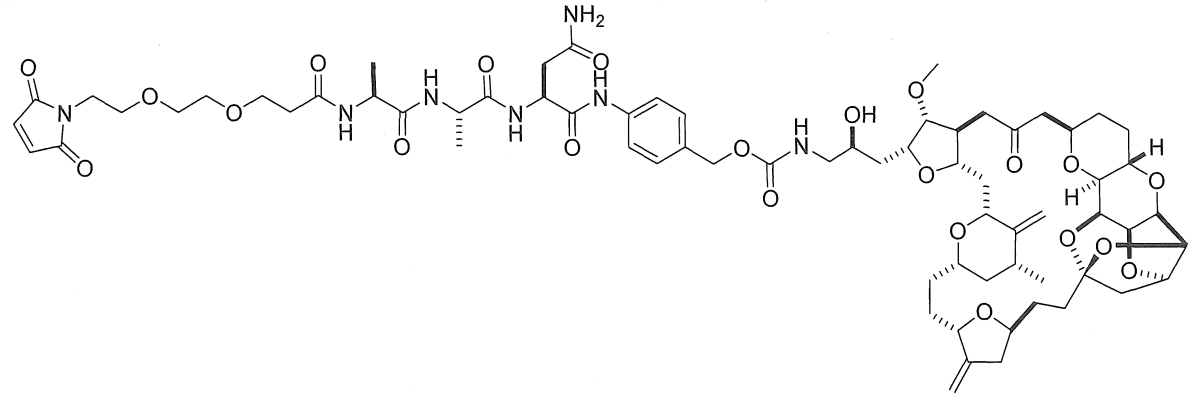
NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001242288)



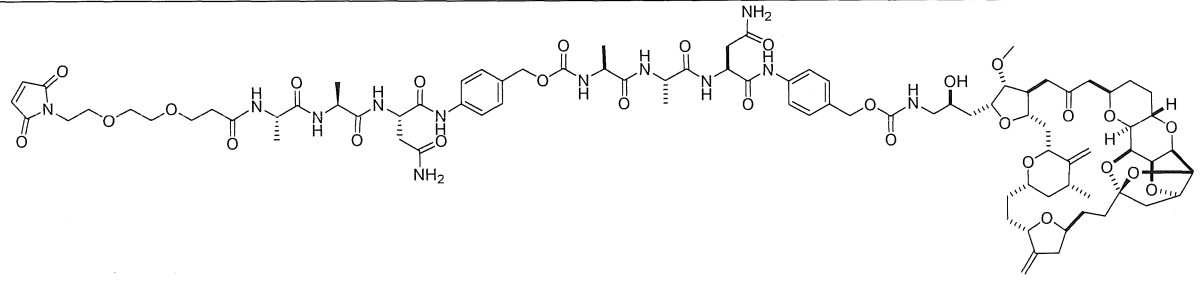
NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin

(ER-001243700)



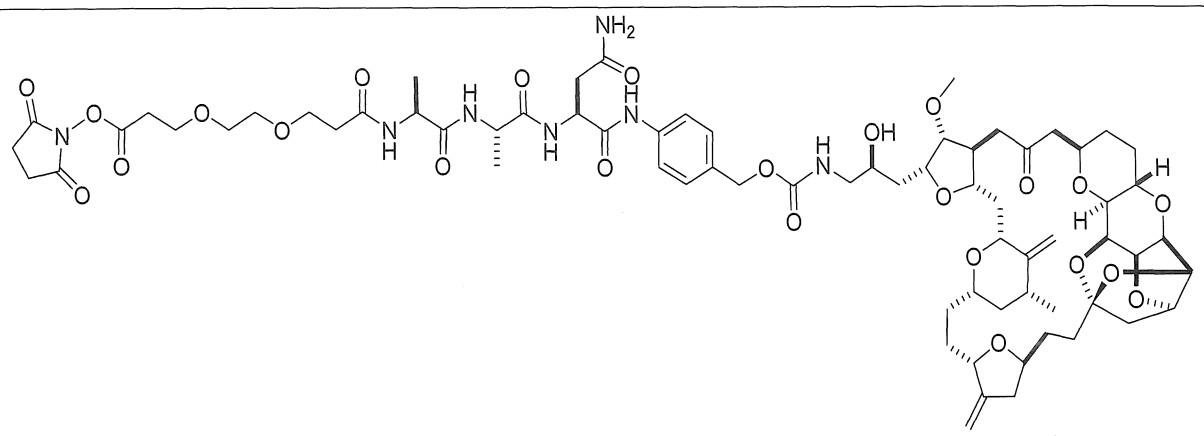
Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin

(ER-001231679)



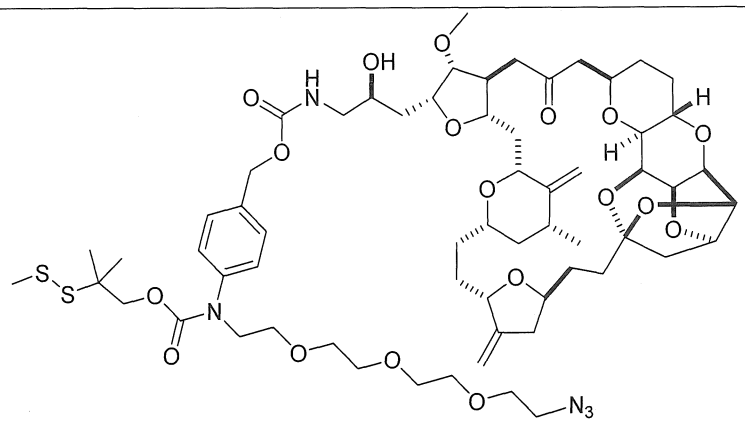
Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulin

(ER-001231690)



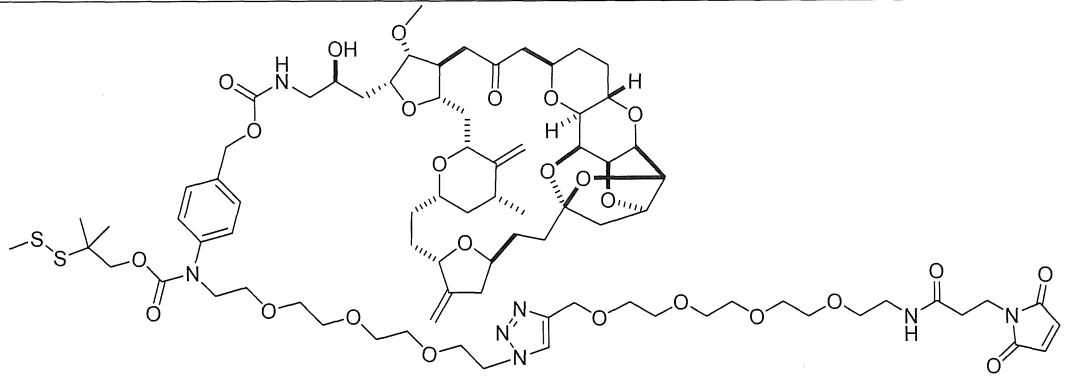
NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin

(ER-001231691)



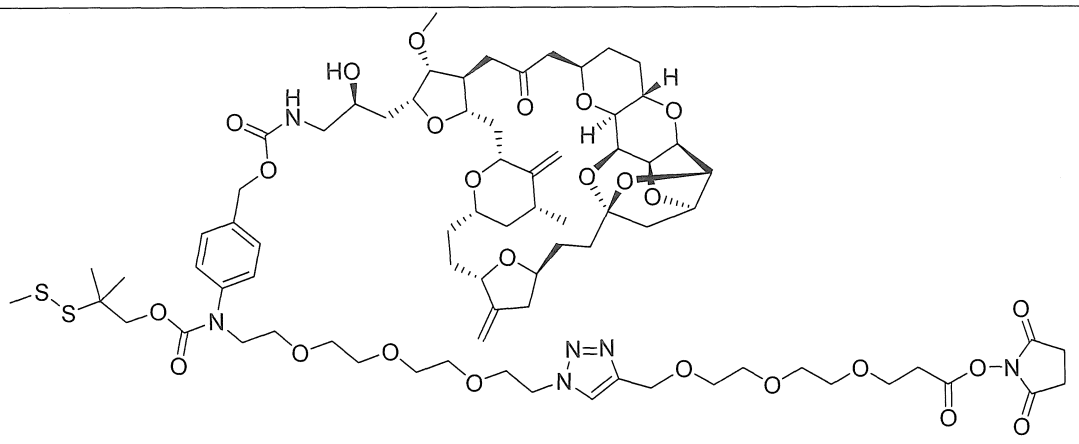
Azit-PEG3-disulfua-PAB-eribulin

(ER-001237508)



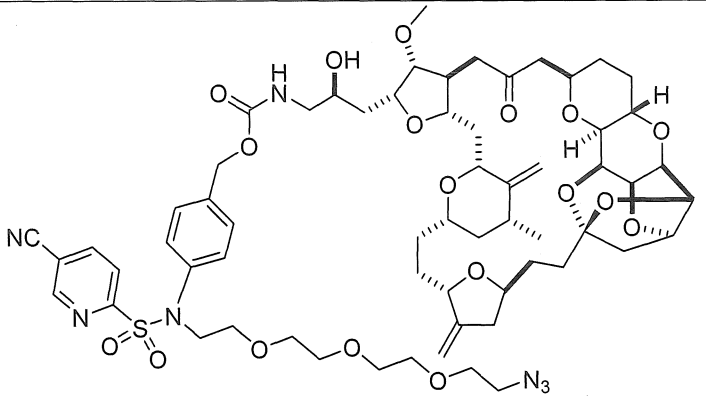
Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin

(ER-001237504)



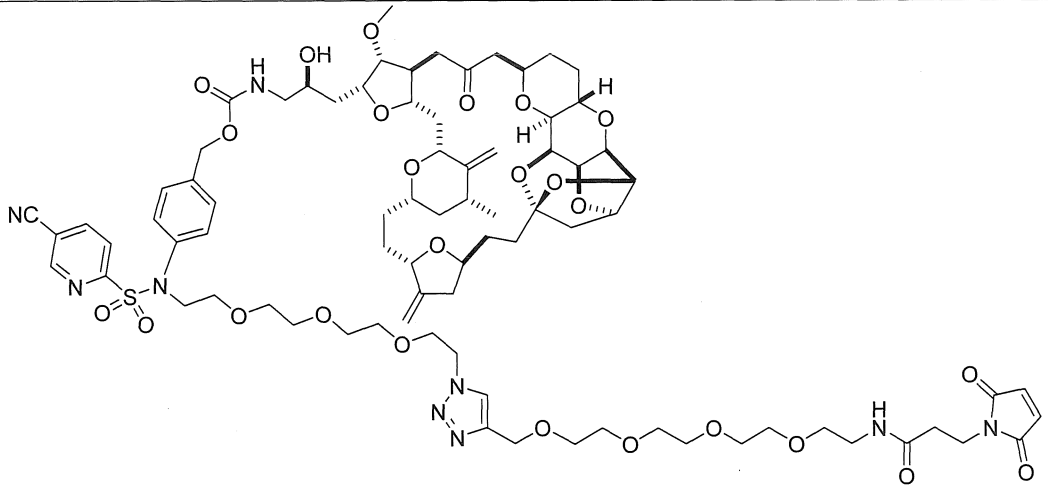
NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin

(ER-001244129)



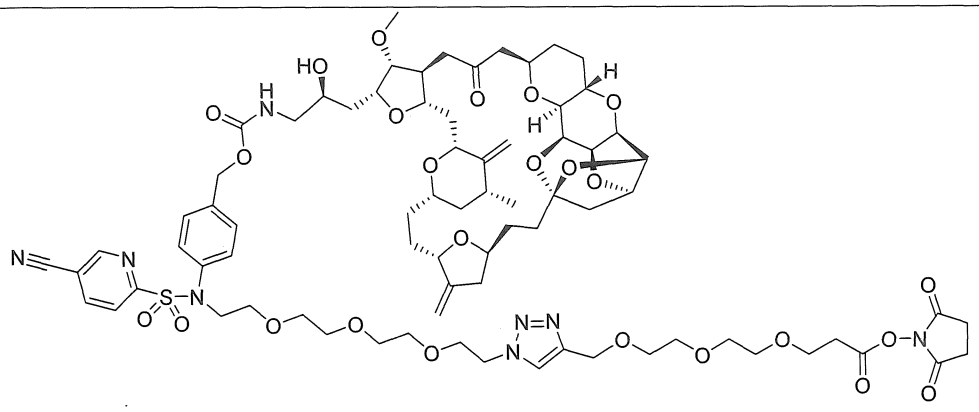
Azit-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin

(ER-001138856)



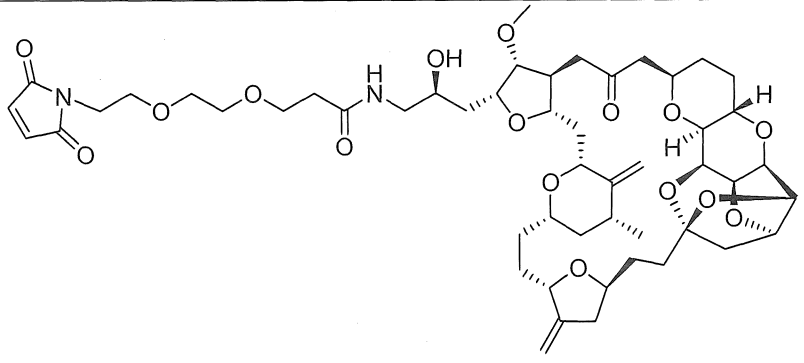
Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin

(ER-001237505)

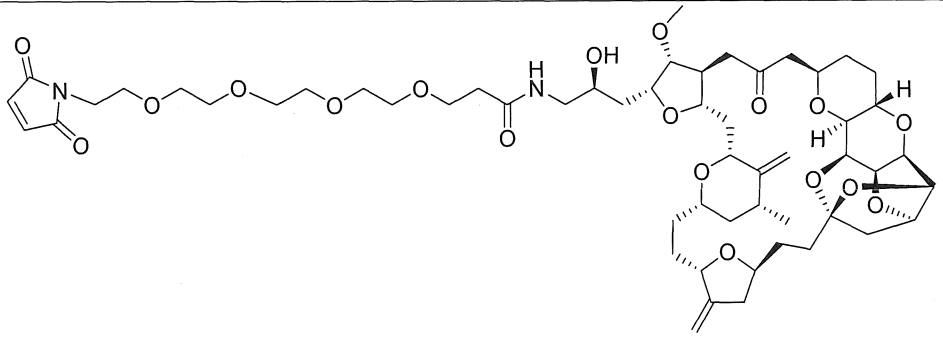


NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin

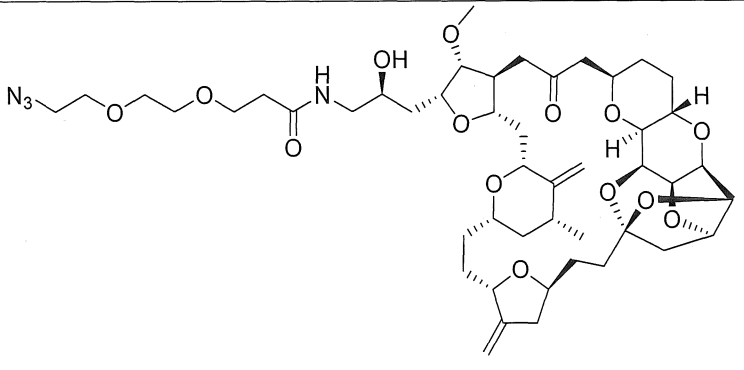
(ER-001244623)



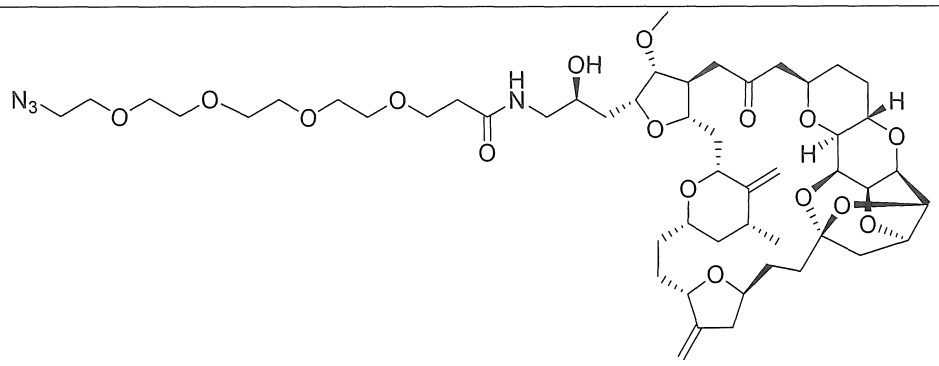
Mal-PEG2-eribulin



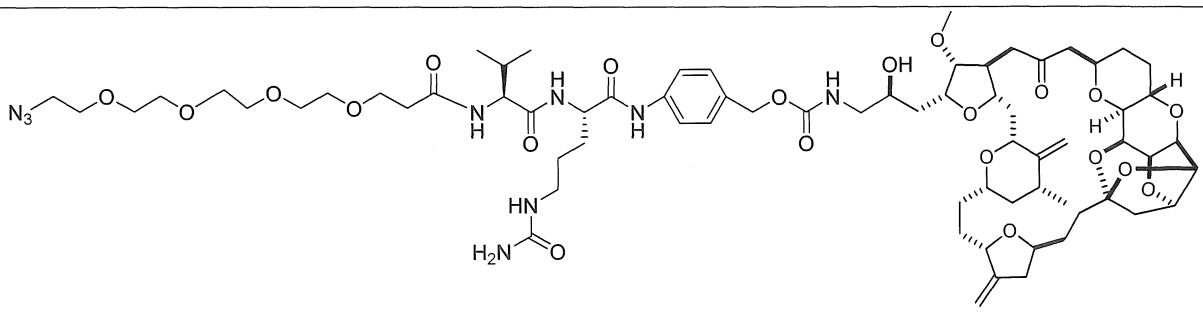
Mal-PEG4-eribulin



Azido-PEG2-eribulin

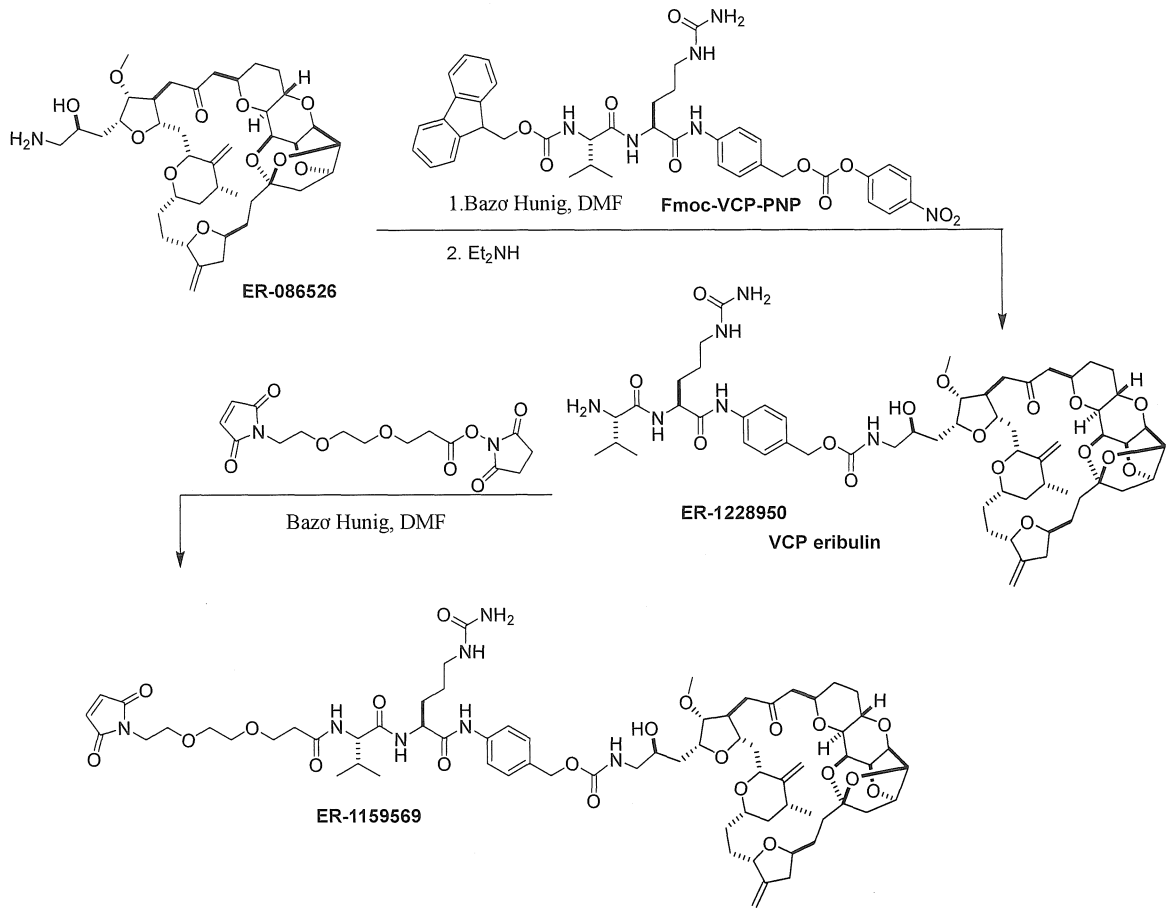


Azido-PEG4-eribulin



Azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulin

1.1 Điều chế MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569)

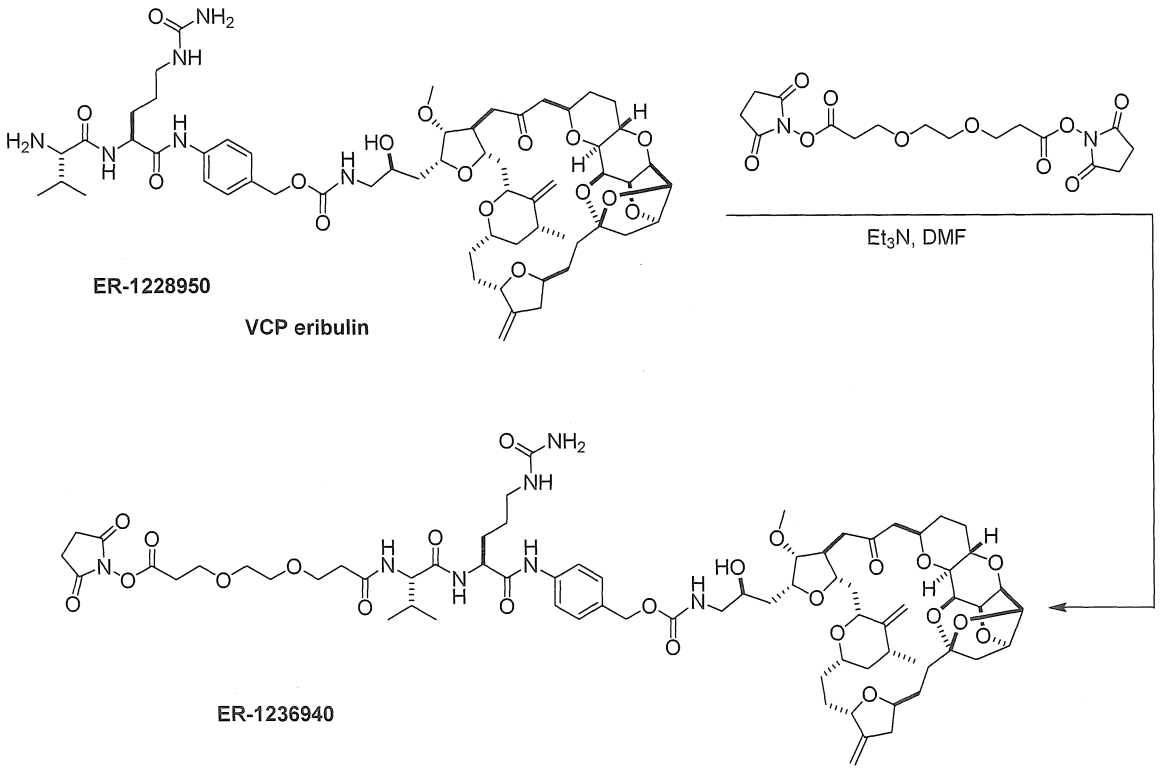


Eribulin (ER-000086526) (61,5mg, 0,074mmol) được hòa tan trong *N*,*N*-dimetylformamit (DMF) (6,0mL) và sau đó được phối hợp với bazơ Hunig (0,027mL, 0,156mmol) và Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (86mg, 0,112 mmol). Phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ cho đến khi hoàn thành phản ứng kết hợp, như được xác định bằng phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Dietylamin (0,078mL, 0,745mmol) được bổ sung vào hỗn hợp này, và hỗn hợp này được khuấy thêm trong 2 giờ cho đến khi hoàn thành phản ứng. Dung môi được loại bằng cách bốc hơi, và phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001228950) là chất rắn màu trắng (60mg, hiệu suất 71%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,06 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,62 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,57 (dd, J = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,18 (dd, J = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,98 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,76-3,70 (m, 4H), 3,60 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,26-3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, J = 2,0,

11,2 Hz, 1H), 2,91-2,84 (m, 1H), 2,75-2,64 (m, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,07-1,01 (m, 1H), 1,06 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,02 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1135,7.

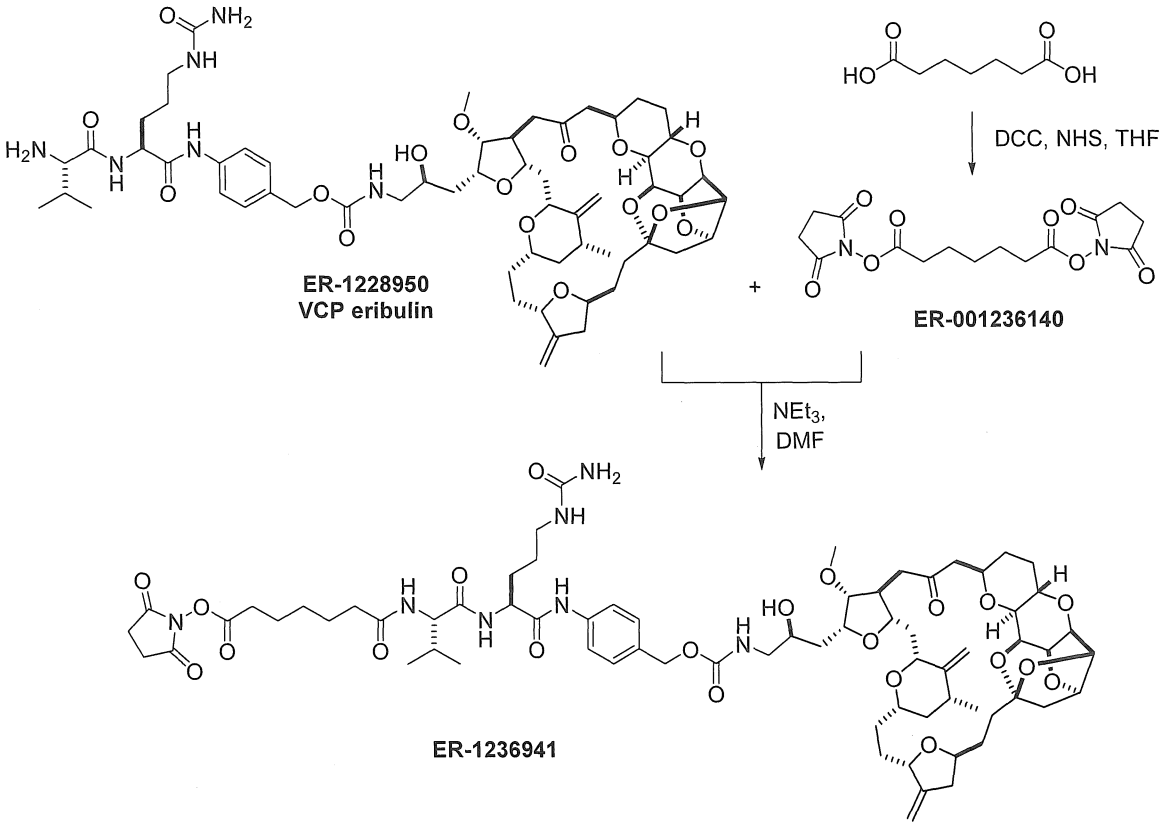
Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001228950) (16mg, 14µmol) được hòa tan trong DMF (1mL). *N,N*-diisopropyletylamin (7,2µL, 41µmol) và Mal-PEG2-NHS (9,7mg, 27µmol) sau đó được bổ sung vào dung dịch này ở nhiệt độ phòng, và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp thô được tinh chế bằng HPLC pha đảo bằng cách sử dụng pha động axetonitril-nước chứa axit formic 0,1%. Các phần thu thập được được cô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ phòng trong bồn nước không gia nhiệt để thu được Mal-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569) (7,1mg, 5,2µmol, hiệu suất 38%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,59 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,81 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 5,2, 9,2 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,19 (dd, *J* = 6,8, 11,6 Hz, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,76-3,64 (m, 6H), 3,62-3,51 (m, 6H), 3,38 (s, 3H), 3,22-3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, *J* = 2,4, 9,6 Hz, 1H), 2,92-2,84 (m, 1H), 2,76-2,63 (m, 2H), 2,52 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,80-1,66 (m, 5H), 1,66-1,28 (m, 10H), 1,11 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H), 1,07-1,01 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1374,9.

1.2 Điều chế NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236940)



Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001228950) (45mg, 0,04 mmol) và bis(2,5-dioxopyrolidin-1-yl) 3,3'-(etan-1,2-diylbis(oxy))dipropanoat (79mg, 0,198 mmol) được phối hợp trong DMF (1,5mL), và Et_3N (44,2µl, 0,317mmol) sau đó được bổ sung vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 18 giờ cho đến khi hoàn thành phản ứng, được xác định bằng phân tích HPLC. Dung môi được bốc bơi và phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236940) là chất rắn màu trắng (38mg, hiệu suất 68%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,05 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,62 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,51 (dd, J = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,50-4,47 (m, 1H), 4,32-4,27 (m, 2H), 4,21 (dd, J = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,14-4,08 (m, 2H), 3,99 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,82 (m, 3H), 3,78-3,70 (m, 4H), 3,62 (s, 2H), 3,62-3,58 (m, 1H), 3,50-3,46 (m, 2H), 3,39 (s, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,22-3,08 (m, 3H), 2,93 (dd, J = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91-2,87 (m, 1H), 2,84 (s, 2H), 2,80 (s, 2H), 2,75-2,64 (m, 2H), 2,59-2,52 (m, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 10H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 8H), 1,11 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,08-0,98 (m, 1H), 1,00 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,98 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1421,0.

1.3 Điều chế NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236941)

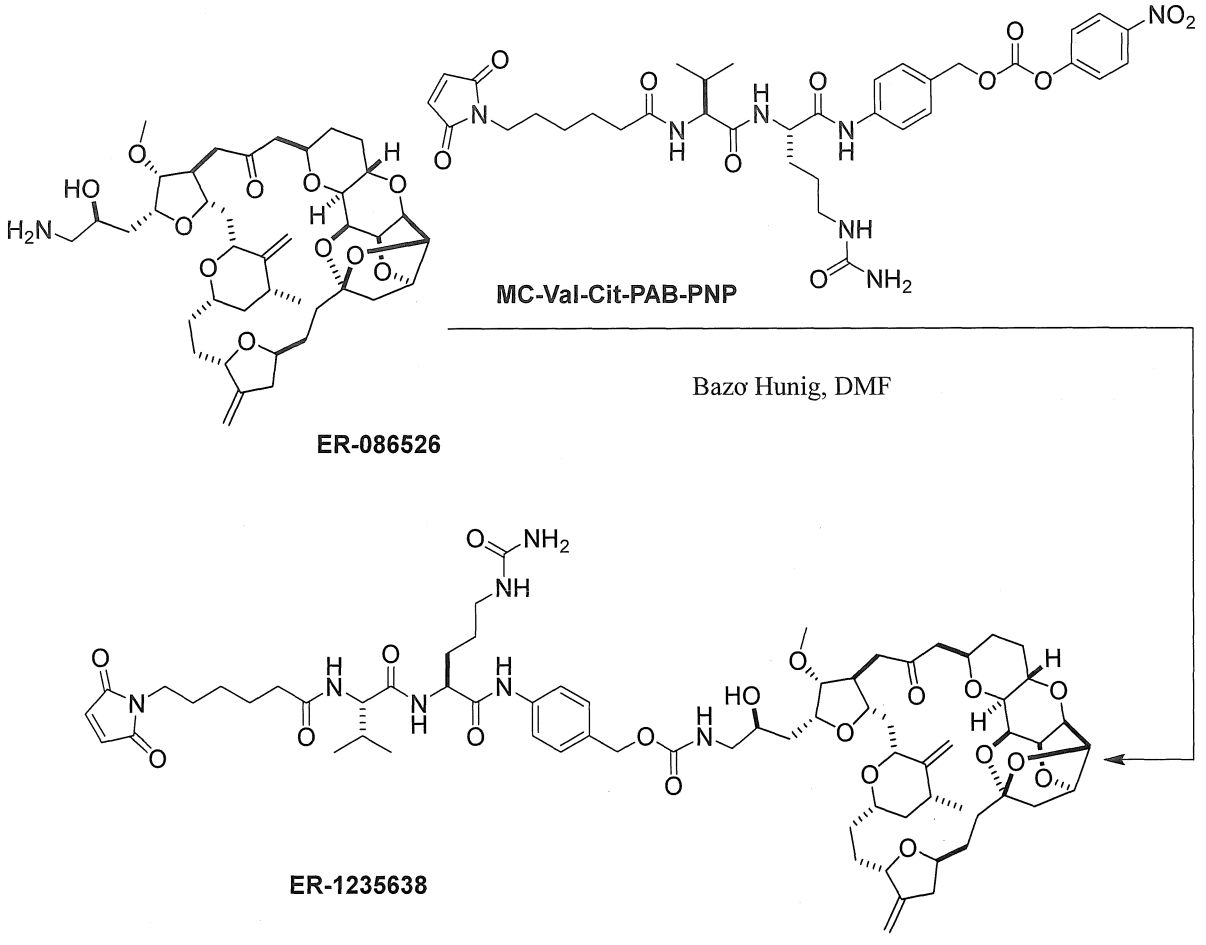


Axit heptandioic (1,6g, 9,99mmol) được hòa tan trong tetrahydrofuran (THF) (100mL), và 1-hydroxypyrolidin-2,5-dion (2,299g, 19,98mmol) sau đó được bổ sung vào, sau đó bổ sung DCC (4,12g, 19,98mmol) vào. Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra phản ứng hoàn thành. Chất rắn được loại riêng bằng cách lọc qua miếng celite, và rửa bằng THF (3 x 2 mL). Dịch lọc gộp lại được cô và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được bis(2,5-dioxopyrolidin-1-yl) heptandioat (ER-001236140) là chất rắn màu trắng (2,5g, hiệu suất 71%). ^{1}HNMR (400MHz) δ ppm 2,83 (s, 8H), 2,64 (t, J = 7,6 Hz, 4H), 1,80 (dt, J = 7,6 Hz, 4H), 1,59-1,51 (m, 2H). LCMS (M+H)=355,2.

NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236941) được điều chế (8,5mg, hiệu suất 47%) từ VCP-eribulin (ER-001228950) và bis(2,5-dioxopyrolidin-1-yl) heptandioat (ER-001236140) bằng quy trình giống như được mô tả ở trên để điều chế NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00

(d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,70 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,46 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 4,36-4,25 (m, 2H), 4,17 (dd, J = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,13-4,06 (m, 2H), 3,97 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,87-3,80 (m, 3H), 3,74-3,68 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,20-3,06 (m, 4H), 2,94 (dd, J = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,90-2,82 (m, 1H), 2,82 (s, 4H), 2,74-2,65 (m, 2H), 2,61 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 2,46-2,26 (m, 7H), 2,24-1,81 (m, 13H), 1,78-1,28 (m, 19H), 1,10 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,06-0,96 (m, 1H), 0,97 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,95 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1375,1.

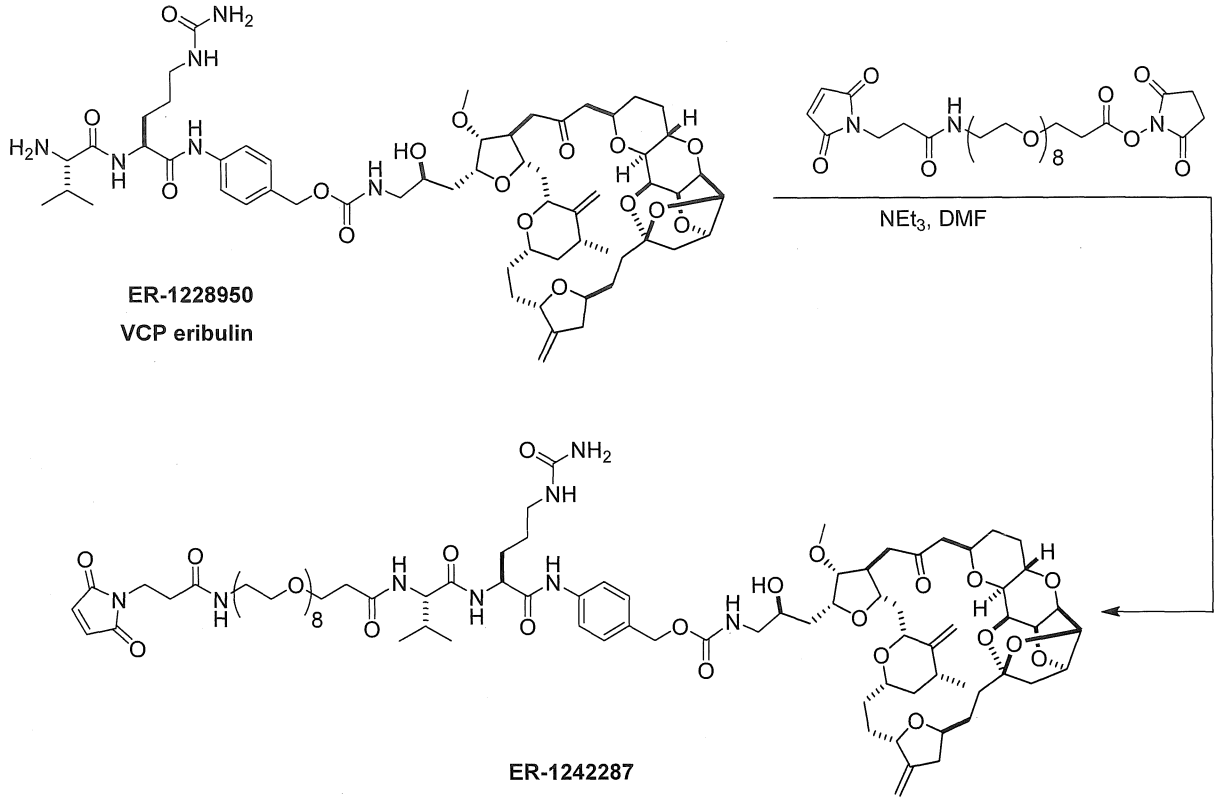
1.4 Điều chế Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001235638)



Eribulin (ER-000086526) (10mg, 0,012mmol) được hòa tan trong DMF (1mL), và được phối hợp với MC-Val-Cit-PAB-PNP (9,02mg, 0,012mmol) và bazơ Hunig (4,44µL, 0,025mmol). Hỗn hợp này sau đó được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra phản ứng hoàn thành. Hỗn hợp phản ứng được cô và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001235638) là chất rắn màu trắng (11,3mg, hiệu suất 63%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,57

(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,05 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,56-4,46 (m, 3H), 4,35-4,27 (m, 2H), 4,20-4,07 (m, 4H), 3,98 (t, J = 10,8 Hz, 1H), 3,87-3,83 (m, 3H), 3,73-3,70 (m, 2H), 3,48 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, J = 1,6, 9,6 Hz, 1H), 2,89-2,85 (m, 1H), 2,69 (dt, J = 11,2, 16,8 Hz, 2H), 2,44-2,33 (m, 5H), 2,27-1,83 (m, 13H), 1,78-1,68 (m, 5H), 1,66-1,27 (m, 14H), 1,11 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 1,07-0,98 (m, 1H), 0,98 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,96 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1328.9.

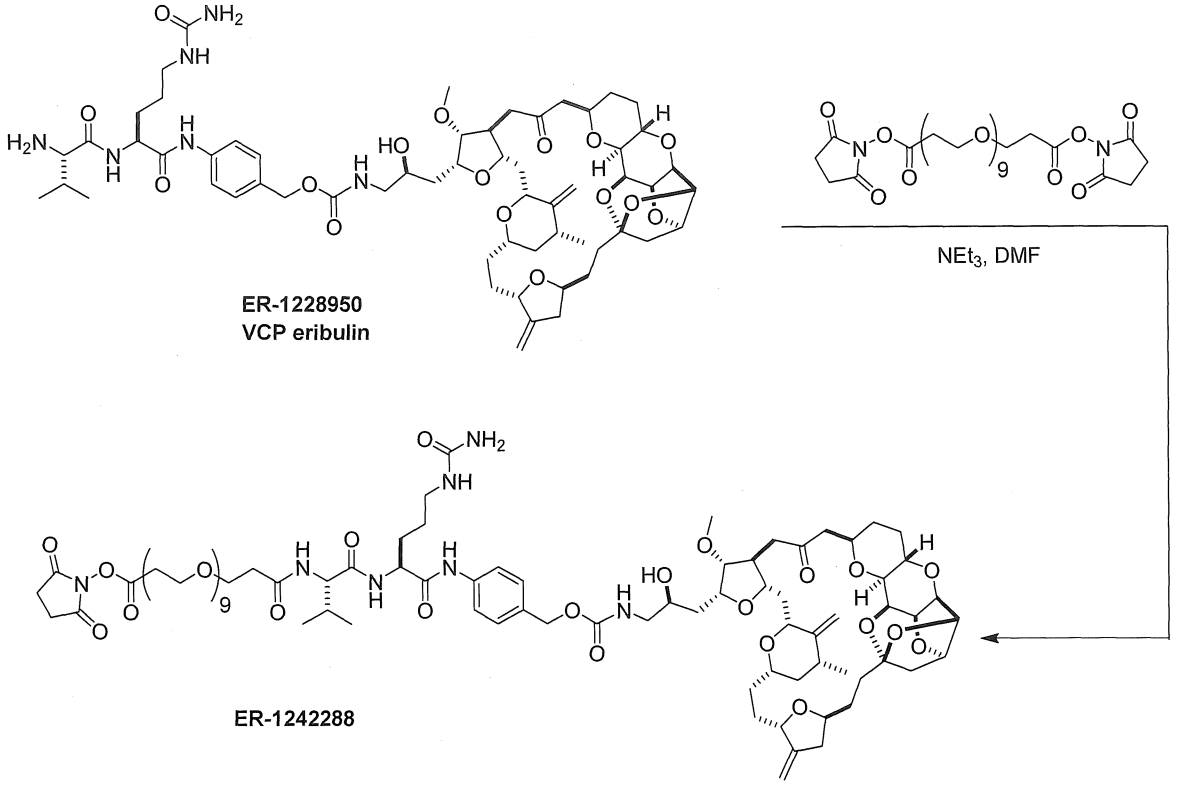
1.5 Điều chế Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001242287)



VCP-eribulin (ER-001228950) (10mg, 8,808µmol) và 2,5-dioxopyrolidin-1-yl 1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaoxa-4-azahentriacontan-31-oat (6,07mg, 8,808µmol) được phối hợp trong DMF (1mL), sau đó bổ sung Et_3N (9,82µl, 0,07mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra phản ứng hoàn thành. Dung môi được loại bằng cách bốc hơi, và phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001242287) là chất rắn màu trắng (3,0mg, hiệu suất 20%).

^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,12 (s, 1H), 5,04 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,99 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,59 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,50-4,42 (m, 2H), 4,32-4,24 (m, 2H), 4,20-4,14 (m, 2H), 4,12-4,04 (m, 3H), 3,96 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,86-3,80 (m, 3H), 3,76-3,57 (m, 4H), 3,48 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 3,36 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 3H), 2,91 (dd, J = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,90-2,82 (m, 1H), 2,74-2,60 (m, 2H), 2,44-2,29 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 10H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,20 (m, 19H), 1,09 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,04-0,98 (m, 1H), 0,99 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1711,6.

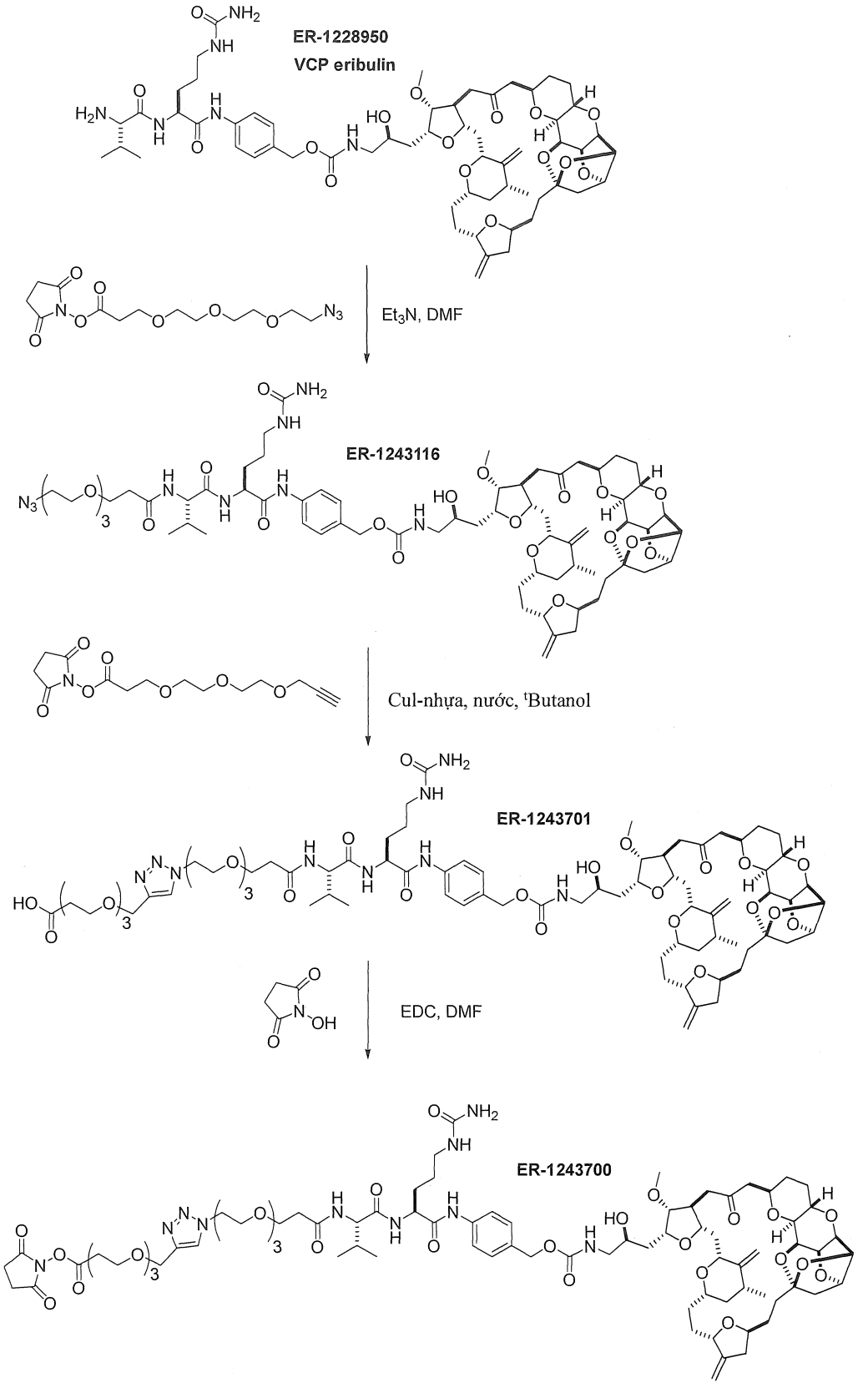
1.6 Điều chế NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001242288)



NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001242288) được điều chế (13mg, hiệu suất 85%) từ VCP-eribulin (ER-001228950) và BisNHS-PEG9 bằng quy trình giống như được mô tả ở trên để điều chế NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,16 (s, 1H), 5,06 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,52-4,45 (m, 2H), 4,34-4,26 (m, 2H),

4,20-4,19 (m, 1H), 4,14-4,06 (m, 2H), 3,98 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,88-3,80 (m, 3H), 3,76-3,70 (m, 4H), 3,66-3,58 (m, 37H), 3,38 (s, 3H), 3,24-3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, J = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91-2,84 (m, 1H), 2,84 (s, 4H), 2,76-2,64 (m, 2H), 2,58-2,50 (m, 4H), 2,46-2,28 (m, 5H), 2,22-1,96 (m, 8H), 1,91-1,82 (m, 3H), 1,79-1,68 (m, 5H), 1,64-1,24 (m, 8H), 1,11 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,08-0,96 (m, 1H), 0,99 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1729,7.

1.7 Điều chế NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001243700)



VCP-eribulin (ER-001228950) (25mg, 0,022mmol) được hòa tan trong DMF (2,5mL), và sau đó được phối hợp với Et_3N (24,55µl, 0,176mmol) và Azit-PEG3-NHS

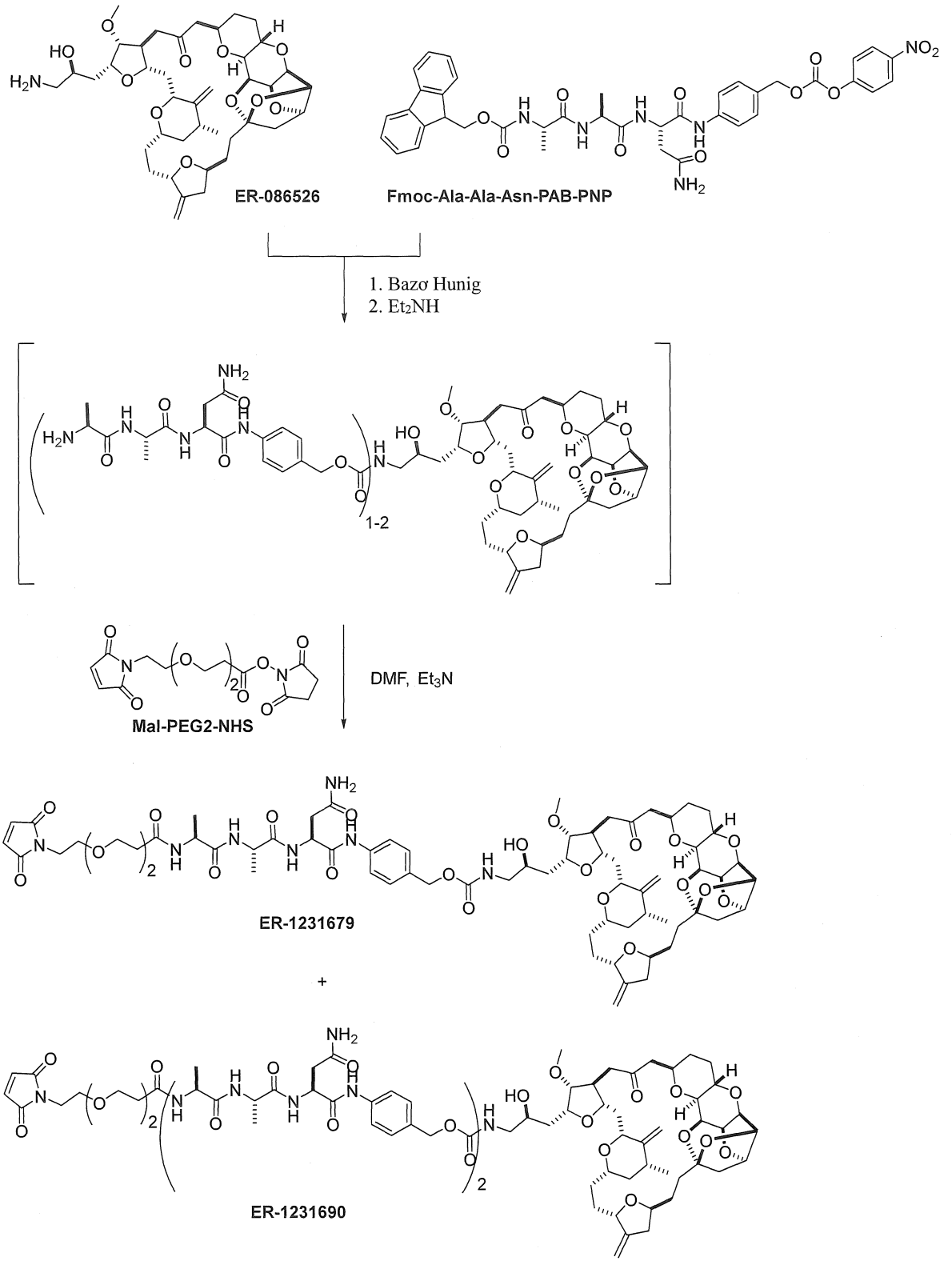
(8,34mg, 0,024mmol). Hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra phản ứng hoàn thành. Hỗn hợp này được cô trong điều kiện chân không, và phần cặn được tinh chế bằng prep-HPLC (MeCN và nước với axit formic 0,1%). Các phần chứa azit-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin được chiết với diclorometan (CH_2Cl_2) (3 x 20 mL), và CH_2Cl_2 được bốc hơi để thu được azit-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001243116) là chất rắn màu trắng (18,9mg, hiệu suất 63%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,04 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,70 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,52-4,48 (m, 2H), 4,31-4,25 (m, 2H), 4,20-4,15 (m, 1H), 4,13-4,07 (m, 2H), 3,99 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,84-3,79 (m, 3H), 3,77-3,65 (m, 4H), 3,64-3,56 (m, 13H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,05 (m, 3H), 2,95-2,80 (m, 2H), 2,75-2,60 (m, 2H), 2,55-2,50 (m, 2H), 2,43-2,25 (m, 5H), 2,21-1,97 (m, 8H), 1,93-1,83 (m, 3H), 1,79-1,72 (m, 5H), 1,68-1,29 (m, 10H), 1,08 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,05-0,95 (m, 1H), 0,98 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,95 (d, J = 7,2 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1365,1.

Azit-PEG3-VCP-eribulin (ER-001243116) (9,6mg, 7,035µmol) và 2,5-dioxopyrolidin-1-yl 3-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)etoxy)etoxy)propanoat (6,61mg, 0,021mmol) được phối hợp trong nước (0,6mL) và t-Butanol (1,8mL). Hỗn hợp này được sục N_2 trong 45 phút. Đồng iođua trên amberlyst-21 (1,23mmol/g, 10mg) được bổ sung vào hỗn hợp này và N_2 được sục qua hỗn hợp này thêm trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng sau đó được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ cho đến khi tiêu thụ hoàn toàn nguyên liệu bắt đầu. Không quan sát thấy sản phẩm NHS este mong muốn nào bằng phân tích LCMS, chỉ thấy axit carboxylic thủy phân. Hỗn hợp này được lọc qua miếng celite ngắn để loại nhựa CuI. Dịch lọc được cô trong chân không, và cặn thu được được tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng điều chế (prep-TLC) (20% MeOH/CH_2Cl_2) để thu được axit-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001243701) là chất rắn màu trắng (3,7mg, hiệu suất 33%). LCMS (ES) (M+H)=1581,2.

Axit-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001243701) (3,0mg, 1,898µmol) được hòa tan trong DMF (200 µL) và 1-hydroxypyrolidin-2,5-dion (0,437mg, 3,796µmol) được bổ sung vào, sau đó bổ sung 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)carbodiimit (EDC) (0,728mg, 3,796µmol). Phản ứng hoàn thành khoảng 50% sau khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. EDC (1,46mg, 7,8µmol) được

bổ sung vào, và hỗn hợp này được khuấy thêm 18 giờ nữa cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra >95% chuyển hóa thành NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin. Hỗn hợp này được cô trong chân không, và phần cặn được tinh chế bằng prep-TLC (15% MeOH/CH_2Cl_2) để thu được NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001243700) là chất rắn màu trắng (2,2 mg, hiệu suất 69%). ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8,00 (s, 1H), 7,59 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, J = 4,0 Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,61 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,57-4,55 (m, 2H), 4,51-4,45 (m, 1H), 4,32-4,28 (m, 2H), 4,21-4,17 (m, 2H), 4,13-4,10 (m, 2H), 3,98 (t, J = 10,8 Hz, 1H), 3,88-3,80 (m, 5H), 3,75-3,70 (m, 4H), 3,68-3,55 (m, 18H), 3,45-3,40 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20-3,08 (m, 4H), 2,93-2,80 (m, 2H), 2,75-2,50 (m, 2H), 2,68 (s, 4H), 2,48-2,30 (m, 7H), 2,28-1,92 (m, 10H), 1,90-1,68 (m, 8H), 1,65-1,27 (m, 8H), 1,11 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,05-0,95 (m, 1H), 0,99 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, J = 6,8 Hz, 3H). LCMS (M+H)=1678,3.

1.8 Điều chế Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231679) và Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulin (ER-001231690)



Eribulin (ER-000086526) (10mg, 0,014mmol) được hòa tan trong DMF (0,5mL), và được phối hợp với bazơ Hunig (3,59µL, 0,021mmol). (9H-fluoren-9-yl)metyl ((S)-1-

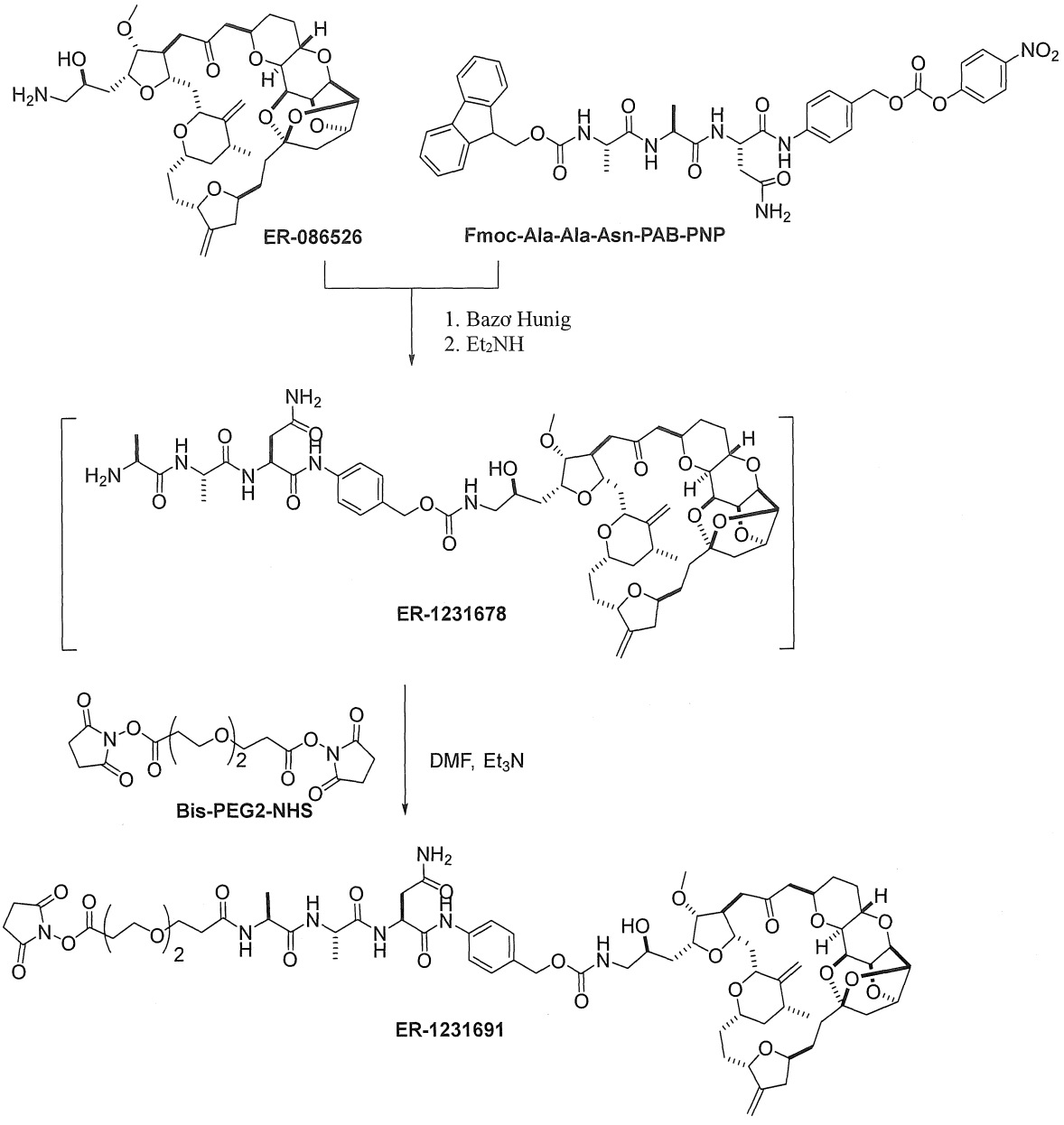
(((S)-1-(((S)-4-amino-1-((4-((((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy)metyl)phenyl)amino)-1,4-dioxobutan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamat (15,76mg, 0,021mmol) sau đó được bổ sung vào, và dung dịch màu vàng thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày cho đến khi phân tích HPLC chỉ ra sự tiêu thụ hoàn toàn nguyên liệu bắt đầu. Dietylamin (14,23µL, 0,137mmol) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, sau đó nó được khuấy ở nhiệt độ phòng trong thêm 2 giờ nữa cho đến khi đạt 100% sự cắt nhóm Fmoc bảo vệ. Hỗn hợp phản ứng được cô để loại riêng dietylamin, và phần cặn được hòa tan lại trong DMF (1,5mL). Et_3N (0,015mL, 0,11mmol) được bổ sung vào ở nhiệt độ phòng, sau đó bổ sung 2,5-dioxopyrolidin-1-yl 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)etoxy)etoxy)propanoat (9,71mg, 0,027mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ cho đến khi hoàn thành phản ứng, được xác định bằng phân tích LCMS. Hỗn hợp này được cô trong điều kiện chân không cao, và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh để thu được Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231679) (9,2mg, hiệu suất 49%) và Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulin (ER-001231690) (6,0mg, hiệu suất 18%) là chất dầu không màu.

Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231679): ^{1}HNMR (400 MHz) δ ppm 9,23 (s, 1H), 8,00 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,13 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,30 (br s, 1H), 6,04-6,00 (m, 1H), 5,77 (br s, 1H), 5,42 (br s, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,06-4,98 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90-4,82 (m, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, J = 4,0 Hz, 1H), 4,60 (t, J = 4,0 Hz, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 4,38-4,25 (m, 4H), 4,19 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 4,15-4,08 (m, 1H), 4,03 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 3,97-3,85 (m, 3H), 3,83-3,50 (m, 12H), 3,41 (s, 3H), 3,50-3,10 (m, 3H), 3,02-2,64 (m, 6H), 2,52-2,30 (m, 7H), 2,30-1,65 (m, 14H), 1,65-1,20 (m, 12H), 1,10 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,13-1,05 (m, 1H). LCMS (M+Na)=1396,6.

Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulin (ER-001231690): ^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,65 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,23 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,06-4,98 (m, 4H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,85-4,72 (m, 2H), 4,71 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 4,61 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 4,30-4,06 (m, 9H), 3,97 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 3,89-3,80 (m, 3H), 3,75-3,48 (m, 12H), 3,38 (s, 3H), 3,17 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 2,94-2,62 (m, 8H), 2,50-2,28

(m, 7H), 2,22-1,65 (m, 14H), 1,58-1,30 (m, 18H), 1,10 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,06-0,97 (m, 1H). LCMS (M+Na)=1802,8.

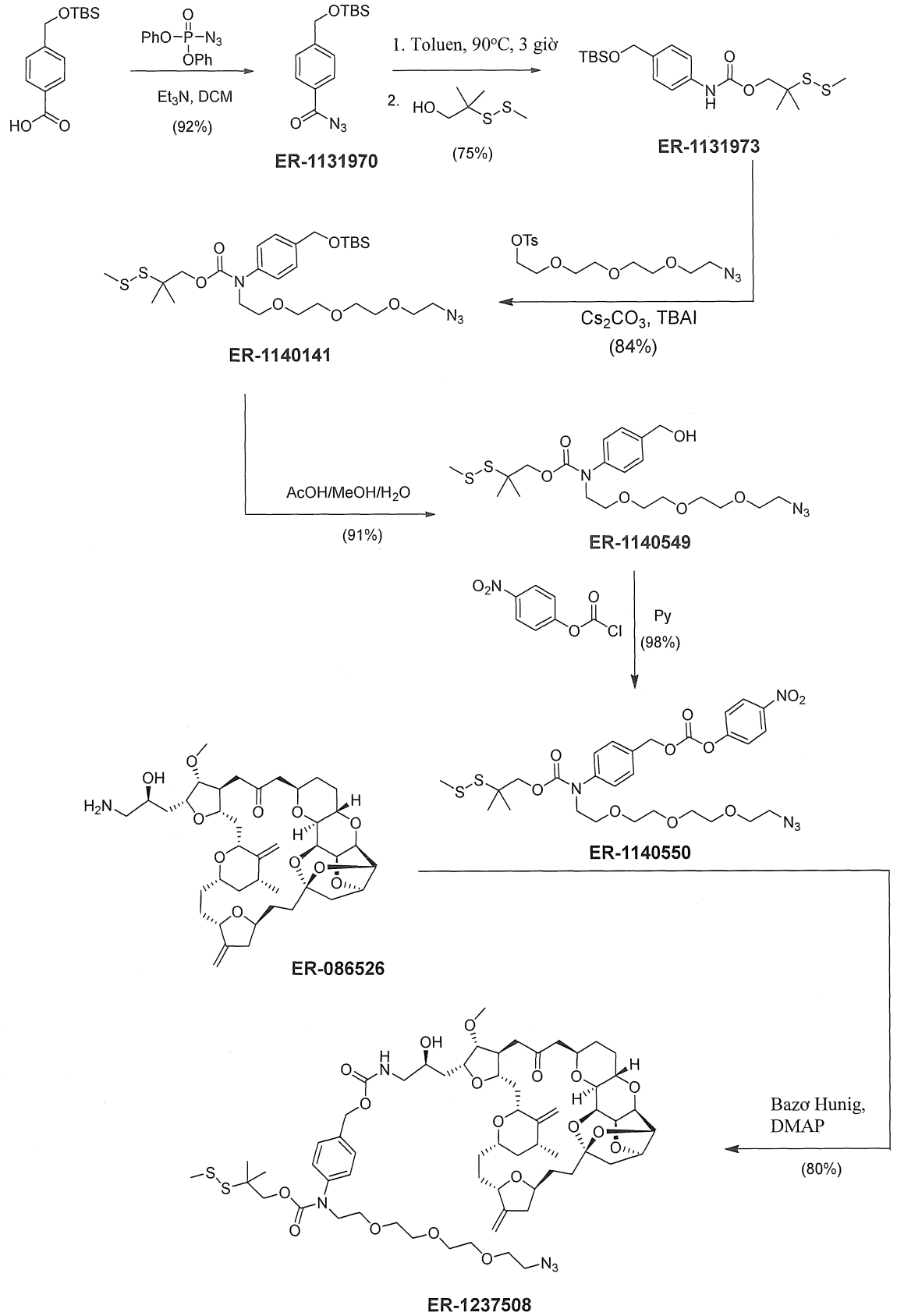
1.9 Điều chế NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231691)



Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231678) được điều chế (15mg, hiệu suất định lượng) từ eribulin (ER-000086526) và Fmoc-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP bằng quy trình giống như được mô tả ở trên để điều chế Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001228950). LCMS (M+H)=1135,5.

NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231691) được điều chế (12,4mg, hiệu suất 64%) từ Ala-Ala-Asn-PAB-eribulin (ER-001231678) và BisNHS-PEG2 bằng quy trình giống như được mô tả ở trên để điều chế NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001236940). ^{1}HNMR (400 MHz) δ ppm 9,21 (s, 1H), 7,95 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,58-7,52 (m, 1H), 7,28 (br s, 1H), 7,24 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,10 (br s, 1H), 6,29 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,83 (br s, 1H), 5,38 (br s, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,05-4,95 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90-4,83 (m, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,69 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,46-4,41 (m, 1H), 4,36-4,25 (m, 4H), 4,19 (dd, J = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 4,15-4,09 (m, 1H), 4,03 (dd, J = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 3,99-3,89 (m, 3H), 3,85-3,50 (m, 10H), 3,41 (s, 3H), 3,40-3,10 (m, 3H), 3,01-2,60 (m, 10H), 2,60-2,35 (m, 7H), 2,35-1,65 (m, 14H), 1,65-1,20 (m, 14H), 1,10 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,15-1,03 (m, 1H). LCMS (ES) (M+H)=1442,7.

1.10 Điều chế azit-PEG3-disulfua-PAB-eribulin (ER-001237508)



Axit 4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)benzoic (1,0g, 3,754mmol) được hòa tan trong diclorometan (DCM) (25mL) đã làm lạnh đến 0°C. Trietylamin (0,549mL, 3,941mmol) sau đó được bổ sung vào, sau đó là diphenyl phosphorazidat (1,085mg, 3,941mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm dần đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 14 giờ. Hỗn hợp thô được pha loãng với etyl axetat (EtOAc)/Hep (1:1, 100mL), và cho đi qua nút silica ngắn rửa giải bằng EtOAc/Hep (50%). Dung môi được loại trong điều kiện chân không để thu được 1,10g 4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)benzoyl azit (ER-001131970). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,98 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,40 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 4,79 (s, 2 H), 0,94 (s, 9 H), 0,10 (s, 6 H).

4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl) benzoyl azit (ER-001131970) (1,1g, 3,775 mmol), được hòa tan trong toluen (20 mL), được gia nhiệt ở 110°C trong 3 giờ. Mặc dù sản phẩm không thể hiện ở dạng vết riêng biệt, phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) chỉ ra rằng nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm mát đến nhiệt độ phòng, và chuyển vào ống thủy tinh được đậy kín trong điều kiện nitơ và bảo quản ở dạng dung dịch trong toluen (1mL = 32,6mg) ở -20°C.

Trietylamin (0,099mL, 0,709mmol) được bổ sung vào dung dịch tert-butyl((4-isoxyanatobenzyl)oxy)dimetylsilan (165mg, 0,626mmol) trong toluen (5 mL), sau đó là rượu (90,0mg, 0,591mmol), và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 6 giờ ở 36°C. Tiến trình phản ứng được theo dõi bằng UPLC/MS. Dung dịch bão hòa của natri hydro cacbonat ($NaHCO_3$) (10mL) sau đó được bổ sung, chiết với EtOAc/Hep (tỷ lệ 1:1, 60mL), rửa bằng nước muối, sấy khô trên natri sulfat, và cô. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 10% đến 40%) để thu được 215 mg 2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl(4-(((tert-butyldimetylsilyl) oxy)metyl)phenyl)carbamat (ER-001131973). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,26 (d, 2 H, J = 7,6 Hz), 6,63 (br s, 1 H), 4,69 (s, 2 H), 4,17 (s, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 1,35 (s, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)-carbamat (ER-001131973) (198mg, 0,476mmol) và 2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl 4-metylbenzensulfonat (325mg, 0,87mmol) được hòa tan trong DMF (6,6mL). Xêsi cacbonat (621mg, 1,905mmol) sau đó được bổ sung vào, sau đó là tetrabutylamoniiođua (45mg, 0,122mmol), và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 15

giờ ở 36°C. Tiến trình phản ứng được theo dõi bằng UPLC/MS. Dung dịch bão hòa của NH_4Cl (30 mL) sau đó được bổ sung vào, chiết với EtOAc/Hep (2:1, 150mL), rửa bằng nước muối (10mL), sấy khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 20% đến 50%) để thu được 248mg 2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy) etoxy)etyl)(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)carbamat (ER-001140141). ^1H NMR (400 MHz) δ ppm 7,28 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,20 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 4,73 (s, 2 H), 4,06 (br s, 2 H), 3,83 (dd, 2 H, J = 6,4, 5,6 Hz), 3,68- 3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, J = 5,6, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,14 (br s, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,09 (s, 6 H).

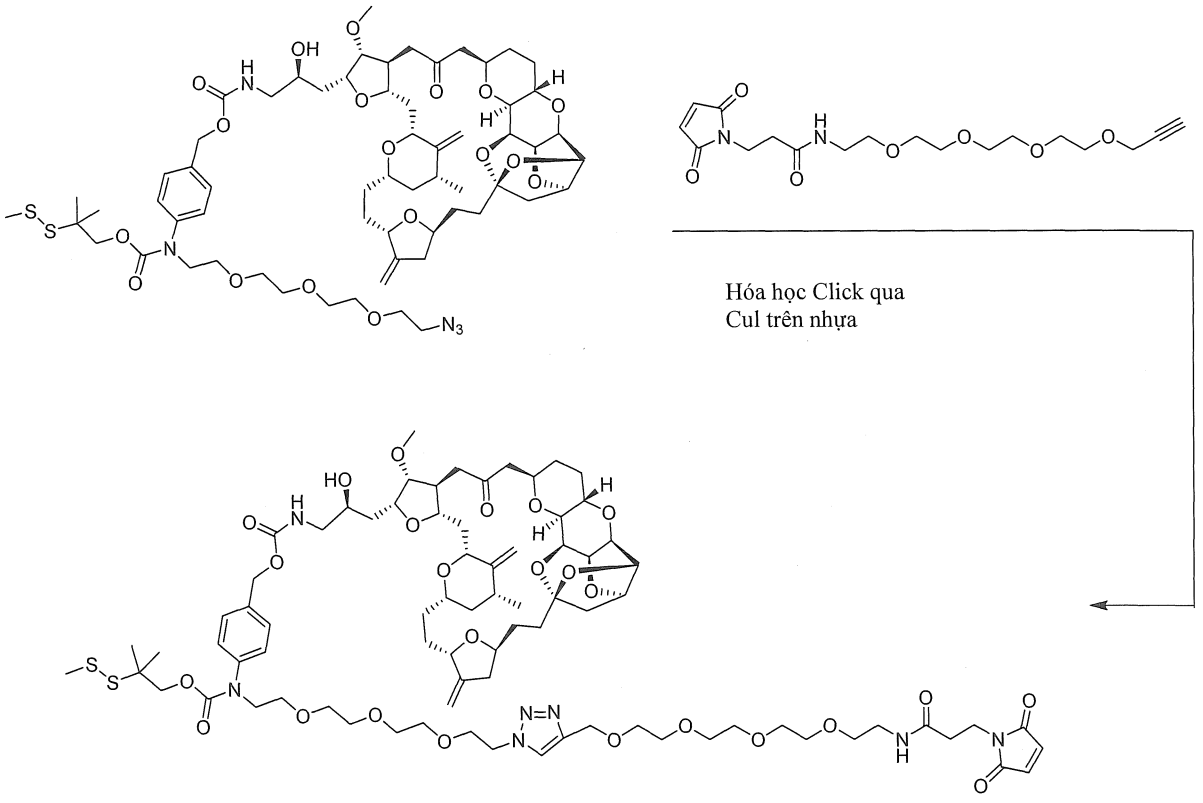
2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)carbamat (ER-001140141) (81mg, 0,131mmol) được hòa tan trong hỗn hợp chứa metanol (5mL) và nước (0,5 mL). Axit axetic (0,5mL, 8,734mmol) sau đó được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, và khuấy trong 14 giờ ở 38°C. Hỗn hợp phản ứng được làm mát đến nhiệt độ phòng, và dung môi được loại trong điều kiện chân không. Phần cặn được pha loãng với EtOAc (30mL), rửa bằng nước (2 X 5mL), $NaHCO_3$, và nước muối (3 mL), sấy khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện chân không. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 30% đến 90%) để thu được 61,0mg 2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy) etyl)(4-(hydroxymetyl)phenyl)carbamat (ER-001140549). ^1H NMR (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,26 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 4,69 (d, 2 H, J = 4,4 Hz), 4,06 (br s, 2 H), 3,84 (dd, 2 H, J = 6,2, 6,2 Hz), 3,66-3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,74 (br s, 1 H), 1,14 (br s, 6 H).

2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)(4-(hydroxymetyl)phenyl)carbamat (ER-001140549) (60mg, 0,119mmol) được hòa tan trong DCM (2mL) và Py (0,019mL, 0,239mmol) đã làm lạnh đến 0°C. 4-nitrophenyl carbonocloridat (38,5mg, 0,191mmol) trong DCM (2mL) và dimetylaminopyridin (DMAP) (2,9mg, 0,024mmol) sau đó được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở 0°C. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ phòng, và khuấy cho đến khi nguyên liệu bắt đầu được tiêu thụ (xấp xỉ 2,5 giờ). Dung môi sau đó được loại trong điều kiện chân không, và phần cặn được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 10% đến 35%) để thu được 78mg 2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-

(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy) etyl)(4-((((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy)metyl)phenyl)-carbamat (ER-001140550). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,27 (dd, 2 H, J = 6,8, 2,4 Hz), 7,41 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,37 (dd, 2 H, J = 7,2, 2,4 Hz), 7,33(d, 2 H, J = 8,8 Hz), 5,27 (s, 2 H), 4,08 (br s, 2 H), 3,85 (dd, 2 H, J = 5,8, 5,8 Hz), 3,66- 3,57 (m, 12 H), 3,36 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (br s, 3 H), 1,19 (br s, 6 H).

2-metyl-2-(metyldisulfanyl)propyl (2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)(4-((((4-nitrophenoxy)carbonyl)oxy)metyl)phenyl)carbamat (ER-001140550) (30mg, 0,045mmol) trong DCM (3mL, 46,625 mmol) được đặt trong bình phản ứng 25-ml trong điều kiện nitơ, và làm lạnh đến 0°C. Amin (40,8mg, 0,049mmol) trong DCM (2mL) và bazơ Hunig (0,024mL, 0,135mmol) được bổ sung vào, sau đó DMAP (1,4mg, 0,011mmol). Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm ấm dần dần đến nhiệt độ phòng, khuấy trong 3 giờ, cô trong điều kiện chân không, và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 50% đến 100%, sau đó là MeOH/EtOAc 3% đến 8%) để thu được 45,0mg azit-PEG3-disulfua-PAB-eribulin tinh chế (ER-001237508). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,32 (d, 2 H, J = 8,0 Hz), 7,25 (d, 2 H, J = 7,2 Hz), 5,28 (dd, 1 H, J = 5,6, 5,6 Hz), 5,11-5,04 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,88 (s, 1 H), 4,81 (s, 1 H), 4,69 (dd, 1 H, J = 4,4, 4,4 Hz), 4,60 (dd, 1 H, J = 4,2, 4,2 Hz), 4,36 (br s, 1 H), 4,33(dd, 1 H, J = 4,0, 2,0), 4,29 (ddd, 1 H, J = 9,6, 4,4, 4,4 Hz), 4,18 (dd, 1 H, J = 6,4, 4,4 Hz), 4,14-4,04 (m, 3 H), 4,03 (dd, 1 H, J = 6,4, 4,4 Hz), 3,97-3,89 (m, 3 H), 3,84-3,78 (m, 3 H), 3,67-3,56 (m, 14 H), 3,42 (s, 3 H), 3,40-3,35 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 3,27 (d, 1 H, J = 3,2 Hz), 3,20 (ddd, 1 H, J = 12,8, 6,0, 6,0 Hz), 2,91-2,83 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, J = 16,0, 10,0 Hz), 2,52-2,40 (m, 3 H), 2,35-2,13 (m, 9 H), 2,10-2,06 (m, 1 H), 2,01-1,89 (m, 4 H), 1,78-1,64 (m, 4 H), 1,60-1,52 (m, 4 H), 1,49-1,28 (m, 5 H), 1,22-1,07 (m, 6 H), 1,09 (d, 3 H, J = 6,0 Hz).

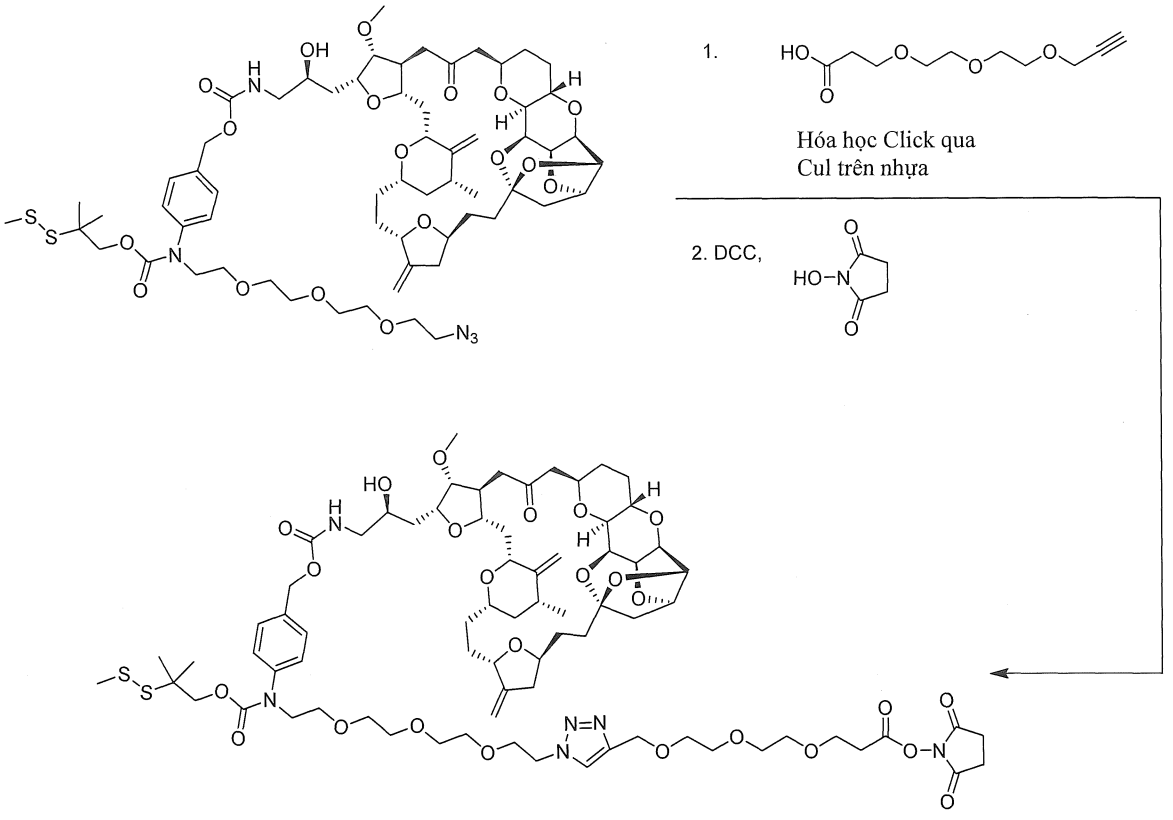
1.11 Điều chế Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin (ER-001237504)



Hỗn hợp chứa azit (9,0mg, 7,151µmol) và 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl)propanamit (6,8mg, 0,018mmol) trong tert-butanol (1,5mL) và nước (0,5mL) được đuổi khí trong 45 phút. Đồng iođua trên amberlyst-21 (1,23mmol/g, 10mg) sau đó được bổ sung, và đuổi khí tiếp trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ, và theo dõi bởi UPLC/MS. Phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính. Hỗn hợp này sau đó được tách ra khỏi nhựa, và được tinh chế trên HPLC (axetonitril/nước với axit formic 0,05%) để thu được 1,5mg Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin (ER-001237504). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 7,74 (s, 1 H), 7,32 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 7,27-7,25 (m, 2 H), 6,69 (br s, 2 H), 5,43 (dd, 1 H, J = 5,6, 5,6 Hz), 5,14-5,06 (m, 3 H), 4,95 (s, 1 H), 4,89 (s, 1 H), 4,82 (s, 1 H), 4,70 (dd, 1 H, J = 4,4, 4,4 Hz), 4,66 (s, 2 H), 4,62 (dd, 1 H, J = 4,4, 4,4 Hz), 4,52(dd, 1 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 4,38-4,31 (m, 2 H), 4,30 (ddd, 1 H, J = 10,4, 4,0, 4,0 Hz), 4,20 (dd, 1 H, J = 6,4, 4,4 Hz), 4,16-4,05 (m, 3 H), 4,04 (dd, 1 H, J = 6,4, 4,4 Hz), 3,99-3,91 (m, 3 H), 3,87-3,80 (m, 6 H), 3,70-3,59 (m, 22 H), 3,53 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 3,44 (s, 3 H), 3,43-3,36 (m, 3 H), 3,29 (d, 1 H, J = 2,8 Hz), 3,18 (ddd, 1 H, J = 12,9, 6,2, 6,2 Hz), 2,92-2,84 (m, 2 H), 2,72 (dd, 1 H, J = 16,0, 10,0 Hz), 2,54-2,42 (m, 5

H), 2,37-1,90 (m, 19 H), 178-1,52 (m, 3 H), 1,50-1,14 (m, 16 H), 1,10 (d, 3 H, J = 6,0 Hz). LCMS (M+H)=1642,1.

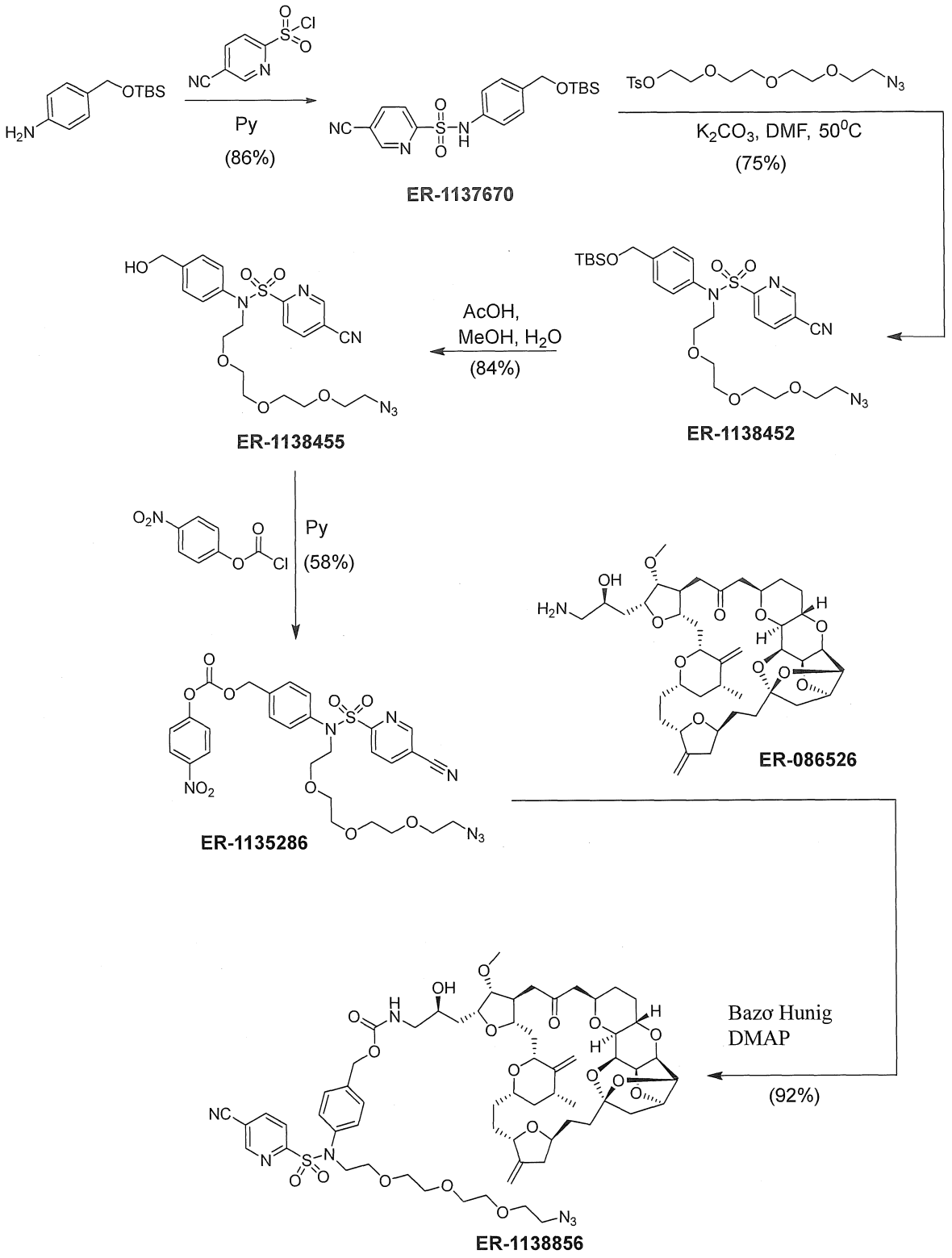
1.12 Điều chế NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin (ER-001244129)



Hỗn hợp của azit (9mg, 7,151µmol) và 2,5-dioxopyrolidin-1-yl 3-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)etoxy)etoxy)propanoat (4,5mg, 14,30µmol) trong tert-butanol (1mL) và nước (0,5mL) được đuổi khí trong 45 phút. Đồng iođua trên amberlyst-21 (1,23mmol/g, 10mg, 7,151 µmol) sau đó được bổ sung, và đuổi khí tiếp trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy nhiệt độ phòng trong 18 giờ, và theo dõi bởi UPLC/MS. Phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính. Hỗn hợp này sau đó được tách khỏi nhựa bằng cách lọc, chiết với DCM (15 mL), rửa bằng nước muối (3 X 3 mL), sấy khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện chân không. Phần cặn (5mg, 3,39µmol) được cất đồng sôi với toluen, được hòa tan trong THF (1mL), và làm lạnh đến 0°C. DCC (4,2mg, 0,02mmol) được bổ sung vào, sau đó 1-hydroxypyrolidin-2,5-dion (2,2mg, 0,019mmol), và hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. Phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính, được xác định bằng UPLC/MS. Hỗn hợp phản ứng was sau đó được cô và được tinh chế trên

TLC điều chế (DCM/*i*-propanol, 8%) để thu được 2,5mg NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfua-PAB-eribulin (ER-001244129) là chất dầu không màu. ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 7,72 (s, 1 H), 7,32 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,25 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 5,08-5,04 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,85 (s, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 4,64 (dd, 1 H, J = 4,4, 4,4 Hz), 4,58 (s, 2 H), 4,55 (dd, 1 H, J = 4,4, 4,4 Hz), 4,48 (dd, 2 H, J = 5,0, 5,0 Hz), 4,32 (d, 1 H, J = 6,6 Hz), 4,27-4,22 (m, 2 H), 4,14 (dd, 1 H, J = 6,6, 4,8 Hz), 4,10-4,01 (m, 3 H), 4,00 (dd, 1 H, J = 6,8, 4,4 Hz), 3,92-3,78 (m, 9 H), 3,65-3,53 (m, 19 H), 3,44-3,39 (m, 4 H), 3,37 (s, 3 H), 3,26 (d, 1 H, J = 3,2 Hz), 3,13 (ddd, 1 H, J = 12,4, 6,0, 6,0 Hz), 2,91-2,73 (m, 11 H), 2,70-2,64 (m, 2 H), 2,54-2,41 (m, 3 H), 2,38-1,80 (m, 16 H), 1,74-1,52 (m, 3 H), 1,41-1,13 (m, 10 H), 1,07 (d, 3 H, J = 6,4 Hz). LCMS (M+H)=1572,3.

1.13 Điều chế azit-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001138856)



4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)anilin (315mg, 1,327mmol) được hòa tan trong DCM (10mL) đã làm mát đến 0°C. Pyridin (0,268mL, 3,317mmol) sau đó được bổ

sung vào, sau đó 5-xyanopyridin-2-sulfonyl clorua (365mg, 1,801mmol) trong DCM (10mL) trên 15 phút. Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ phòng trong 1 giờ, và khuấy trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được hòa tan với EtOAc (50mL), rửa bằng nước muối, sấy khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện chân không để thu được 610mg (103%) N-(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)-5-xyanopyridin-2-sulfonamit (ER-001137670). Sản phẩm thô là khá tinh khiết, mặc dù có màu. ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,94 (dd, 1 H, J = 1,8, 0,6 Hz), 8,10 (dd, 1 H, J = 8,4, 2,0 Hz), 7,99 (dd, 1 H, J = 8,0, 0,8 Hz), 7,18 (d, 2 H, J = 8,2 Hz), 7,15 (br s, 1 H), 7,11 (dd, 2 H, J = 6,8, 0,8 Hz), 4,64 (s, 2 H), 0,90 (s, 9 H), 0,05 (s, 6 H).

N-(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)-5-xyanopyridin-2-sulfonamit (ER-001137670) (105,0mg, 0,26mmol) và 2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl 4-metylbenzensulfonat (143mg, 0,383mmol) được hòa tan trong DMF (4mL). Kali cacbonat (K_2CO_3) (144mg, 1,041mmol) sau đó được bổ sung vào, sau đó tetrabutylamoni iođua (19,2mg, 0,052mmol), và hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 36 giờ đến 50°C. Tiến trình phản ứng được theo dõi bởi UPLC/MS. Dung dịch bão hòa của NH_4Cl (10mL) được bổ sung vào, chiết với EtOAc/Hep (tỷ lệ 2:1, 30mL), rửa bằng nước muối, sấy khô trên natri sulfat, và cô. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 25% đến 80%) để thu được 118,0mg N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-N-(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)-5-xyanopyridin-2-sulfonamit (ER-001138452) (75%). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (dd, 1 H, J = 1,8, 0,6 Hz), 8,08 (dd, 1 H, J = 8,2, 2,2 Hz), 7,86 (dd, 1 H, J = 8,0, 0,8 Hz), 7,24 (d, 2 H, J = 10 Hz), 7,09 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 4,69 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, J = 6,0, 6,0 Hz), 3,67 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 3,65 – 3,62 (m, 4 H), 3,58 (dd, 2 H, J = 6,2, 6,2 Hz), 3,56 – 3,53 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-N-(4-(((tert-butyldimetylsilyl)oxy)metyl)phenyl)-5-xyanopyridin-2-sulfonamit (ER-001138452) (150mg, 0,248mmol) được hòa tan trong metanol (6mL). Nước (0,60mL) sau đó được bổ sung, sau đó là axit axetic (AcOH) (0,60mL, 10,481mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến 38°C, và khuấy trong 14 giờ. Phần lớn dung môi được loại trong điều kiện chân không. Phần cặn được pha loãng với EtOAc (30mL), rửa bằng nước (2 X 5mL), $NaHCO_3$, và nước muối, sấy khô trên natri sulfat, và cô trong điều kiện chân không.

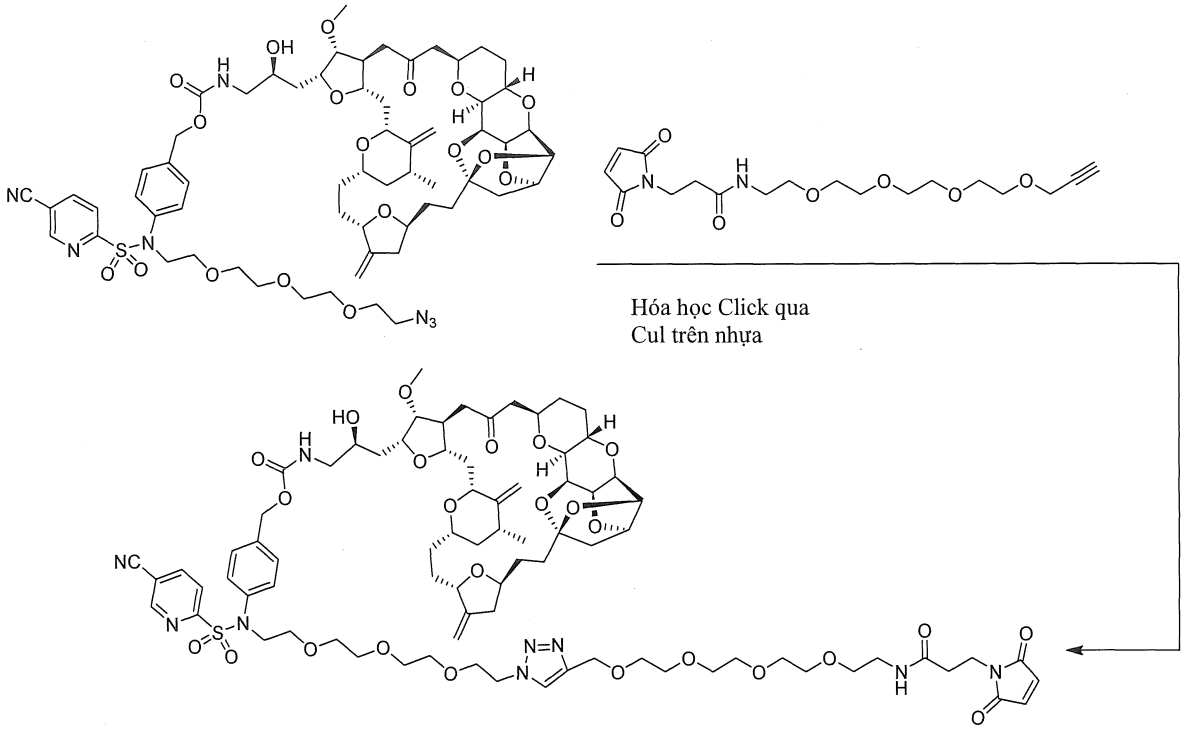
Nguyên liệu thô được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 35% đến 90%) để thu được 105,0mg N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-5-xyano-N-(4-(hydroxymetyl)phenyl)pyridin-2-sulfonamit (ER-001138455) (84%). ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, J = 1,2 Hz), 8,09 (dd, 1 H, J = 8,4, 2,0 Hz), 7,88 (dd, 1 H, J = 8,4, 0,8 Hz), 7,30 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 7,15 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 4,67 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, J = 6,2, 6,2 Hz), 3,66 (dd, 2 H, J = 5,0, 5,0 Hz), 3,65 – 3,58 (m, 6 H), 3,55 – 3,51 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, J = 5,2, 5,2 Hz.

N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-5-xyano-N-(4-(hydroxymetyl)phenyl)pyridin-2-sulfonamit (ER-001138455) (45mg, 0,092mmol) được hòa tan trong DCM (3 mL), và làm lạnh đến 0°C sau đó bổ sung pyridin (0,015mL, 0,183mmol). Sau đó bổ sung 4-nitrophenyl carbonocloridat (20,3mg, 0,101mmol) trong DCM (2mL) và DMAP (2,3mg, 0,018mmol). Hỗn hợp phản ứng được làm ấm từ từ đến nhiệt độ phòng và khuấy trong 2 giờ. UPLC/MS chỉ ra rằng một số nguyên liệu bắt đầu vẫn còn. Hỗn hợp phản ứng sau đó được cô trong điều kiện chân không, và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 12% đến 40%) để thu được 35mg 4-((N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-5-xyanopyridin)-2-sulfonamido)benzyl (4-nitrophenyl) cacbonat (ER-001235286) (58%), và 20mg nguyên liệu bắt đầu. ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, J = 0,8 Hz), 8,27 (dd, 2 H, J = 9,2, 2,0 Hz), 8,12 (dd, 1 H, J = 7,6, 2,0 Hz), 7,92 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 7,38 (d, 4 H, J = 9,6 Hz), 7,26 (d, 2 H, J = 8,8 Hz), 5,45 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, J = 5,8, 5,8 Hz), 3,67 – 3,58 (m, 8 H), 3,58 – 3,50 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, J = 6,1, 6,1 Hz).

4-(N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxy)etoxy)etoxy)etyl)-5-xyanopyridin-2-sulfonamido)benzyl (4-nitrophenyl) cacbonat (ER-001235286) (35,0mg, 0,053mmol) được đặt vào trong bình thủy tinh 25-mL trong điều kiện nitơ, và làm lạnh đến 0°C. Amin (48,5mg, 0,059 mmol) trong DCM (3mL, 46,625mmol) và bazơ Hunig (0,037mL, 0,214mmol) sau đó được bổ sung, sau đó DMAP (2,61mg, 0,021mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 30 phút ở 0°C, và sau đó khuấy thêm trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được cô trong điều kiện chân không, và được tinh chế bằng phép sắc ký nhanh (EtOAc/Hep 50% đến 100%, sau đó MeOH/EtOAc 3% đến 8%) để thu được 61,0mg azit-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001138856) tinh khiết. ^{1}H NMR (400 MHz) δ ppm 8,98 (d, 1 H, J = 1,2 Hz), 8,10 (dd, 1 H, J = 8,2, 1,8 Hz), 7,87 (d, 1 H, J = 8,0

Hz), 7,26 (d, 2 H, J = 6,8 Hz), 7,13 (d, 2 H, J = 8,4 Hz), 5,29 (dd, 1 H, J = 5,6, 5,6 Hz), 5,08-5,00 (m, 3 H), 4,92 (s, 1 H), 4,87 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, J = 4,6, 4,6 Hz), 4,59 (dd, 1 H, J = 4,6, 4,6 Hz), 4,38-4,30 (m, 2 H), 4,28 (ddd, 1 H, J = 10,4, 4,0, 4,0, Hz), 4,17 (dd, 1 H, J = 6,2, 4,6 Hz), 4,13-4,01 (m, 4 H), 3,97-3,88 (m, 3 H), 3,82-3,78 (m, 1 H), 3,67-3,50 (m, 15 H), 3,41 (s, 3 H), 3,40-3,33 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, J = 4,8, 4,8 Hz), 3,27 (d, 1 H, J = 3,2 Hz), 3,15 (ddd, 1 H, J = 12,8, 6,4, 6,4 Hz), 2,90-2,82 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, J = 16,0, 10,0 Hz), 2,51-2,40 (m, 3 H), 2,34-2,13 (m, 7 H), 2,10-2,05 (m, 1 H), 1,99-1,88 (m, 4 H), 1,78-1,64 (m, 5 H), 1,62-1,52 (m, 2 H), 1,50-1,29 (m, 4 H), 1,08 (d, 3 H, J = 6,8 Hz).

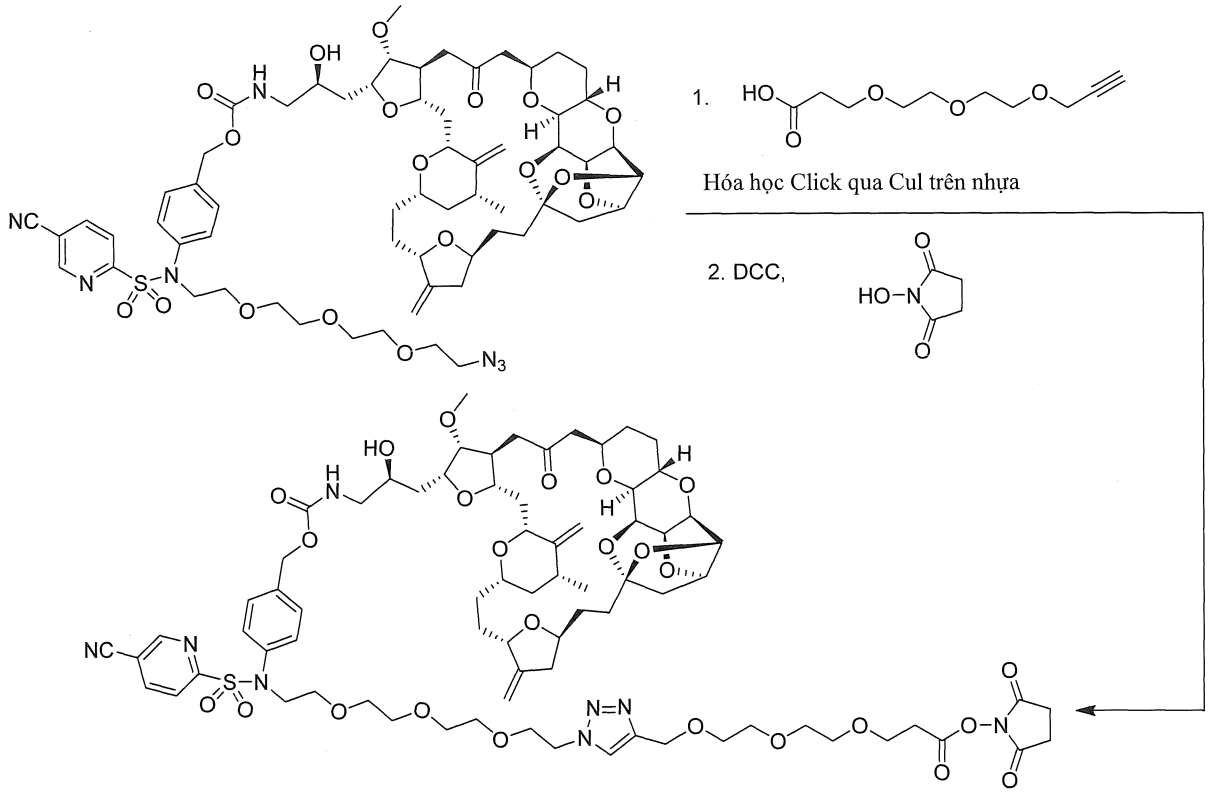
1.14 Điều chế Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001237505)



Hỗn hợp của azit (10mg, 8,023µmol) và 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl)propanamit (9,20mg, 0,024mmol) trong tert-butanol (2,1mL) và nước (0,7mL) được đuổi khí trong 45 phút. Đồng iođua trên amberlyst-21 (1,23mmol/g, 15mg) sau đó được bổ sung, và đuổi khí thêm trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ, và được theo dõi bởi UPLC/MS. Phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tách khỏi nhựa, và được tinh chế trên TLC điều chế

(DCM/metanol, 7%) để thu được 5,5mg Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001237505). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,01 (s, 1 H), 8,15 (dd, 1 H, *J* = 8,0, 1,8 Hz), 7,87 (d, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 7,75 (s, 1 H), 7,28 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,14 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 6,68 (s, 2 H), 6,47 (br s, 1 H), 5,44 (br s, 1 H), 5,10-5,02 (m, 3 H), 4,94 (s, 1 H), 4,86 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,59 (s, 2 H), 4,56 (dd, 1 H, *J* = 4,4, 4,4 Hz), 4,51(dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2, Hz), 4,34(d, 1 H, *J* = 7,6, Hz), 4,30-4,23 (m, 2 H), 4,19 – 4,14 (m, 2 H), 4,08 (dd, 1 H, *J* = 4,0, 4,0 Hz), 4,03 – 3,98 (m, 2 H), 3,94 – 3,72 (m, 8 H), 3,68 – 3,46 (m, 28 H), 3,38 (s, 3 H), 3,38 – 3,33 (m, 3 H), 3,27 (d, 1 H, *J* = 3,2 Hz), 3,16 – 3,02 (m, 2 H), 2,90 – 2,81 (m, 2 H), 2,68 (dd, 1 H, *J* = 16,2, 9,8 Hz), 2,54-2,40 (m, 7H), 2,40-1,8 (m, 11 H), 1,80-1,50 (m, 3 H), 1,48-1,25 (m, 3 H), 1,09 (d, 3 H, *J* = 6,4 Hz). LCMS (M+H)=1630,0.

1.15 Điều chế NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001244623)



Hỗn hợp chứa azit (14mg, 0,011mmol) và 2,5-dioxopyrolidin-1-yl 3-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)etoxy)etoxy)propanoat (8,80mg, 0,028mmol) trong tert-butanol (2mL) và nước (1mL) được đuổi khí trong 45 phút. Đồng iođua trên amberlyst-21 (1,23mmol/g, 20mg) sau đó được bổ sung, và đuổi khí tiếp trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được khuấy

ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ, và được theo dõi bởi UPLC/MS. Phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tách khỏi nhựa bằng cách chiết với DCM (2 x 10mL). Lớp DCM được rửa bằng nước muối (4 x 5mL), sấy khô trên natri sulfat, và cô đến sản phẩm mong muốn (chất này được sử dụng trong bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm).

Axit thô (15,0mg, 10,255µmol) được hòa tan trong THF (1,5mL), và làm lạnh đến 0°C. DCC (15,2mg, 0,074mmol) sau đó được bổ sung, sau đó 1-hydroxypyrolidin-2,5-dion (8,3mg, 0,072 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 18 giờ. UPLC/MS chỉ ra rằng phần lớn nguyên liệu bắt đầu đã được tiêu thụ, và sản phẩm mong muốn thể hiện là đỉnh chính. Hỗn hợp phản ứng được cô, và được tinh chế trên TLC điều chế (DCM/*i*-propanol, 8%) để thu được 2,5mg NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamit-PAB-eribulin (ER-001244623). ^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,00 (s, 1 H), 8,12 (d, 1 H, *J* = 8,4 Hz), 8,00 (d, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 7,72 (s, 1 H), 7,26 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,12 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 5,37 (br s, 1 H), 5,08-5,02 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,85 (s, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 4,66-4,62 (m, 1 H), 4,58-4,56 (m, 4 H), 4,33 (d, 1 H, *J* = 10,8 Hz), 4,29-4,21 (m, 2 H), 4,10-3,96 (m, 4 H), 3,93-3,76 (m, 6 H), 3,74-3,44 (m, 27 H), 3,36 (s, 3 H), 3,34-3,24 (m, 2 H), 3,15-3,06 (m, 1 H), 2,97 (br s, 1 H), 2,90-2,78 (m, 8 H), 2,74-2,08 (m, 13 H), 2,05 -1,78 (m, 5 H), 1,73-1,50 (m, 2 H), 1,41-1,25 (m, 4 H), 1,07 (d, 3 H, *J* = 6,0 Hz). LCMS (M+H)=1560,0.

1.16 Điều chế Mal-PEG2-eribulin

Eribulin (5mg, 7µmol) được hòa tan trong DMF (0,5mL), và được phối hợp với maleimido-PEG2-NHS (5mg, 14µmol; Broadpharm, số danh mục BP-21680) và bazơ Hunig (2,4µL, 14µmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh chế bằng HPLC (gradient nước—axetonitril 30-70% chứa axit formic 0,1%). Dung môi rửa giải được thu thập theo khối lượng, và đông khô đến khô. Hiệu suất cuối cùng là 3,7mg (3,8µmol, 54%). Khối lượng dự đoán chính xác là 968,5 Da. Khối lượng đo được là 969,6 Da [M+H].

1.17 Điều chế Mal-PEG4-eribulin

Eribulin (5mg, 7µmol) được hòa tan trong DMF (0,5mL), và được phối hợp với maleimido-PEG4-NHS (6,2mg, 14µmol; Broadpharm, số danh mục BP-20554) và bazơ Hunig (2,4µL, 14µmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh chế bằng HPLC (građient nước—axetonitril 30-70% chứa axit formic 0,1%). Dung môi rửa giải được thu thập theo khối lượng, và đông khô đến khô. Hiệu suất cuối cùng là 3,7mg (3,5µmol, 50%). Khối lượng dự tính chính xác là 1056,5 Da. Khối lượng đo được là 1057,7 Da [M+H].

1.18 Điều chế azido-PEG2-eribulin

Eribulin (5mg, 7µmol) được hòa tan trong DMF (0,5mL), và được phối hợp với azido-PEG2-NHS (4,2mg, 14µmol; Broadpharm, số danh mục BP-20524) và bazơ Hunig (2,4µL, 14µmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh chế bằng HPLC (građient nước—axetonitril 30-70% chứa axit formic 0,1%). Dung môi rửa giải được thu thập theo khối lượng, và đông khô đến khô. Hiệu suất cuối cùng là 2,2mg (2,4µmol, 34%). Khối lượng dự tính chính xác là 914,5 Da. Khối lượng đo được là 915,7 Da [M+H].

1.19 Điều chế azido-PEG4-eribulin

Eribulin (5mg, 7µmol) được hòa tan trong DMF (0,5mL), và được phối hợp với azido-PEG4-NHS (5,5mg, 14µmol; Broadpharm, số danh mục BP-20518) và bazơ Hunig (2,4µL, 14µmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh chế bằng HPLC (građient nước—axetonitril 30-70% chứa axit formic 0,1%). Dung môi rửa giải được thu thập theo khối lượng, và đông khô đến khô. Hiệu suất cuối cùng là 3,0mg (3,0µmol, 43%). Khối lượng dự tính chính xác là 1002,5Da. Khối lượng đo được là 1003,7Da [M+H].

1.20 Điều chế azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulin

Eribulin (15mg, 21µmol) được hòa tan trong DMF (1,5mL), và trộn kỹ. Bazơ Hunig (5,5µL, 32µmol) và Fmoc-VCP-PNP (24mg, 22µmol; Levena Biopharma, số danh mục VC1003) sau đó được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm (16 giờ). Khi hoàn thành phản ứng, dietylamin (20µL, 0,21 mmol) được bổ sung vào

hỗn hợp phản ứng, và khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng để loại nhóm bảo vệ Fmoc. Phản ứng loại nhóm bảo vệ được theo dõi bằng phổ kế khối lượng Waters SQD. Khi hoàn thành phản ứng, hỗn hợp phản ứng được chuyển vào ống siêu ly tâm 1,5mL đã được cân trước. Dung môi được bốc hơi trong điều kiện chân không bằng máy cô Centrivap được làm lạnh có nhiệt độ được đặt ở 30°C. Hiệu suất là 16mg (14µmol) NH2-Val-Cit-pAB-eribulin thô (khối lượng chính xác 1134,6Da, hiệu suất 67%).

NH2-Val-Cit-pAB-eribulin (16mg, 14,1µmol) được hòa tan trong DMF (1,5mL). Bazơ Hunig (7,2µL, 41µmol) và azido-PEG4-NHS (11mg, 28,2µmol) sau đó được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được tinh chế bằng HPLC (građient nước—axetonitril 48-72% chứa axit formic 0,1%). Dung môi rửa giải được thu thập ở mức m/z 1409, và đông khô để thu được azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulin (khối lượng chính xác 1407,7 Da). Thu được 13mg (9,2µmol) azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulin (hiệu suất của bước 65%, hiệu suất tổng cộng là 44%).

Ví dụ 4

1. Nguyên liệu và phương pháp

Tất cả thuốc thử sử dụng có được từ các nhà cung cấp trên thị trường ở tiêu chuẩn nghiên cứu hoặc cao hơn, trừ khi được nêu khác.

1.1. Kháng thể

MORAb-003 (kháng thụ thể folat alpha của người được biến đổi cho phù hợp với người, 25mg/mL) và MORAb-009 (kháng-mesothelin người khảm chuột-người, 25mg/mL) sử dụng trong các nghiên cứu sau đây lần lượt là từ Lot #NB02962-19 và Lot #030A14. Trastuzumab được mua trên thị trường (Clingen), và là từ Lot #503345.

Kháng thể kháng-mesothelin người khảm thỏ-người và được biến đổi cho phù hợp với người có cystein chưa cặp đôi ở vị trí LCcys80 (Bảng 1) được biểu hiện trong tế bào 293F tạm thời hoặc ở dạng nhóm được lựa chọn ổn định. Môi trường bổ sung được tinh chế và khử cystein như mô tả trong mục 1.4.1.2.1.

1.2. Độc tố tế bào

Hợp chất eribulin liên hợp được được tổng hợp như mô tả trong Ví dụ 3 (Bảng 46). Nguồn dự trữ (10mM) được điều chế trong DMSO và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

1.3. Dòng tế bào khối u

Dòng tế bào khối u người sử dụng trong các phân tích ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab điều chế được với hợp chất maleimido/sucxinimit (OSu)/azido-nhóm liên kết-eribulin (Bảng 46) bao gồm IGROV1 (caxinom buồng trứng người, FR^{hi}, $MSLN^{neg}$), NCI-H2110 (caxinom phổi tế bào không nhỏ của người, FR^{med}, $MSLN^{med}$), A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$), NCI-N87-luc (caxinom dạ dày người, FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$), NUGC3 (ung thư tuyến dạ dày người, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$), ZR75 (caxinom ống tuyến vú người, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$), và BT-474 (caxinom ống tuyến vú người, FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$). Dòng tế bào khối u người sử dụng trong các phân tích kháng thể kháng-mesothelin người khảm thỏ-người và được biến đổi cho phù hợp với người LCcys80 được liên hợp với MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569) là A3 (A431 được chuyển nạp ổn định với mesothelin người, $MSLN^{hi}$), OVCAR3 (caxinom buồng trứng người, $MSLN^{hi}$), HEC-251 (dạng nội mạc tử cung của người, $MSLN^{med}$), H226 (u trung biểu mô tế bào có vảy phổi của người, $MSLN^{lo}$), và A431 gốc ($MSLN^{neg}$). Tất cả dòng tế bào sử dụng được thu trực tiếp từ American Type Culture Collection (ATCC), với ngoại lệ là IGROV1 (thu được từ National Cancer Institute, có sự cho phép) và A3 (tạo ra tại Morphotek từ A431 gốc).

1.4. Liên hợp kháng thể-dược chất

1.4.1. Liên hợp dựa trên cystein sử dụng maleimit

1.4.1.1. Liên hợp với disulfua giữa các chuỗi

1.4.1.1.1. Khử một phần

MORAb-003 và MORAb-009 được trao đổi đệm vào trong nước muối đệm phosphat Dulbecco (DPBS), và sau đó được cô đến nồng độ 20mg/mL bằng phương pháp cô ly tâm. Một thể tích tương đương chứa tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP) 270µM trong 1X DPBS với EDTA 2mM được bổ sung vào, và việc khử được tiến hành bằng cách

trộn nhẹ trong 80 phút ở nhiệt độ phòng. Trastuzumab được khử một phần theo cách tương tự, ngoại trừ việc khử được tiến hành bằng cách trộn nhẹ trong 40 phút ở nhiệt độ phòng.

1.4.1.1.2. Phản ứng liên hợp

Hợp chất maleimido-nhóm liên kết-eribulin (trong DMSO) được liên hợp với kháng thể đã khử một phần ở tỷ lệ mol là 1:6 (mAb:hợp chất). Hợp chất này được bổ sung vào propylen glycol 50% trong DPBS và trộn kỹ. Một thể tích tương đương chứa kháng thể đã được khử một phần sau đó được bổ sung vào, và trộn nhẹ (nồng độ propylen glycol cuối là 25%). Phản ứng liên hợp xảy ra trong 3,5 đến 4 giờ ở nhiệt độ phòng.

1.4.1.2. Phản ứng liên hợp với LCcys80

1.4.1.2.1. Khử cystein hóa

Sử dụng ÄKTA Explorer (GE Healthcare), cân bằng cột protein A (GE Healthcare) bằng 10 lần thể tích cột (CV) natri phosphat 20mM, EDTA 10mM, độ pH =7,2 (đệm cân bằng). Sau đó, môi trường có điều chỉnh được nạp, sau đó rửa nguyên liệu chưa gắn kết bằng 10 CV đệm cân bằng. Cột được rửa bằng 16 CV natri phosphat 20mM, EDTA 10mM, cystein 5mM, độ pH =7,2 ở 0,5mL/phút trong 16 giờ để loại nhóm che phủ. Sau đó cột được rửa bằng 60 CV Tris20mM, độ pH= 7,5 ở 0,5mL/phút trong 60 giờ. Kháng thể khử cystein được rửa giải bằng 5CV glyxin 0,1M, độ pH =2,9 và trung hòa ngay lập tức bằng 5% thể tích Tris 2M, độ pH =9,0. Các phân đoạn chứa kháng thể được chia nhóm và thẩm tách trong DPBS bằng MWCO 20K Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher).

1.4.1.2.2. Phản ứng liên hợp

Kháng thể đã khử cystein được đưa đến nồng độ 5,0mg/mL trong DPBS, EDTA 1mM, và propylen glycol 50% được chuẩn bị trong DPBS, 1mM EDTA. MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569) (12mM trong DMSO) được bổ sung vào propylen glycol 50% và trộn kỹ. Một thể tích tương đương chứa kháng thể đã khử cystein sau đó được bổ sung vào với tỷ lệ mol là 1:4 (mAb:hợp chất), và trộn nhẹ. Phản ứng liên hợp xảy ra trong 3,5 đến 4 giờ ở nhiệt độ phòng.

1.4.2. Phản ứng liên hợp dựa trên amin sử dụng sucxinimit

1.4.2.1. Phản ứng liên hợp

Kháng thể (MORAb-003 hoặc MORAb-009, không được khử) được đưa đến nồng độ 10,0mg/mL trong natri bicacbonat 0,1M, độ pH = 8,3. Propylen glycol 50% được điều chế trong natri bicacbonat 0,1M, độ pH =8,3. Sucxinimit (OSu)-nhóm liên kết-eribulin (trong DMSO) được bổ sung vào propylen glycol 50% và trộn kỹ. Một thể tích tương đương chứa kháng thể sau đó được bổ sung vào với tỷ lệ mol là 1:4 (mAb:hợp chất), và trộn kỹ. Phản ứng liên hợp xảy ra trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Phản ứng liên hợp được dập tắt bằng cách bổ sung 1:20 thể tích 1M Tris, độ pH =8,0, và ADC được tinh chế như mô tả trong mục 1.4.4.

1.4.3. Phản ứng liên hợp 2 bước dựa trên amin sử dụng hóa học alkyn-azit thúc đẩy theo chủng (SPAAC)

1.4.3.1. Tạo dẫn xuất dybenzylxyclooctyn (DBCO)

Kháng thể (MORAb-003 hoặc MORAb-009, không khử) được đưa đến nồng độ 10,0mg/mL trong natri bicacbonat 0,1M, độ pH =8,3. propylen glycol 50% được chuẩn bị trong natri bicacbonat 0,1M, độ pH =8,3. NHS-PEG_4-DBCO (Click Chemistry Tools, 50mM trong DMSO) được bổ sung vào propylen glycol 50% và trộn kỹ. Một thể tích tương đương chứa kháng thể sau đó được bổ sung vào với tỷ lệ mol là 1:4 (mAb:hợp chất), và trộn kỹ. Sự liên hợp xảy ra trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. NHS-PEG_4-DBCO không phản ứng được loại bỏ, như mô tả trong mục 1.4.4.

1.4.3.2. Phản ứng liên hợp

Propylen glycol 50% được pha chế trong DPBS. Hợp chất azido-nhóm liên kết-eribulin được bổ sung vào propylen glycol 50% và trộn kỹ. Một thể tích tương đương chứa MORAb-003 hoặc MORAb-009 biến đổi - DBCO sau đó được bổ sung vào hỗn hợp này với tỷ lệ mol là 1:4 (mAb:hợp chất), và trộn kỹ. Phản ứng liên hợp SPAAC được để cho xảy ra qua đêm ở nhiệt độ phòng. NHS-PEG_4-DBCO không phản ứng được loại bỏ, như mô tả trong mục 1.4.4.

1.4. Tinh chế

Kháng thể đã liên hợp được tinh chế bằng (các) cột khử muối HiTrap (GE Healthcare). Phép sắc ký được tiến hành trên sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC- sắc ký lỏng

protein nhanh) (GE Healthcare), sử dụng 1X DPBS làm chất đệm chạy, để loại bỏ maleimido/OSu/azido-nhóm liên kết-eribulin và propylen glycol. Hàm lượng protein cuối cùng được xác định bằng thử nghiệm BCA, như mô tả trong mục 1.3.1 của Ví dụ 1.

1.5. Xác định đặc điểm sinh lý

1.5.1. Phân tích SEC-HPLC

Sự kết tụ của ADC được phân tích bằng -loại trừ kích thước (SEC-HPLC) sử dụng Agilent 1260 HPLC. ADC được pha loãng đến 1mg/mL trong DPBS. ADC (10µL) sau đó được bơm lên trên cột bảo vệ Advanced SEC 300A (4,6mm x 3,5cm, cỡ lỗ 2,7µm, Agilent), sau đó là cột AdvancedBio 300A (4,6mm x 30cm, cỡ lỗ 2,7µm). ADC được rửa giải từ cột bằng natri phosphat 0,1M chứa NaCl 0,15M và 5% IPA, độ pH= 7,4 ở tốc độ dòng 0,25mL/phút trong 28 phút. Tất cả số liệu được phân tích bằng phần mềm Agilent ChemStation. Phần trăm kết tụ được tính toán là $[PA_{kết\ tụ}/Pa_{tổng}]*100$, trong đó PA = diện tích đỉnh hợp nhất.

1.5.2. Phân tích HIC-HPLC về tỷ lệ dược chất với kháng thể (DAR)

DAR được phân tích bằng HPLC tương tác kỵ nước (HIC-HPLC). Các mẫu được bơm lên trên TSKgel® Butyl-NP5, 4,6mm ID x 3,5cm, kích thước cột không lỗ 2,5µM (Tosoh Bioscience), và rửa giải bằng cách cân bằng 3 phút trong 100% pha động A, građient 15 phút (0-100% B), giữ 5 phút trong 100% B, thay đổi 1 phút thành 100% A, và cân bằng lại 5 phút trong 100% pha động A, ở tốc độ 0,7mL/phút. Pha động A là natri phosphat 25mM, amoni sulfat 1,5M, độ pH =7,0. Pha động B là natri phosphat 25mM, isopropanol 25%, độ pH =7,0. Việc phát hiện được tiến hành ở 280nm (ưu tiên 320nm). DAR được xác định bằng công thức:

$$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \ldots n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{tổng}]$$

trong đó AUC_{+1} là diện tích dưới đường cong của đỉnh kháng thể tương ứng với ADC được liên hợp với một độc tố tế bào, AUC_{+2} là diện tích dưới đường cong của đỉnh kháng thể tương ứng với ADC được liên hợp với hai độc tố tế bào, v.v.. $\Sigma AUC_{tổng}$ là diện tích dưới đường cong gộp lại của tất cả các đỉnh.

1.5.3. Phân tích LC-MS DAR

DAR cũng được phân tích bằng phương pháp LC-MS với HPLC Waters Alliance và phát hiện SQD/PDA. Các mẫu được bơm lên trên cột Proteomix RP-1000 (5µM, 1000A, 4,6mm x 15cm, Sepax) ở 65°C, và rửa giải bằng cách cân bằng 3 phút trong 25%B, gradient tuyến tính 27 phút từ 25%-55%B, giữ 5 phút ở 55%B, thay đổi 1 phút với 90%B, giữ 5 phút ở 90%B, thay đổi 1 phút trở lại 25%B, và cân bằng lại 5 phút ở 25%B. Pha động A là TFA 0,1% trong nước, và pha động B là TFA 0,1% trong axetonitril. Nước rửa giải sau đó được chia (tỷ lệ 10:1) vào trong bộ dò PDA và SQD. Bộ dò SQD được cài đặt là điện áp mao dẫn, ES dương, ở 3,2kV, phễu điện áp ở 40V, thiết bị chiết ở 3V, và thấu kính RF ở 0,2V, nhiệt độ nguồn ở 150°C, và nhiệt độ khử solvat hóa ở 250°C. Số liệu về khối lượng thu được ở 200-2000m/z từ 40 phút, kiểu liên tục, thời gian quét 1 giây. Số liệu được phân tích và được tháo cuộn ngoại tuyến bằng MassLynx và MaxEnt1. DAR được tính bằng công thức sau:

$$2[[AUC_{LC+1} + 2(AUC_{LC+2}) + 3(AUC_{LC+3}) + \ldots n(AUC_{LC+n})]/\Sigma I_{LC}tot] +$$
$$2[[AUC_{HC+1} + 2(AUC_{HC+2}) + 3(AUC_{HC+3}) + \ldots n(AUC_{HC+n})]/\Sigma AUC_{HC}tot]$$

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

1.5.4. Phân tích UPLC/ESI-MS DAR của các ADC LCcys80

ADC (1mg/mL) được khử bằng cách bổ sung DTT đến nồng độ cuối là 20mM, sau đó ủ ở 60°C trong 3 phút. Các mẫu sau đó được phân tích bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng Waters Acquity và phổ kế khối lượng Q-Tof Premier. Các mẫu (0,5-2µg mỗi mẫu) được bơm lên trên vi cột khử muối MassPrep ở 65°C, được rửa giải từ cột với 5 phút cân bằng trong 95% pha động A, gradient 10 phút (5-90% B), và cân bằng lại 10 phút trong 95% pha động A, ở 0,05mL/phút. Pha động A là axit formic 0,1% trong nước. Pha động B là axit formic 0,1% trong axetonitril. Phổ kế khối lượng Q-Tof được chạy trên kiểu V, ion dương, với việc phát hiện nằm trong khoảng từ 500-4000 m/z. Các thông số nguồn điện là như sau: điện áp mao dẫn, 2,25kV (kháng thể nguyên vẹn)-2,50kV (kháng thể đã khử); điện áp phễu lấy mẫu, 65,0V (kháng thể nguyên vẹn) hoặc 50,0V (kháng thể đã khử); nhiệt

độ nguồn, 105°C; nhiệt độ khử solvat hóa, 250°C; dòng khí khử solvat hóa, 550 L/giờ. Đỉnh protein chuỗi nhẹ được tháo cuộn bằng hàm MassLynx MaxEnt 1. Mật độ tỷ đối của khối lượng chuỗi nhẹ không được liên hợp và được liên hợp đơn chuỗi nhẹ được sử dụng để tính DAR tổng cộng bằng công thức:

$$2[LC_{+1}/\Sigma LC_{tot}]$$

trong đó LC_{+1} là mật độ khối lượng của chuỗi nhẹ được liên hợp với một độc tố tế bào, và ΣLC_{tot} là mật độ tổng của chuỗi nhẹ không được liên hợp và được liên hợp.

1.6. Xác định đặc điểm gắn kết

1.6.1. BIAcore

Nồng độ kháng thể được điều chỉnh đến 2µg/mL trong đệm HBS-P+ (GE Healthcare). Các kháng thể chưa biến đổi, hoặc ADC, được bơm lên cảm biến kháng-IgG người trên BIAcore T100 (GE Healthcare) trong 1 phút ở tốc độ dòng là 10 µL/phút. Để ghi lại mức kết hợp kháng nguyên với kháng thể bắt giữ được, một dãy nồng độ tăng dần của kháng nguyên được bơm trong 300 giây ở tốc độ dòng 30µL/phút. Đối với kháng thể kháng-mesothelin, khoảng nồng độ là 10nM – 0,041nM. Đối với ADC MORAb-003 và MORAb-009, khoảng nồng độ là 100nM – 0,41nM. Sự phân ly của kháng nguyên được theo dõi trong 30 phút ở cùng tốc độ dòng. Bề mặt cảm biến được tái tạo bằng cách bơm $MgCl_2$ 3M trong 2 x 30 giây ở tốc độ dòng 30µL/phút. Biểu đồ đáp ứng theo thời gian được phân tích bằng phần mềm đánh giá Biacore T100 sử dụng mô hình gắn kết 1:1 Langmuir.

1.6.2. ELISA - Thụ thể folat alpha

Thụ thể folat alpha của người tái tổ hợp được pha loãng đến nồng độ 115ng/mL trong đệm bao phủ (đệm cacbonat-bicacbonat 50mM, độ pH =9,6), và được bao lên trên các đĩa màu đen Maxisorp 96-lỗ (Thermo, Số danh mục 43711, 100µL/lỗ) ở 4°C, qua đêm. Dung dịch bao được bỏ đi và các đĩa được rửa ba lần bằng 1X PBS với đệm Tween-20 0,05% (PBST). Các đĩa được phong bế trong 300µL đệm phong bế (BSA 1% trong PBST) ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ trên máy rung lắc quỹ đạo. MORAb-003 và ADC MORAb-003 được pha loãng đến 1000ng/mL trong đệm phong bế, sau đó pha loãng dần 2 lần để thu được khoảng từ 1000 ng/mL đến 0,98 ng/mL. Đệm phong bế được bỏ đi và bổ sung kháng thể pha loãng 100µL/lỗ vào các đĩa. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ

trên máy rung lắc quỹ đạo. Dung dịch kháng thể được bỏ đi và các đĩa được rửa ba lần bằng PBST. 100µL/lỗ dung dịch HRP dê-kháng-IgG người (H+L) (pha loãng tỷ lệ 1:10.000 trong đệm phong bế) được bổ sung vào đĩa, và các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trên máy rung lắc quỹ đạo. Dung dịch kháng thể thứ cấp được bỏ đi và đĩa được rửa ba lần bằng PBST. 100µL/lỗ dung dịch hoạt động chứa cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang QuantaBlu (Thermo, Số danh mục 15169) được bổ sung vào các đĩa, và các đĩa này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Huỳnh quang được đọc ở bước sóng kích thích 325nm/bước sóng phát xạ 420nm bằng SpectraMax M5 (Molecular Devices). Số liệu được phân tích bằng phần mềm SoftMaxPro 5.4.2 với sự điều chỉnh 4 thông số.

1.6.3. ELISA - Mesothelin

Mesothelin người tái tổ hợp được pha loãng đến nồng độ 1µg/mL trong đệm bao phủ (đệm cacbonat-bicacbonat 50mM, độ pH= 9,6), và được bao lên trên đĩa màu đen Maxisorp 96-lỗ (Thermo, Số danh mục 43711, 100µL/lỗ) ở 4°C, qua đêm. Dung dịch bao được bỏ đi và các đĩa được rửa ba lần bằng 1X PBS with 0.05% Tween-20 (PBST) buffer. Các đĩa were blocked in 300 µL đệm phong bế (BSA 1% trong PBST) ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ trên máy rung lắc quỹ đạo. ADC MORAb009 và MORAb-009 được pha loãng đến 1000ng/mL trong đệm phong bế, sau đó pha loãng dần 2,5-lần để thu được nồng độ nằm trong khoảng từ 1000ng/mL đến 0,105ng/mL. Đệm phong bế được bỏ đi và bổ sung 100µL/lỗ kháng thể pha loãng diluted vào các đĩa. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ trên máy rung lắc quỹ đạo. Dung dịch kháng thể được bỏ đi và các đĩa được rửa ba lần bằng PBST. 100µL/lỗ dung dịch dê-kháng-IgG người (H+L)-HRP (pha loãng tỷ lệ 1:10.000 trong đệm phong bế) được bổ sung vào các đĩa, và các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ trên máy rung lắc quỹ đạo. Dung dịch kháng thể thứ cấp được bỏ đi và các đĩa được rửa ba lần bằng PBST. Dung dịch hoạt động chứa cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang QuantaBlu 100µL/lỗ (Thermo, số danh mục 15169) được bổ sung vào các đĩa, và các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Độ huỳnh quang được đọc ở bước sóng kích thích 325nm/phát xạ 420nm bằng SpectraMax M5 (Molecular Devices). Số liệu được phân tích bằng phần mềm SoftMaxPro 5.4.2 với sự điều chỉnh 4 thông số.

1.7. Phân tích độc tính tế bào

1.7.1. Thử nghiệm Crystal Violet

Tế bào IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$), NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$), và A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$) được nuôi cấy dưới dòng và cấy ở mật độ 5.000 tế bào/lỗ trong môi trường phát triển hoàn toàn trong các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ, ủ ở 37°C, 5% CO_2 qua đêm (16 giờ). Thuốc thử của thử nghiệm được pha loãng tỷ lệ 1:3 trong đĩa pha loãng có lỗ sâu dung tích 2mL, bắt đầu từ 200nM (tổng cộng 10 dung dịch pha loãng). Các mẫu đã pha loãng (100µL) được bổ sung vào các đĩa tế bào (nồng độ bắt đầu của mẫu thử nghiệm là ở 100nM). Các đĩa được ủ ở 37°C, 5% CO_2 thêm trong 5 ngày. Môi trường sau đó được bỏ đi. Các đĩa được rửa một lần với 200µL DPBS, nhuộm màu với 50µL dung dịch Crystal Violet 0,2% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, và sau đó rửa sạch với nước vòi. Các đĩa được để khô trong không khí, và Crystal Violet được hòa tan với 200µL dung dịch SDS 1%. Các đĩa được đọc ở bước sóng 570nm. Số liệu được phân tích bằng GraphPad Prism 6.

2. Kết quả

2.1. Xác định đặc điểm sinh lý của các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

Các ADC MORAb-003 (kháng thụ thể folat alpha của người được biến đổi cho phù hợp với người), MORAb-009 (kháng-mesothelin người khảm chuột-người), và trastuzumab (kháng-her2 người được biến đổi cho phù hợp với người) được điều chế bằng cách sử dụng hợp chất eribulin liên hợp được nêu trong Bảng 46 theo một trong ba phương pháp liên hợp, bao gồm: (1) khử một phần disulfua giữa các chuỗi của kháng thể bằng chất khử non-thiol TCEP, sau đó liên hợp bằng các cấu trúc maleimido-đơn vị khoảng cách-nhóm liên kết-eribulin có thiol-hoạt động; (2) liên hợp trực tiếp với các gốc lysin của kháng thể bằng cách sử dụng cấu trúc sucxinimit (OSu)-phần tử khoảng cách-nhóm liên kết-eribulin; và (3) liên hợp với các gốc lysin trong kháng thể bằng phương pháp hai bước, bằng cách đó đầu tiên OSu-PEG4-dibenzylxyclooctyn được liên hợp với các gốc lysin, sau đó liên hợp vuông góc các cấu trúc azido-đơn vị khoảng cách-nhóm liên kết-eribulin được tiến hành bằng SPAAC.

Sau khi tinh chế, mức kết tụ của tất cả các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab được xác định bằng SEC-HPLC và tỷ lệ dược chất với kháng thể (DAR) được

phân tích bằng LC-MS pha đảo và/hoặc HIC-HPLC. DAR của tất cả ADC dựa trên maleimit được phân tích bằng cả LC-MS pha đảo và HIC-HPLC. Đặc trưng quan sát thấy sự chênh lệch giá trị DAR là nhỏ hơn 0,3 giữa hai phương pháp. Ngược lại, DAR của tất cả các ADC điều chế được thông qua phương pháp liên hợp qua gốc lysin được phân tích chỉ bằng LC-MS, do mức độ không đồng nhất cao của các ADC ngăn cản độ phân giải của các kiểu DAR riêng biệt theo HIC-HPLC. Sự gắn kết với kháng nguyên đích cũng được phân tích bằng ELISA, đối với ADC MORAb-003 và MORAb-009. Kết quả của phân tích DAR và mức kết tụ được trình bày trong Bảng 47 bên cạnh ADC tương ứng.

Bảng 47.
Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

					Phân tích DAR		Phân tích SEC-HPLC			Sự gắn kết kháng nguyên	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	% Monome	% Frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003		N/A	N/A	N/A			3,62	96,38	0	6,29	0,04
MORAb009		N/A	N/A	N/A			0	100	0	42,60	0,28
trastuzumab		N/A	N/A	N/A			3,52	96,48	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	3,58	3,91	3,12	96,88	0	22,60	0,15
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	3,63	3,93	3,23	96,77	0	43,70	0,29
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	4,80	4,88	3,21	96,79	0	18,20	0,12
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	4,68	4,57	0,90	99,10	0	33,10	0,22
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	3,10	3,11	1,26	98,74	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1242287	MORAb-003	maleimit	PEG8	val-cit-pAB	2,31	2,35	18,63	81,37	0	21,50	0,14

Bảng 47.
Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

					Phân tích DAR		Phân tích SEC-HPLC			Sự gắn kết kháng nguyên	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	% Monome	% Frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	maleimit	PEG8	val-cit-pAB	1,13	2,00	11,24	88,76	0	58,60	0,39
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	maleimit	pentyl	val-cit-pAB	3,65	3,89	3,95	96,05	0	15,30	0,10
MORAb009-ER1235638	MORAb-009	maleimit	pentyl	val-cit-pAB	3,99	4,10	4,5	95,5	0	65,60	0,44
MORAb003-ER1231679	MORAb-003	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,60	3,83	3,09	96,91	0	18,30	0,12
MORAb009-ER1231679	MORAb-009	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,27	3,94	4,39	95,61	0	41,40	0,28
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3,02	3,23	4,44	95,56	0	8,92	0,06
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2,36	3,17	6,22	93,78	0	58,70	0,39
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,52	1,61	13,73	86,27	0	29,80	0,20
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,72	1,03	9,78	90,22	0	55,90	0,37
MORAb003-ER1237505	MORAb-003	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamit	1,85	3,88	5,72	94,28	0	18,30	0,12
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamit	2,33	3,91	5,44	94,56	0	61,00	0,41

Bảng 47.
Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

					Phân tích DAR		Phân tích SEC-HPLC			Sự gắn kết kháng nguyên	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	% Monome	% Frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003-PEG2-eribulin	MORAb-003	maleimit	PEG2	không tách được	4,15	4,49	3,97	96,03	0	6,96	0,05
MORAb009-PEG2-eribulin	MORAb-009	maleimit	PEG2	không tách được	4,55	4,30	1,15	97,11	1,74	8,84	0,06
MORAb003-PEG4-eribulin	MORAb-003	maleimit	PEG4	không tách được	4,70	4,79	9,84	89,76	0	9,31	0,06
MORAb009-PEG4-eribulin	MORAb-009	maleimit	PEG4	không tách được	4,48	4,57	1,03	97,13	1,84	11,60	0,08
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	sucxinimit	PEG2	val-cit-pAB	0,72		3,65	96,35	0	17,00	0,11
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	sucxinimit	PEG2	val-cit-pAB	0,89		2,75	97,25	0	66,30	0,44
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	sucxinimit	PEG9	val-cit-pAB	0,00		2,85	97,15	0	14,40	0,10
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	sucxinimit	PEG9	val-cit-pAB	0,21		1,69	98,31	0	15,30	0,10
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	sucxinimit	pentyl	val-cit-pAB	0,77		3,13	96,87	0	13,00	0,09
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	sucxinimit	pentyl	val-cit-pAB	0,93		3,04	96,96	0	44,60	0,30
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,00		3,92	96,08	0	6,22	0,04

51551

Bảng 47.
Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

					Phân tích DAR		Phân tích SEC-HPLC			Sự gắn kết kháng nguyên	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	% Monome	% Frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,06		1,97	98,03	0	46,70	0,31
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	sucxinimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,37		3,46	96,54	0	11,50	0,08
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	sucxinimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,29		2,45	97,55	0	43,30	0,29
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,24		10,87	89,13	0	14,30	0,10
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,47		12,79	87,21	0	57,70	0,38
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamit	0,55		5,21	94,79	0	4,54	0,03
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamit	1,14		0	100	0	39,00	0,26
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	2,19		4,1	95,9	0	24,10	0,16
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	2,33		0	100	0	53,80	0,36
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG3	sulfonamit	1,82		3,49	96,51	0	15,00	0,10

Bảng 47.
Phân tích sinh lý các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

					Phân tích DAR		Phân tích SEC-HPLC			Sự gắn kết kháng nguyên	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	% Monome	% Frag.	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG3	sulfonamit	1,59		0	100	0	44,70	0,30
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG4	val-cit-pAB	3,09		2,87	97,13	0	16,00	0,11
MORAb009-DBCO-PEG4 VCP eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG4	val-cit-pAB	2,91		0,22	99,78	0	33,70	0,22
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG2	không tách được	3,43		3,88	96,12	0	19,10	0,13
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG2	không tách được	3,07		1,15	98,85	0	23,30	0,16
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG4	không tách được	2,96		3,64	96,36	0	13,30	0,09
MORAb009-DBCO-PEG4 eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooc ten-triazol-PEG4	không tách được	2,8		1,12	98,88	0	45,20	0,30

Ký hiệu viết tắt: % Aggr: % kết tụ; % Frag : % mức phân mảnh.

51551

2.1.1. Các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

Không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể giữa MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab, cả về mặt hiệu lực liên hợp và các thông số sinh lý. Tất cả các ADC chứng minh giá trị DAR và mức tạo khối kết tụ tương đương.

2.1.2. ADC dựa trên maleimit

Đối với ADC dựa trên maleimit, cả đơn vị khoảng cách pentyl và PEG_2 được ghép đôi với vị trí cắt val-cit-pAB, và đơn vị khoảng cách PEG_2 được ghép đôi với vị trí cắt ala-ala-asn-pAB, mang lại giá trị DAR nằm trong khoảng từ 3,5 đến 4,0 bằng pha đảo LC-MS và HIC-HPLC, ngoài mức kết tụ thấp (<5%). Tuy nhiên, khi đơn vị khoảng cách được kéo dài thành PEG_8 (được ghép đôi với vị trí cắt val-cit-pAB), mức kết tụ tăng lên (11-18%) và hiệu lực liên hợp giảm, khiến cho giá trị DAR nằm trong khoảng từ 1,1 đến 2,3. *Xem, ví dụ*, phần trăm kết tụ và giá trị DAR của MORAb003/MORAb009-ER-001159569 (nhóm liên kết PEG ngắn) và MORAb003/MORAb009-1242287 (nhóm liên kết PEG dài) trong Bảng 47.

Đối với ADC điều chế được với vị trí cắt disulfidyl-pAB, quan sát thấy các giá trị DAR thấp (1,0-1,6), cùng với mức kết tụ tương đối cao (10-14%). Quan sát thấy giá trị DAR thấp hơn đáng kể khi các ADC được phân tích bằng LC-MS thấp hơn là bằng HIC-HPLC (xem, ví dụ, giá trị DAR theo LC-MS/HIC-HPLC của MORAb003/MORAb009-ER1237504 và MORAb003/MORAb009-ER1237505 trong Bảng 47). Kết quả này gợi ý rằng vị trí cắt của nhóm liên kết thể hiện sự không ổn định theo độ pH, do pha động của phân tích LC-MS xấp xỉ 3,0, pha động của phép phân tích HIC-HPLC là trung hòa.

Đối với các ADC điều chế được với vị trí cắt sulfonamit, quan sát thấy mức kết tụ thấp (< 5%). Tương tự với các ADC disulfidyl-pAB, quan sát thấy các giá trị DAR thấp hơn khi phân tích bằng LC-MS (1,8-2,3) hơn là phân tích bằng HIC-HPLC (3,9), điều này một lần nữa chỉ ra rằng vị trí cắt của nhóm liên kết thể hiện sự không ổn định theo độ pH.

Đối với nhóm liên kết không tách được PEG_2 và PEG_4, quan sát thấy sự liên hợp hiệu quả, khiến cho giá trị DAR nằm trong khoảng từ 4,0 đến 4,7. ADC MORAb -009 với các nhóm liên kết không tách được cũng chứng minh mức kết tụ thấp (< 2%), trong khi đó quan sát thấy mức kết tụ hơi cao hơn đối với ADC MORAb-003 tương ứng (4% và 10% đối với PEG_2 và PEG_4, lần lượt).

2.1.3. ADC dựa trên sucxinimit

Tất cả các ADC điều chế được bằng cách sử dụng sucxinimit kết hợp với đơn vị khoảng cách-nhóm liên kết-eribulin khiến cho các giá trị DAR < 1,0. Để khẳng định rằng hiệu lực liên hợp thấp hơn này (so với maleimit) là không phải kết quả của chính quy trình liên hợp, các ADC được tạo lại bằng cách sử dụng tỷ lệ hợp chất:kháng thể và phân tích lại bằng cách sử dụng phương pháp phân tích DAR tương tự. Thu được kết quả tương tự, điều này gợi ý rằng, không bị giới hạn bởi lý thuyết, giá trị DAR thấp hơn là một đặc điểm riêng của hỗn hợp sucxinimit và eribulin, và các maleimit có thể được liên hợp hiệu quả hơn. Hiệu lực liên hợp sucxinimit được tăng lên qua việc sử dụng phương pháp hai bước, theo cách đó đầu tiên DBCO được bổ sung vào kháng thể bằng cách sử dụng NHS-DBCO, sau đó bổ sung hợp chất azido. Phương pháp này mang lại giá trị DAR cao hơn, như đo được bởi phân tích HPLC pha đảo, so với sự liên hợp trực tiếp với gốc lysin của kháng thể. Đối với ADC dựa trên sucxinimit có nhóm liên kết sulfonamit (có thể tách được), val-cit-PAB (có thể tách được), hoặc PEG_2/PEG_4 (không tách được), giá trị DAR thu được từ phương pháp liên hợp hai bước là tương tự với giá trị xác định được của ADC dựa trên maleimit có vị trí cắt sulfonamit. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, kết quả này một lần nữa gợi ý rằng các giá trị DAR thấp của phản ứng liên hợp sucxinimit-đơn vị khoảng cách-nhóm liên kết-eribulin là đặc điểm riêng của hỗn hợp của sucxinimit và eribulin.

2.2. Xác định đặc điểm gắn kết của các ADC MORAb-003 và MORAb-009

Đối với ADC MORAb-003, không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể giữa ADC nhóm liên kết dựa trên maleimit-eribulin không tách được và MORAb-003 gốc về mặt gắn kết kháng nguyên đích. Đối với các ADC nhóm liên kết dựa trên maleimit-eribulin MORAb-003 khác, đặc trưng quan sát thấy sự giảm gắn kết kháng nguyên từ 2 đến 3 lần so với MORAb-003 gốc bởi phương pháp phân tích ELISA. Tuy nhiên, không có sự tương quan rõ ràng giữa chiều dài của nhóm liên kết hoặc công thức nhóm liên kết và giá trị EC_{50} thấp. Tương tự, đối với ADC nhóm liên kết dựa trên sucxinimit-eribulin MORAb-003, thường quan sát thấy sự giảm gắn kết kháng nguyên đích từ 0 đến 3 lần so với MORAb-003 không liên hợp. Một lần nữa, không có mối tương quan rõ ràng giữa chiều dài nhóm liên kết hoặc công thức nhóm liên kết và giá trị EC_{50} thấp. Đối với các ADC MORAb-009, tất cả các ADC có mức giảm giá trị EC_{50} thấp hơn 2 lần, so với MORAb-009 gốc.

2.3. Phân tích độc tính tế bào *in vitro* của các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab

Hiệu lực *in vitro* của các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab điều chế được được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm độc tính tế bào dựa trên tế bào Crystal Violet. Dòng tế bào được chọn để sàng lọc các ADC MORAb-003 và MORAb-009 là IGROV1, NCI-H2110, và A431. Tế bào IGROV1 là thuộc gốc caxinom biểu mô buồng trứng người và biểu hiện các mức cao thụ thể folat alpha, nhưng không biểu hiện mesothelin (tức là, MORAb-003-phản ứng). Tế bào NCI-H2110 là thuộc gốc caxinom phổi tế bào không nhỏ của người và biểu hiện các mức trung bình của cả thụ thể folat alpha và mesothelin (tức là, MORAb-003- và MORAb-009-phản ứng). Tế bào đối chứng A431 là thuộc gốc caxinom biểu bì của người và không thể hiện cả hai kháng nguyên đích. Các kết quả của sàng lọc này được trình bày trong Bảng 48. Các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab bao gồm nhóm liên kết-độc tố maleimido-PEG2-val-cit-pAB-eribulin (VCP-eribulin) cũng được đánh giá trong dòng tế bào ung thư dạ dày và dòng tế bào ung thư vú, bao gồm NCI-N87 (FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$), BT-474 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$), ZR-75 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$), và NUGC3 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$). Các kết quả của sàng lọc này được trình bày trong Bảng 49.

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb009		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
trastuzumab		N/A	N/A	N/A						
eribulin	N/A	N/A	N/A	N/A	0,320	0,212	0,199	0,034	0,653	0,159
MORAb003 - ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	0,155	0,064	3,685	0,417	>100	
MORAb009 - ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	9,450	2,093	14,945	1,747	>100	
MORAb003 - ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	0,020		1,550		>100	

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009 - ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	5,687		6,784		>100	
trastuzumab - ER1159569	trastuzumab	maleimit	PEG2	val-cit-pAB						
MORAb003 - ER1242287	MORAb-003	maleimit	PEG8	val-cit-pAB	0,115	0,035	7,065	0,417	85,960	
MORAb009 - ER1242287	MORAb-009	maleimit	PEG8	val-cit-pAB	25,765	8,478	34,455	3,033	>100	
MORAb003 - ER1235638	MORAb-003	maleimit	pentyl	val-cit-pAB	0,105	0,092	3,920	1,032	>100	
MORAb009 - ER1235638	MORAb-009	maleimit	pentyl	val-cit-pAB	6,830	0,962	13,965	6,611	>100	
MORAb003 - ER1231679	MORAb-003	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,080	0,028	3,800	0,566	31,630	1,202

51551

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009-ER1231679	MORAb-009	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	8,890	0,976	7,080	1,867	34,390	3,536
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	0,125	0,021	4,745	2,114	38,555	0,403
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	maleimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	16,980	5,176	12,310	3,422	54,960	5,360
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,265	0,092	0,845	0,177	7,005	0,290
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	6,375	2,751	1,220	0,325	8,130	0,608
MORAb003-ER1237505	MORAb-003	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamit	0,370	0,269	0,690	0,283	6,800	0,834
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimit	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamit	6,370	3,012	0,990	0,453	9,030	1,527
MORAb003-PEG2-eribulin	MORAb-003	maleimit	PEG2	không tách được	0,330		38,300		>100	

51551

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009-PEG2-eribulin	MORAb-009	maleimit	PEG2	không tách được	42,770		50,040		>100	
MORAb003-PEG4-eribulin	MORAb-003	maleimit	PEG4	không tách được	0,277		21,630		>100	
MORAb009-PEG4-eribulin	MORAb-009	maleimit	PEG4	không tách được	76,320		31,600		>100	
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	sucxinimit	PEG2	val-cit-pAB	0,325	0,106	30,545	3,132	>100	
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	sucxinimit	PEG2	val-cit-pAB	31,915	2,510	36,500	11,031	90,060	
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	sucxinimit	PEG9	val-cit-pAB	38,105	45,601	64,010	8,075	>100	
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	sucxinimit	PEG9	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	sucxinimit	pentyl	val-cit-pAB	0,330	0,071	42,105	12,594	>100	

51551

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	sucxinimit	pentyl	val-cit-pAB	>100		49,485	13,569	>100	
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	1,150		>100		>100	
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	sucxinimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	12,320		31,795	4,448	>100	
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	sucxinimit	PEG2	ala-ala-asn-pAB	>100		20,000	5,954	>100	
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,370	0,184	0,750	0,071	12,005	1,534
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	6,595	4,052	0,840	0,057	9,230	0,014
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamit	0,980	0,396	1,820	0,410	37,235	15,733

51551

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	sucxinimit	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamit	24,505	4,702	2,235	0,629	36,665	14,206
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	0,545	0,389	0,900	0,071	9,670	0,382
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG3	disylfidyl-dimetyl-pAB	10,245	3,486	1,040	0,297	11,280	2,277
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG3	sulfonamit	1,775	1,421	1,655	0,007	24,990	2,022
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG3	sulfonamit	19,155	5,438	1,960	0,113	28,070	0,636
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG4	val-cit-pAB	0,038		4,281		>100	
MORAb009-DBCO-PEG4 VCP eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG4	val-cit-pAB	12,960		31,400		>100	

51551

Bảng 48. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003 và MORAb-009 trên tế bào IGROV1, NCI-H2110, và A431

					Phân tích độc tính tế bào					
					IGROV1 (FR^{hi}, $MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}, $MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$)	
ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG2	không tách được	4,250		38,070		>100	
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG2	không tách được	75,680		85,680		>100	
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulin	MORAb-003	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG4	không tách được	1,323		46,280		>100	
MORAb009-DBCO-PEG4 eribulin	MORAb-009	sucxinimit/ Hóa học Click	dibenzylxyclooct en-triazol-PEG4	không tách được	61,490		39,330		>100	

Tất cả các giá trị IC_{50} là đơn vị nM, và thể hiện giá trị trung bình của các thử nghiệm lặp lại. SD – độ lệch chuẩn.

51551

Bảng 49. Sàng lọc độc tính tế bào (IC_{50}) của ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab trên tế bào NCI-N87, BT-474, ZR-75, và NUGC3

					Phân tích độc tính tế bào			
					NCI-N87-Luc (FR^{lo}, $MSLN^{med}$, $her2^{hi}$)	BT-474 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{hi}$)	ZR-75-1 (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{med}$)	NUGC3-Luc (FR^{neg}, $MSLN^{neg}$, $her2^{neg}$)
Các ADC	Kháng thể	Hóa học liên hợp	Đơn vị khoảng cách	Hóa học cắt	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
MORAb003		N/A	N/A	N/A				
MORAb009		N/A	N/A	N/A				
trastuzumab		N/A	N/A	N/A	0,78	0,641	>100	>100
eribulin	N/A	N/A	N/A	N/A	0,257	0,151	0,236	0,445
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	4,528	11,46	14,74	20,45
MORAb009-ER1159569	MORAb-009	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	0,013	10,21	12,8	29,93

51551

(Lot NB3142-62D)								
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimit	PEG2	val-cit-pAB	0,006	0,003	0,023	20,06

Tất cả các giá trị IC_{50} là đơn vị nM, và thể hiện giá trị trung bình của các thử nghiệm lặp lại. SD – độ lệch chuẩn.

51551

2.3.1. Độc tính tế bào của ADC dựa trên maleimit

Tất cả các ADC dựa trên maleimit MORAb-003 và MORAb-009 thể hiện độc tính tế bào đặc hiệu trên tế bào IGROV1, với việc quan sát thấy sự chênh lệch độ lớn 2-3 bậc về hiệu lực giữa các kháng thể. ADC val-cit-pAB-eribulin MORAb-003 chứng minh hiệu lực cao hơn trên dòng tế bào IGROV1 so với cả ADC MORAb-003 không tách được PEG_2 hoặc PEG_4, nhưng cấp độ đặc hiệu không thay đổi. Quan sát thấy xu hướng tương tự đối với ADC MORAb-009, với ADC MORAb-009 không tách được chứng minh độc tính tế bào thấp hơn trên tế bào IGROV1 so với ADC val-cit-pAB-eribulin MORAb-009.

ADC dựa trên maleimit MORAb-009 có nhóm liên kết dựa trên disulfidyl và sulfonamit chứng minh hiệu lực trên dòng tế bào NCI-H2110 cao hơn so với dòng tế bào IGROV1. Điều này có thể là do khả năng không ổn định của nhóm liên kết trong nuôi cấy, như được mô tả sau đây. Độc tính tế bào tiềm năng cũng được quan sát thấy với các ADC MORAb-003 tương ứng. Ngược lại, ADC dựa trên maleimit MORAb-003 và MORAb-009 có nhóm liên kết không tách được chứng minh hiệu lực tương đối thấp trên tế bào NCI-H2110. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, kết quả này gợi ý rằng với sự biểu hiện đích thấp, sự cắt hiệu quả và giải phóng lượng nạp có thể làm tăng độc tính tế bào.

ADC có nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym val-cit-pAB hoặc nhóm liên kết không tách được chứng minh các mức diệt sai đích thấp trên tế bào đối chứng A431 (IC_{50} > 100 nM), trong đó ADC có nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym ala-ala-asn-pAB thể hiện sự diệt yếu nhưng có thể phát hiện được với các tế bào đối chứng. Điều này chỉ ra rằng nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym val-cit-pAB có thể ổn định hơn trong nuôi cấy so với nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym ala-ala-asn-pAB. Ngoài ra, ADC MORAb-009 có đơn vị khoảng cách PEG_2 ngắn hơn chứng minh độc tính tế bào trong tế bào IGROV1 cao hơn so với ADC tương ứng có đơn vị khoảng cách PEG_8 dài hơn. Quan sát thấy xu hướng tương tự trong các tế bào NCI-H2110 đối với cả ADC MORAb-003 và MORAb-009, có chiều dài đơn vị khoảng cách ngắn hơn gây ra độc tính tế bào cao hơn.

Các ADC có nhóm liên kết dựa trên sulfonamit thường chứng minh giá trị DAR cao hơn và mức kết tụ thấp hơn so với ADC tương ứng có nhóm liên kết dựa trên disulfidyl. Tuy nhiên, quan sát thấy sự diệt tế bào đối chứng A431 ở mức độ nM ở cả hai nhóm ADC này, gợi ý rằng nhóm liên kết dựa trên sulfonamit và disulfidyl là kém ổn định hơn trong

nuôi cấy so với nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym trong các điều kiện thử nghiệm được tiến hành.

Nhóm liên kết-độc tố maleimido-PEG_2-val-cit-pAB-eribulin (VCP-eribulin) cụ thể được kiểm tra thêm về tính đặc hiệu và hiệu lực trên các dòng tế bào ung thư dạ dày và vú khác nhau. VCP-eribulin được liên hợp với MORAb-003 và MORAb-009, ngoài kháng thể kháng- her2 người trastuzumab. MORAb-003-VCP-eribulin chứng minh sự diệt yếu nhưng đặc hiệu trên tế bào NCI-N87, tế bào này biểu hiện mức thấp thụ thể folat alpha (FR), và sự diệt nhẹ trên ba dòng tế bào FR-âm tính còn lại. MORAb-009-VCP-eribulin cũng chứng minh độc tính tế bào tiềm năng trên tế bào NCI-N87, tế bào này biểu hiện mức trung bình mesothelin. Trastuzumab-VCP-eribulin là rất tiềm năng (3 – 6pM, IC_{50}) trên tế bào NCI-N87 và BT-474, hai dòng tế bào này biểu hiện mức độ cao her2, và cũng tiềm năng trên tế bào ung thư vú ZR-75, tế bào này chỉ biểu hiện trung bình her2. Tất cả các ADC MORAb-003, MORAb-009, và trastuzumab VCP-eribulin all chứng minh độc tính tế bào thấp trên tế bào NUGC3, mà không biểu hiện FR, mesothelin, hoặc her2, kháng nguyên đích tương ứng.

2.3.2. Độc tính tế bào của ADC dựa trên sucxinimit

Xu hướng của độc tính tế bào của ADC dựa trên sucxinimit là tương tự như ADC dựa trên maleimit đối với tế bào IGROV1, ADC có đơn vị khoảng cách PEG_8 chứng minh độc tính tế bào thấp ngoài các giá trị DAR thấp. Thường quan sát thấy độc tính tế bào thấp trên cả tế bào IGROV1 và NCI-H2110 đối với ADC dựa trên sucxinimit có nhóm liên kết phân cắt được bởi enzym so với ADC dựa trên maleimit tương ứng, điều này có khả năng là do giá trị DAR thấp của chúng. Cũng quan sát thấy sự diệt sai đích tế bào A431 với nhóm liên kết dựa trên sulfonamit và disulfidyl, tương tự như ADC dựa trên maleimit tương ứng. Điều này chỉ ra sự không ổn định tăng lên từ vị trí cắt, chứ không phải là từ hóa học liên hợp.

Khi phương pháp liên hợp hai bước được tiến hành, quan sát thấy các giá trị DAR cao hơn so với các giá trị thu được bởi phương pháp liên hợp sucxinimit trực tiếp. Giá trị DAR cao hơn tỷ lệ với hiệu lực cao hơn. Đối với ADC VCP-eribulin MORAb-003, quan sát thấy độc tính tế bào tiềm năng lên cả tế bào IGROV1 và NCI-H2110. Trong khi các ADC không tách được MORAb-003 chứng minh hiệu lực trên tế bào IGROV1 (1- 4nM),

chúng vẫn có hiệu lực kém hơn ADC VCP-eribulin MORAb-003 điều chế bằng phương pháp này (38pM), mặc dù giá trị DAR là có thể so sánh được. Ngoài ra, ADC không tách được MORAb-003 điều chế được bằng phương pháp hai bước là có hiệu lực hơi kém hơn so với ADC dựa trên maleimit tương ứng trên dòng tế bào IGROV1, điều này có thể là do giá trị DAR thấp hơn của chúng. Giống với các chất tương tự dựa trên maleimit của chúng, các ADC không tách được điều chế được bằng phương pháp hai bước cũng mất gần hết độc tính tế bào trên tế bào NCI-2110.

2.4. Xác định đặc điểm sinh lý của ADC kháng-mesothelin người (LCcys80)

MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulin (ER-001159569) được liên hợp với tám kháng thể kháng-mesothelin người khác nhau (Bảng 1). Ái lực gắn kết của các kháng thể gốc được xác định bằng phân tích BIAcore, như mô tả trên trong mục 1.6.1. Mức kết tụ của tất cả các ADC kháng-mesothelin người được xác định bằng SEC-HPLC và DAR được phân tích bằng HIC-HPLC. Hiệu lực *in vitro* được đánh giá bằng thử nghiệm độc tính tế bào dựa trên tế bào Crystal Violet trong tế bào A3 (A431 được chuyển nạp ổn định với mesothelin người (MSLN), $MSLN^{hi}$), OVCAR3 (buồng trứng của người, $MSLN^{hi}$), HEC-251 (dạng nội mạc tử cung của người, $MSLN^{med}$), H226 (u trung biểu mô tế bào có vảy phổi của người, $MSLN^{lo}$), và A431 gốc ($MSLN^{neg}$). Kết quả của DAR, mức kết tụ, và phân tích độc tính tế bào được trình bày trong Bảng 50.

Bảng 50. Xác định đặc điểm sinh lý của ADC kháng-mesothelin người (LCcys80)

		Mab gốc			ADC								
		Ái lực			Lượng nạp	HIC	SEC-HPLC		Thử nghiệm độc tính tế bào dựa trên tế bào, EC50, nM				
		K_a (10^5 M^{-1} giây^{-1})	K_d (10^{-3} giây^{-1})	K_D (10^{-9} M)	Dược chất-nhóm liên kết	DAR	% kết tụ	% monome	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
33O11	xi				ER-001159569-000	1,92	8,97	91,03	40,67	0,008	3,950	>100	0,14
	zu	2,2	0,65	3,4	ER-001159569-000	1,69	1,42	98,58	~100	0,064	26,500	>100	0,28

111B10	xi	6,5	3,9	6,3	ER-001159569-000	1,90	4,25	95,75	38,10	0,004	13,960	~100	0,05
	zu	5,1	3	6,5	ER-001159569-000	1,81	3,64	96,36	68,92	0,014	27,42	>100	0,12
201C15	xi	2,4	0,26	1,1	ER-001159569-000	1,85	1,62	98,38	48,50	0,004	14,82	~100	0,27
	zu	3,1	1,1	4,2	ER-001159569-000	1,80	5,84	94,16	68,88	0,290	20,42	>100	0,41
346C6	xi	3,8	0,49	1,4	ER-001159569-000	1,56	5,28	94,72	34,49	0,087	5,73	~100	0,11
	zu	133	93	8,9	ER-001159569-000	1,63	4,48	95,52	72,86	1,180	32,54	>100	0,55

Ký hiệu viết tắt: xi – khảm; zu – được biến đổi cho phù hợp với người.

Tất cả các ADC kháng-mesothelin người vẫn giữ mức kết tụ thấp (mức kết tụ 10%) và chứng minh hiệu lực cao trên các dòng tế bào đích. Quan sát thấy hiệu lực cao trên A3 và OVCAR3, trong khi các tế bào HEC-251 và H226 là tương đối kháng lại độc tính tế bào của ADC.

Trình tự được chọn:

SEQ ID NO: 1 (MORAb-003 Chuỗi nặng (HC))

```
  1  EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM
 51  ISSGGSYTYY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG
101  DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
201  ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301  TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
```

SEQ ID NO: 2 (MORAb-003 HC CDR1; Kabat): GYGLS

SEQ ID NO: 3 (MORAb-003 HC CDR2; Kabat): MISSGGSYTYYADSVKG

SEQ ID NO: 4 (MORAb-003 HC CDR3; Kabat): HGDDPAWFAY

SEQ ID NO: 5 (MORAb-003 Trình tự axit amin tiền-protein chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng; trình tự dẫn đầu được gạch chân)

```
  1  MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGFTFSG
 51  YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL
101  QMDSLRPEDT GVYFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA
151  PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201  YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC
251  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451  EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

SEQ ID NO: 6 (MORAb-003 Chuỗi nhẹ (LC))

```
  1  DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPWIY
 51  GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT
101  FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
151  WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
201  HQGLSSPVTK SFNRGEC
```

SEQ ID NO: 7 (MORAb-003 LC CDR1; Kabat): SVSSSISSNNLH

SEQ ID NO: 8 (MORAb-003 LC CDR2: Kabat): GTSNLAS

SEQ ID NO: 9 (MORAb-003 LC CDR3; Kabat): QQWSSYPYMYT

SEQ ID NO: 10 MORAb-003 Trình tự axit amin tiền-protein chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ (trình tự dẫn đầu được gạch chân)

```
  1  MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVTI TCSVSSSISS
 51  NNLHWYQQKP GKAPKPWIYG TSNLASGVPS RFSGSGSGTD YTFTISSLQP
101  EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151  TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201  LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
```

SEQ ID NO: 11 (MORAb-003 HC nt)

```
   1  ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
  51  CCACTCCGAG GTCCAACTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG
 101  GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC
 151  TATGGGTTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT
 201  TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA
 251  AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCCTG
 301  CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG
 351  ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG
 401  TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA
 451  CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
 501  CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
 551  TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
 601  TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA
 651  GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
 701  AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 751  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
 801  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 851  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 901  GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 951  CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
1001  GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1051  GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
1151  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
1251  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
1301  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
1401  GAAATGA
```

SEQ ID NO: 12 (MORAb-003 LC nt)

```
   1  ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
  51  CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
 101  TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
 151  AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG
 201  GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTCAGCG
 251  GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
 301  GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
 351  GTACACGTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
 401  CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
 451  ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
 501  AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
 551  GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
 601  CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
 651  AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
 701  GAGAGTGTTA A
```

SEQ ID NO: 13 (MORAb-003 HC CDR1; IMGT): GFTFSGYG

SEQ ID NO: 14 (MORAb-003 HC CDR2; IMGT): ISSGGSYT

SEQ ID NO: 15 (MORAb-003 HC CDR3; IMGT): ARHGDDPAWFAY

SEQ ID NO: 16 (MORAb-003 LC CDR1; IMGT): SSISSNN

SEQ ID NO: 17 (MORAb-003 LC CDR2; IMGT): GTS

SEQ ID NO: 18 (MORAb-003 LC CDR3; IMGT): QQWSSYPYMYT

SEQ ID NO: 19 (FRA người)

```
  1 maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcmna khhkekpgpe dklheqcrpw
 61 rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv
121 dqswrkervl nvplckedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf
181 yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa
241 awpfllslal mllwlls
```

SEQ ID NO: 20 (nucleotit FRA người)

```
  1 cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg
 61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg
121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa
181 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
241 tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac
301 tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc
361 ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
421 aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat
481 tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg
541 tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc
601 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg
661 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg
721 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg
781 cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac
841 ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg
901 tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat
961 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

SEQ ID NO: 21 (her2 người)

```
1    melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly qgcqvvqgnl
61   eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvplqrlr ivrgtqlfed nyalavldng
```

121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvliqrnpq lcyqdtilwk difhknnqla
181 ltlidtnrsr achpcspmck gsrcwgesse dcqsltrtvc aggcarckgp lptdccheqc
241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt fgascvtacp
301 ynylstdvgs ctlvcplhnq evtaedgtqr cekcskpcar vcyglgmehl revravtsan
361 iqefagckki fgslaflpes fdgdpasnta plqpeqlqvf etleeitgyl yisawpdslp
421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swlglrslre lgsglalihh nthlcfvhtv
481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wgpgptqcvn csqflrgqec
541 veecrvlqgl preyvnarhc lpchpecqpq ngsvtcfgpe adqcvacahy kdppfcvarc
601 psgvkpdlsy mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdlddk gcpaeqrasp ltsiisavvg
661 illvvvlgvv fgilikrrqq kirkytmrrl lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel
721 rkvkvlgsga fgtvykgiwi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp
781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygclldhv renrgrlgsq dllnwcmqia kgmsyledvr
841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarll dideteyhad ggkvpikwma lesilrrrft
901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid vymimvkcwm
961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlgpaspl dstfyrslle dddmgdlvda
1021 eeylvpqqgf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseeea prsplapseg
1081 agsdvfdgdl gmgaakglqs lpthdpsplq rysedptvpl psetdgyvap ltcspqpeyv
1141 nqpdvrpqpp spregplpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfafgga venpeyltpq
1201 ggaapqphpp pafspafdnl yywdqdpper gappstfkgt ptaenpeylg ldvpv

SEQ ID NO: 22 (nucleotit her2 người)

1 ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC CCCCGGAGCC
61 GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG
121 ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA GGGAAACCTG
181 GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT CCAGGAGGTG
241 CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCACTGCA GAGGCTGCGG
301 ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT AGACAATGGA
361 GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT GCGGGAGCTG
421 CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG GAACCCCCAG
481 CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA CCAGCTGGCT
541 CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG
601 GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG CACTGTCTGT
661 GCCGGTGGCT GTGCCCGCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT
721 GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA CTTCAACCAC
781 AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTGAG
841 TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC
901 TACAACTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA

961 GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA
1021 GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC CAGTGCCAAT
1081 ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTTCT GCCGGAGAGC
1141 TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT CCAAGTGTTT
1201 GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA CAGCCTGCCT
1261 GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA CAATGGCGCC
1321 TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC ACTGAGGGAA
1381 CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG
1441 CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCCA
1501 GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG AGGGCACTGC
1561 TGGGGTCCAG GGCCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG CCAGGAGTGC
1621 GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC CAGGCACTGT
1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG
1741 GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT GGCCCGCTGC
1801 CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG
1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG
1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC GGTGGTTGGC
1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG ACGGCAGCAG
2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCCGCTG
2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA GACGGAGCTG
2161 AGGAAGGTGA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG CATCTGGATC
2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA AAACACATCC
2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT GGGCTCCCCA
2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT
2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT GGGCTCCCAG
2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA GGATGTGCGG
2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA CCATGTCAAA
2581 ATTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA CCATGCAGAT
2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG GCGGTTCACC
2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC
2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG
2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA ATGTTGGATG
2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC
2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG AATGAGGACT TGGGCCCAGC CAGTCCCTTG
3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT GGTGGATGCT
3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC GGGCGCTGGG
3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG GGACCTGACA

3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC CTCCGAAGGG
3241 GCTGGCTCCG ATGTATTTGA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG GCTGCAAAGC
3301 CTCCCCACAC ATGACCCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCCAC AGTACCCCTG
3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCCAGCC TGAATATGTG
3421 AACCAGCCAG ATGTTCGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT GCCTGCTGCC
3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCCC AAGACTCTCT CCCCAGGGAA GAATGGGGTC
3541 GTCAAAGACG TTTTTGCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT GACACCCCAG
3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT CGACAACCTC
3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT CAAAGGGACA
3721 CCTACGGCAG AGAACCCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức (I):

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

trong đó

Ab là kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người (HER2) nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:71 (HCDR1), SEQ ID NO:72 (HCDR2), và SEQ ID NO:73 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:74 (LCDR1), SEQ ID NO:75 (LCDR2), và SEQ ID NO:76 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:191 (HCDR1), SEQ ID NO:192 (HCDR2), và SEQ ID NO:193 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:194 (LCDR1), SEQ ID NO:195 (LCDR2), và SEQ ID NO:196 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

D là eribulin;

L là nhóm liên kết phân cắt được, trong đó nhóm liên kết phân cắt được này chứa đơn vị phân cắt được chứa valin-citrullin (Val-Cit); và

p là số nguyên có giá trị từ 1 đến 8.

2. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, trong đó *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 4.

3. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, trong đó nhóm liên kết phân cắt được bao gồm nhóm gắn kết kháng thể, và đơn vị khoảng cách.

4. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được nối với nhóm gắn kết kháng thể.

5. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó đơn vị khoảng cách bao gồm gốc polyetylen glycol (PEG).

6. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 5, trong đó gốc PEG bao gồm -$(PEG)_m$- và *m* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 10.

7. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 6, trong đó *m* bằng 2.

8. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó đơn vị khoảng cách gắn với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua nhóm gắn kết kháng thể.

9. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm gắn kết kháng thể bao gồm gốc maleimit (Mal) ("đơn vị khoảng cách-Mal").

10. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 9, trong đó đơn vị khoảng cách-Mal được nối với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên thông qua gốc cystein trên kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên.

11. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 9, trong đó đơn vị khoảng cách-Mal gắn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên với đơn vị phân cắt được trong nhóm liên kết.

12. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit.

13. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó đơn vị phân cắt được trong nhóm liên kết được nối với eribulin trực tiếp hoặc thông qua đơn vị khoảng cách bổ sung tùy ý.

14. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 13, trong đó đơn vị khoảng cách bổ sung bao gồm p-aminobenzyloxycarbonyl (pAB).

15. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Val-Cit-pAB.

16. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB.

17. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 3, trong đó nhóm liên kết phân cắt được được liên kết cộng hóa trị với eribulin thông qua C-35 amin.

18. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28.

19. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người.

20. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa của người.

21. Thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức (I):

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

trong đó

Ab là kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người (HER2) nội bào hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nội bào hóa của nó bao gồm ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:71 (HCDR1), SEQ ID NO:72 (HCDR2), và SEQ ID NO:73 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:74 (LCDR1), SEQ ID NO:75 (LCDR2), và SEQ ID NO:76 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số Kabat; hoặc ba vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (HCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:191 (HCDR1), SEQ ID NO:192 (HCDR2), và SEQ ID NO:193 (HCDR3); và ba vùng xác định bổ thể chuỗi nhẹ (LCDR) bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO:194 (LCDR1), SEQ ID NO:195 (LCDR2), và SEQ ID NO:196 (LCDR3), như được xác định bởi hệ thống đánh số IMGT;

D là eribulin;

L là nhóm liên kết phân cắt được bao gồm Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB; và

p là số nguyên có giá trị từ 1 đến 8.

22. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 21, trong đó *p* là số nguyên có giá trị từ 1 đến 4.

23. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 21, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:28.

24. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 21, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người.

25. Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm 21, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định chuỗi nhẹ Ig kappa của người.

26. Dược phẩm để điều trị bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư biểu hiện HER2, chứa thành phần hoạt tính là thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, hoặc nhiều bản sao của thể liên hợp kháng thể-dược chất này, trong đó trong đó giá trị *p* trung bình của các thể liên hợp kháng thể-dược chất trong dược phẩm này là nằm trong khoảng từ 3,2 đến khoảng 4,4.

27. Dược phẩm để giảm hoặc ức chế sự phát triển của khối u, trong đó khối u biểu hiện HER2, chứa lượng có hiệu quả điều trị của thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25.

28. Phương pháp sản xuất thể liên hợp kháng thể-dược chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, bao gồm bước cho kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên phản ứng với nhóm liên kết phân cắt được được nối với eribulin trong các điều kiện cho phép liên hợp.

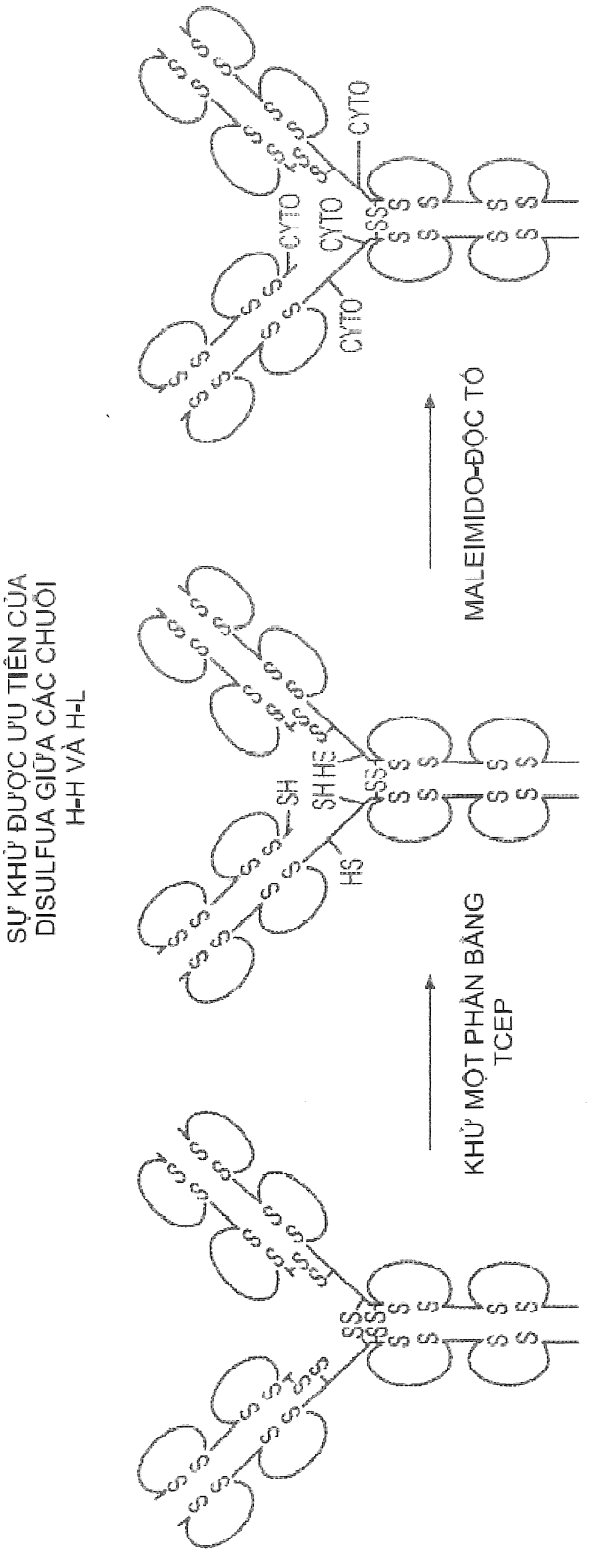

SỰ KHỬ ĐƯỢC ƯU TIÊN CỦA
DISULFUA GIỮA CÁC CHUỖI
H-H VÀ H-L
KHỬ MỘT PHẦN BẰNG
TCEP
MALEIMIDO-ĐỘC TỐ
SH
HS
CYTO

FIG. 1

2/32

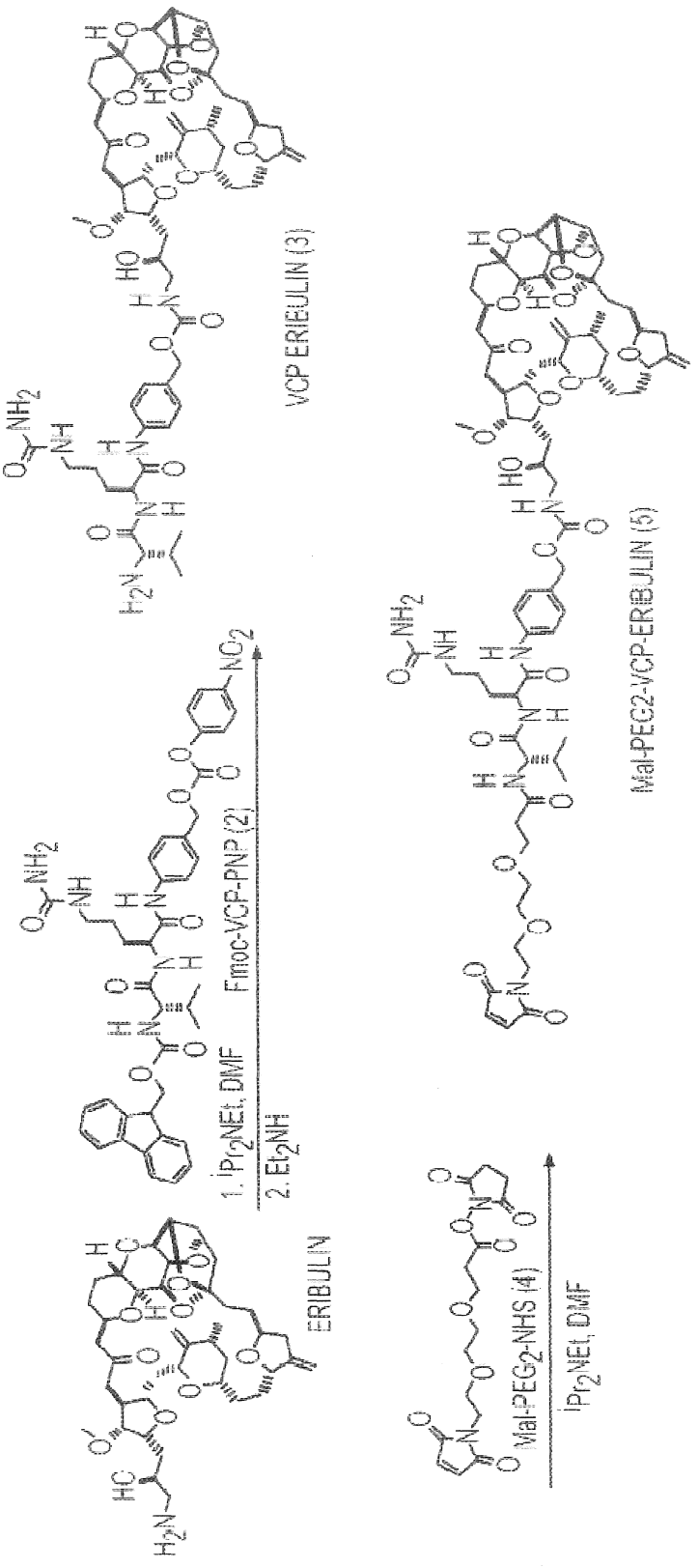

ERIBULIN
1. iPr2NEt, DMF
Fmoc-VCP-PNP (2)
2. Et2NH
VCP ERIBULIN (3)
Mal-PEG2-NHS (4)
iPr2NEt, DMF
Mal-PEG2-VCP-ERIBULIN (5)

FIG. 2

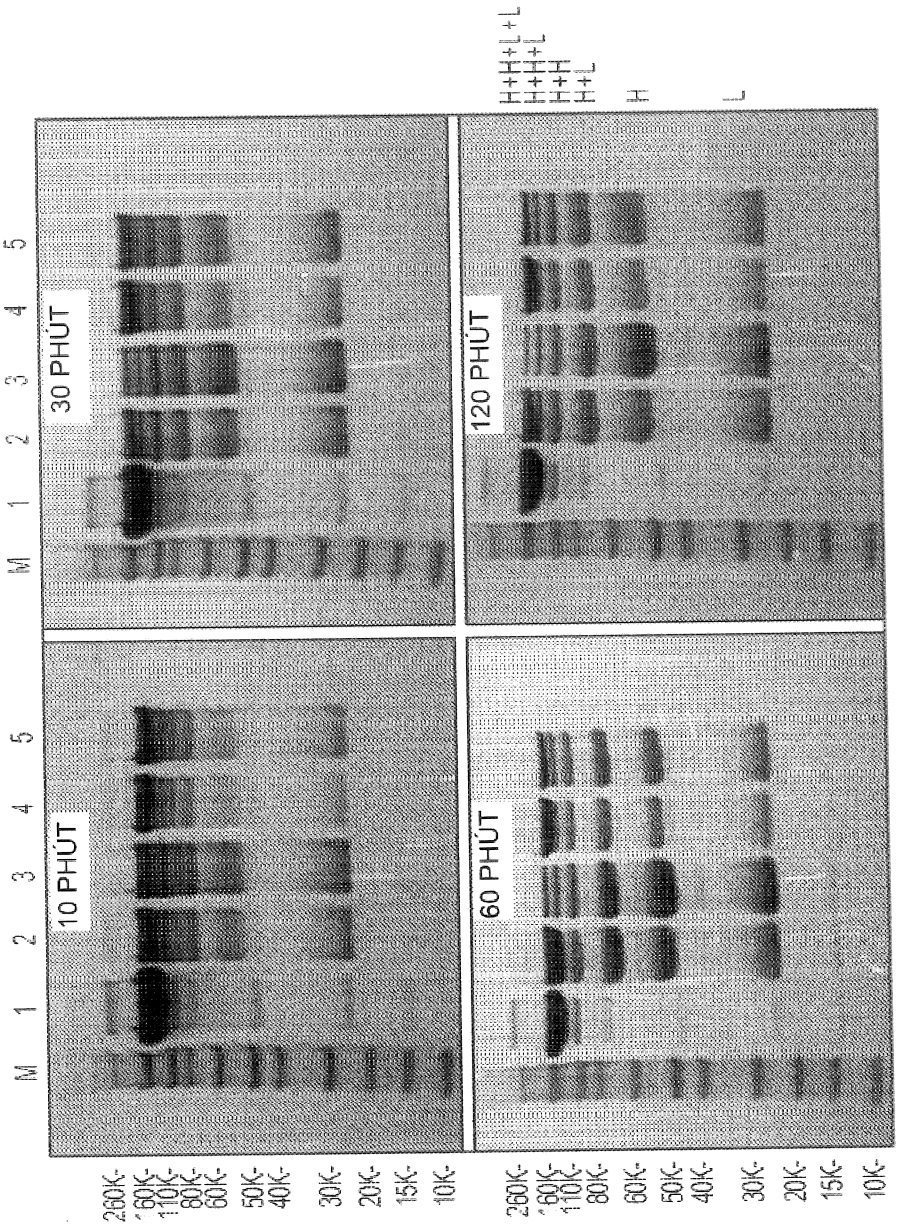

M 1 2 3 4 5
10 PHÚT
30 PHÚT
60 PHÚT
120 PHÚT
260K-
160K-
110K-
80K-
60K-
50K-
40K-
30K-
20K-
15K-
10K-
H+H+L+L
H+H+H+L
H+H+H
H+L
H
L

FIG. 3

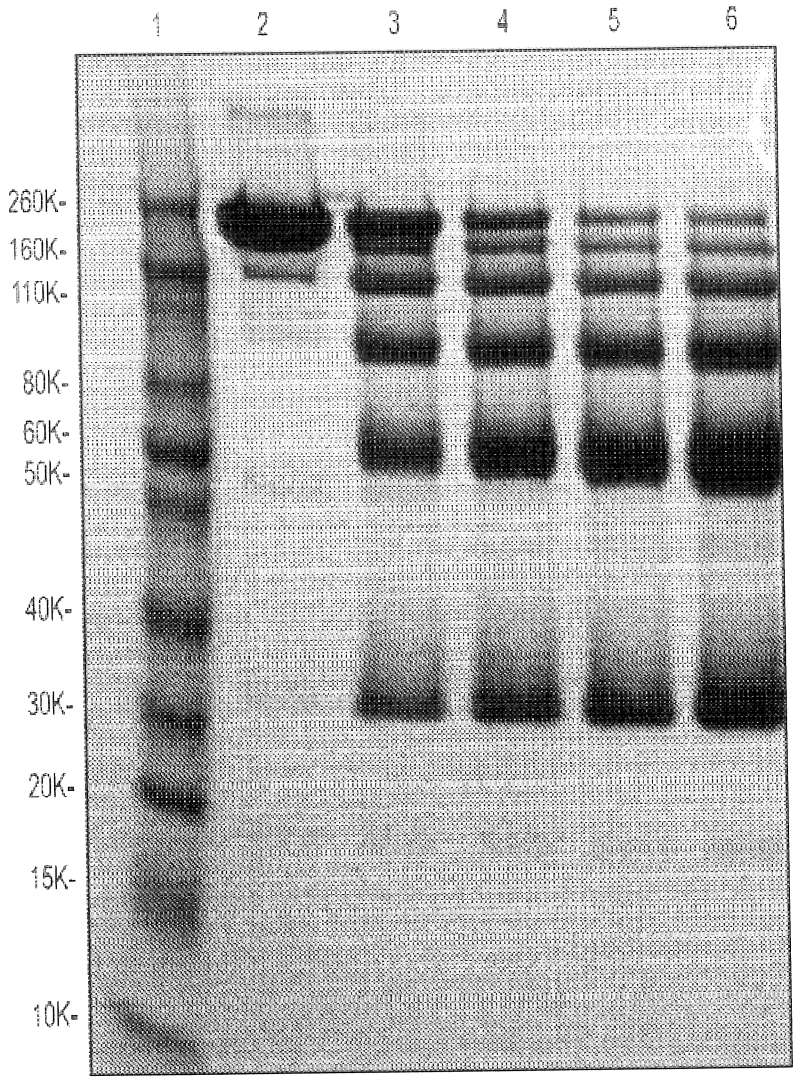


FIG. 4

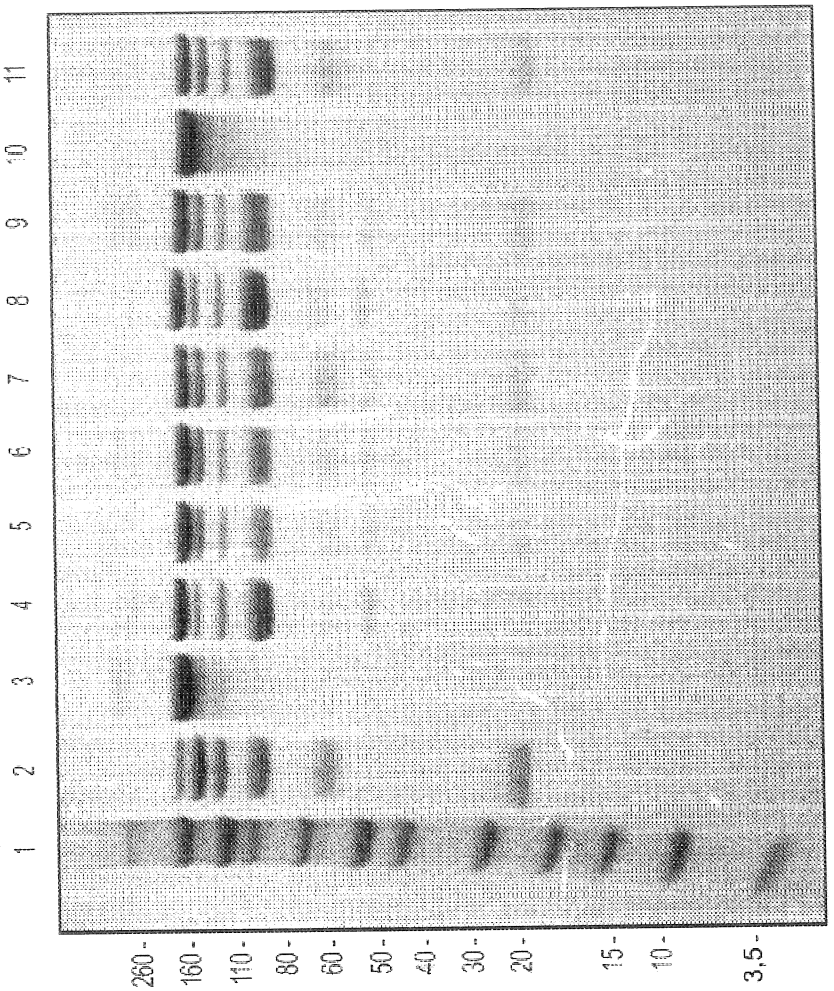


FIG. 5

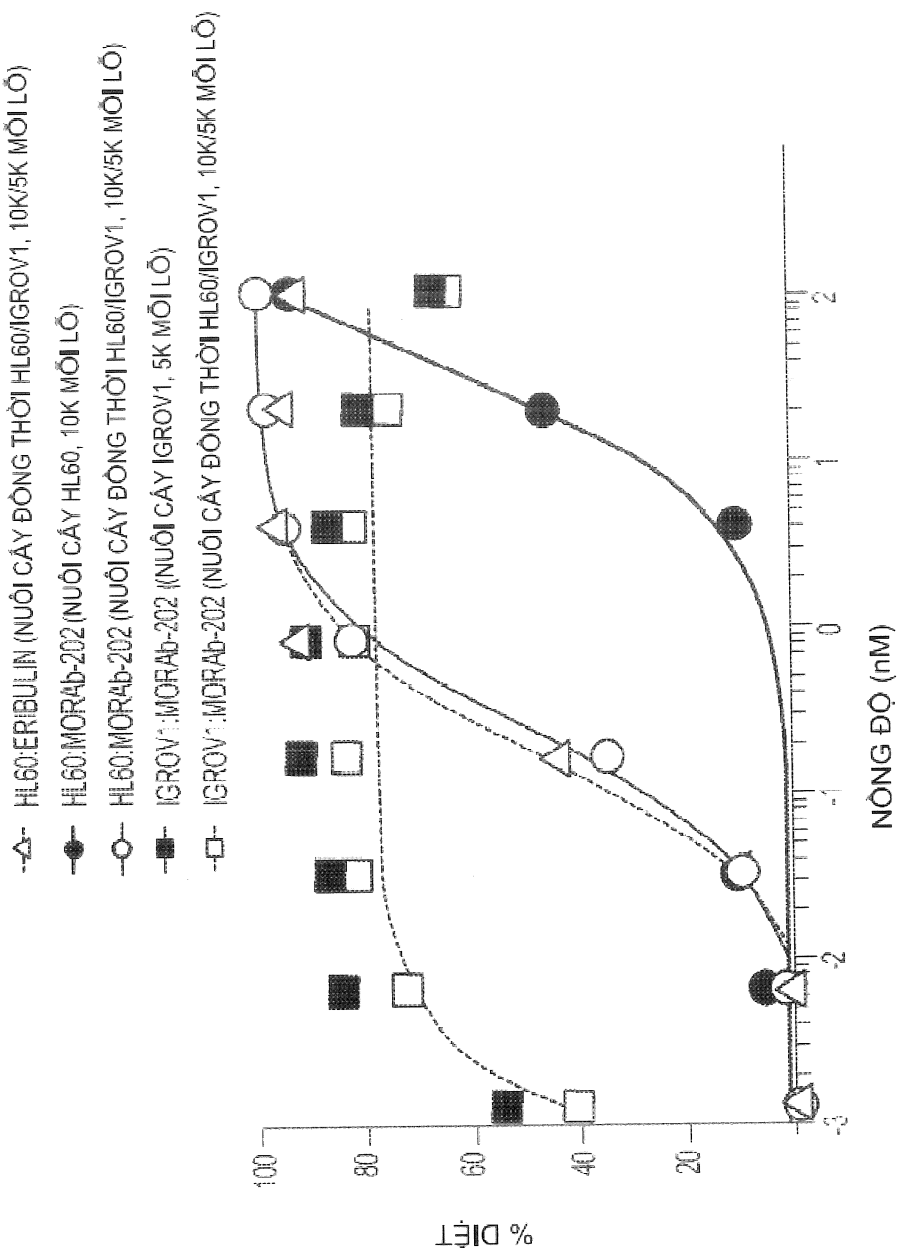

HL60:ERIBULIN (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 10K/5K MỖI LỖ)
HL60:MORAb-202 (NUÔI CÂY HL60, 10K MỖI LỖ)
HL60:MORAb-202 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 10K/5K MỖI LỖ)
IGROV1:MORAb-202 (NUÔI CÂY IGROV1, 5K MỖI LỖ)
IGROV1:MORAb-202 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 10K/5K MỖI LỖ)
% DIỆT
100
80
60
40
20
-3
-2
-1
0
1
2
NỒNG ĐỘ (nM)

FIG. 6A

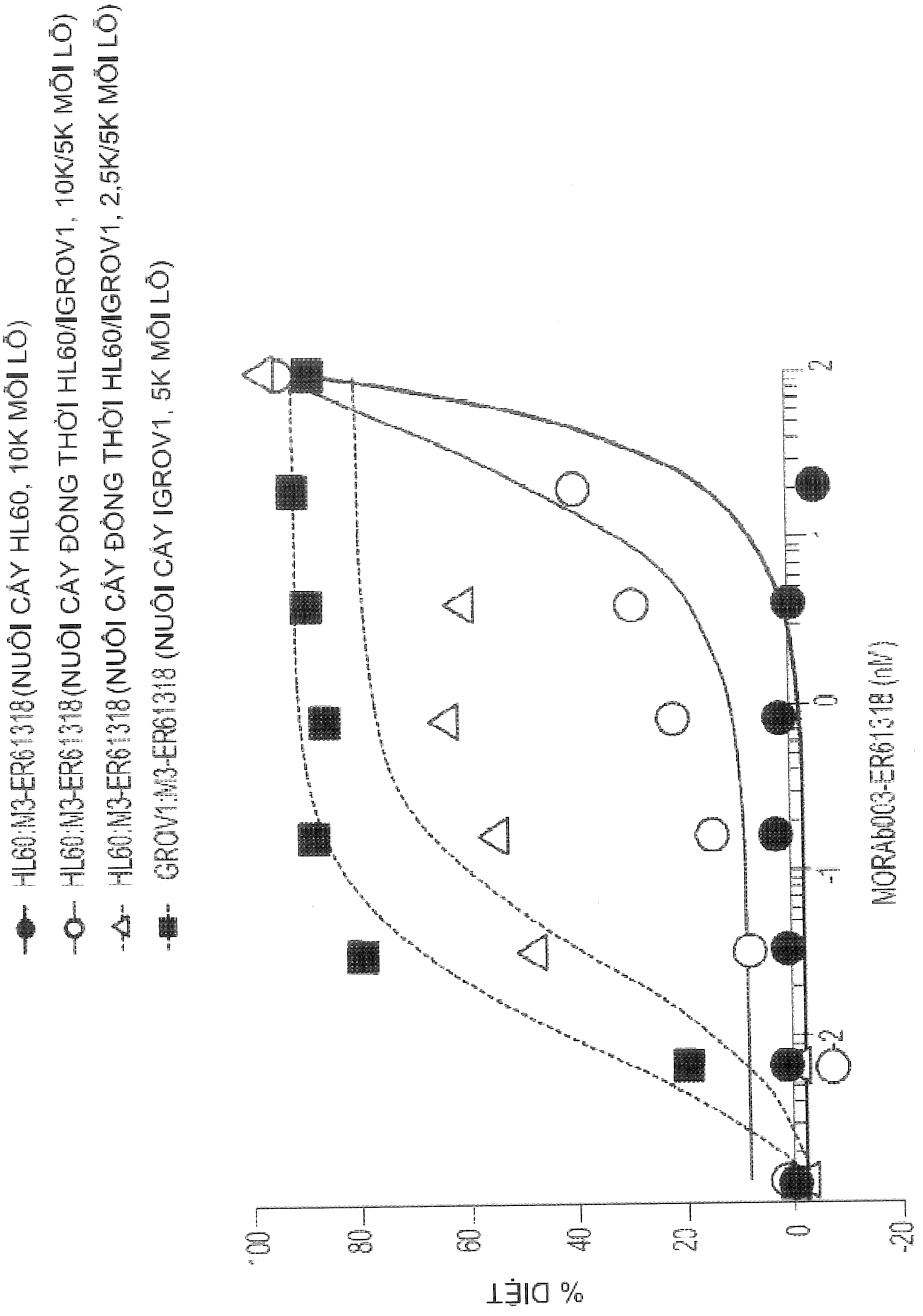

HL60:M3-ER61318 (NUÔI CÂY HL60, 10K MỖI LỖ)
HL60:M3-ER61318 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 10K/5K MỖI LỖ)
HL60:M3-ER61318 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 2,5K/5K MỖI LỖ)
GROV1:M3-ER61318 (NUÔI CÂY IGROV1, 5K MỖI LỖ)
% DIỆT
100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
MORAb003-ER61318 (nM)

FIG. 6B

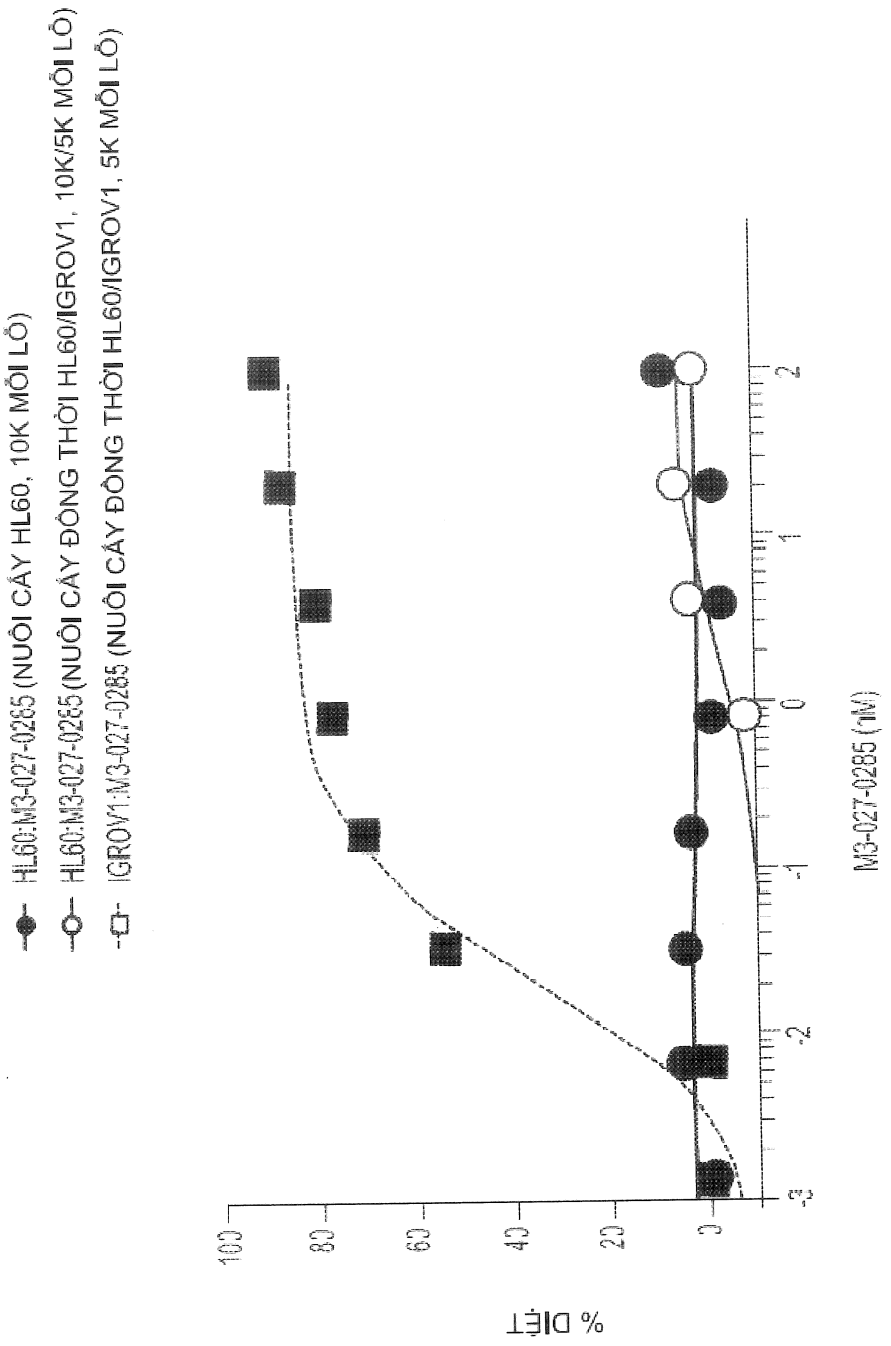

HL60:M3-027-0285 (NUÔI CÂY HL60, 10K MỖI LỖ)
HL60:M3-027-0285 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 10K/5K MỖI LỖ)
IGROV1:M3-027-0285 (NUÔI CÂY ĐỒNG THỜI HL60/IGROV1, 5K MỖI LỖ)
% DIỆT
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
M3-027-0285 (nM)

FIG. 6C

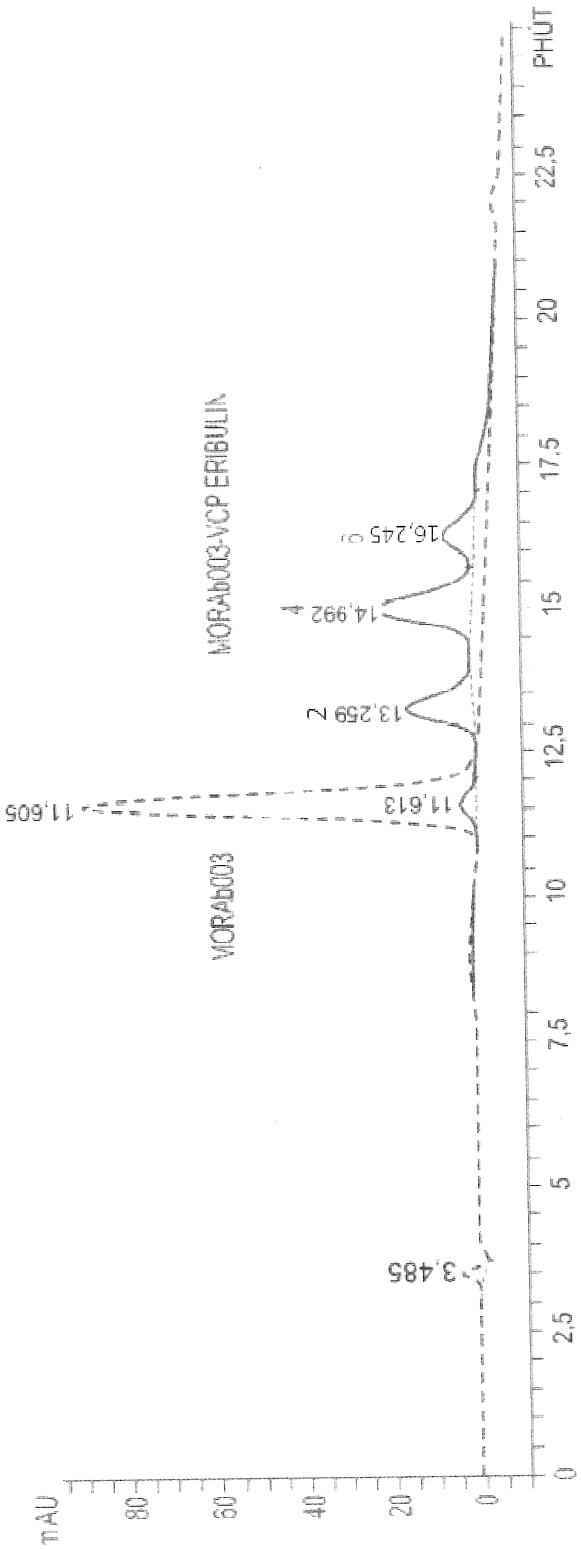

mAU
80
60
40
20
0
0
2,5
5
7,5
10
12,5
15
17,5
20
22,5
PHÚT
MORAb003-VCP ERIBULIN
MORAb003
3,485
11,605
11,613
13,259
14,992
16,245

FIG. 7A

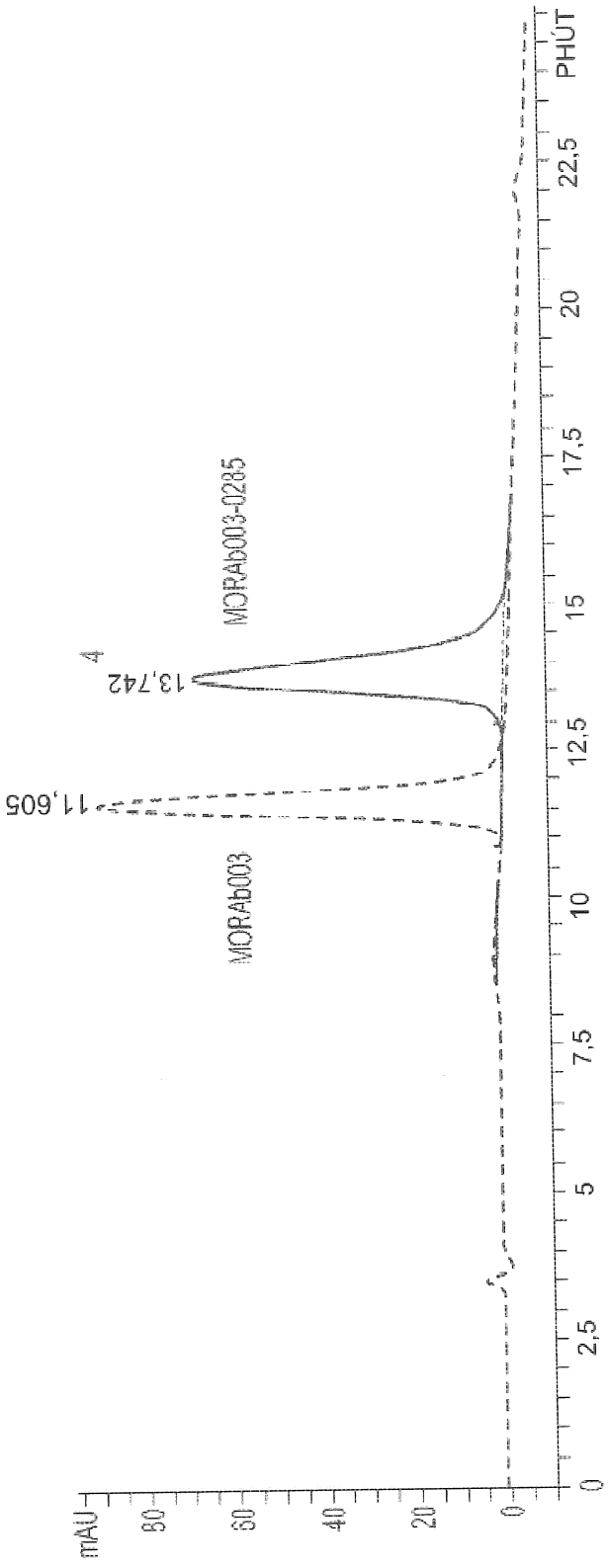

mAU
80
60
40
20
0
0
2,5
5
7,5
10
12,5
15
17,5
20
22,5
PHÚT
MORAb003-0285
13,742
4
11,605
MORAb003

FIG. 7B

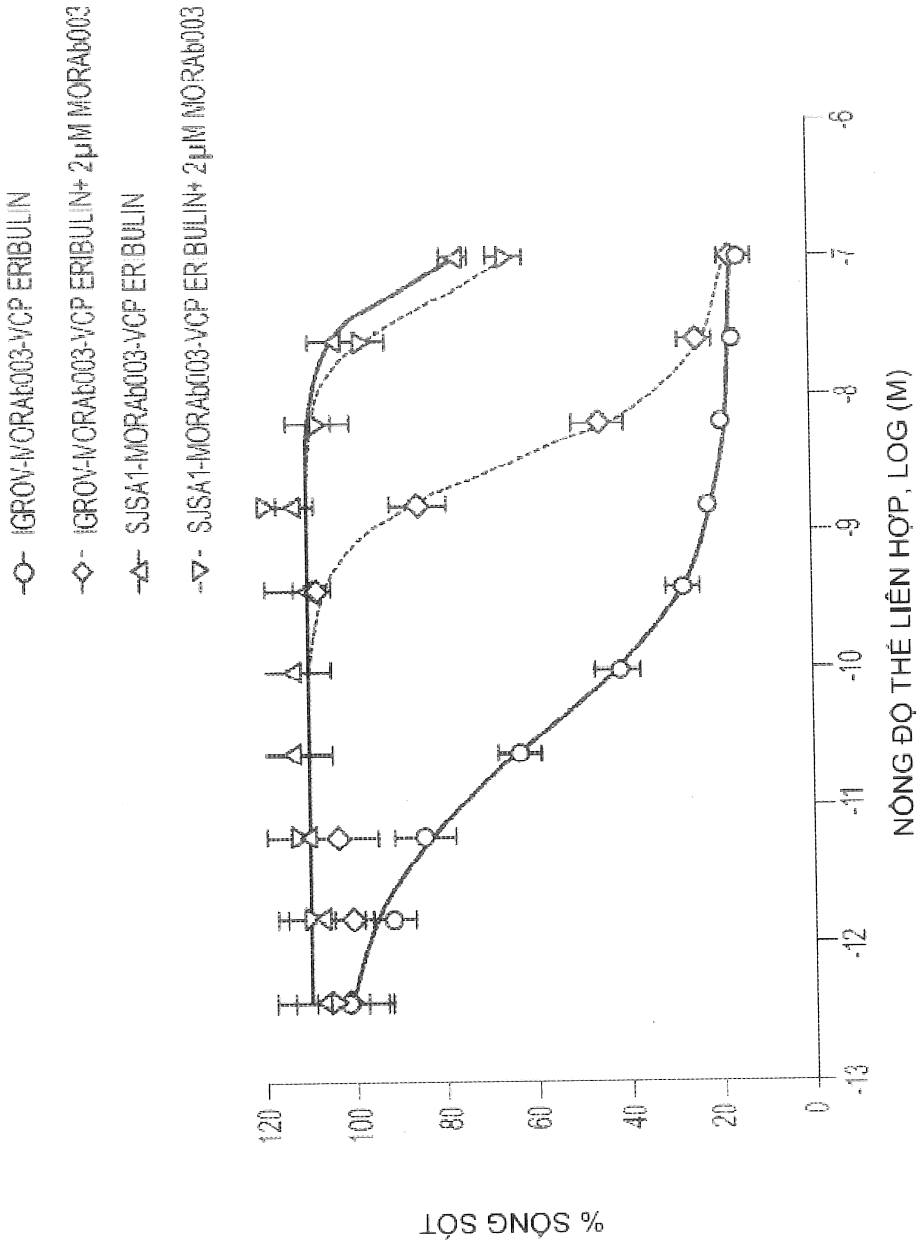

IGROV-MORAb003-VCP ERIBULIN
IGROV-MORAb003-VCP ERIBULIN+ 2µM MORAb003
SJSA1-MORAb003-VCP ERIBULIN
SJSA1-MORAb003-VCP ERIBULIN+ 2µM MORAb003
% SỐNG SÓT
120
100
80
60
40
20
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
NỒNG ĐỘ THẾ LIÊN HỢP, LOG (M)

FIG. 8

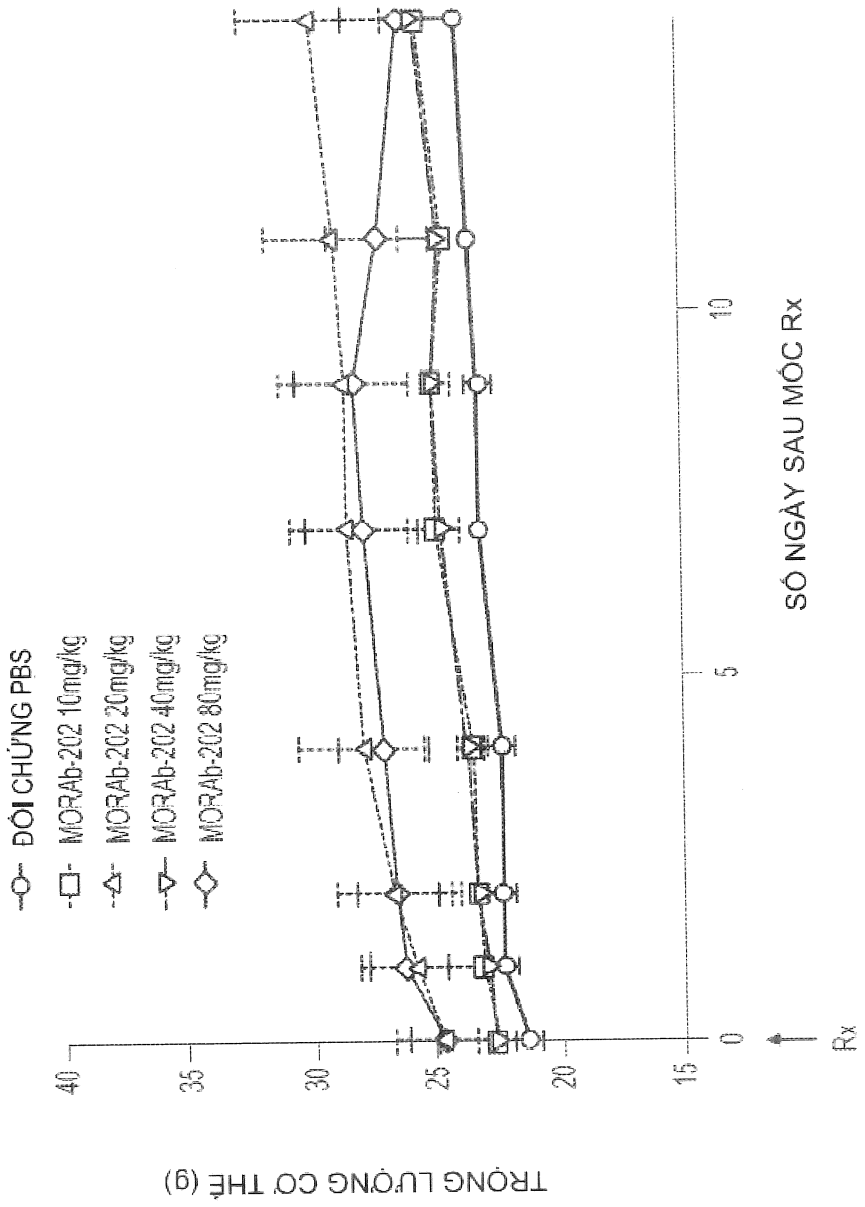

ĐỐI CHỨNG PBS
MORAb-202 10mg/kg
MORAb-202 20mg/kg
MORAb-202 40mg/kg
MORAb-202 80mg/kg
TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ (g)
40
35
30
25
20
15
0
5
10
Rx
SỐ NGÀY SAU MỔC Rx

FIG. 9

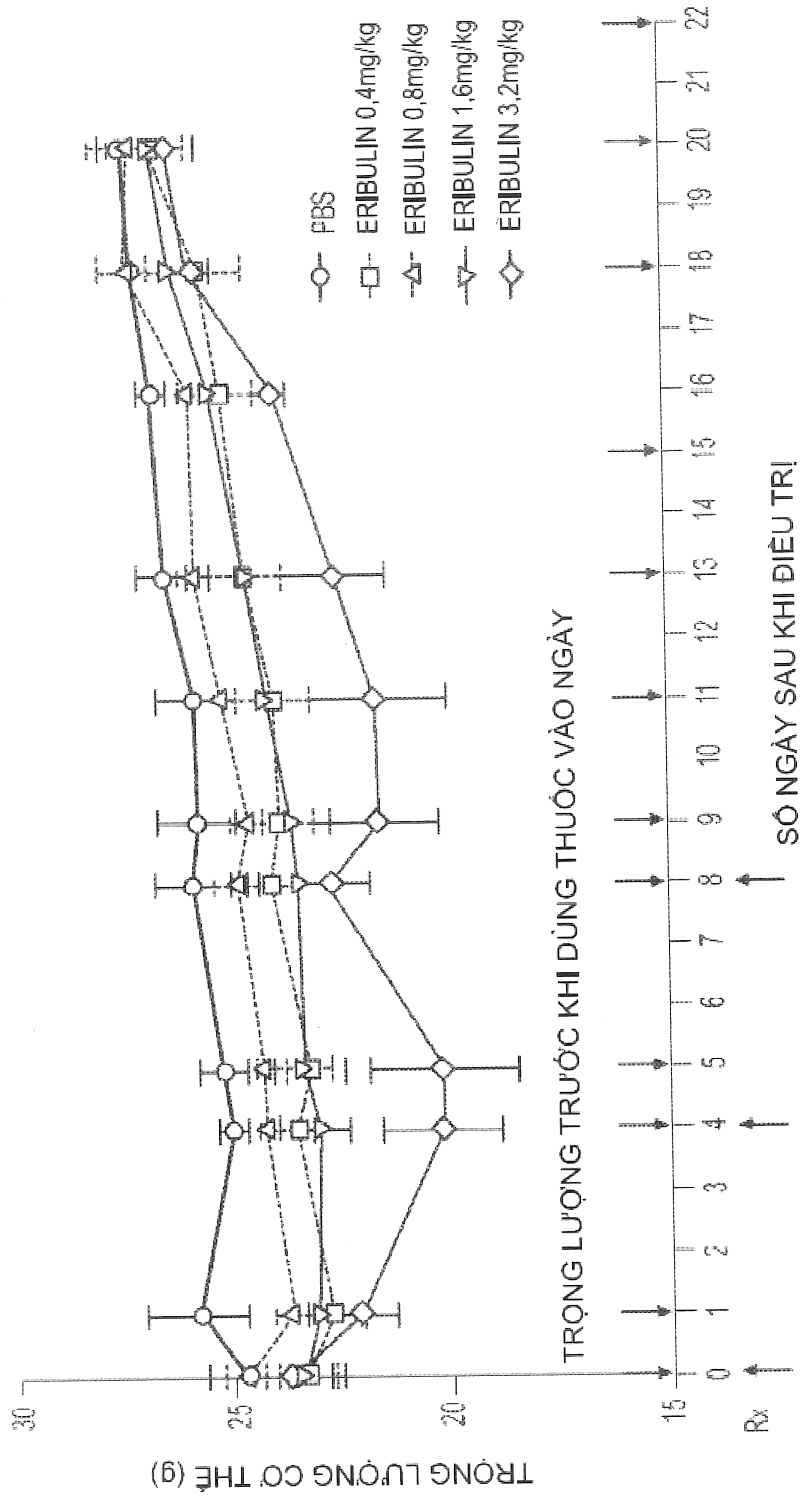

TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ (g)
30
25
20
15
TRỌNG LƯỢNG TRƯỚC KHI DÙNG THUỐC VÀO NGÀY
Rx
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
SỐ NGÀY SAU KHI ĐIỀU TRỊ
PBS
ERIBULIN 0,4mg/kg
ERIBULIN 0,8mg/kg
ERIBULIN 1,6mg/kg
ERIBULIN 3,2mg/kg

FIG. 10

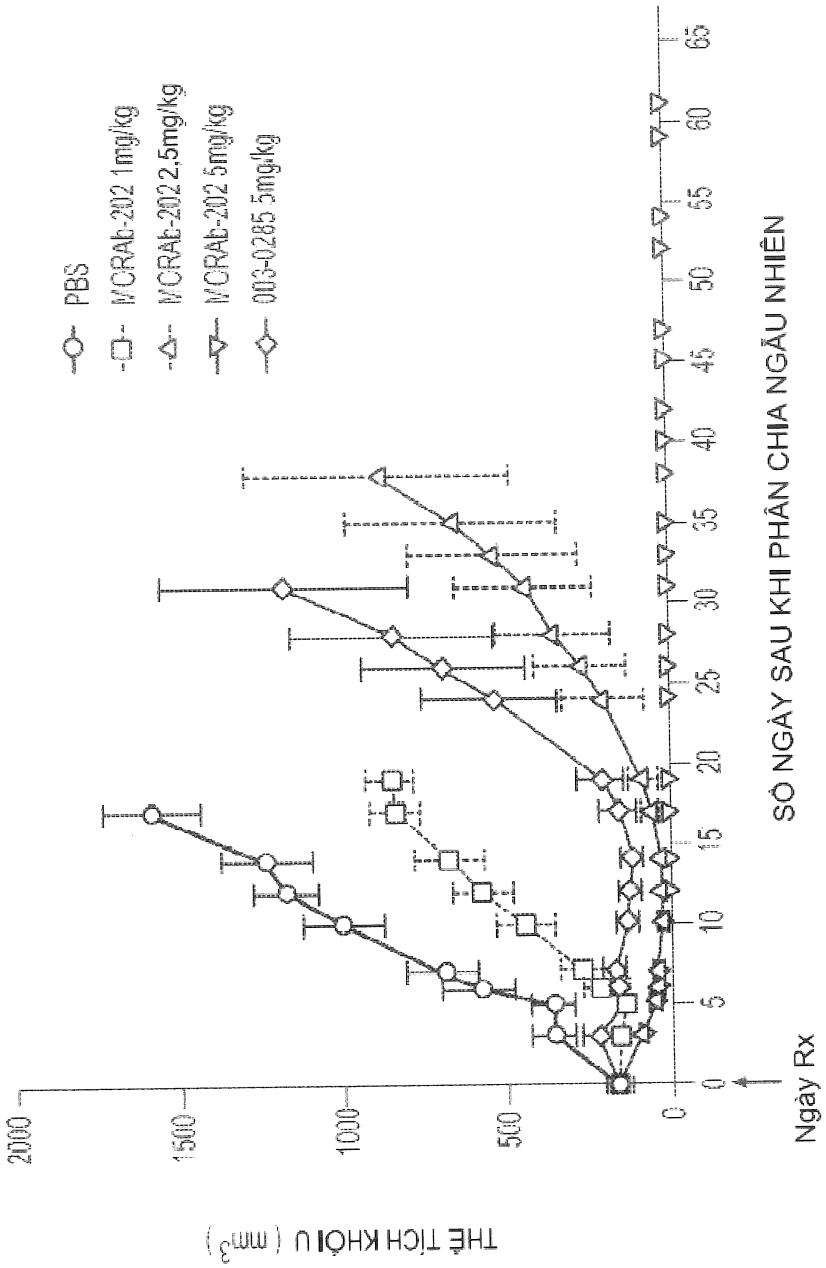

PBS
M/CRAb-202 1mg/kg
M/CRAb-202 2,5mg/kg
M/CRAb-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg
THỂ TÍCH KHỐI U (mm3)
2000
1500
1000
500
0
Ngày Rx
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
SỐ NGÀY SAU KHI PHÂN CHIA NGẪU NHIÊN

FIG. 11

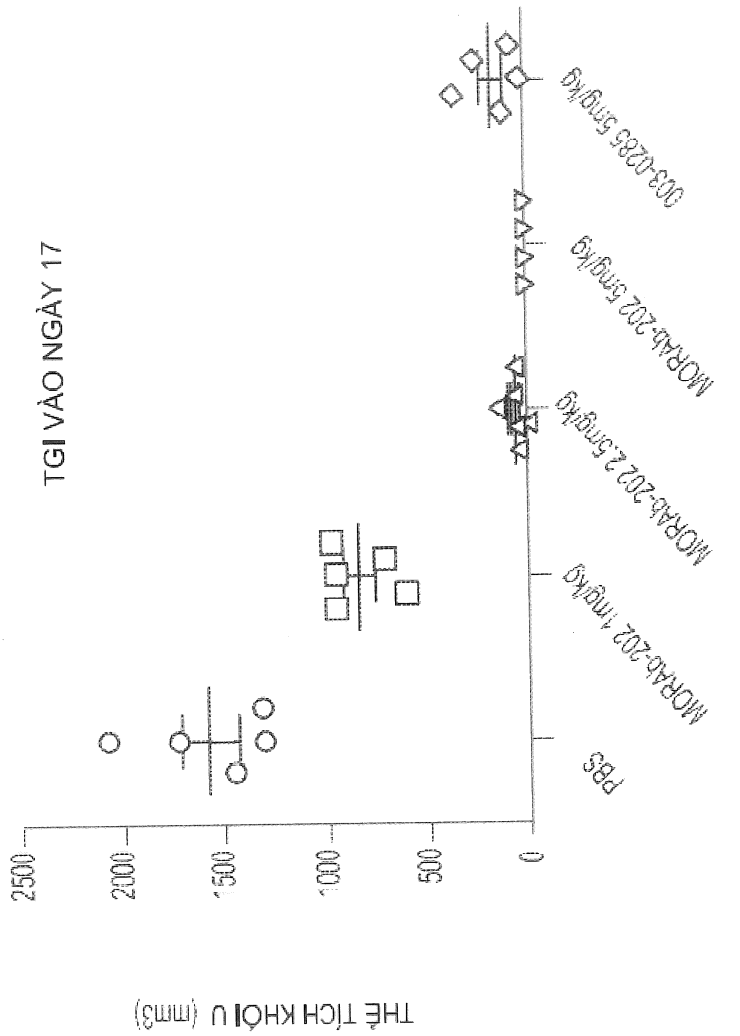

TGI VÀO NGÀY 17
THỂ TÍCH KHỐI U (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
MOR-202 1mg/kg
MOR-202 2.5mg/kg
MOR-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg

FIG. 12

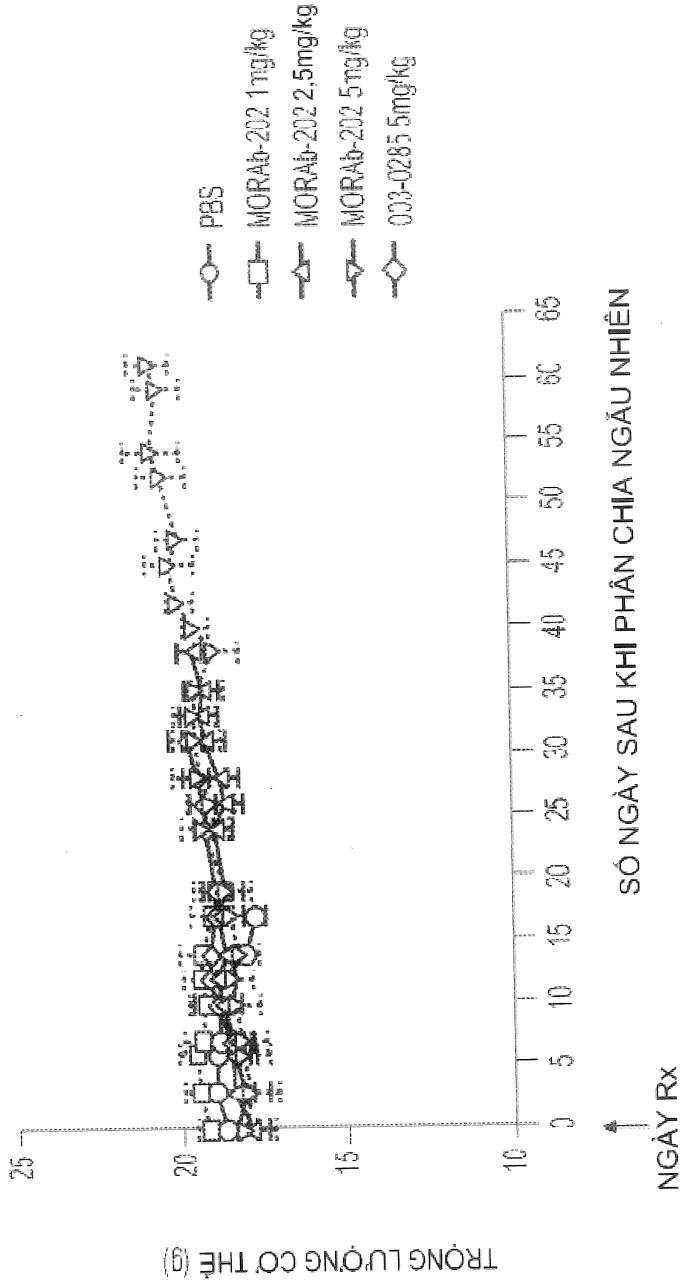

PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2.5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg
TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ (g)
25
20
15
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
NGÀY Rx
SỐ NGÀY SAU KHI PHÂN CHIA NGẪU NHIÊN

FIG. 13

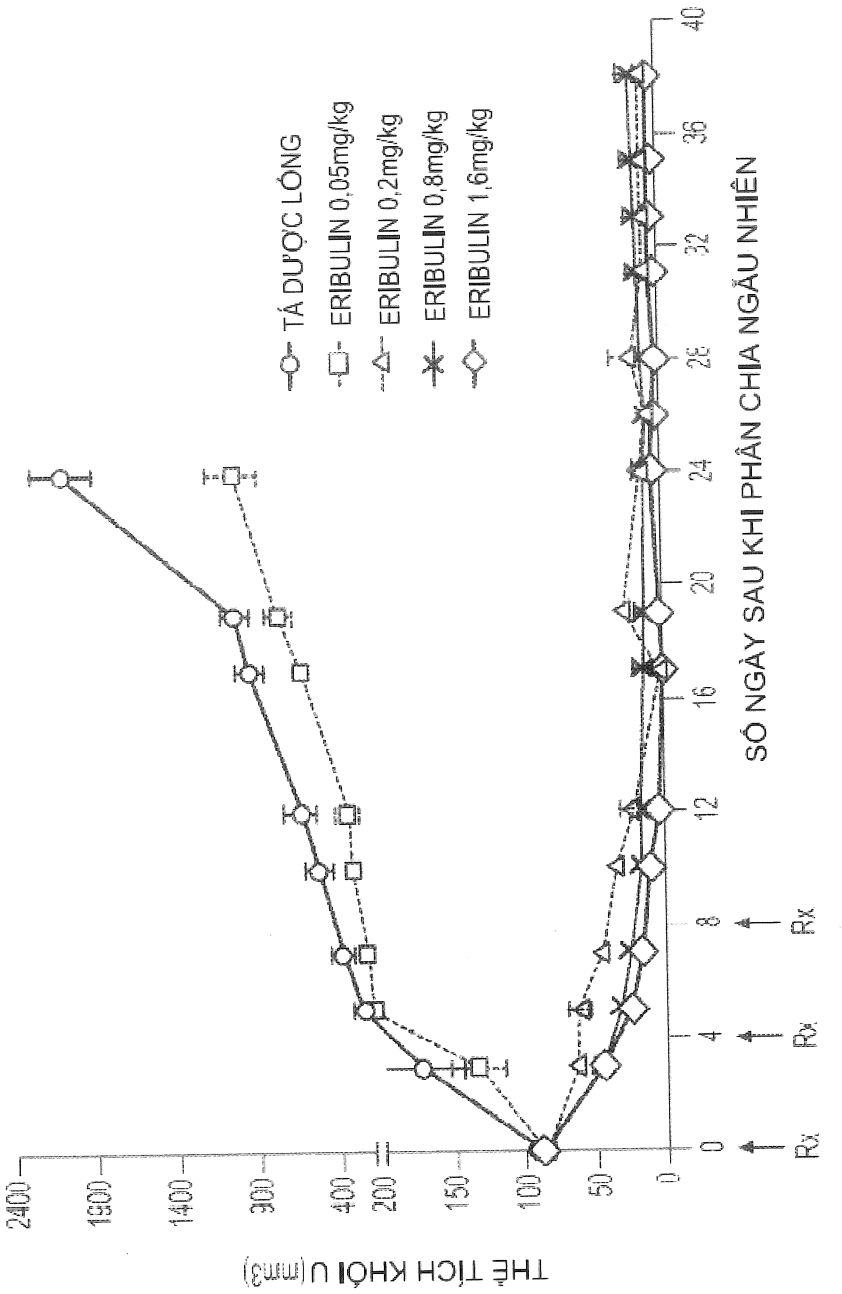

TÁ DƯỢC LỎNG
ERIBULIN 0,05mg/kg
ERIBULIN 0,2mg/kg
ERIBULIN 0,8mg/kg
ERIBULIN 1,6mg/kg
THỂ TÍCH KHỐI U (mm3)
2400
1900
1400
900
400
200
150
100
50
0
Rx
Rx
Rx
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
SỐ NGÀY SAU KHI PHÂN CHIA NGẪU NHIÊN

FIG. 14

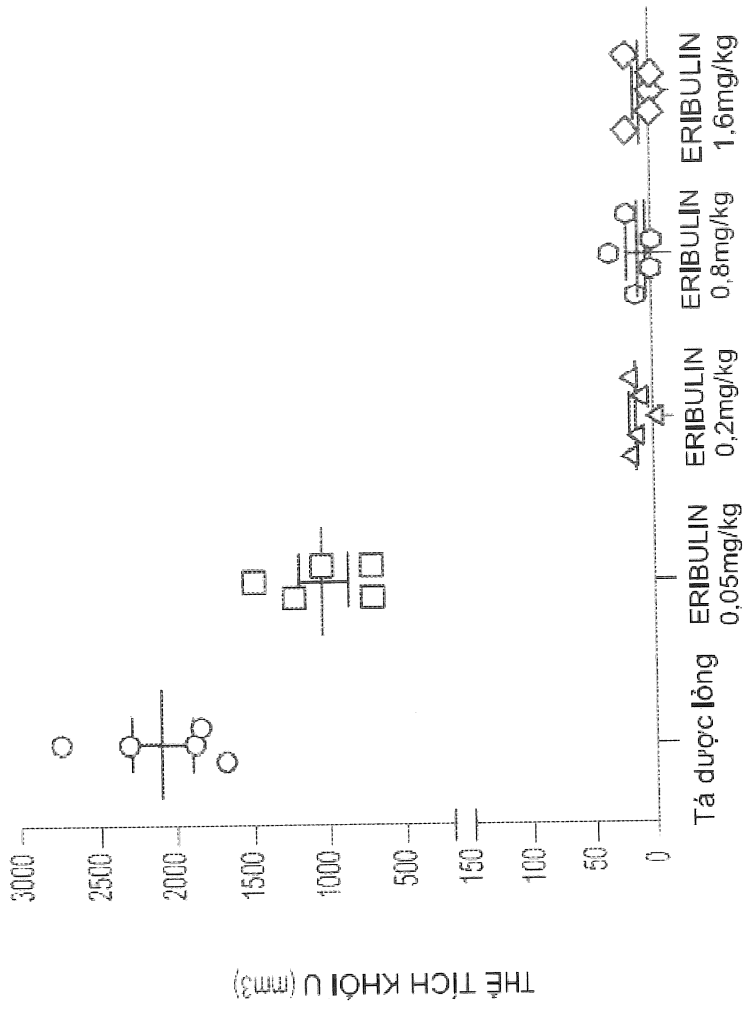

THỂ TÍCH KHỐI U (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
150
100
50
0
Tá dược lỏng
ERIBULIN 0,05mg/kg
ERIBULIN 0,2mg/kg
ERIBULIN 0,8mg/kg
ERIBULIN 1,6mg/kg

FIG. 15

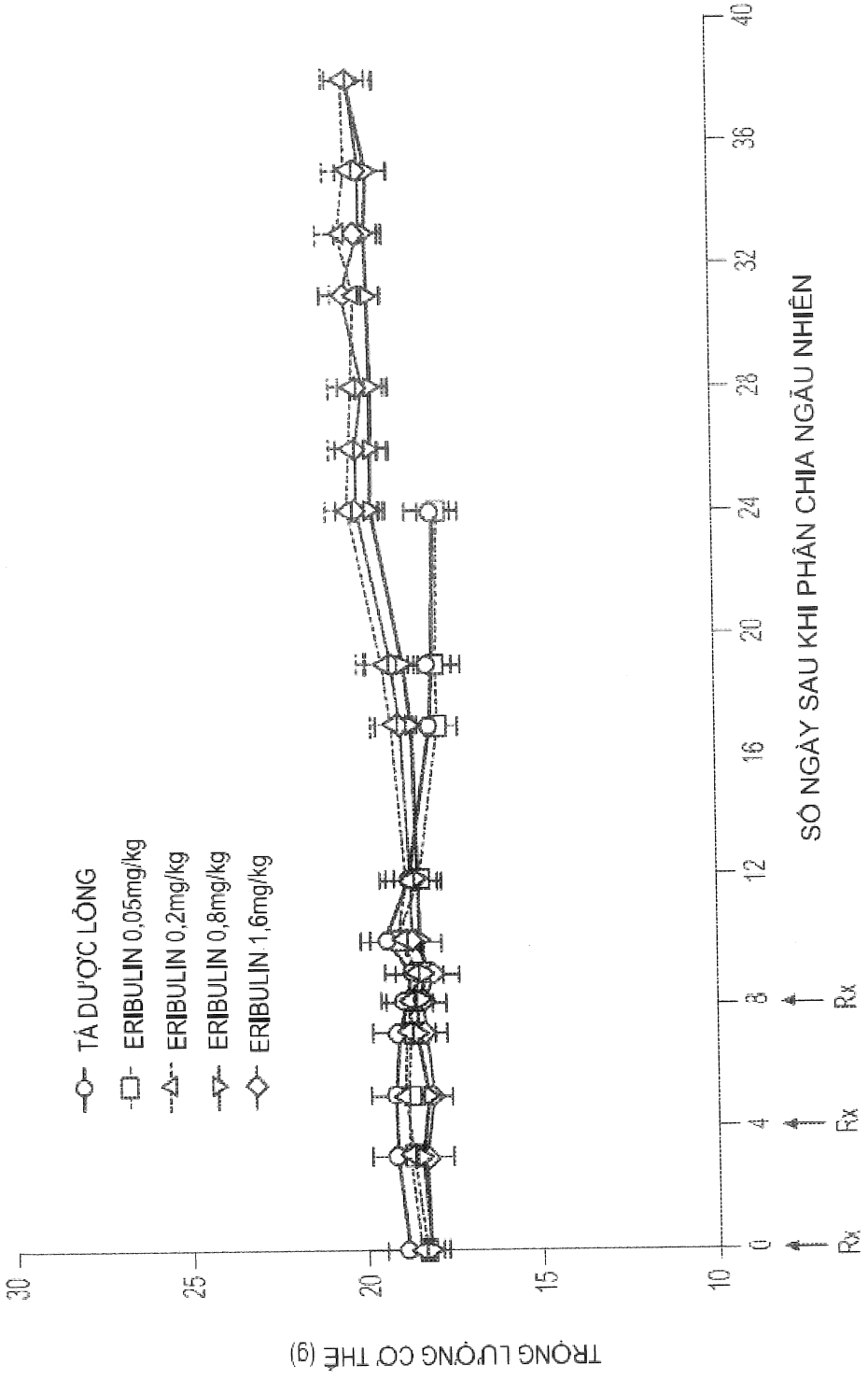

TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ (g)
30
25
20
15
10
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
Rx
Rx
Rx
SỐ NGÀY SAU KHI PHÂN CHIA NGẪU NHIÊN
TÁ DƯỢC LỎNG
ERIBULIN 0,05mg/kg
ERIBULIN 0,2mg/kg
ERIBULIN 0,8mg/kg
ERIBULIN 1,6mg/kg

FIG. 16

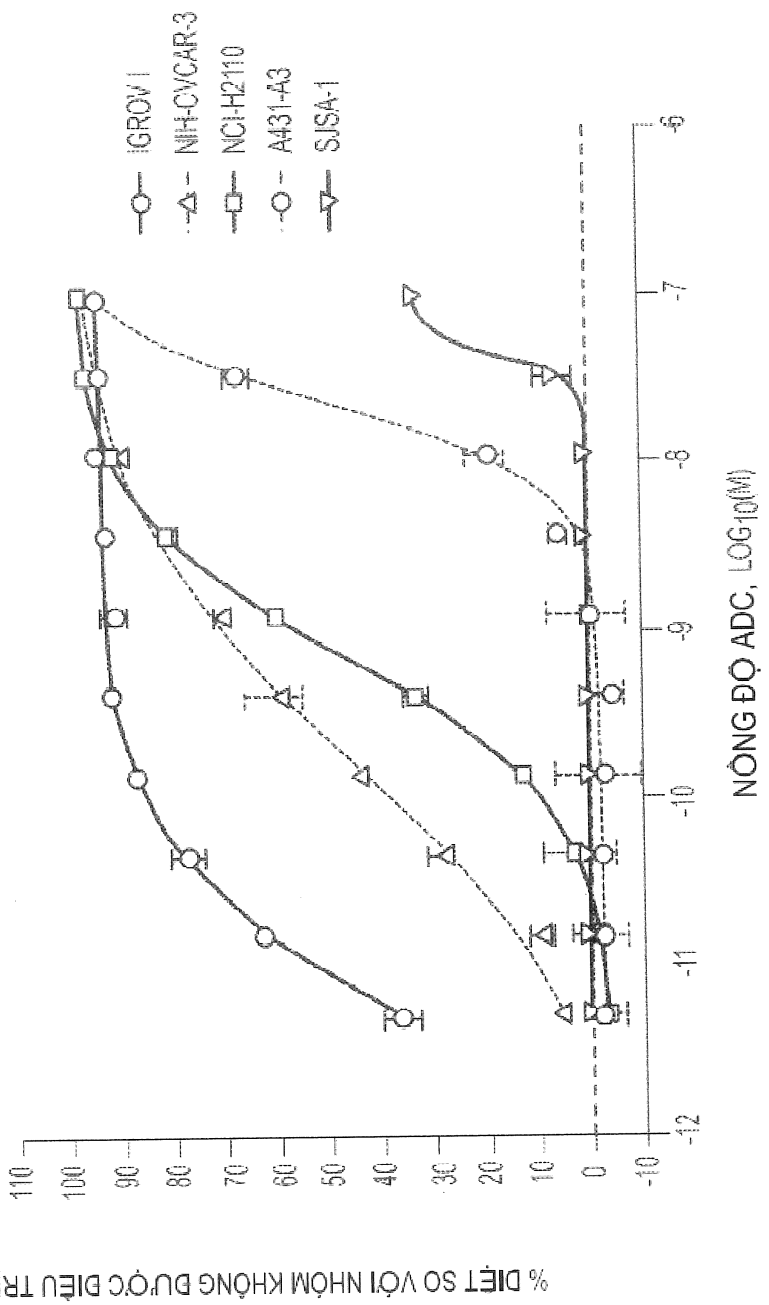

% DIỆT SO VỚI NHÓM KHÔNG ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
NỒNG ĐỘ ADC, LOG10(M)
iGROV 1
NIH-OVCAR-3
NCI-H2110
A431-A3
SJSA-1

FIG. 17

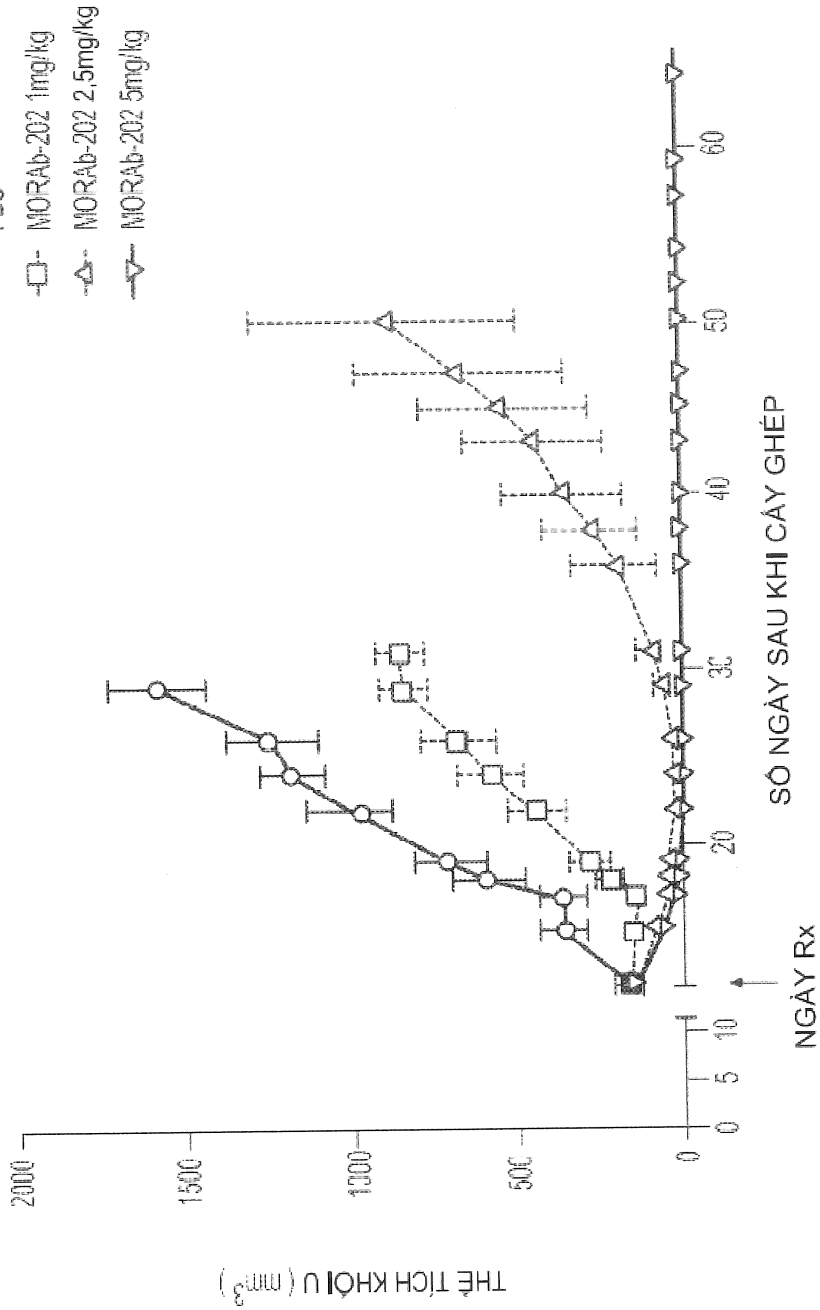

003-ADC-009-2015:
PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2,5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
THỂ TÍCH KHỐI U (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
NGÀY Rx
20
30
40
50
60
SỐ NGÀY SAU KHI CẤY GHÉP

FIG. 18

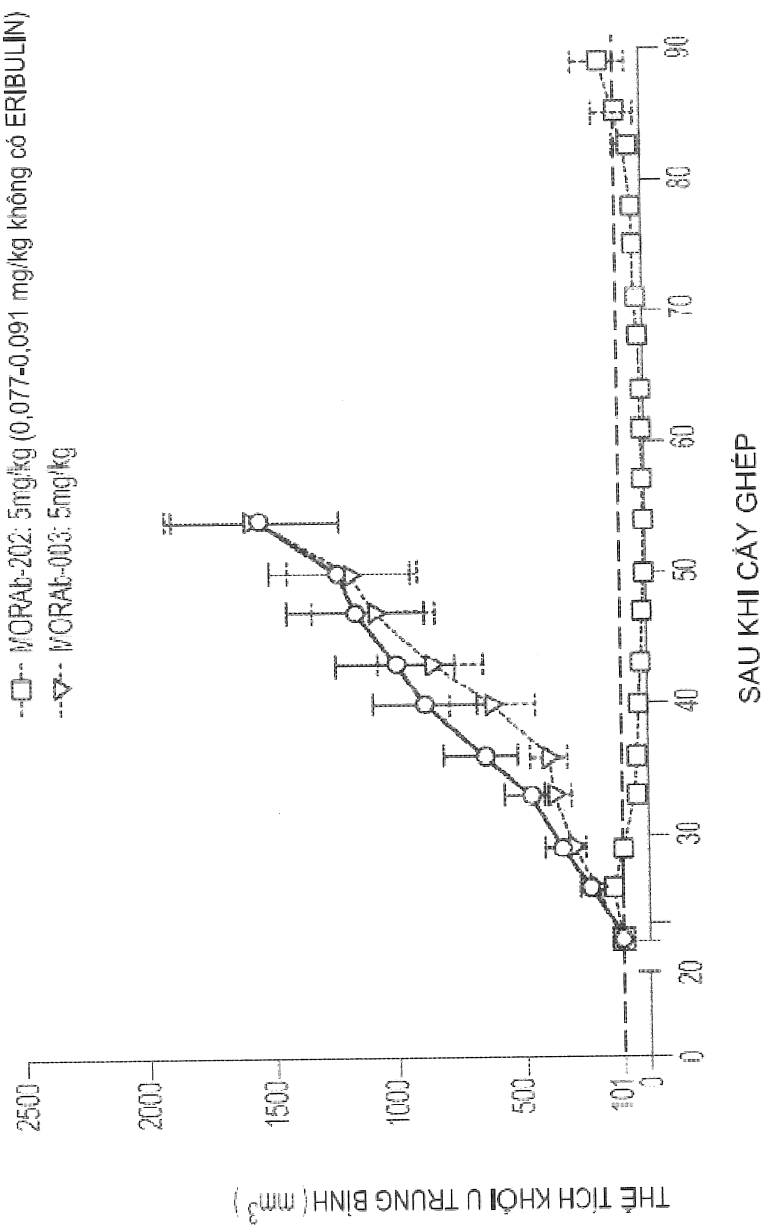

MORAb-202: 5mg/kg (0,077-0,091 mg/kg không có ERIBULIN)
MORAb-003: 5mg/kg
THỂ TÍCH KHỐI U TRUNG BÌNH (mm³)
SAU KHI CẤY GHÉP
2500
2000
1500
1000
500
101
0
0
20
30
40
50
60
70
80
90

FIG. 19A

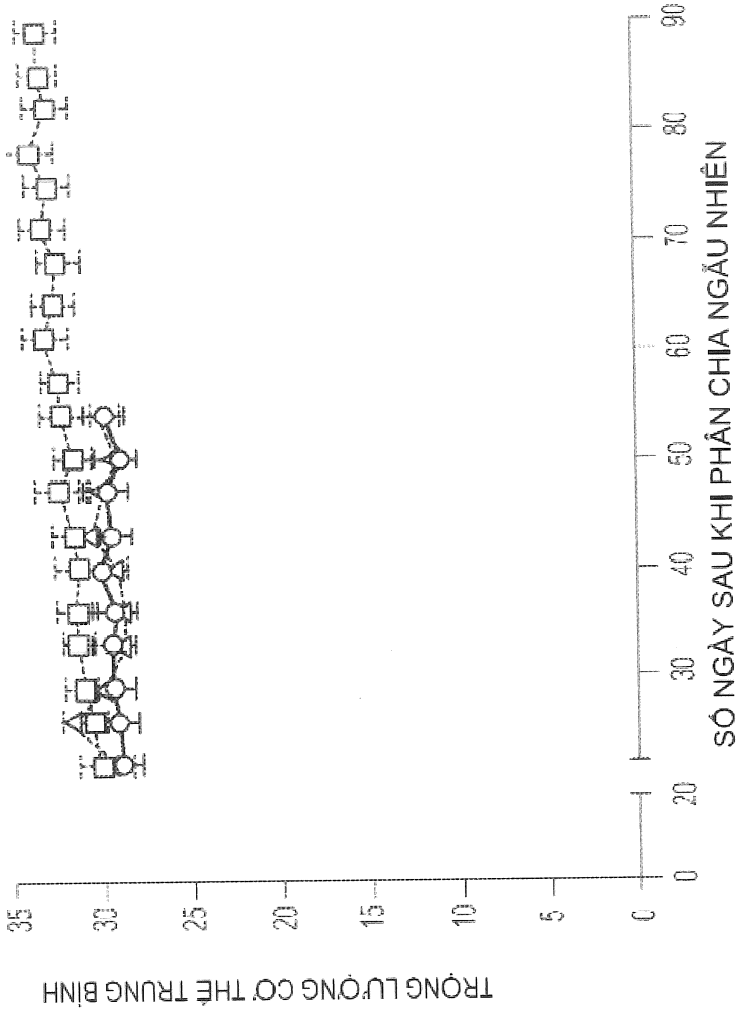

TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ TRUNG BÌNH
35
30
25
20
15
10
5
0
0
20
30
40
50
60
70
80
90
SỐ NGÀY SAU KHI PHÂN CHIA NGẪU NHIÊN

FIG. 19B

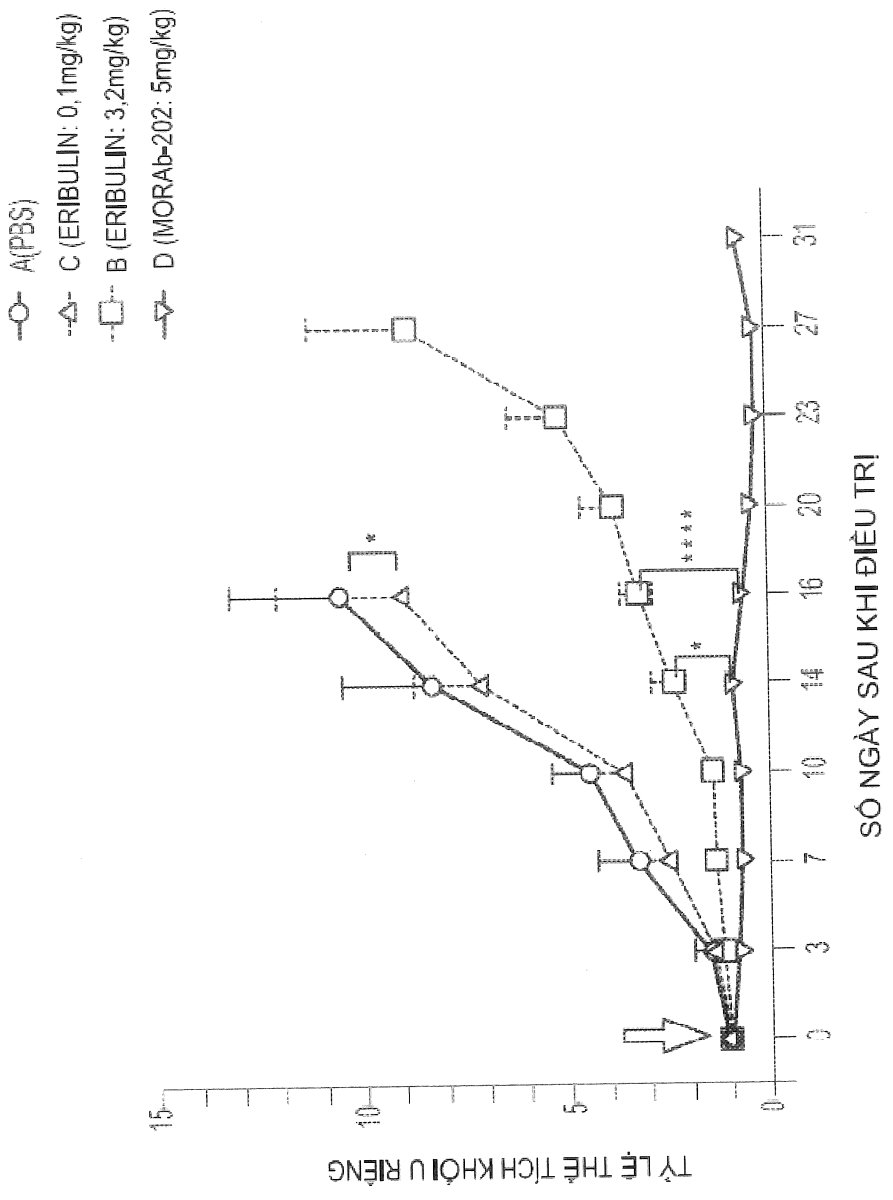

A(PBS)
C (ERIBULIN: 0,1mg/kg)
B (ERIBULIN: 3,2mg/kg)
D (MORAb-202: 5mg/kg)
TỶ LỆ THỂ TÍCH KHỐI U RIÊNG
SỐ NGÀY SAU KHI ĐIỀU TRỊ
0
5
10
15
0
3
7
10
14
16
20
23
27
31
*
*
****

FIG. 20A

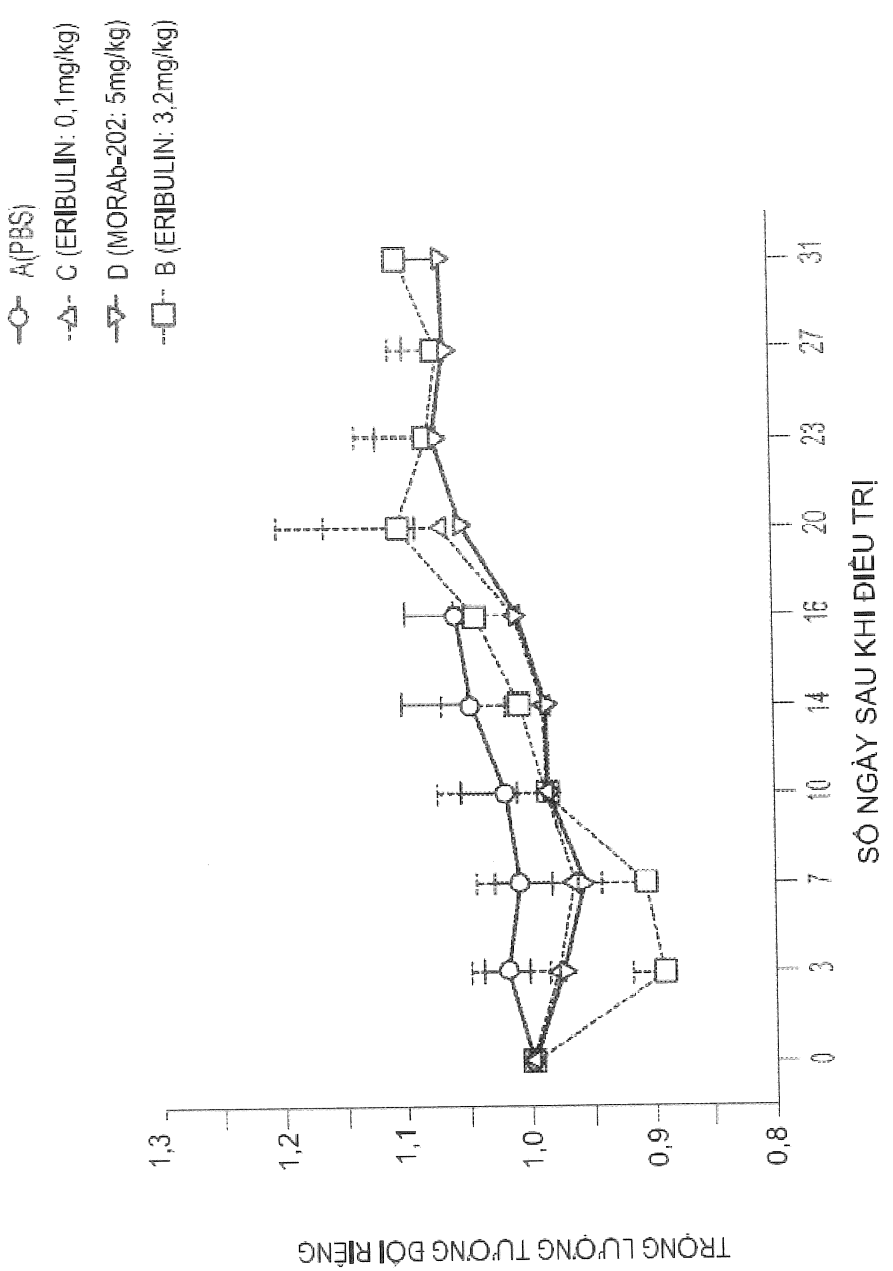

A(PBS)
C (ERIBULIN: 0,1mg/kg)
D (MORAb-202: 5mg/kg)
B (ERIBULIN: 3,2mg/kg)
TRỌNG LƯỢNG TƯƠNG ĐỐI RIÊNG
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0
3
7
10
14
16
20
23
27
31
SỐ NGÀY SAU KHI ĐIỀU TRỊ

FIG. 20B

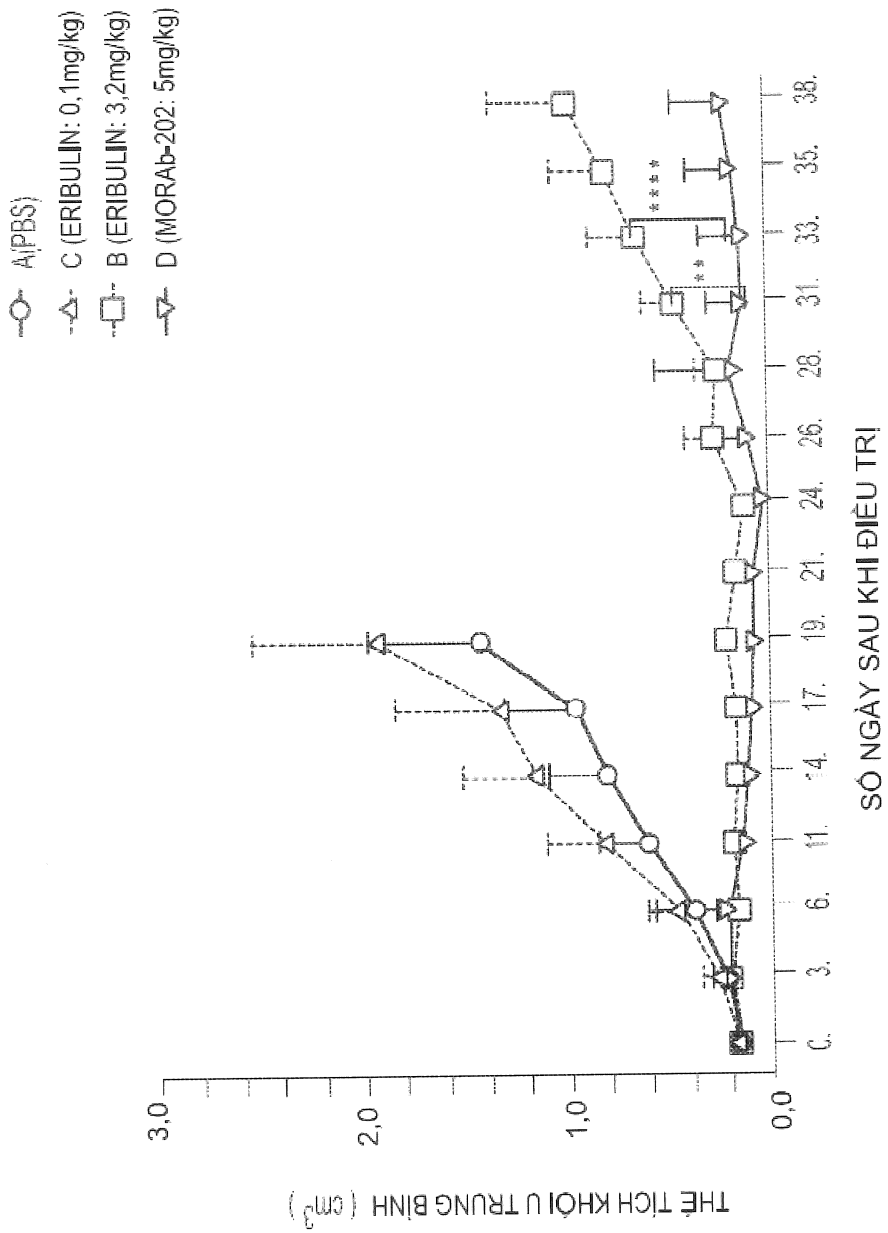

A (PBS)
C (ERIBULIN: 0,1mg/kg)
B (ERIBULIN: 3,2mg/kg)
D (MORAb-202: 5mg/kg)
THỂ TÍCH KHỐI U TRUNG BÌNH (cm³)
3,0
2,0
1,0
0,0
C.
3.
6.
11.
14.
17.
19.
21.
24.
26.
28.
31.
33.
35.
38.
SỐ NGÀY SAU KHI ĐIỀU TRỊ
****
**

FIG. 20C

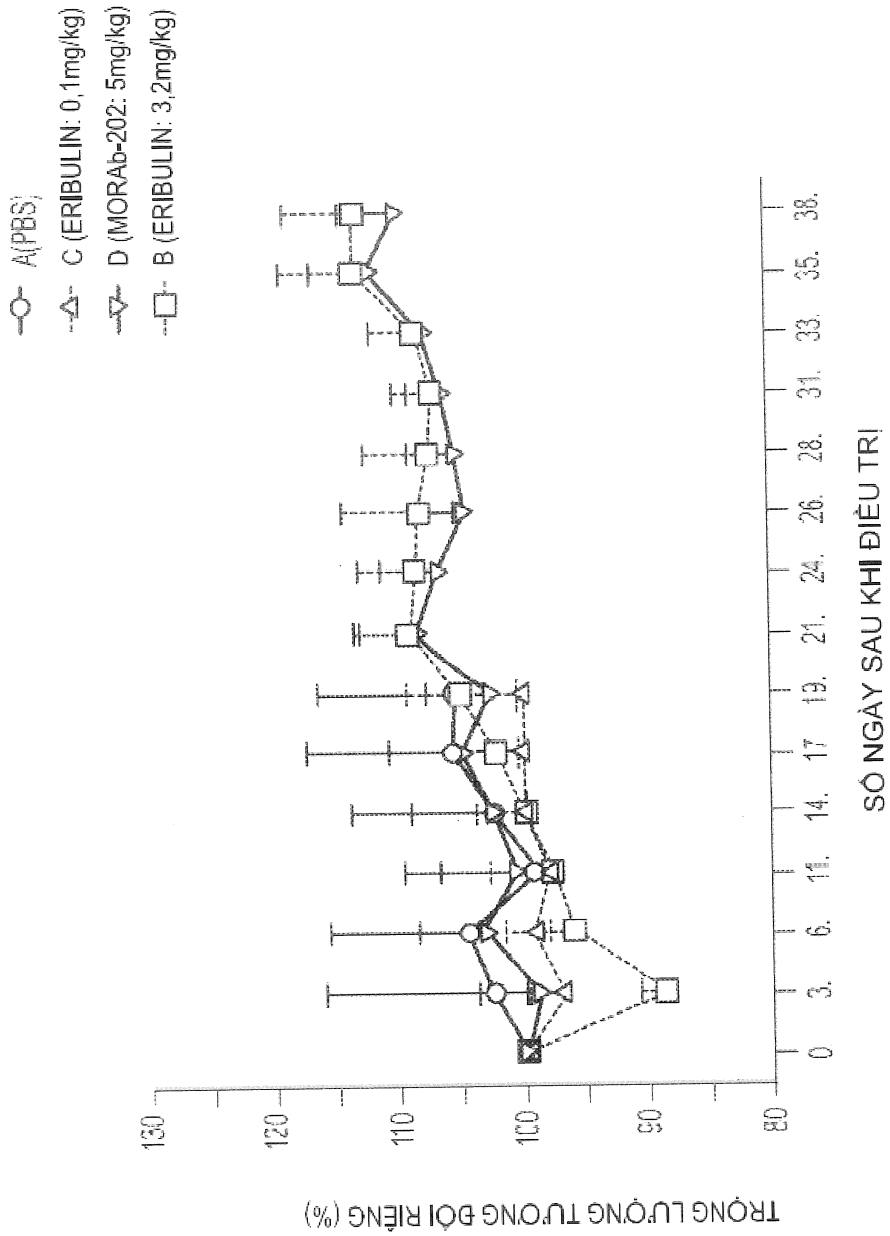

A(PBS)
C (ERIBULIN: 0,1mg/kg)
D (MORAb-202: 5mg/kg)
B (ERIBULIN: 3,2mg/kg)
TRỌNG LƯỢNG TƯƠNG ĐỐI RIÊNG (%)
130
120
110
100
90
80
0
3.
6.
11.
14.
17
19.
21.
24.
26.
28.
31.
33.
35.
38.
SỐ NGÀY SAU KHI ĐIỀU TRỊ

FIG. 20D

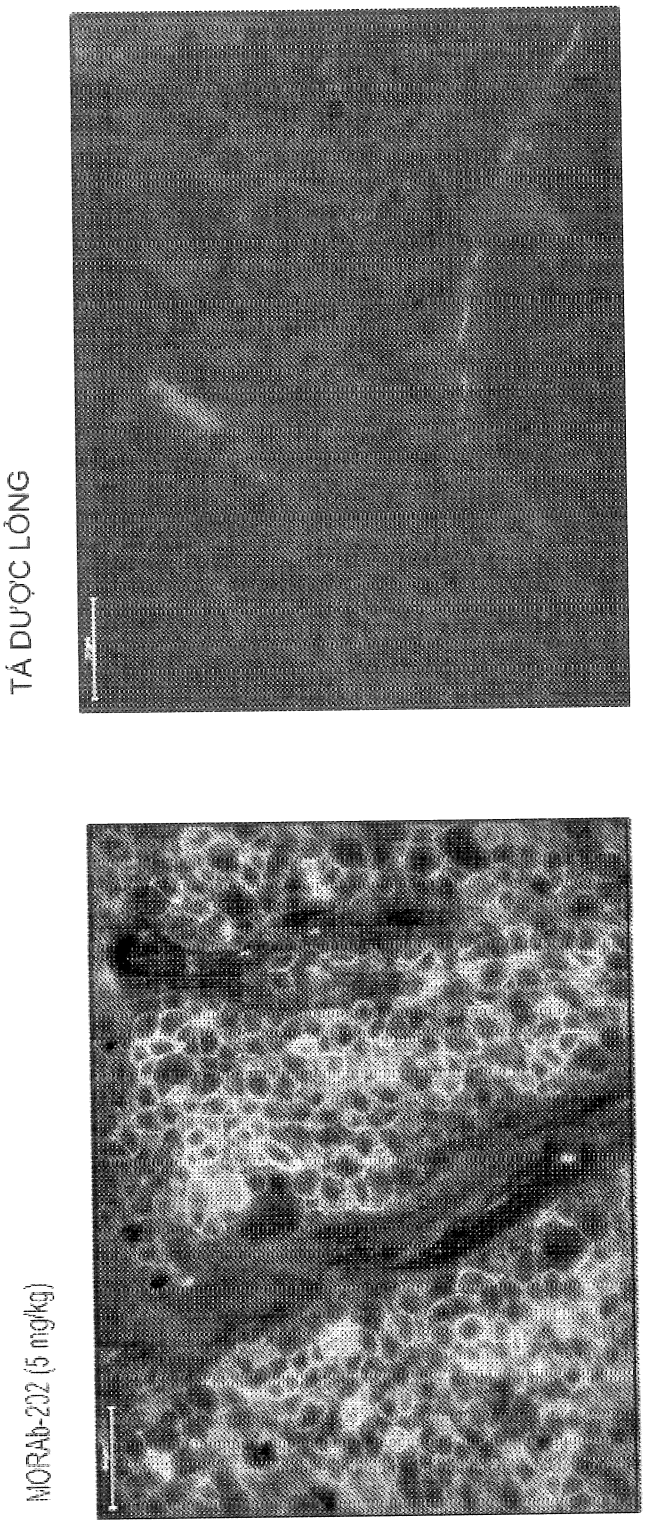


FIG. 21A

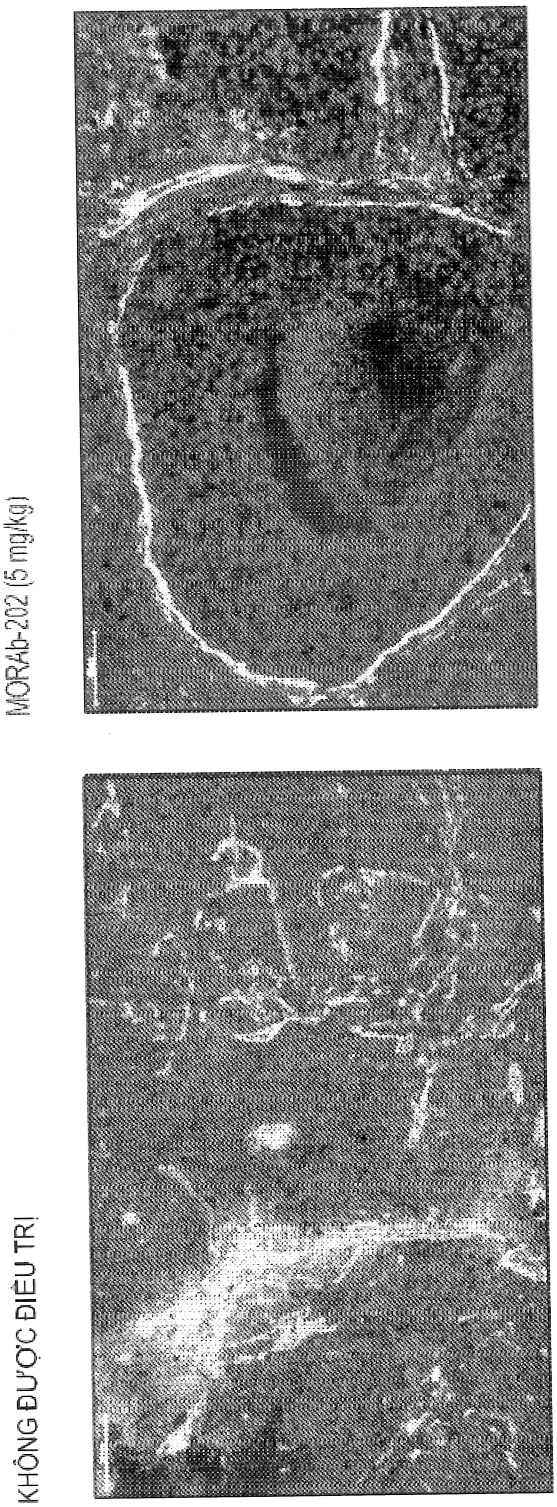


FIG. 21B

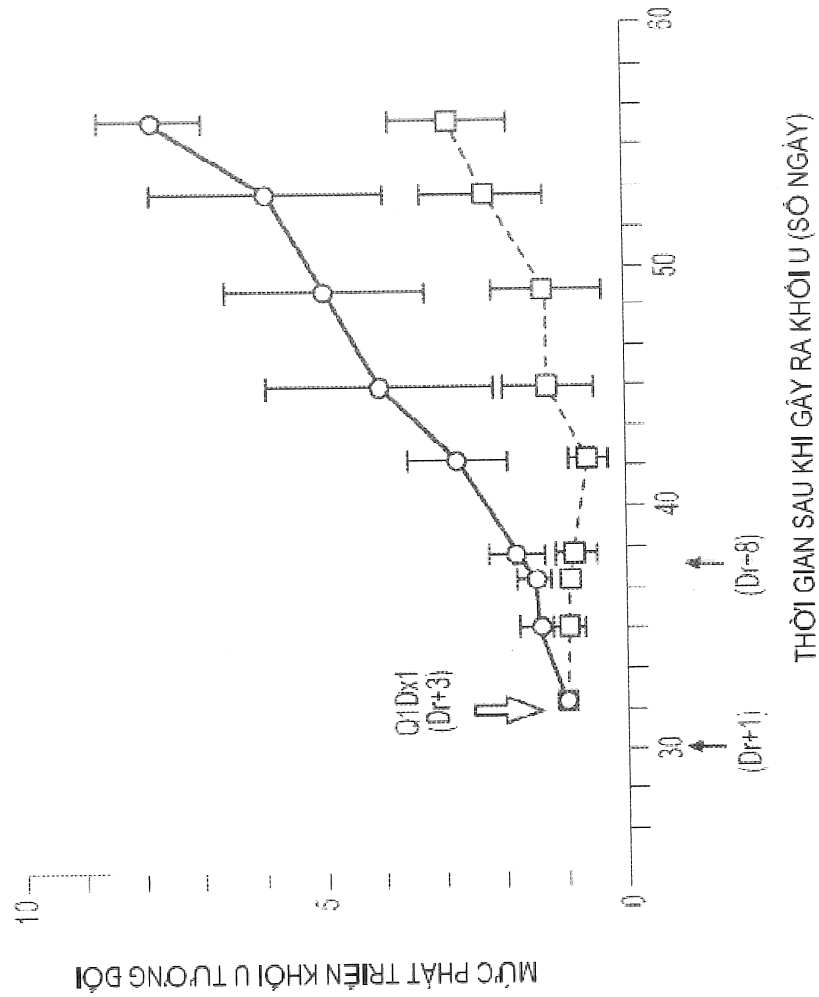

MỨC PHÁT TRIỂN KHỐI U TƯƠNG ĐỐI
10
5
0
30
40
50
60
(Dr+1)
(Dr−8)
THỜI GIAN SAU KHI GÂY RA KHỐI U (SỐ NGÀY)
Q1Dx1
(Dr+3)

FIG. 21C

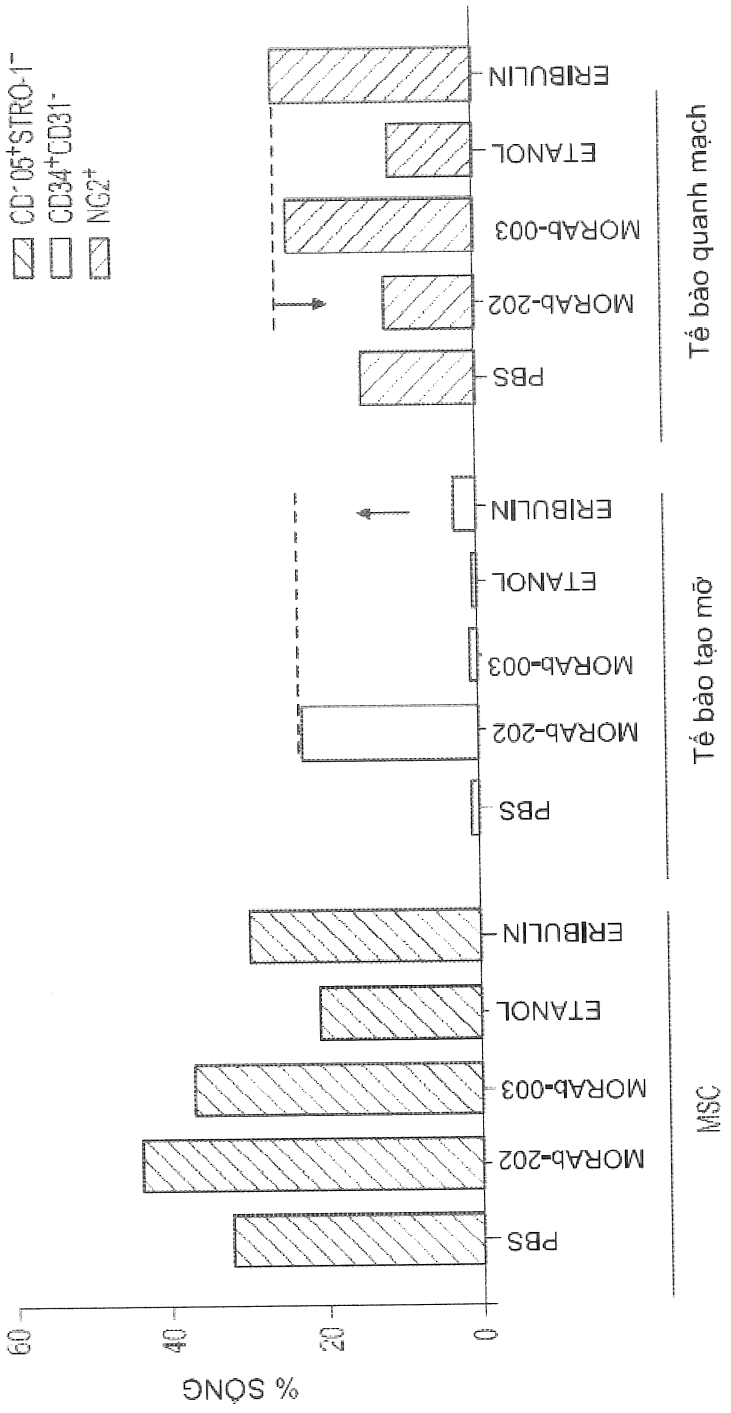

CD105+STRO-1-
CD34+CD31-
NG2+
% SỐNG
60
40
20
0
MSC
PBS
MORAb-202
MORAb-003
ETANOL
ERIBULIN
Tế bào tạo mỡ
PBS
MORAb-202
MORAb-003
ETANOL
ERIBULIN
Tế bào quanh mạch
PBS
MORAb-202
MORAb-003
ETANOL
ERIBULIN

FIG. 22

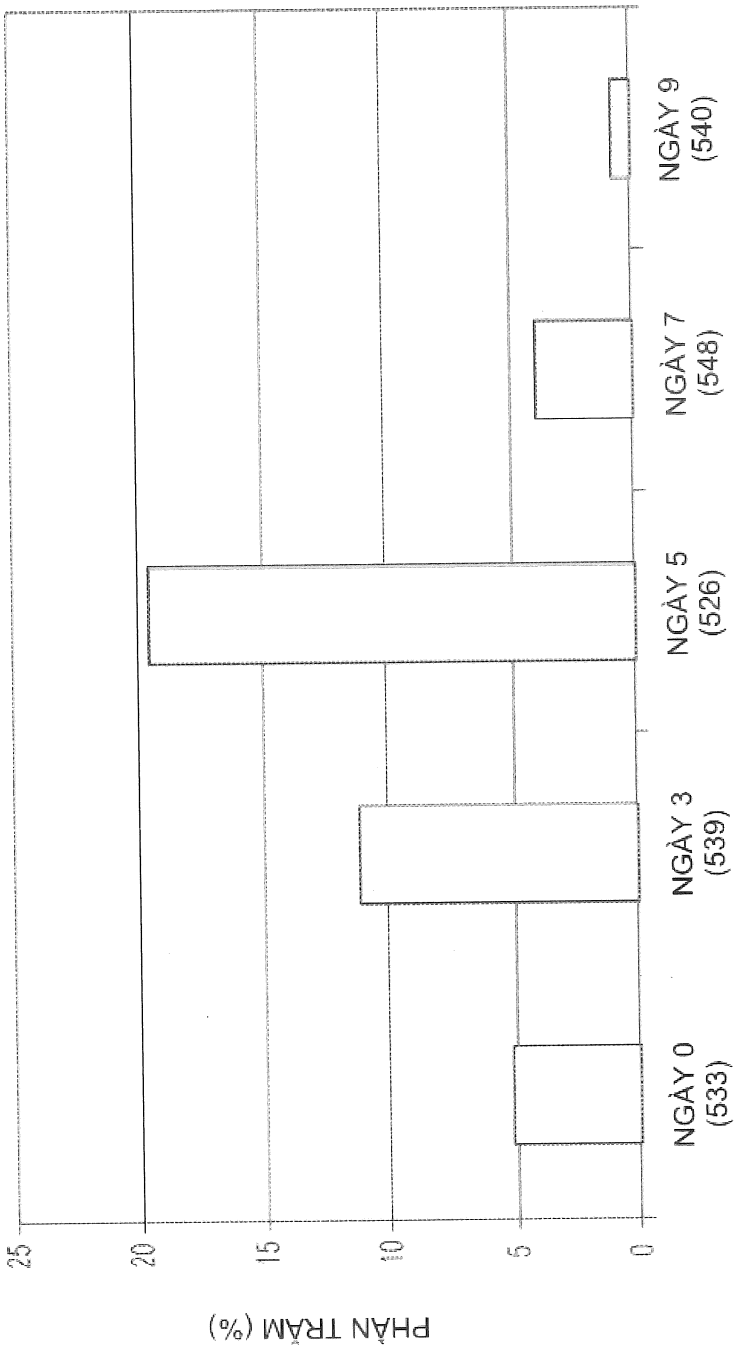

PHẦN TRĂM (%)
25
20
15
10
5
0
NGÀY 0
(533)
NGÀY 3
(539)
NGÀY 5
(526)
NGÀY 7
(548)
NGÀY 9
(540)

FIG. 23

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> EISAI CO., LTD.
EISAI INC.
MORPHOTEK, INC.

<120> THỂ LIÊN HỢP KHÁNG THỂ-DƯỢC CHẤT DỰA TRÊN ERIBULIN, DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ LIÊN HỢP NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ LIÊN HỢP NÀY

<130> 08061.0024-00304

<140> PCT/US2017/020529
<141> 2017-03-02

<150> 62/302,562
<151> 2016-03-02

<160> 368

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 2
Gly Tyr Gly Leu Ser
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 3
Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 4
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 468
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 5
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 6
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

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

115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 7
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 8
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 9
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 10
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile

35 40 45

Ser Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11
<211> 1407
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 11
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgag 60

gtccaactgg tggagagcgg tggaggtgtt gtgcaacctg gccggtccct gcgcctgtcc 120

tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct 180

ggaaaaggtc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtggtg gtagttatac ctactatgca 240

gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttcctg 300

caaatggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac 360

gatcccgcct ggttcgctta ttggggccaa gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

<210> 12
<211> 711
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 12
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60

atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc 120

acctgtagtg tcagctcaag tataagttcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca 180

ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc 240

agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 300

gaggacatcg ccacctacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtacat gtacacgttc 360

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a 711

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 13
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 14
Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 15
Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 16
Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn
1 5

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 17
Gly Thr Ser
1

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 18
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 257
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 19
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu

130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 20
<211> 982
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 20
cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg 60

acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg 120

attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa 180

aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc 240

tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac 300

tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc 360

ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc 420

aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat 480

tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg 540

tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc 600

actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg 660

agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg 720

gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg 780

cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac 840

ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg 900

tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat 960

ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa 982

<210> 21
<211> 1255
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 21
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

<210> 22
<211> 3768
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 22
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120

acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180

gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300

attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360

gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420

cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaaccccccag 480

ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540

ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600

ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720

gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780

agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840

tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgcccccct gcacaaccaa 960

gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140

tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200

gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc ccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100

acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160

aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220

cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280

cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340

tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460

gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520

ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580

attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640

gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700

caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760

aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820

ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880

attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940

agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000

gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060

gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120

ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180

ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240

gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300

ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtacccctg 3360

ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg 3420

aaccagccag atgttcggcc ccagcccccc tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480

cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540

gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600

ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660

tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720

cctacggcag agaacccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 24
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp

35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 26
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: tpolypeptit"ổng hợp

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 29
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
85 90 95

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 30
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 33
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 34
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 37
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
65 70 75 80

Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 38
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 41
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 42
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 45
gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 46
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 46

gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 47
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 47
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 48
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 48
gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 49
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 49
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttca 369

<210> 50
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 50
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaa 336

<210> 51
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 51
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtca 378

<210> 52

<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 52
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaa 336

<210> 53
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 53
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttca 354

<210> 54
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 54
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaa 324

<210> 55
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 55
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tct 363

<210> 56
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 56
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaa 324

<210> 57
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 57
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt ta 342

<210> 58
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 58
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330

<210> 59
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 59
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc t 351

<210> 60
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 60
gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 61
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 61
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 62
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 62
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 63
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 63
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catct 375

<210> 64
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 64
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 65
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 66
Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 67
Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 68
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 69
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 70
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 71
Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 72
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 73
Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 74
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 75
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 76
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 77

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 77
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 78
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 79
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 80
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 81
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 82
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 83
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 84
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 85
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 85
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 86
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 87
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp

<400> 88
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala

1 5 10

<210> 89
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 89
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 90
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 91
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 92
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 93
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
"

<400> 94
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 95
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 96
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 97
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 11
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 98
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 99
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 100
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 101
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 102
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 103
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 104
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala

1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 105
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 106
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 107
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 108

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 108
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 109
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 110
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 111
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 112
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 113
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 114
Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 115
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 116
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 117
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 118
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 119
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 120
Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 121
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 122
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 122
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 123
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 124
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 124
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 125
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 125
ggctatgggt tgtct 15

<210> 126
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 126
atgattagta gtggtggtag ttatacctac tatgcagaca gtgtgaaggg t 51

<210> 127
<211> 30
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 127
catggggacg atcccgcctg gttcgcttat 30

<210> 128
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 128
agtgtcagct caagtataag ttccaacaac ttgcac 36

<210> 129
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 129
ggcacatcca acctggcttc t 21

<210> 130
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 130
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 131
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 131
ggctacacca tgaac 15

<210> 132
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 132
cttattactc cttacaatgg tgcttctagc tacaaccaga agttcagggg c 51

<210> 133
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 133

ggggggttacg acgggagggg ttttgactac 30

<210> 134
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 134
agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac 30

<210> 135
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 135
gacacatcca aactggcttc t 21

<210> 136
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 136
cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 137

<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 137
agcgatgcaa taagc 15

<210> 138
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 138
atcattaatg gtggtggtaa cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 139
<211> 54
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 139
ggcattcaac atggtggtgg taatagtgat tattattatt acggcatgga cctc 54

<210> 140
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 140
caggccagtc agagcattag tagtgtcttg tcc 33

<210> 141
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 141
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 142
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 142
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 143
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 143
tccgacgcga ttagc 15

<210> 144
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 144
atcatcaacg gcggcggaaa cacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 145
<211> 54
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 145
ggcatccagc acggtggtgg aaacagcgac tactactact atgggatgga tctg 54

<210> 146
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 146
caggcgtccc agtcaattag cagcgtgctc tcc 33

<210> 147
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 147
ttggcctcca ctctggcctc g 21

<210> 148
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 148
caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 149
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 149
aactatgcaa tgagc 15

<210> 150
<211> 48
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 150
tccattagta ctggtggtct cgcattctac gcgaactggg caaaaggc 48

<210> 151
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 151
aatggtggtg gtagttatat tttctattat tttgacttg 39

<210> 152
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 152
caggccagtc agagcattag tagttactta tcc 33

<210> 153
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 153
tctgcatcca ctctggcatc t 21

<210> 154
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 154
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 155
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 155
aactacgcca tgtcc 15

<210> 156
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 156

tccatcagca caggcggcct ggccttctac gccaattggg ccaagggc 48

<210> 157
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 157
aacggcggag gctcctacat cttctactac ttcgacctg 39

<210> 158
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 158
caggcctccc agtccatctc ctcctacctg tcc 33

<210> 159
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 159
tctgcctcca cactggcctc c 21

<210> 160

<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 160
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 161
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 161
agctatgcaa tgggc 15

<210> 162
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 162
accattaata ttggtggtcg cgtatattac gcgagctggg caaaaggc 48

<210> 163
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 163
tattataatg gtggtagtta tgacatc 27

<210> 164
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 164
caggccagtg agagcattta tcgcgtattg gcc 33

<210> 165
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 165
gatacatcca ctctggcatc t 21

<210> 166
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 166
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 167
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 167
tcctacgcta tgggc 15

<210> 168
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 168
accatcaaca tcggcggcag agtgtactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 169
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 169
tactacaacg gcggctccta cgatatc 27

<210> 170
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 170
caggcctccg agtccatcta ccgggtgctg gcc 33

<210> 171
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 171
gacaccagca cactggcctc c 21

<210> 172
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 172
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 173
<211> 15
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 173
agttatgcaa tgatc 15

<210> 174
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 174
accattagta ctggtggtat cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 175
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 175
gggggatatg ctgctagtag tgcttattat ctcccgtact actttgactt g 51

<210> 176
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 176
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 177
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 177
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 178
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 178
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 179
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 179

tcctacgcta tgatc 15

<210> 180
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 180
accatctcta ccggcggaat tacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 181
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 181
ggcggctacg ccgccagctc cgcttactac ctgccctact acttcgacct g 51

<210> 182
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 182
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 183

<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 183
ctggcctcca cactggcctc t 21

<210> 184
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 184
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 185
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 185
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5

<210> 186
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 186
Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser
1 5

<210> 187
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 187
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 188
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 189
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 189
Asp Thr Ser
1

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 190
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 191
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 191
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 192
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 192
Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 193
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 193
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 194
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 194
Gln Asp Val Asn Thr Ala
1 5

<210> 195
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 195
Ser Ala Ser
1

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 196
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 197
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 197
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 198
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 199
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 199
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
20

<210> 200
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 200
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 201
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 201
Leu Ala Ser
1

<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 202
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 203
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 203
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

<210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 204
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 205
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 205
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
20

<210> 206
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 206
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 207
<211> 3
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 207
Leu Ala Ser
1

<210> 208
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 208
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 209
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 210
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 211
Gly Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 212
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 213
Ser Ala Ser
1

<210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 214
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 215
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 216
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1 5

<210> 217
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 217
Ala Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 218
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 218
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 219
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 219
Ser Ala Ser
1

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 220
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 221
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 221
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 222
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 223
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 224
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 224
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

<210> 225
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 225
Asp Thr Ser
1

<210> 226
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 226
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 227
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 228
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 229
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 229
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 230
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 230
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

<210> 231
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 231

Asp Thr Ser
1

<210> 232
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 232
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 233
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 234
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr

1 5

<210> 235
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 235
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

<210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 236
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 237
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 237
Leu Ala Ser
1

<210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 238
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 239
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 239
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 240
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 240
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 241
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 241
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 242
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 243
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 243
Leu Ala Ser
1

<210> 244
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 244
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 245
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 245
ggcttcacct tcagcggcta tggg 24

<210> 246
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 246
attagtagtg gtggtagtta tacc 24

<210> 247
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 247
gcaagacatg gggacgatcc cgcctggttc gcttat 36

<210> 248
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 248
tcaagtataa gttccaacaa c 21

<210> 249
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 249
ggcacatcc 9

<210> 250
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 250
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 251
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 251
ggttactcat tcactggcta cacc 24

<210> 252
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 252
attactcctt acaatggtgc ttct 24

<210> 253
<211> 36
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 253
gcaaggggggg gttacgacgg gaggggtttt gactac 36

<210> 254
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 254
tcaagtgtaa gttac 15

<210> 255
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 255
gacacatcc 9

<210> 256
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp oligonucleotit"

<400> 256
cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 257
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 257
ggaatctccc tcagtagcga tgca 24

<210> 258
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 258
attaatggtg gtggtaacac a 21

<210> 259
<211> 60
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 259

gccagaggca ttcaacatgg tggtggtaat agtgattatt attattacgg catggacctc 60

<210> 260
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 260
cagagcatta gtagtgtc 18

<210> 261
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 261
ctggcatct 9

<210> 262
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 262
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 263

<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 263
ggaatttccc tctcctccga cgcg 24

<210> 264
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 264
atcaacggcg gcggaaacac c 21

<210> 265
<211> 60
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 265
gcgcgcggca tccagcacgg tggtggaaac agcgactact actactatgg gatggatctg 60

<210> 266
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 266
cagtcaatta gcagcgtg 18

<210> 267
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 267
ttggcctcc 9

<210> 268
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 268
caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 269
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 269
ggattctccc tcaataacta tgca 24

<210> 270
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 270
attagtactg gtggtctcgc a 21

<210> 271
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 271
ggcagaaatg gtggtggtag ttatattttc tattattttg acttg 45

<210> 272
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 272
cagagcatta gtagttac 18

<210> 273
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 273
tctgcatcc 9

<210> 274
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 274
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 275
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 275
ggcttctccc tgaacaacta cgcc 24

<210> 276
<211> 21
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 276
atcagcacag gcggcctggc c 21

<210> 277
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 277
gccagaaacg gcggaggctc ctacatcttc tactacttcg acctg 45

<210> 278
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 278
cagtccatct cctcctac 18

<210> 279
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp

<400> 279
tctgcctcc 9

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288
000

<210> 289

<400> 289
000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 300
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 301
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 301
ggaatcgacc tcagtagcta tgca 24

<210> 302
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 302
attaatattg gtggtcgcgt a 21

<210> 303
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 303
gccagatatt ataatggtgg tagttatgac atc 33

<210> 304
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 304
gagagcattt atcgcgta 18

<210> 305
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 305
gatacatcc 9

<210> 306
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 306
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 307
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 307
ggaatcgacc tgtcctccta cgct 24

<210> 308
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 308
atcaacatcg gcggcagagt g 21

<210> 309
<211> 33
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 309
gcccggtact acaacggcgg ctcctacgat atc 33

<210> 310
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 310
gagtccatct accgggtg 18

<210> 311
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 311
gacaccagc 9

<210> 312
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 312
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 313
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 313
ggattctccc tcagtagtta tgca 24

<210> 314
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 314
attagtactg gtggtatcac a 21

<210> 315
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 315

gccagagggg gatatgctgc tagtagtgct tattatctcc cgtactactt tgacttg 57

<210> 316
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 316
cagagtgttt ataataataa caac 24

<210> 317
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 317
ctggcatcc 9

<210> 318
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 318
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 319

<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 319
ggcttctccc tgtcctccta cgct 24

<210> 320
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 320
atctctaccg gcggaattac c 21

<210> 321
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 321
gctagaggcg gctacgccgc cagctccgct tactacctgc cctactactt cgacctg 57

<210> 322
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 322
cagtccgtgt ataacaacaa caac 24

<210> 323
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 323
ctggcctcc 9

<210> 324
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 324
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 325
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 325

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 326
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 326
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 327
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 327
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 328
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 328

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 329
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 329
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
85 90 95

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 330
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 330
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 331
<211> 456
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 331
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 332
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 332
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 333
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 333
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

```
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
          20                  25                  30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
       35                  40                  45

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65                  70                  75                  80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
                85                  90                  95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
          100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
       115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
          180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
       195                 200                 205
```

```
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380
```

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 334
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 334
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 335
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 335

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175
```

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 336
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 336
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 337
<211> 444
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 337
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
65 70 75 80

Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 338
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 338
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 339
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 339
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 340
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 340

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 341
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 341
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 342
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 342
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 343
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 343
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

```
Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240
```

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 344
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 344
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 345
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 345
gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cttatattca aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 346

<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 346
gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttaa 654

<210> 347
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 347
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 348

<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 348
gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 642

<210> 349
<211> 1362
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 349
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720

ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcttatatt caaagctcac cgtggacaag 1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1362

<210> 350

<211> 660
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 350
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 351
<211> 1371
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 351
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtcagc atccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc 420

tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 480

gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600

agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660

gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 780

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 900

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcttatattc aaagctcacc 1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc ccgggaaatg a 1371

<210> 352

<211> 660
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 352
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 353
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 353
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttcagcatcc 360

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1347

<210> 354

<211> 648
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 354
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 355
<211> 1356
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 355
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tctgcatcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctta tattcaaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctcccggg aaatga 1356

<210> 356

<211> 648
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 356
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 357
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 357
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt tagcatccac caagggccca 360

tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 420

tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 480

accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 540

agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 600

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 660

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 720

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 780

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 900

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcttat attcaaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320

tctcccggga aatga 1335

<210> 358

<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 358
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 359
<211> 1344
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 359
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc tgcatccacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcttata ttcaaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctcccgggaa atga 1344

<210> 360

<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 360
gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 361
<211> 1359
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 361
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcat ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc 420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ttatattcaa agctcaccgt ggacaagagc 1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc gggaaatga 1359

<210> 362

<211> 660
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 362
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 363
<211> 1368
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp

<400> 363
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catctgcatc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttct tatattcaaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaaatga 1368

<210> 364

<211> 660
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 364
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 365
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 365
Ala His Lys Asp
1

<210> 366
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 366
Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 367
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 367
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 368
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 368
Ala Leu Ala Leu
1