



(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)



1-0028826

(51)⁷ C07K 16/00; C07K 16/46; C07K 16/32; (13) B
C07K 16/24; C07K 16/28

(21) 1-2013-03360

(22) 28/03/2012

(86) PCT/US2012/030948 28/03/2012

(87) WO/2012/135345 04/10/2012

(30) 61/468,276 28/03/2011 US; 1160311 14/11/2011 FR

(45) 25/07/2021 400

(43) 27/01/2014 310A

(73) SANOFI (FR)

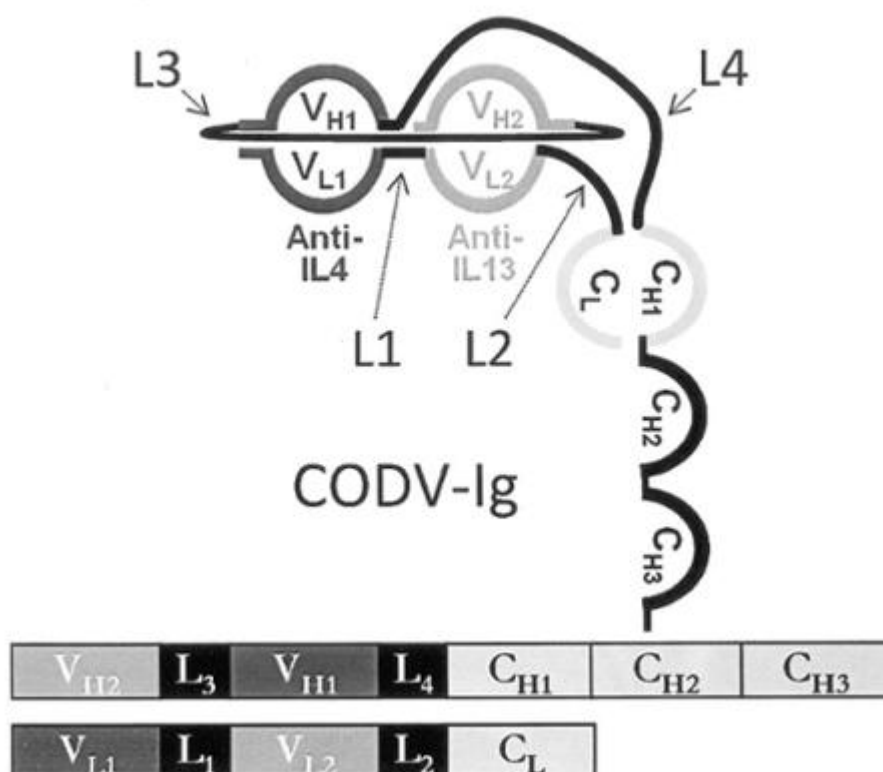
54, rue la Boetie 75008 Paris, France

(72) BAURIN, Nicolas (FR); BEIL, Christian (DE); CORVEY, Carsten (DE); LANGE, Christian (DE); LI, Danxi (US); MIKOL, Vincent (FR); STEINMETZ, Anke (FR); RAO, Ercole (DE).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PROTEIN LIÊN KẾT GIỐNG KHÁNG THỂ CÓ VÙNG BIẾN ĐỔI KÉP VÀ HƯỚNG CỦA CÁC VÙNG LIÊN KẾT CHÉO NHAU VÀ ĐƯỢC PHẠM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó mỗi cặp polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể có các miền biến đổi kép có hướng chéo nhau. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các protein liên kết giống kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết giống kháng thể chứa bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó mỗi cặp polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể sở hữu các miền biến đổi kép có hướng chéo nhau. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các protein liên kết giống kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kháng thể IgG xuất hiện trong tự nhiên là kháng thể có hai hóa trị và đơn đặc hiệu. Các kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu liên kết đối với hai kháng nguyên khác nhau có thể được tạo ra sử dụng công nghệ tái tổ hợp và có nhiều ứng dụng lâm sàng. Đã biết rõ rằng phân tử kháng thể IgG hoàn chỉnh là phân tử hình chữ Y bao gồm bốn chuỗi polypeptit: hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm hai miền, miền tận cùng N được biết là miền (hoặc vùng) biến đổi hoặc V_L và miền tận cùng C được biết là miền cố định (hoặc C_L) (miền cố định kappa (C_K) hoặc miền cố định lambda (C_λ)). Mỗi chuỗi nặng bao gồm bốn hoặc năm miền, tùy thuộc vào lớp của kháng thể. Miền tận cùng N được biết là miền (hoặc vùng) biến đổi (hoặc V_H), theo sau là miền cố định thứ nhất (hoặc C_{H1}), vùng bản lề, và tiếp theo là miền cố định thứ hai và thứ ba (hoặc C_{H2} và C_{H3}). Trong kháng thể lắp ghép, miền V_L và V_H kết hợp với nhau để tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên. Tương tự, miền C_L và C_{H1} kết hợp với nhau giúp một chuỗi nặng kết hợp với một chuỗi nhẹ. Hai heterodime chuỗi nặng-chuỗi nhẹ kết hợp với nhau bằng tương tác của miền C_{H2} và C_{H3} và tương tác của các vùng bản lề trên hai chuỗi nặng.

Đã biết rằng việc phân cắt protein của kháng thể có thể dẫn đến việc tạo ra các mảnh kháng thể (Fab và Fab2). Các mảnh này của kháng thể toàn phần có thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên. Các mảnh kháng thể cũng có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Mảnh Fv, chỉ bao gồm các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kết hợp với nhau có thể được tạo ra. Các mảnh Fv này có hóa trị một khi liên kết với kháng nguyên. Các mảnh nhỏ hơn như các miền biến đổi riêng rẽ (các kháng thể miền hoặc các dAB; Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341(6242): 544-46), và các vùng xác định tính hỗ trợ riêng lẻ hoặc các CDR (Williams *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86(14): 5537-41)

cũng được chỉ ra là có đặc tính liên kết của kháng thể gốc, mặc dù hầu hết các kháng thể xuất hiện trong tự nhiên thường cần cả V_H lẫn V_L mới có hoạt lực liên kết đầy đủ.

Các cấu trúc mảnh biến đổi chuỗi đơn (single chain variable fragment - scFv) bao gồm miền V_H và V_L của kháng thể, nằm trong chuỗi polypeptit đơn, trong đó các miền tách biệt nhau bằng liên kết linh động có chiều dài đầy đủ (nhiều hơn 12 gốc axit amin), mà ảnh hưởng đến tương tác nội phân tử, cho phép quá trình tự lắp ghép của hai miền thành vị trí liên kết epitop chức năng (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242(4877): 423-26). Các protein nhỏ này (MW ~25,000 Da) thường có tính đặc hiệu và ái lực đối với kháng nguyên của chúng trong polypeptit đơn và có thể cung cấp khối lắp ghép thuận tiện cho các phân tử đặc hiệu lớn hơn.

Một ưu điểm của việc sử dụng mảnh kháng thể so với việc sử dụng kháng thể toàn phần trong chẩn đoán và điều trị là kích thước của mảnh kháng thể nhỏ hơn. Chúng chắc chắn sinh miễn dịch ít hơn so với kháng thể toàn phần và nhiều khả năng thâm vào mô hơn. Một nhược điểm khi sử dụng các mảnh này là chúng chỉ có một vị trí liên kết kháng nguyên, làm cho ái lực bị giảm. Ngoài ra, do kích thước nhỏ nên chúng bị thanh thải rất nhanh khỏi huyết thanh, và do đó, có thời gian bán hủy ngắn.

Vấn đề quan tâm đó là tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (bispecific antibody - BsAb) mà kết hợp hai vị trí liên kết kháng nguyên của hai kháng thể trong cùng một phân tử, và do đó, sẽ có khả năng cùng lúc liên kết hai kháng nguyên khác nhau. Bên cạnh các ứng dụng cho mục đích chẩn đoán, các phân tử này còn mở ra nhiều ứng dụng điều trị mới, ví dụ, bằng cách hướng hệ thống tác động tiềm ẩn vào khu vực bị bệnh (tại đây, các tế bào ung thư thường phát triển các cơ chế ức chế đáp ứng miễn dịch thông thường được tạo ra bởi kháng thể đơn dòng, như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC)), hoặc bằng cách tăng hoạt tính trung hòa hoặc kích thích của kháng thể. Khả năng này được biết đến rất sớm, tạo ra nhiều phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép. Các công trình nghiên cứu ban đầu đều tập trung vào việc kết hợp tính đặc hiệu liên kết của hai kháng thể toàn phần với các kháng nguyên đích khác nhau cho mục đích điều trị, bằng cách sử dụng phân tử dị tiếp hợp được dung hợp hóa học (Staerz *et al.*, 1985, *Nature* 314(6012): 628-31).

Kháng thể đặc hiệu kép đầu tiên được tạo ra bằng cách dung hợp hai thể lai, các thể lai này đều có khả năng tạo ra các globulin miễn dịch khác nhau (Milstein *et al.*,

1983, *Nature* 305(5934): 537-40), nhưng tính hỗn tạp của kháng thể loại này (lên đến 10 loại khác nhau) mà được tạo ra trong môi trường nuôi cấy tế bào khiến việc tinh chế chúng khó khăn và tốn kém (George *et al.*, 1997, *THE ANTIBODIES* 4: 99-141 (Capra *et al.*, ed., Harwood Academic Publishers)). Khi sử dụng dạng này, kháng thể IgG2a ở chuột nhất và IgG2b ở chuột đồng được tạo ra trong cùng một tế bào (*ví dụ*, dưới dạng thể dung hợp bốn của hai thể lai, hoặc trong các tế bào CHO được xử lý kỹ thuật). Vì chuỗi nhẹ của từng kháng thể sẽ ưu tiên kết hợp với chuỗi nặng của loài cùng nguồn gốc nên ba loại kháng thể chính sẽ được lắp ghép; hai kháng thể gốc và heterodime của hai kháng thể mang một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ của kháng thể, kết hợp thông qua phần Fc của chúng. Dime mong muốn có thể được tinh chế từ hỗn hợp này nhờ đặc tính liên kết với protein A khác với đặc tính liên kết của kháng thể gốc: IgG2b chuột đồng không liên kết với protein A, trong khi đó IgG2a chuột nhất lại liên kết với protein này. Do đó, heterodime chuột nhất-chuột đồng liên kết với protein A nhưng lại được rửa giải ở độ pH cao hơn so homodime IgG2a chuột nhất, và điều này cho phép tinh chế chọn lọc heterodime đặc hiệu kép (Lindhofer *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 155(1): 219-25). Heterodime đặc hiệu kép thu được không có nguồn gốc từ người hoàn toàn, do đó nó có tính sinh miễn dịch cao, nhưng cũng có thể có tác dụng phụ gây hại (*ví dụ*, phản ứng "HAMA" hoặc phản ứng "HARA"), và/hoặc hoạt tính trung hòa chất trị liệu. Do đó, cần có kháng thể đặc hiệu kép đã qua xử lý kỹ thuật có đặc tính ưu việt và có thể được sản xuất từ môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú dễ dàng với hiệu suất cao.

Mặc dù đã thu được kết quả khả quan khi sử dụng thể tiếp hợp dị tương đồng hoặc kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bởi thể dung hợp tế bào như đã nêu, nhưng một vài yếu tố làm cho chúng không khả thi trong ứng dụng điều trị trên quy mô lớn. Các yếu tố này bao gồm: thể tiếp hợp dị tương đồng có thời gian thanh thải *in vivo* nhanh, do đó cần kỹ thuật chuyên dụng trong phòng thí nghiệm để tạo ra loại phân tử này, cần tinh chế kỹ thể tiếp hợp dị tương đồng này để tách chúng ra khỏi thể tiếp hợp tương đồng hoặc kháng thể đơn đặc hiệu, và thường có hiệu suất thấp.

Việc xử lý kỹ thuật gen đã được sử dụng để tăng hiệu suất trong thiết kế, cải biến và tạo ra kháng thể hoặc dẫn xuất của kháng thể có bộ đặc tính liên kết và chức năng tác động mong muốn. Rất nhiều phương pháp tái tổ hợp đã được phát triển để sản xuất các BsAb một cách có hiệu quả, cả hai đều dưới dạng mảnh kháng thể (Carter *et al.*, 1995, *J. Hematother.* 4(5): 463-70; Pluckthun *et al.*, 1997, *Immunotechnology* 3(2): 83-105;

Todorovska *et al.*, 2001, *J. Immunol. Methods* 248(1-2): 47-66) và dạng IgG có chiều dài đầy đủ (Carter, 2001, *J. Immunol. Methods* 248(1-2): 7-15).

Việc kết hợp hai scFv khác nhau sẽ tạo ra dạng BsAb có khối lượng phân tử tối thiểu, được gọi bằng thuật ngữ sc-BsAbs hoặc Ta-scFvs (Mack *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(15): 7021-25; Mallender *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269(1): 199-206). Các BsAb đã được xây dựng cấu trúc bằng cách dung hợp di truyền hai scFv với tính năng dime hóa như vùng khóa kéo leuxin (Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148(5): 1547-53; de Kruif *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(13): 7630-34).

Kháng thể đôi (diabody) là mảnh kháng thể nhỏ, hóa trị hai và đặc hiệu kép. Các mảnh này mang V_H liên kết với V_L trên cùng chuỗi polypeptit thông qua liên kết rất ngắn (có chiều dài nhỏ hơn 12 gốc axit amin) để hai miền trên cùng một mạch ghép cặp với nhau. Các miền này bắt buộc phải cặp liên phân tử với miền của chuỗi khác, và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Các mảnh kháng nguyên dime này, hoặc "kháng thể đôi" là các mảnh kháng nguyên hóa trị hai và đặc hiệu kép (Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(14): 6444-48). Các kháng thể đôi này có kích thước tương tự với mảnh Fab. Các chuỗi polypeptit mang miền V_H và V_L nối với nhau bằng liên kết có chiều dài từ 3 đến 12 gốc axit amin, để chủ yếu tạo ra dime (kháng thể hai), trong khi đó liên kết có chiều dài từ 0 đến 2 gốc axit amin chủ yếu tạo ra trime (kháng thể ba) và tetrame (kháng thể bốn). Ngoài phụ thuộc vào chiều dài của liên kết, mô hình oligome hóa chính xác dường như còn phụ thuộc vào thành phần cũng như hướng của miền biến đổi (Hudson *et al.*, 1999, *J. Immunol. Methods* 231(1-2): 177-89). Khả năng phỏng đoán cấu trúc cuối cùng của phân tử kháng thể đôi là rất thấp.

Mặc dù sc-BsAb và các cấu trúc dựa trên kháng thể đôi có hoạt lực lâm sàng đáng chú ý nhưng đã chỉ ra rằng việc phân tử kết hợp với nhau bằng liên kết không đồng hóa trị sẽ không đủ ổn định trong điều kiện sinh lý. Tính ổn định toàn bộ của mảnh scFv phụ thuộc vào tính ổn định nội tại của miền V_L và V_H cũng như tính ổn định của ranh giới giữa các miền. Độ ổn định không đủ của ranh giới miền V_H - V_L của mảnh scFv thường được cho là nguyên nhân chính làm vô hoạt scFv không thuận nghịch, do việc mở rộng tạm thời của ranh giới miền mà được tạo ra bởi liên kết peptit, từ đó làm lộ ra các mảng kỵ nước, tạo điều kiện cho quá trình kết tụ và do đó, làm mất ổn định và giảm hiệu suất sản xuất (Wörn *et al.*, 2001, *J. Mol. Biol.* 305(5): 989-1010).

Phương pháp khác để sản xuất các protein liên kết kháng nguyên hóa trị hai, đặc hiệu đôi từ miền V_H và V_L đã được mô tả trong patent Mỹ số 5,989,830. Cấu hình hai đầu và Fv kép thu được bằng cách biểu hiện vector hai cistron mã hóa hai polypeptit. Trong cấu hình Fv kép, các miền biến đổi của hai kháng thể khác nhau được biểu hiện theo hai hướng nối tiếp trên hai chuỗi tách biệt (một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ), trong đó một chuỗi polypeptit có hai miền V_H có hướng nối tiếp nhau và tách biệt bởi liên kết peptit (V_{H1} -liên kết- V_{H2}) và chuỗi polypeptit còn lại có các miền V_L bổ trợ nối tiếp nhau bằng liên kết peptit (V_{L1} -liên kết- V_{L2}). Trong cấu hình hai đầu liên kết chéo, các miền biến đổi của hai kháng thể khác nhau được biểu hiện theo hai hướng nối tiếp trên hai chuỗi polypeptit riêng biệt (một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ), trong đó một chuỗi polypeptit có hai miền V_H có hướng nối tiếp nhau và tách biệt bởi liên kết peptit (V_{H1} -liên kết- V_{H2}) và chuỗi polypeptit còn lại có các miền V_L bổ trợ nối tiếp nhau bằng liên kết peptit nằm ở hướng đối diện (V_{L2} -liên kết- V_{L1}). Việc mô hình hóa phân tử của các cấu trúc cho thấy kích thước liên kết sẽ đủ dài để bao gồm 30-40 Å (15-20 gốc axit amin).

Việc làm tăng hóa trị của kháng thể đang được quan tâm do nó làm tăng ái lực chức năng của kháng thể nhờ tác dụng bám dính. Các phức protein đa hóa trị (polyvalent protein complexes - PPC) có hóa trị được làm tăng đã được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2005/0003403 A1. Các PPC bao gồm hai chuỗi polypeptit thường được sắp xếp bên sườn của một chuỗi khác. Mỗi chuỗi polypeptit thường bao gồm ba hoặc bốn "vùng v" mà bao gồm các trình tự axit amin có khả năng tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên khi được ghép cặp với vùng v tương ứng trên chuỗi đối diện. Có tới 6 vùng v có thể được sử dụng trên mỗi chuỗi polypeptit. Các vùng v của mỗi chuỗi polypeptit liên kết thẳng với vùng v khác và có thể được liên kết bằng các vùng liên kết nằm rải rác. Khi được sắp xếp ở dạng PPC, các vùng v trên mỗi chuỗi polypeptit tạo ra các vị trí liên kết kháng nguyên riêng lẻ. Phức này có thể có một hoặc một vài tính đặc hiệu liên kết.

Chiến lược tạo ra heterodime Fc sử dụng bộ đột biến "khóa trong ổ" trong miền C_{H3} của Fc đã được Carter và đồng tác giả đề xuất (Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9(7): 617 đến 21; Carter, 2011, *J. Immunol. Methods* 248(1-2): 7-15). Bộ đột biến này làm thay đổi tính bổ trợ che lấp gốc giữa ranh giới miền C_{H3} trong nhân kỵ nước được bảo toàn cấu trúc sao cho việc tạo ra heterodime chiếm ưu thế hơn so với đồng dime, từ đó thu được mức biểu hiện heterodime tốt từ môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú.

Mặc dù chiến lược này sẽ cho hiệu suất thu heterodime cao hơn nhưng các heterodime này không bị ức chế hoàn toàn (Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16(7): 677-81).

Gunasekaran và các đồng tác giả đã phát hiện ra rằng khi thực hiện tạo ra heterodime Fc bằng cách thay đổi tính bổ trợ điện tích ở ranh giới miền C_{H3} (Gunasekaran *et al.*, 2010, *J. Biol. Chem.* 285(25): 19637-46) sẽ giữ lại được tính thu nhận của nhân kỵ nước. Nhờ ưu điểm của cơ chế hướng tĩnh điện, các cấu trúc này có khả năng tăng cường hiệu quả việc tạo ra heterodime Fc với mức tạp chất đồng dime nhỏ nhất nhờ đột biến hai cặp gốc mang điện nằm ở ngoại biên. Ngược với mô hình, khóa trong ổ, các đồng dime thậm chí còn bị ức chế do bản chất của cơ chế đẩy tĩnh điện, nhưng không thể tránh được hoàn toàn.

Davis và các đồng tác giả mô tả phương pháp xử lý kỹ thuật kháng thể để chuyển hóa đồng dime Fc thành heterodime bằng cách cài mảnh của mạch β ở miền C_{H3} của IgG và IgA vào, mà không đưa thêm liên kết disulfua nội mạch vào (Davis *et al.*, 2010, *Protein Eng. Des. Sel.* 23(4): 195-202). Việc biểu hiện protein dung hợp thể mầm (SEEDbody - Sb) ở các tế bào của động vật có vú tạo ra các heterodime Sb với hiệu suất cao và dễ dàng tinh chế để loại bỏ lượng nhỏ các sản phẩm phụ.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2010/331527 A1 mô tả kháng thể đặc hiệu kép dựa trên việc heterodime hóa miền C_{H3} , đưa vào đột biến H95R và Y96F trong miền C_{H3} trong một chuỗi nặng. Các thay thế axit amin này thu được từ miền C_{H3} của tiểu loại IgG3 và sẽ heterodime hóa bằng khung xương IgG1. Chuỗi nhẹ thông thường có xu hướng cặp với mỗi chuỗi nặng là điều kiện cần cho tất cả các dạng dựa trên việc heterodime hóa thông qua miền C_{H3} . Do đó, tổng ba loại kháng thể này được tạo ra bao gồm: 50% có khung xương thuần IgG1, một phần ba có khung xương đột biến thuần H95R và Y96F, và một phần ba có hai chuỗi nặng khác nhau (đặc hiệu kép). Heterodime mong muốn có thể được tinh chế từ hỗn hợp này nhờ đặc tính liên kết của nó với protein A khác với đặc tính liên kết của nó với Protein của kháng thể gốc: các miền C_{H3} thu được từ IgG3 không liên kết với protein A, trong khi đó các miền thu được từ IgG1 lại liên kết với protein này. Do đó, heterodime này liên kết với protein A, nhưng lại rửa giải ở độ pH cao hơn so với đồng dime thuần IgG1, và điều này cho phép tinh chế chọn lọc heterodime đặc hiệu kép.

Patent Mỹ số 7,612,181 mô tả kháng thể đặc hiệu kép IgG miền biến đổi kép (Dual-Variable-Domain IgG - DVD-IgG) dựa trên dạng Fv kép được mô tả trong đơn

Patent Mỹ số 5,989,830. Dạng đặc hiệu kép tương tự cũng được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2010/0226923 A1. Việc bổ sung các miền cố định vào các chuỗi tương ứng của Fv kép (C_{H1} -Fc vào chuỗi nặng và miền cố định kappa hoặc lambda vào chuỗi nhẹ) sẽ tạo ra kháng thể chức năng đặc hiệu kép mà không cần các cải biến khác (*nghĩa là*, việc bổ sung miền cố định rõ ràng là để tăng cường độ ổn định). Một số kháng thể được biểu hiện trong dạng DVD-Ig/TBTI có ảnh hưởng tích cực đến vị trí liên kết kháng nguyên thứ hai (hoặc trong cùng) (Fv2). Tùy thuộc vào trình tự và bản chất của kháng nguyên được nhận diện bởi vị trí Fv2, miền kháng thể này có ái lực giảm với kháng nguyên của nó (*nghĩa là*, mất tốc độ kết hợp so với kháng thể gốc). Một lý do có thể lý giải cho kết quả này là liên kết giữa V_{L1} và V_{L2} nhô vào trong vùng CDR của Fv2, ở một mức độ nào đó làm cho Fv2 không thể tiếp cận được với các kháng nguyên lớn hơn.

Cấu hình thứ hai của mảnh kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong patent Mỹ số 5,989,830 là hai đầu liên kết chéo (cross-over double head - CODH), có hướng của các miền biến đổi được biểu hiện trên hai chuỗi như sau:

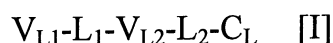
V_{L1} -liên kết- V_{L2} , đối với chuỗi nhẹ, và

V_{H2} -liên kết- V_{H1} , đối với chuỗi nặng

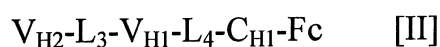
Patent số '830 mô tả rằng mảnh kháng thể hai đầu liên kết chéo có tính đặc hiệu kép (cấu trúc GOSA.E) giữ được hoạt tính liên kết cao hơn so với Fv kép (xem trang 20, dòng 20-50 của patent '830), và còn mô tả rằng dạng này ít bị ảnh hưởng hơn bởi liên kết được sử dụng giữa các miền biến đổi (xem trang 20-21 của patent '830).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

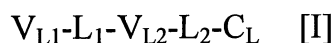
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

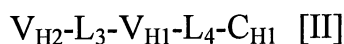
L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Sáng chế cũng đề xuất protein liên kết giống kháng thể bao gồm hai chuỗi polypeptits tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

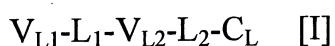
C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

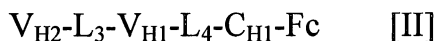
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 và liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, bao gồm các bước sau: xác định miền biến đổi thứ nhất của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và miền biến đổi thứ hai của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ hai, mỗi miền đều chứa V_L , và V_H ; quy định chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng làm chuỗi khuôn mẫu; quy định V_L của miền biến đổi thứ nhất của kháng thể hoặc miền biến đổi thứ hai của kháng thể làm V_{L1} ; quy định V_{L2} , V_{H1} , và V_{H2} theo các công thức [I] và [II] dưới đây:





xác định chiều dài nhỏ nhất và lớn nhất của L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 ; tạo ra các cấu trúc polypeptit có công thức I và II; chọn các cấu trúc polypeptit có công thức I và II liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và kháng nguyên đích thứ hai khi được kết hợp để tạo ra protein liên kết giống kháng thể;

trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

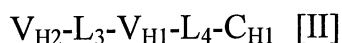
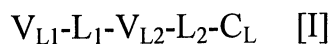
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, bao gồm xác định miền biến đổi thứ nhất của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và miền biến đổi thứ hai của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ hai, mỗi miền đều bao gồm V_L và V_H ; quy định chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng làm chuỗi khuôn mẫu; quy định V_L của miền biến đổi thứ nhất của kháng thể hoặc miền biến đổi thứ hai của kháng thể làm V_{L1} ; quy định V_{L2} , V_{H1} , và V_{H2} theo các công thức [I] và [II] dưới đây:



xác định chiều dài nhỏ nhất và lớn nhất L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 ; tạo ra cấu trúc polypeptit có công thức I và II; chọn các cấu trúc polypeptit có công thức I và II mà liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và kháng nguyên đích thứ hai khi được kết hợp để tạo ra protein liên kết giống kháng thể;

trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1, L_2, L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Các phương án cụ thể của sáng chế sẽ trở lên rõ ràng nhờ phần mô tả chi tiết hơn các phương án nhất định và các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Sơ đồ thể hiện các miền liên kết kháng nguyên Fv1 và Fv2 trong cấu hình vùng V kép và sự sắp xếp các liên kết peptit L_L và L_H tương ứng của chúng ở dạng TBTI.

Fig.2. Sơ đồ (2D) của các miền liên kết kháng nguyên Fv1 (kháng-IL4) và Fv2 (kháng-IL13) trong cấu hình vùng biến đổi kép liên kết chéo (cross-over dual variable - CODV) và sự sắp xếp các liên kết peptit tương ứng của chúng.

Fig.3. Sơ đồ thể hiện Fv kháng-IL4 và Fab kháng-IL13 cho thấy sự sắp xếp không gian có thể tạo ra bằng cách phân cắt protein-protein của vùng Fv trong kháng thể kháng IL4 và vùng Fv của kháng thể kháng IL13.

Fig.4. Đánh giá khả năng liên kết của protein CODV có hóa trị bốn và tính đặc hiệu kép trong thử nghiệm BIACORE bằng cách tiêm hai kháng nguyên lần lượt hoặc đồng thời lên chip phủ protein DVD-Ig. Tín hiệu lớn nhất quan sát được khi tiêm lần lượt có thể thu được bằng cách cùng tiêm cả hai kháng nguyên, điều đó cho thấy tất cả các vị trí liên kết đều bão hòa.

Fig.5. Sơ đồ (2D) của các miền liên kết kháng nguyên trong cấu hình CODV và sự sắp xếp của peptit liên kết L_L tương ứng (L_1 và L_2) và L_H (L_3 và L_4). Trong bảng A, chuỗi nhẹ được giữ ở liên kết "thẳng hoặc khuôn mẫu", trong khi đó chuỗi nặng ở cấu hình "liên kết chéo". Trong bảng B, chuỗi nặng được giữ ở liên kết "thẳng hoặc khuôn mẫu" và chuỗi nhẹ ở cấu hình "liên kết chéo".

Fig.6. Sơ đồ của thiết kế CODV-Ig dựa trên việc chuỗi nhẹ hay chuỗi nặng được sử dụng làm khuôn mẫu.

Fig.7. So sánh phân tử TBTI/DVD-Ig hoặc CODV-Ig kết hợp trình tự kháng IL4 và

kháng IL13.

Fig.8. So sánh dạng CODV-Fab và B-Fab trong thử nghiệm gây độc tế bào sử dụng các tế bào NALM-6.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế mô tả protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó mỗi cặp polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể có các miền biến đổi kép có hướng chéo nhau. Sáng chế cũng mô tả phương pháp tạo ra các protein liên kết giống kháng thể này.

Việc mô hình hóa trên máy tính cho thấy mô hình hai đầu liên kết chéo (cross-over double-head - CODH) trong bằng patent Mỹ số 5,989,830 sẽ tạo ra phức chất, trong đó hai vị trí liên kết nằm ở hai hướng đối diện nhau, mà không có những điều kiện ràng buộc như gợi ý cho cấu hình Fv kép trong Patent Mỹ số 7,612,181. Cụ thể, việc mô hình hóa trên máy tính chỉ ra rằng chiều dài của liên kết axit amin giữa các miền biến đổi không phải là yếu tố quan trọng trong mô hình CODH, nhưng là yếu tố quan trọng cho phép tiếp cận hoàn toàn với cả hai vị trí liên kết kháng nguyên trong vùng Fv kép. Như đối với dạng DVD-Ig/TBTI, cấu trúc protein liên kết giống kháng thể được tạo ra, trong đó các miền cố định được gắn vào cấu hình CODH để tạo ra protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó mỗi cặp polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể có các miền biến đổi kép có hướng chéo nhau (*nghĩa là*, CODH-Ig). Các phân tử CODH-Ig được mong đợi có tính ổn định cải thiện hơn đáng kể so với các phân tử CODH (vì DVD-Ig/TBTI có độ ổn định cải thiện hơn so với các phân tử Fv kép).

Để kiểm chứng giả thiết nêu trên, phân tử CODH-Ig được tạo ra sử dụng trình tự kháng thể kháng IL4 và kháng IL13 được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2010/0226923 A1. Phân tử CODH-Ig khác với phân tử CODH của US 2010/0226923 về chiều dài của liên kết axit amin tách biệt các miền biến đổi với nhau trên các chuỗi polypeptit tương ứng. Các phân tử CODH-Ig được biểu hiện trong các tế bào sau khi gây nhiễm tạm thời và sau đó, được tinh chế bằng sắc ký protein A. Mặc dù sắc ký loại theo kích thước (size-exclusion chromatography - SEC) cho thấy mức kết tập bằng 5-10% nhưng không có phân tử CODH-Ig bất kỳ có chức năng, và do đó, không có phân tử CODH-Ig bất kỳ có khả năng liên kết với tất cả các kháng nguyên đích của nó. Việc thiếu hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể quá trình dime hóa bị ảnh hưởng của

các vùng Fv của chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ do chiều dài liên kết không thích hợp ảnh hưởng đến sự tạo ra paratop chính xác. Kết quả là một quy trình được phát triển để xác định liên kết axit amin thích hợp để xen vào giữa hai miền biến đổi và miền biến đổi thứ hai và miền cố định trên cả polypeptit chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ của protein liên kết giống kháng thể. Quy trình này dựa trên việc tiếp hợp tương đồng protein-protein và mô hình thử nghiệm của vùng FvIL4 và FvIL13, tương ứng, kể cả mô hình miền Fc1, và xây dựng cấu trúc của các liên kết thích hợp giữa vùng FvIL4 và FvIL13 và giữa vùng Fv và vùng cố định Fc1.

Phương pháp ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn được dùng để xây dựng cấu trúc polynucleotit mã hóa polypeptit mà tạo ra protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, kết hợp các polynucleotit vào trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và đưa các vec tơ này vào trong các tế bào chủ. *Xem ví dụ, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed.).* Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật, hoặc như được mô tả ở đây. Trừ khi định nghĩa cụ thể được đưa ra, danh pháp liên quan, và quy trình thử nghiệm, kỹ thuật, hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, và hóa cơ và hóa dược được mô tả ở đây là đã được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tương tự, các kỹ thuật thông thường có thể được dùng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, sản xuất, bào chế, phân phối dược phẩm và điều trị cho bệnh nhân.

1. Các định nghĩa tổng quát

Như được dùng trong phần mô tả, các thuật ngữ sau, trừ khi được thông báo, sẽ được hiểu theo nghĩa sau đây. Trừ khi nội dung nêu rõ, thuật ngữ số ít sẽ bao gồm số nhiều và thuật ngữ số nhiều cũng bao gồm số ít.

Thuật ngữ "polynucleotit" như được sử dụng ở đây chỉ polyme của axit nucleic mạch đơn hoặc mạch kép có chiều dài ít nhất là 10 nucleotit. Theo các phương án nhất định, nucleotit bao gồm polynucleotit mà có thể là ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit hoặc dạng cải biến của một trong số dạng nucleotit này. Các cải biến này bao gồm các cải biến bazơ như bromuridin, các cải biến riboza như arabinosit và 2',3'-dideoxyriboza, và các cải biến liên kết giữa các nucleotit như phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenoat, phosphorodlâelenoat, phosphoroanilothioat, phoshoraniladat và phosphoroamidat. Thuật ngữ "polynucleotit" bao gồm dạng mạch đơn và mạch kép của

ADN.

"Polynucleotit phân lập được" là polynucleotit của hệ gen, ADN bổ trợ hoặc có nguồn gốc tổng hợp hoặc một số dạng kết hợp của chúng, mà do nguồn gốc của nó nên polynucleotit phân lập được: (1) không kết hợp với toàn bộ hoặc một phần của polynucleotit trong đó polynucleotit đã phân lập được phát hiện thấy trong tự nhiên, (2) liên kết với polynucleotit mà trong tự nhiên nó không liên kết, hoặc (3) không xuất hiện trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự lớn hơn.

"Polypeptit phân lập được" là một polypeptit: (1) không chứa ít nhất một số polypeptit khác thường thấy trong tự nhiên, (2) hầu như không chứa các polypeptit khác từ cùng nguồn, ví dụ, từ cùng loài, (3) được biểu hiện bằng tế bào từ các loài khác nhau, (4) đã được tách ra khỏi ít nhất 50% polynucleotit, lipid, hydratcacbon, hoặc các nguyên liệu khác mà trong tự nhiên kết hợp với nó, (5) không kết hợp (bằng tương tác đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị) với các phần của polypeptit kết hợp với "polypeptit phân lập được" trong tự nhiên, (6) liên kết động (bằng tương tác đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị) với polypeptit trong tự nhiên không kết hợp với nó, hoặc (7) không xuất hiện trong tự nhiên. Polypeptit phân lập được này có thể được mã hóa bằng ADN hệ gen, ADN bổ trợ, ARN thông tin hoặc ARN khác, có nguồn gốc tổng hợp, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Tốt hơn, nếu polypeptit phân lập được gần như không chứa polypeptit hoặc các tạp chất khác được phát hiện thấy trong môi trường tự nhiên của nó mà có thể ảnh hưởng đến việc sử dụng nó (trong điều trị, chẩn đoán, phòng ngừa, nghiên cứu hoặc mục đích khác).

Thuật ngữ "kháng thể người" như được sử dụng ở đây bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng cố định gần tương ứng với trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Theo một số phương án, các kháng thể người được tạo ra trong động vật có vú không phải là người, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật gặm nhấm, như chuột nhắt, và chuột đồng, và động vật gặm nhấm, như thỏ. Theo một số phương án, các kháng thể người được tạo ra trong các tế bào lai. Theo các phương án khác nữa, các kháng thể người được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

Các kháng thể xuất hiện trong tự nhiên thường chứa tetrame. Mỗi tetrame này thường cấu thành từ hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (thường có phân tử lượng khoảng 25 kDa) và một chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ (thường có phân tử lượng khoảng 50-70 kDa). Các thuật ngữ "chuỗi nặng" và "chuỗi nhẹ" như được sử dụng ở đây chỉ polypeptit globulin miễn dịch bất kỳ có trình tự

miền biến đổi đủ dài để nó có tính đặc hiệu với kháng nguyên đích. Phần tận cùng amino của mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thường bao gồm miền biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn thường chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên. Phần tận cùng carboxyl của mỗi chuỗi thường xác định miền cố định chịu trách nhiệm cho chức năng tác động. Do đó, kháng thể xuất hiện trong tự nhiên, polypeptit globulin miễn dịch mang chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bao gồm miền biến đổi (V_H) và ba miền cố định (C_{H1} , C_{H2} , và C_{H3}), trong đó miền V_H nằm ở đầu tận cùng amino của polypeptit và miền C_{H3} ở đầu tận cùng carboxyl, và polypeptit globulin miễn dịch mang chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ bao gồm miền biến đổi (V_L) và miền cố định (C_L), trong đó miền V_L nằm ở đầu tận cùng amino của polypeptit và miền C_L nằm ở đầu tận cùng carboxyl.

Các chuỗi nhẹ ở người thường được phân loại thành chuỗi nhẹ kappa và lambda, và các chuỗi nặng ở người thường được phân loại thành mu, delta, gamma, alpha, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, tương ứng. IgG có một vài phân lớp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. IgM có các phân lớp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgM1 và IgM2. IgA được phân chia tương tự thành các phân lớp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgA1 và IgA2. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, các miền biến đổi và miền cố định thường được nối với nhau bằng vùng "J" chứa khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng "D" chứa nhiều hơn khoảng 10 axit amin. Xem, *ví dụ*, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2nd ed., 1989), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung cho tất cả các mục đích. Vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng thường tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên. Các miền biến đổi của các kháng thể xuất hiện trong tự nhiên thường có chung cấu trúc tổng quát của vùng khung làm việc (FR) được bảo toàn tương đối, nối với nhau bằng các vùng siêu biến, cũng được gọi là vùng xác định tính bổ trợ hoặc CDR. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp thường liên kết với nhau bằng vùng khung làm việc, mà có thể có khả năng liên kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl, cả miền biến đổi của chuỗi nhẹ lẫn miền biến đổi của chuỗi nặng thường chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4.

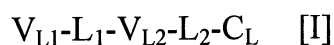
Thuật ngữ "Fc tự nhiên" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử chứa trình tự của mảnh không liên kết kháng nguyên thu được từ sự tiêu hóa kháng thể hoặc được tạo ra bằng các cách khác, bất kể ở dạng monome hay multime, và có thể chứa vùng bản lề.

Nguồn globulin miễn dịch ban đầu của Fc tự nhiên tốt hơn là có nguồn gốc từ người và có thể là globulin miễn dịch bất kỳ, nhưng IgG1 và IgG2 được ưu tiên hơn. Các phân tử Fc tự nhiên được tạo ra từ các monome polypeptit có thể liên kết thành dạng dime hoặc multime bằng cách kết hợp đồng hóa trị (*nghĩa là*, các liên kết disulfua) và không đồng hóa trị. Số liên kết disulfua giữa các phân tử mang tiểu đơn vị monome của phân tử Fc tự nhiên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tùy thuộc vào lớp (*ví dụ*, IgG, IgA, và IgE) hoặc phân lớp (*ví dụ*, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, và IgGA2). Một ví dụ về Fc tự nhiên là dime liên kết disulfua thu được từ việc phân cắt IgG bằng papain. Thuật ngữ "Fc tự nhiên" như được sử dụng ở đây đều chỉ dạng monome, dime, và multime.

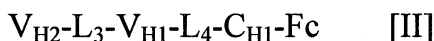
Thuật ngữ "biến thể Fc" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử hoặc trình tự mà được cải biến từ Fc tự nhiên nhưng vẫn bao gồm vị trí liên kết cho thụ thể đảm bảo, FcRn (thụ thể Fc mới sinh). Ví dụ về các biến thể Fc, và tương tác của chúng với thụ thể đảm bảo, là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, thuật ngữ "biến thể Fc" có thể bao gồm phân tử hoặc trình tự được nhân hóa từ Fc tự nhiên không có ở người. Ngoài ra, Fc tự nhiên bao gồm các vùng có thể được loại bỏ do chúng tạo ra các đặc tính cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học không cần thiết đối với protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế. Do đó, thuật ngữ "biến thể Fc" bao gồm phân tử hoặc trình tự mà thiếu một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc ở Fc tự nhiên, hoặc trong đó một hoặc nhiều vị trí hoặc gốc ở Fc tự nhiên đã được cải biến, có ảnh hưởng hoặc liên quan đến: (1) sự tạo thành liên kết disulfua, (2) không tương hợp với tế bào chủ đã chọn, (3) tính dị sinh đầu tận cùng N khi biểu hiện trong tế bào chủ đã chọn, (4) glycosyl hóa, (5) tương tác với bề mặt, (6) liên kết với thụ thể Fc khác với thụ thể đảm bảo, hoặc (7) ADCC.

Thuật ngữ "miền Fc" như được sử dụng ở đây bao gồm Fc tự nhiên và biến thể Fc và trình tự như được định nghĩa ở trên. Như với biến thể Fc và các phân tử Fc tự nhiên, thuật ngữ "miền Fc" bao gồm các phân tử ở dạng monome hoặc multime, bất kể được phân cắt từ kháng thể toàn phần hay được tạo ra bằng cách khác.

Thuật ngữ "protein liên kết giống kháng thể" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử không xuất hiện trong tự nhiên (hoặc tái tổ hợp) liên kết đặc hiệu với ít nhất một kháng nguyên đích, và bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

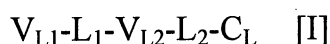
C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo. Thuật ngữ "protein liên kết giống kháng thể" như được sử dụng ở đây cũng chỉ phân tử không xuất hiện trong tự nhiên (hoặc tái tổ hợp) liên kết đặc hiệu với ít nhất một kháng nguyên đích, và bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo ra hai các vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó thứ nhất chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo. Phân tử A "tái tổ hợp" là một phân tử được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp.

Một phương án của sáng chế mô tả protein liên kết giống kháng thể có tính đặc

hiệu sinh học và đặc hiệu miễn dịch với từ một đến bốn kháng nguyên đích. Một phương án khác của sáng chế mô tả phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể này. Phương án khác của sáng chế mô tả vector biểu hiện bao gồm các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa chuỗi polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể này. Phương án khác nữa của sáng chế mô tả các tế bào chủ biểu hiện protein liên kết giống kháng thể này (*nghĩa là*, bao gồm các phân tử axit nucleic hoặc các vector mã hóa chuỗi polypeptit tạo ra protein liên kết giống kháng thể này).

Thuật ngữ "khả năng hoán đổi" như được sử dụng ở đây chỉ khả năng thay thế lẫn nhau của các miền biến đổi trong dạng CODV và giữ lại sự gấp nếp và ái lực liên kết đặc trưng. "Khả năng hoán đổi hoàn toàn" chỉ khả năng hoán đổi trật tự của hai miền V_{H1} và V_{H2} , và do đó, trật tự của các miền V_{L1} và V_{L2} , trong CODV-Ig (*nghĩa là*, đảo trật tự) hoặc CODV-Fab trong khi vẫn giữ lại chức năng đầy đủ của protein liên kết giống kháng thể như được chứng minh bằng việc giữ lại ái lực liên kết. Ngoài ra, cần hiểu rằng ký hiệu V_H và V_L trong CODV-Ig hoặc CODV-Fab cụ thể chỉ vị trí của miền đó trên chuỗi protein cụ thể ở dạng cuối cùng. Ví dụ, V_{H1} và V_{H2} có thể thu được từ các miền V_{L1} và V_{L2} trong các kháng thể gốc và được đặt ở các vị trí V_{H1} và V_{H2} trong protein liên kết giống kháng thể. Ngược lại, V_{L1} và V_{L2} có thể thu được từ các miền V_{H1} và V_{H2} ở các kháng thể gốc và được đặt ở vị trí V_{H1} và V_{H2} trong protein liên kết giống kháng thể. Do đó, các ký hiệu V_H và V_L chỉ vị trí hiện tại và không phải là vị trí ban đầu kháng thể gốc. Do đó, các miền V_H và V_L có "khả năng hoán đổi"

Protein liên kết giống kháng thể "đã phân lập" là một protein đã được định danh và tách ra và/hoặc thu hồi từ các thành phần môi trường tự nhiên của nó. Thành phần tạp nhiễm của môi trường tự nhiên của nó là nguyên liệu sẽ ảnh hưởng đến việc sử dụng protein liên kết giống kháng thể để chẩn đoán hoặc điều trị, và có thể bao gồm các enzym, hormone, và các chất tan chứa protein hoặc không chứa protein. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết giống kháng thể sẽ được tinh chế: (1) để lớn hơn 95% trọng lượng kháng thể như được xác định bằng phương pháp Lowry, và tốt nhất nếu lớn hơn 99% trọng lượng, (2) đến mức đủ để thu được ít nhất 15 gốc trong trình tự axit amin ở đầu tận cùng N hoặc trình tự axit amin bên trong bằng cách sử dụng máy đọc trình tự cồng quay, hoặc (3) để tính mức độ tương đồng bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử hoặc không khử sử dụng xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là nhuộm bạc. Protein liên kết

giống kháng thể phân lập được bao gồm protein liên kết giống kháng thể *in situ* trong các tế bào tái tổ hợp do ít nhất một thành phần môi trường tự nhiên của protein liên kết giống kháng thể sẽ không có mặt.

Các thuật ngữ "gần như tinh khiết" hoặc "được tinh chế phần lớn" như được sử dụng ở đây chỉ hợp chất hoặc các loại vật chất mà là loại vật chất chủ yếu (*nghĩa là*, tính theo mol, nó nhiều hơn bất kỳ một loại vật chất riêng lẻ khác trong chế phẩm). Theo các phương án khác, phần đã được tinh chế phần lớn là chế phẩm trong đó các loại bao gồm ít nhất khoảng 50% (tính theo mol) của tất cả các loại đại phân tử có mặt. Theo một số phương án, chế phẩm gần như tinh khiết sẽ bao gồm lớn hơn khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 99% tất cả các loại đại phân tử có mặt trong chế phẩm. Theo các phương án khác nữa, các loại này được tinh chế đến mức tương đồng cần thiết (các loại tạp chất có thể phát hiện được bằng các phương pháp phát hiện thông thường), trong đó chế phẩm này chứa chủ yếu là các loại đại phân tử đơn.

Thuật ngữ "kháng nguyên" hoặc "kháng nguyên đích" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử hoặc phần phân tử có khả năng liên kết với protein liên kết giống kháng thể, và ngoài ra, có khả năng được dùng ở động vật để tạo ra các kháng thể có khả năng liên kết với epitop của kháng nguyên đó. Kháng nguyên đích có thể có một hoặc nhiều epitop. Đối với mỗi kháng nguyên đích được nhận diện bởi protein liên kết giống kháng thể, protein liên kết giống kháng thể có khả năng cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà nhận diện kháng nguyên đích này. Protein liên kết giống kháng thể "hóa trị hai", không phải là protein liên kết giống kháng thể "đa đặc hiệu" hoặc "đa chức năng", được hiểu là có các vị trí liên kết kháng nguyên có tính đặc hiệu kháng nguyên giống nhau.

Kháng thể đặc hiệu kép hoặc hai chức năng thường là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết hoặc epitop khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách rất nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung hợp các thể lai hoặc liên kết các mảnh F(ab').

Mảnh F(ab) thường bao gồm một chuỗi nhẹ và các miền V_H và C_{H1} của một chuỗi nặng, trong đó phần V_H - C_{H1} trong chuỗi nặng của mảnh F(ab) không thể tạo ra liên kết disulfua với chuỗi nặng polypeptit khác. Như được sử dụng ở đây, mảnh F(ab) cũng có thể bao gồm một chuỗi nhẹ chứa hai miền biến đổi tách biệt bởi liên kết axit amin và một chuỗi nặng chứa hai miền biến đổi tách biệt bởi liên kết axit amin và miền C_{H1} .

Mảnh F(ab') thường bao gồm một chuỗi nhẹ và một phần của một chuỗi nặng mà

chứa nhiều vùng cố định hơn (giữa miền C_{H1} và C_{H2}), sao cho liên kết disulfua giữa các chuỗi có thể được tạo ra giữa hai chuỗi nặng để tạo ra phân tử $F(ab')_2$.

Cụm từ "tính chất sinh học" "đặc tính sinh học" và thuật ngữ "hoạt tính" trong nội dung đề cập đến protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế được dùng thay thế cho nhau ở đây và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ái lực và tính đặc hiệu với epitop, khả năng đối kháng hoạt tính của kháng nguyên đích (hoặc polypeptit được tạo đích), độ ổn định *in vivo* của protein liên kết giống kháng thể, và đặc tính sinh miễn dịch của protein liên kết giống kháng thể. Các tính chất hoặc đặc tính sinh học có thể xác định được của protein liên kết giống kháng thể bao gồm, ví dụ, tính phản ứng chéo, (nghĩa là, với các chất tương đồng không có ở người của đích kháng nguyên, hoặc với các đích kháng nguyên hoặc mô, nói chung) và khả năng giữ lại mức biểu hiện cao của protein trong các tế bào động vật có vú. Tính chất hoặc đặc tính nêu trên có thể được quan sát hoặc xác định sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ELISA, ELISA cạnh tranh, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt, thử nghiệm trung hòa *in vitro* và *in vivo*, và hóa mô miễn dịch trên các khu vực mô từ nhiều nguồn khác nhau bao gồm người, động vật linh trưởng hoặc nguồn bất kỳ khác khi cần có thể.

Thuật ngữ "mảnh globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch" như được sử dụng ở đây chỉ mảnh polypeptit chứa ít nhất một CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch từ mảnh polypeptit tạo ra nó. Mảnh globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch có khả năng liên kết với kháng nguyên đích.

Protein liên kết giống kháng thể "trung hòa" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử có khả năng phong bế hoặc gần như làm giảm chức năng tác động của kháng nguyên đích liên kết với nó. Như được sử dụng ở đây, "gần như làm giảm" có nghĩa là làm giảm chức năng tác động của kháng nguyên đích ít nhất khoảng 60%, tốt hơn là ít nhất khoảng 70%, tốt hơn là ít nhất khoảng 75%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 80%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 85%, tốt hơn nhất là ít nhất khoảng 90%.

Thuật ngữ "epitop" bao gồm chất xác định bất kỳ, tốt hơn là chất xác định polypeptit, có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T. Theo các phương án nhất định, chất xác định epitop bao các nhóm các phân tử bề mặt có hoạt tính hóa học như axit amin, mạch nhánh đường, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và theo các phương án nhất định, có thể có đặc tính cấu trúc ba chiều đặc biệt

và/hoặc đặc tính mang điện đặc biệt. Epitop là một vùng của kháng nguyên được liên kết với kháng thể hoặc protein liên kết giống kháng thể. Theo các phương án nhất định, protein liên kết giống kháng thể được gọi là liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi nó ưu tiên nhận diện kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức của protein và/hoặc các đại phân tử. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết giống kháng thể được gọi là liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi hằng số phân ly cân bằng $\leq 10^{-8}$ M, tốt hơn nếu khi hằng số phân ly cân bằng $\leq 10^{-9}$ M, và tốt nhất là khi hằng số phân ly $\leq 10^{-10}$ M.

Hằng số phân ly (K_D) của protein liên kết giống kháng thể có thể được xác định, ví dụ, bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Thông thường, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt xác định các tương tác liên kết theo thời gian thực giữa phối tử (kháng nguyên đích trên dàn cảm biến) và chất phân tích (protein liên kết giống kháng thể trong dung dịch) bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (cộng hưởng plasmon bề mặt - SPR) sử dụng hệ thống BIAcore (Pharmacia Biosensor; Placataway, NJ). Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt cũng có thể được tiến hành bằng cách cố định chất phân tích (protein liên kết giống kháng thể trên dàn cảm biến) và để lộ ra phối tử (kháng nguyên đích). Thuật ngữ " K_D ," như được sử dụng ở đây chỉ hằng số phân ly của tương tác giữa một protein liên kết giống kháng thể cụ thể và kháng nguyên đích.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" như được sử dụng ở đây chỉ khả năng của protein giống kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với kháng nguyên chứa epitop với K_D bằng ít nhất khoảng 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, hoặc lớn hơn, và/hoặc liên kết với epitop với ái lực lớn hơn ít nhất hai lần ái lực của nó với kháng nguyên không đặc hiệu.

Thuật ngữ "liên kết" như được sử dụng ở đây chỉ một hoặc nhiều gốc axit amin được xen vào giữa các miền của globulin miễn dịch để tạo ra tính di động đủ cho các miền của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể gấp chéo trong vùng biến đổi kép của globulin miễn dịch. Liên kết lần lượt được xen vào vị trí chuyển tiếp giữa các miền biến đổi hoặc giữa miền biến đổi và miền cố định, ở cấp độ trình tự. Vị trí chuyển tiếp giữa các miền có thể được xác định do kích thước xấp xỉ của các miền của globulin miễn dịch đã được biết rõ. Vị trí chuyển tiếp chính xác của miền có thể xác định được bằng cách xác định vị trí phân peptit nhô ra nhưng không tạo ra nguyên tố cấu trúc bậc hai như phiến beta hoặc chuỗi xoắn alpha như được thể hiện bằng số liệu thử nghiệm hoặc như được giả định bằng kỹ thuật mô hình hóa hoặc phỏng đoán cấu trúc bậc hai. Các liên kết được mô tả ở

đây được gọi là L_1 , nằm trên chuỗi nhẹ giữa miền V_{L1} và V_{L2} của chuỗi nhẹ; L_2 , cũng nằm trên chuỗi nhẹ giữa miền V_{L2} và C_L ở đầu tận cùng C. Các liên kết trên chuỗi nặng được biết là L_3 , nằm giữa miền V_{H2} và V_{H1} ở đầu tận cùng N; và L_4 , nằm giữa miền V_{H1} và C_{H1} -Fc. Liên kết L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 độc lập với nhau nhưng trong một số trường hợp, chúng có thể có cùng trình tự và/hoặc chiều dài.

Thuật ngữ "vector" như được sử dụng ở đây chỉ phân tử bất kỳ (ví dụ, axit nucleic, plasmit, hoặc virut) được dùng để chuyển thông tin mã hóa vào trong tế bào chủ. Thuật ngữ "vector" bao gồm phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác liên kết với nó. Một loại vector là "plasmit" mà chỉ phân tử ADN mạch kép dạng vòng và có thể được xen thêm mảnh ADN bổ sung trong đó. Một loại vector khác là vector virut, trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được xen vào hệ gen của virut. Các vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà nó được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có điểm xuất phát sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú episom). Các vector khác (ví dụ, các vector động vật có vú không episom) có thể được thu nhận vào hệ gen của tế bào chủ khi được đưa vào tế bào chủ và nhờ đó, được sao chép cùng với hệ gen chủ. Ngoài ra, các vector nhất định có khả năng định hướng biểu hiện các gen liên kết động với chúng. Các vector này ở đây gọi là vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là, "vector biểu hiện"). Thông thường, vector biểu hiện hữu ích trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Các thuật ngữ "plasmit" và "vector" có thể được dùng thay thế cho nhau ở đây, vì plasmit là dạng vector được dùng phổ biến nhất. Tuy nhiên, sáng chế được dự định bao gồm các dạng vector biểu hiện khác, vector virut (ví dụ, retrovirut không sao chép, adenovirut, và virut kết hợp adeno), có chức năng tương đương.

Thuật ngữ "liên kết động" được dùng ở đây chỉ việc sắp xếp các trình tự chặn trong đó các trình tự chặn như được mô tả được tạo cấu hình hoặc được lắp ráp sao cho chúng thực hiện chức năng bình thường của này. Do đó, trình tự chặn liên kết động với trình tự mã hóa có thể có khả năng tác động đến việc sao chép, phiên mã và/hoặc dịch mã trình tự mã hóa. Ví dụ, trình tự mã hóa liên kết động với trình tự khởi điểm khi trình tự khởi điểm có khả năng định hướng sự phiên mã của trình tự mã hóa. Trình tự chặn không cần phải là gen kết tiếp với trình tự mã hóa, miễn là nó thực hiện đúng chức năng của mình. Do đó, ví dụ, các trình tự đã phiên mã nhưng chưa dịch mã xen vào có thể có mặt giữa trình tự khởi điểm và trình tự mã hóa và trình tự khởi điểm có thể vẫn được coi là "liên kết động" với trình tự mã hóa.

Cụm từ " tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc "tế bào chủ") như được sử dụng ở đây chỉ tế bào được kết hợp vector tái tổ hợp vào. Tế bào chủ hoặc tế bào chủ tái tổ hợp không chỉ được dự định dùng để chỉ một tế bào quan tâm cụ thể, mà còn chỉ thế hệ sau của tế bào này. Do các cải biến nhất định có thể xuất hiện ở các thế hệ tiếp theo do đột biến hoặc do ảnh hưởng của môi trường nên trong thực tế, những thế hệ sau này có thể không giống với tế bào gốc (tế bào bố mẹ) nhưng các tế bào này vẫn nằm trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" như được sử dụng ở đây. Rất nhiều hệ thống biểu hiện tế bào chủ có thể được sử dụng để biểu hiện protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, bao gồm hệ thống biểu hiện vi khuẩn, nấm men, baculovirut, và hệ thống biểu hiện ở động vật có vú (cũng như các hệ thống biểu hiện thể thực khuẩn). Ví dụ về vector biểu hiện vi khuẩn thích hợp là pUC19. Để biểu hiện protein liên kết giống kháng thể bằng cách tái tổ hợp, tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng một hoặc nhiều vector biểu hiện tái tổ hợp mang các mảnh ADN mã hóa các chuỗi polypeptit của protein liên kết giống kháng thể sao cho các chuỗi polypeptit này được biểu hiện trong tế bào chủ và, tốt hơn là được tiết vào trong môi trường nuôi cấy các tế bào chủ này, và có thể thu hồi protein liên kết giống kháng thể từ môi trường này.

Thuật ngữ "biến nạp" như được sử dụng ở đây chỉ sự thay đổi đặc tính di truyền của tế bào và tế bào được biến nạp khi nó được cải biến để mang ADN mới. Ví dụ, tế bào được biến nạp khi nó được cải biến di truyền từ trạng thái tự nhiên của mình. Sau khi biến nạp, ADN biến nạp có thể tái kết hợp với ADN của tế bào này bằng cách sát nhập vật lý vào trong nhiễm sắc thể của tế bào, hoặc có thể được giữ tạm thời dưới dạng nguyên tố eplisom nhưng không sao chép, hoặc có thể sao chép độc lập dưới dạng plasmit. Một tế bào được coi là đã biến nạp ổn định khi ADN được sao chép cùng với sự phân chia tế bào. Thuật ngữ "chuyển nhiễm" như được sử dụng ở đây chỉ sự thu nhận ADN ngoại lai hoặc ADN ngoại sinh của tế bào và tế bào được chuyển nhiễm khi ADN ngoại sinh đã được đưa vào bên trong màng tế bào. Rất nhiều kỹ thuật chuyển nhiễm đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này có thể được sử dụng để đưa một hoặc nhiều ADN ngoại sinh vào trong tế bào chủ thích hợp.

Thuật ngữ "xuất hiện trong tự nhiên" như được sử dụng ở đây và được dùng cho một đối tượng chỉ thực tế rằng đối tượng này có thể được tìm thấy trong tự nhiên và không được xử lý bởi con người. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt trong sinh vật (kể cả virut) có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên và không được người cải biến

theo chủ đích sẽ được coi là xuất hiện trong tự nhiên. Tương tự, "không xuất hiện trong tự nhiên" như được sử dụng ở đây chỉ đối tượng không tìm thấy được trong tự nhiên và đã được cải biến cấu trúc hoặc được tổng hợp bởi con người.

Như được sử dụng ở đây, 20 axit amin thông thường và các từ viết tắt chỉ việc sử dụng thông thường. Các chất đồng phân lập thể (ví dụ, các D-axit amin) của 20 axit amin thông thường này; các axit amin không có trong tự nhiên như các axit amin được thể α -, α , các axit N-alkyl amin, axit lactic, và các axit amin không thông thường khác cũng có thể là các thành phần thích hợp cho các chuỗi polypeptit của protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về các axit amin không thông thường bao gồm: 4-hydroxyprolin, γ -carboxyglutamat, ϵ -N,N,N-trimetyllysin, ϵ -N-axetyllysin, O-phosphoserin, N-axetylserin, N-formylmetionin, 3-methylhistidin, 5-hydroxylysin, σ -N-metylarginin, và các axit amin tương tự khác và các imino (ví dụ, 4-hydroxyprolin). Trong ký hiệu polypeptit được sử dụng ở đây, hướng bàn tay trái là hướng của đầu tận cùng amino và hướng bàn tay phải là hướng của đầu tận cùng carboxy, theo quy ước và cách sử dụng chuẩn.

Các gốc xuất hiện trong tự nhiên có thể chia ra làm các nhóm dựa trên các đặc tính của mạch nhánh phổ biến:

- (1) kỵ nước: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- (2) ưa nước phân cực: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Hl α , Lys, Ser, Thr ;
- (3) béo: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- (4) kỵ nước béo: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- (5) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (6) axit: Asp, Glu;
- (7) bazơ: Hl α , Lys, Arg;
- (8) các gốc ảnh hưởng đến hướng của mạch: Gly, Pro;
- (9) thơm: Hl α , Trp, Tyr, Phe; và
- (10) kỵ nước thơm: Phe, Trp, Tyr.

Các thay thế axit amin bảo toàn có thể bao gồm sự trao đổi một axit amin trong số các nhóm này bằng một axit amin khác trong cùng nhóm. Các thay thế axit amin bảo toàn có thể bao gồm các gốc axit không xuất hiện trong tự nhiên, mà thường được kết hợp bằng cách tổng hợp hóa học peptit hơn là được tổng hợp trong hệ thống sinh học. Các axit amin này bao gồm các chất giả peptit và các dạng đảo ngược hoặc quay ngược của

các gốc axit amin. Các thay thế không bảo toàn có thể bao gồm sự trao đổi thành viên trong một trong số các nhóm bằng thành viên của một nhóm khác.

Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có khả năng xác định được các biến thể thích hợp của các chuỗi polypeptit của protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ. Ví dụ, người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các khu vực thích hợp của chuỗi polypeptit có thể thay đổi được mà không làm mất hoạt tính bằng các vùng đích được tin là không quan trọng đối với hoạt tính. Theo cách khác, người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các gốc và các phần của các phân tử được bảo toàn trong số các polypeptit tương tự. Ngoài ra, ngay cả những khu vực có thể quan trọng đối với hoạt tính sinh học hoặc với cấu trúc cũng có thể được thay thế axit amin được bảo toàn mà không làm mất hoạt tính sinh học hoặc tác động có hại đến cấu trúc của polypeptit.

Thuật ngữ "bệnh nhân" như được sử dụng ở đây bao gồm đối tượng là người hoặc động vật.

"Rối loạn" là tình trạng bệnh bất kỳ sẽ có lợi nếu điều trị bằng cách sử dụng protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế. "Rối loạn" và "tình trạng bệnh" được sử dụng để thay thế cho nhau ở đây và bao gồm các bệnh và rối loạn cấp và mạn tính, kể cả các tình trạng bệnh lý làm bệnh nhân mắc rối loạn đang nghi ngờ.

Các thuật ngữ "điều trị" dạng động từ hoặc danh động từ được sử dụng ở đây chỉ việc điều trị khỏi và các biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn chặn. Các đối tượng cần điều trị bao gồm các đối tượng có rối loạn cũng như các đối tượng được chứng minh là có rối loạn hoặc các đối tượng có rối loạn cần ngăn chặn.

Các thuật ngữ "dược phẩm" hoặc "chế phẩm dùng để điều trị" như được sử dụng ở đây chỉ hợp chất hoặc chế phẩm có khả năng tạo ra tác dụng điều trị mong muốn khi được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân.

Thuật ngữ "chất mang được dùng" hoặc "chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý" như được sử dụng ở đây chỉ một hoặc nhiều nguyên liệu bào chế thích hợp để thực hiện hoặc tăng cường sự phân phối protein liên kết giống kháng thể.

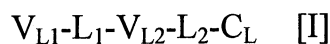
Các thuật ngữ "lượng hữu hiệu" và "lượng có hiệu quả điều trị" khi được dùng trong nội dung đề cập đến dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein liên kết giống kháng thể chỉ lượng hoặc liều đủ để tạo ra kết quả điều trị mong muốn. Cụ thể hơn, lượng cho hiệu quả điều trị là lượng protein liên kết giống kháng thể đủ để ức chế, trong một thời

gian nhất định, một hoặc nhiều quá trình bệnh lý được xác định trong lâm sàng, kết hợp với tình trạng bệnh được điều trị. Lượng hữu hiệu này thay đổi tùy thuộc vào protein liên kết giống kháng thể cụ thể được dùng, và cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố và tình trạng bệnh liên quan đến bệnh nhân được điều trị và mức độ trầm trọng của rối loạn. Ví dụ, nếu protein liên kết giống kháng thể được dùng *in vivo*, các yếu tố như độ tuổi, trọng lượng cơ thể, và sức khỏe của bệnh nhân cũng như các đường cong đáp ứng liều và số liệu về độc tính trong công trình thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật sẽ là các yếu tố được tính đến. Việc xác định lượng hữu hiệu và lượng cho hiệu quả điều trị của một được phẩm nhất định sẽ nằm trong khả năng của người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

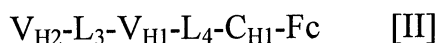
Một phương án của sáng chế mô tả được phẩm bao gồm chất mang được dụng và lượng cho hiệu quả điều trị của protein liên kết giống kháng thể.

2. Protein liên kết giống kháng thể

Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

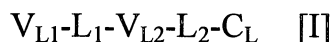
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

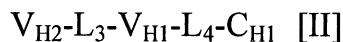
L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Theo phương án khác của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

L_1, L_2, L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra sử dụng các miền hoặc trình tự thu được hoặc được tạo ra từ kháng thể bất kỳ ở người hoặc không có ở người, bao gồm, ví dụ, các kháng thể ở người, chuột nhắt, hoặc các kháng thể được nhân hóa.

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, chiều dài của L_3 gấp ít nhất là hai lần chiều dài của L_1 . Trong protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, chiều dài của L_4 gấp ít nhất là hai lần chiều dài của L_2 . Trong một số protein liên kết giống kháng thể khác theo sáng chế, chiều dài của L_1 gấp ít nhất là hai lần chiều dài của L_3 . Trong protein liên kết giống kháng thể khác theo sáng chế, chiều dài của L_2 gấp ít nhất là hai lần chiều dài của L_4 .

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, L_1 có chiều dài từ 3 đến 12 gốc axit amin, L_2 có chiều dài từ 3 đến 14 gốc axit amin, L_3 có chiều dài từ 1 đến 8 gốc axit amin, và L_4 có chiều dài 1 đến 3 gốc axit amin. Trong protein liên kết giống kháng thể khác, L_1 có chiều dài từ 5 đến 10 gốc axit amin, L_2 có chiều dài từ 5 đến 8 gốc axit amin, L_3 có chiều dài từ 1 đến 5 gốc axit amin và L_4 có chiều dài từ 1 đến 2 gốc axit amin. Trong protein liên kết giống kháng thể được ưu tiên, L_1 có chiều dài từ 7 gốc axit

amin, L_2 có chiều dài 5 gốc axit amin, L_3 có chiều dài 1 gốc axit amin và L_4 có chiều dài 2 gốc axit amin.

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, L_1 có chiều dài 1 đến 3 gốc axit amin, L_2 có chiều dài 1 đến 4 gốc axit amin, L_3 có chiều dài 2 đến 15 gốc axit amin, và L_4 có chiều dài 2 đến 15 gốc axit amin. Trong protein liên kết giống kháng thể khác, L_1 có chiều dài 1 đến 2 gốc axit amin, L_2 có chiều dài 1 đến 2 gốc axit amin, L_3 có chiều dài 4 đến 12 gốc axit amin, và L_4 có chiều dài 2 đến 12 gốc axit amin. Trong protein liên kết giống kháng thể được ưu tiên, L_1 có chiều dài 1 gốc axit amin, L_2 có chiều dài 2 gốc axit amin, L_3 có chiều dài 7 gốc axit amin, và L_4 có chiều dài 5 gốc axit amin.

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, L_1 , L_3 , hoặc L_4 có thể bằng 0. Tuy nhiên, liên kết chuyển vị trí tương ứng giữa vùng biến đổi và vùng cố định hoặc giữa các miền biến đổi kép trên chuỗi khác không thể bằng 0. Theo một số phương án, L_1 bằng 0 và L_3 bằng 2 gốc axit amin hoặc nhiều hơn, L_3 bằng 0 và L_1 bằng 1 gốc axit amin hoặc nhiều hơn, hoặc L_4 bằng 0 và L_2 bằng 3 gốc axit amin hoặc lớn hơn.

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, ít nhất một trong số các liên kết được chọn từ nhóm gồm L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 chứa ít nhất một gốc xystein.

Ví dụ về các liên kết thích hợp bao gồm gốc glyxin (Gly) đơn; diglyxin peptit (Gly-Gly); tripeptit (Gly-Gly-Gly); peptit có bốn gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 25); peptit có năm gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 26); peptit có sáu gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 27); peptit có bảy gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 28); peptit có tám gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; SEQ ID NO: 29). Các tổ hợp của các gốc axit amin có thể được dùng như peptit Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 30) và peptit Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 31). Các liên kết thích hợp khác bao gồm gốc Ser, và Val đơn; dipeptit Arg-Thr, Gln-Pro, Ser-Ser, Thr-Lys, và Ser-Leu; Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 52), Thr-Val-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 53), Gln-Pro-Lys-Ala-Ala (SEQ ID NO: 54), Gln-Arg-Ile-Glu-Gly (SEQ ID NO: 55); Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 48), Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser (SEQ ID NO: 49), Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 50), và Hla-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys (SEQ ID NO: 51). Các ví dụ được liệt kê ở trên không được dùng để giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ, và liên kết bao gồm các axit amin được lựa chọn ngẫu nhiên và

trong nhóm bao gồm valin, leuxin, làoleuxin, serin, threonin, lysin, arginin, histidin, aspartat, glutamat, asparagin, glutamin, glyxin, và prolin đã được chỉ ra là thích hợp trong protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế (*xem ví dụ 12*).

Tên và trình tự của gốc axit amin trong liên kết có thể thay đổi tùy thuộc vào nguyên tố cấu trúc bậc hai cần để thu được trong liên kết. Ví dụ, glyxin, serin, và alanin là tốt nhất đối với các liên kết cần tính linh động lớn nhất. Một số tổ hợp của glyxin, prolin, threonin, và serin hữu dụng nếu nó bền hơn và việc kéo dài liên kết là cần thiết. Gốc axit amin bất kỳ có thể được coi là liên kết khi kết hợp với gốc axit amin khác để tạo ra liên kết peptit lớn hơn nếu cần phụ thuộc vào đặc tính mong muốn.

Trong một số protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế, V_{L1} bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; V_{L2} bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; V_{H1} bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và V_{H2} bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 4.

Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với một hoặc nhiều đích kháng nguyên. Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với ít nhất một đích kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm B7.1, B7.2, BAFF, BlyS, C3, C5, CCL11 (eotaxin), CCL15 (MIP-1d), CCL17 (TARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxin-3), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CD3, CD19, CD20, CD24, CD40, CD40L, CD80, CD86, CDH1 (E-cadherin), Chitinaza, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTLA4, CX3CL1 (SCYD1), CXCL12 (SDF1), CXCL13, EGFR, FCER1A, FCER2, HER2, IGF1R, IL-1, IL-12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL9, IL12/23, IL22, IL23, IL25, IL27, IL35, ITGB4 (b 4 integrin), LEP (leptin), MHC nhóm II, TLR2, TLR4, TLR5, TNF, TNF-a, TNFSF4 (phối tử OX40), TNFSF5 (phối tử CD40), các thụ thể giống Toll, TREM1, TSLP, TWEAK, XCR1 (GPR5/CCXCR1), DNGR-1(CLEC91), và HMGB1. Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể có khả năng ức chế chức năng của một hoặc nhiều đích kháng nguyên.

Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể có tính đặc hiệu kép và có khả năng liên kết với hai đích kháng nguyên hoặc epitop khác nhau. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể có tính đặc hiệu

kép và mỗi cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng đều có khả năng liên kết với hai hai đích kháng nguyên hoặc epitop khác nhau. Theo phương án được ưu tiên hơn, protein liên kết giống kháng thể có khả năng liên kết với đích kháng nguyên khác nhau được chọn từ nhóm bao gồm IL4 và IL13, IGF1R và HER2, IGF1R và EGFR, EGFR và HER2, BK và IL13, PDL-1 và CTLA-4, CTLA4 và MHC nhóm II, IL-12 và IL-18, IL-1 α và IL-1 β , TNF α và IL12/23, TNF α và IL-12p40, TNF α và IL-1 β , TNF α và IL-23, và IL17 và IL23. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, protein liên kết giống kháng thể có khả năng liên kết với đích kháng nguyên IL4 và IL13.

Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể liên kết đặc hiệu với IL4 với tốc độ kết hợp bằng 2,97 E+07 và tốc độ phân ly bằng 3,30 E-04 và liên kết đặc hiệu với IL13 với tốc độ kết hợp bằng 1,39 E+06 và tốc độ phân ly bằng 1,63 E-04. Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể liên kết đặc hiệu với IL4 với tốc độ kết hợp bằng 3,16 E+07 và tốc độ phân ly bằng 2,89 E-04 và liên kết đặc hiệu với IL13 với tốc độ kết hợp bằng 1,20 E+06 và tốc độ phân ly bằng 1,12 E-04.

Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên được tạo ra bằng cách xác định miền biến đổi thứ nhất của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và miền biến đổi thứ hai của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ hai, mỗi miền đều chứa V_L và V_H; quy định chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng làm chuỗi khuôn mẫu; quy định V_L của miền biến đổi thứ nhất của kháng thể hoặc miền biến đổi thứ hai của kháng thể làm V_{L1}; quy định V_{L2}, V_{H1}, và V_{H2} theo các công thức [I] và [II] dưới đây:

$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L \quad [I]$$

$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-Fc \quad [II]$$

xác định chiều dài nhỏ nhất và lớn nhất cho L₁, L₂, L₃, và L₄; tạo ra các cấu trúc polypeptit có công thức I và II; lựa chọn các cấu trúc polypeptit có công thức I và II liên kết kháng nguyên đích thứ nhất và kháng nguyên đích thứ hai khi được kết hợp để tạo ra protein liên kết giống kháng thể;

trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Theo phương án khác của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên được tạo ra bằng cách xác định miền biến đổi thứ nhất của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ nhất và miền biến đổi thứ hai của kháng thể liên kết với kháng nguyên đích thứ hai, mỗi miền đều chứa V_L và V_H ; quy định chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng làm chuỗi khuôn mẫu; quy định V_L của miền biến đổi thứ nhất của kháng thể hoặc miền biến đổi thứ hai của kháng thể làm V_{L1} ; quy định V_{L2} , V_{H1} , và V_{H2} theo các công thức [I] và [II] dưới đây:

$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-C_L \quad [I]$$

$$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1} \quad [II]$$

xác định chiều dài nhỏ nhất và lớn nhất L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 ; tạo ra các cấu trúc polypeptit có công thức I và II; lựa chọn các cấu trúc polypeptit có công thức I và II mà liên kết kháng nguyên đích thứ nhất và kháng nguyên đích thứ hai khi được kết hợp để tạo ra protein liên kết giống kháng thể;

trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

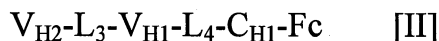
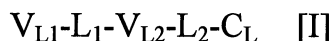
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Theo một số phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể trong đó miền biến đổi thứ nhất của kháng thể và miền biến đổi thứ hai của kháng thể giống nhau được tạo ra.

Một phương án của sáng chế mô tả phương pháp tạo ra protein liên kết giống kháng thể, bao gồm biểu hiện trong tế bào một hoặc nhiều phân tử nucleic mã hóa polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức [I] và [II] dưới đây:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

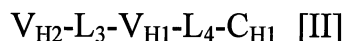
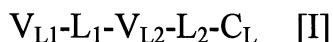
C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

Phương án khác của sáng chế mô tả phương pháp tạo ra protein liên kết giống kháng thể, bao gồm biểu hiện trong tế bào một hoặc nhiều phân tử nucleic mã hóa các polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức [I] và [II] dưới đây:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; and

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

và trong đó polypeptit có công thức I và polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

3. Sử dụng protein liên kết giống kháng thể

Protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm bất kỳ đã biết, như các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, thử nghiệm kẹp giữa trực tiếp và gián tiếp, và thử nghiệm kết tủa miễn dịch để phát hiện và định lượng một hoặc nhiều kháng nguyên đích. Protein liên kết giống kháng thể sẽ liên kết với một hoặc nhiều kháng nguyên đích với ái lực mà thích hợp với phương pháp thử nghiệm được dùng.

Đối với các ứng dụng trong chẩn đoán, theo các phương án nhất định, protein liên kết giống kháng thể có thể được đánh dấu bằng nhóm có thể phát hiện được. Nhóm có thể phát hiện được có thể là nhóm bất kỳ có khả năng tạo ra, trực tiếp hoặc gián tiếp, tín hiệu có thể phát hiện được. Ví dụ, nhóm có thể phát hiện được có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , hoặc ^{67}Ga ; hợp chất phát ánh sáng huỳnh quang hoặc quang hóa như fluorescein isothioxyanat, rhodamin, hoặc luxiferin; hoặc enzym, như alkaline phosphatase, β -galactosidase, hoặc peroxidase cải ngựa.

Protein liên kết giống kháng thể theo sáng chế cũng hữu ích đối trong chụp hình *in vivo*. Protein liên kết giống kháng thể được đánh dấu bằng nhóm có thể phát hiện được có thể được dùng cho động vật, tốt hơn là đưa vào trong dòng máu, và sự có mặt và vị trí của kháng thể được đánh dấu trong vật chủ sẽ được xác định. Protein liên kết giống kháng thể có thể được đánh dấu bằng nhóm bất kỳ có thể phát hiện được ở động vật, bất kể bằng phân tích cộng hưởng từ hạt nhân, phóng xạ, hay các phương pháp phát hiện khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa protein liên kết giống kháng thể và các chất thử khác hữu ích để phát hiện mức kháng nguyên đích trong các mẫu sinh vật. Các chất thử này có thể bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện được, mẫu huyết thanh phong bế, mẫu đối chứng dương tính và âm tính và các chất phát hiện.

4. Các chế phẩm dùng trong điều trị chứa protein liên kết giống kháng thể và việc dùng chúng

Các chế phẩm dùng trong điều trị hoặc dược phẩm chứa protein liên kết giống kháng thể đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Các chế phẩm dùng trong điều trị hoặc

được phẩm này có thể bao gồm lượng cho hiệu quả điều trị của protein liên kết giống kháng thể, hoặc thể tiếp hợp protein liên kết giống kháng thể-được chất, trong hỗn hợp với chất bào chế được dụng hoặc được chấp nhận về mặt sinh lý, được chọn thích hợp với cách dùng.

Các nguyên liệu bào chế chấp nhận được tốt hơn là không gây độc cho đối tượng nhận ở liều và nồng độ được dùng.

Dược phẩm có thể chứa các nguyên liệu bào chế để cải biến, duy trì, hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, tính thẩm thấu, độ nhớt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, tính vô trùng, tính ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, hấp thu hoặc thẩm của chế phẩm. Các nguyên liệu bào chế thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin, hoặc lysin), các chất kháng khuẩn, các chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfit, hoặc natri hydro-sulfit), các chất đệm (như borat, bicarbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat, hoặc các axit hữu cơ khác), các chất tạo khối (như manitol hoặc glyxin), các chất chelat hóa (như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA)), các chất tạo phức (như cafein, polyvinylpyrrolidon, beta-xyclodextrin, hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin), các chất độn, các monosacarit, disacarit, và các hydratecacbon khác (như glucoza, mannoza, hoặc dextrin), protein (như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch), chất tạo màu, chất tạo hương vị và các chất pha loãng, các chất nhũ hóa, các polyme kỵ nước (như polyvinylpyrrolidon), các polypeptit phân tử lượng thấp, các ion trái dấu tạo muối (như natri), các chất bảo quản (như benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, clorhexidin, axit sorbic, hoặc hydro peroxit), các dung môi (như glyxerin, propylen glycol, hoặc polyetylen glycol), các rượu đường (như manitol hoặc sorbitol), các chất tạo huyền phù, các chất hoạt động bề mặt hoặc các chất làm ẩm (như pluronic; PEG; sorbitan este; các polysorbate như polysorbate 20 hoặc polysorbate 80; triton; trometamin; lexithin; cholesterol hoặc tyloxapal), các chất tăng cường độ ổn định (như sucroza hoặc sorbitol), các chất tăng cường độ trương (như halogenua của kim loại kiềm – tốt hơn là natri hoặc kali clorua – hoặc manitol sorbitol), các chất dẫn phân phối, các chất pha loãng, các tá dược hoặc/và các chất điều chỉnh được dụng (*xem, ví dụ, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), và các phiên bản sau đó của ấn phẩm này, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ*).

Dược phẩm tối ưu sẽ được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định, dựa vào, ví dụ, đường dùng dự định, dạng phân phối, và liều mong muốn. Các yếu tố này có thể ảnh hưởng đến trạng thái vật lý, tốc độ giải phóng *in vivo*, tốc độ thanh thải *in vivo* của protein liên kết giống kháng thể.

Chất dẫn hoặc chất mang cơ bản trong dược phẩm, về bản chất, có thể chứa nước hoặc không chứa nước. Ví dụ, chất dẫn hoặc chất mang thích hợp để tiêm có thể là nước, dung dịch nước muối sinh lý, hoặc dịch não tủy nhân tạo, có thể được bổ sung các nguyên liệu khác thường được sử dụng trong dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Nước muối được đệm trung tính hoặc nước muối được trộn albumin huyết thanh là các chất dẫn khác được lấy làm ví dụ. Các thành phần dược dụng khác được lấy làm ví dụ bao gồm đệm có độ pH khoảng 7,0-8,5, hoặc đệm axetat có độ pH khoảng 4,0-5,5, mà có thể còn bao gồm sorbitol hoặc chất thay thế thích hợp. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm chứa protein liên kết giống kháng thể có thể được bào chế để bảo quản bằng cách trộn thành phần đã chọn có độ tinh khiết mong muốn với chất bào chế tùy ý ở dạng bánh đã đông khô hoặc dung dịch nước. Ngoài ra, protein liên kết giống kháng thể có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm đông khô sử dụng các tá dược thích hợp như sucroza.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được chọn để phân phối ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, các dược phẩm có thể được chọn để xông hít hoặc để phân phối qua đường tiêu hóa, như đường miệng. Việc bào chế dược phẩm này nằm trong kỹ năng của người trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các thành phần bào chế có mặt ở nồng độ có thể chấp nhận được đối với vị trí dùng. Ví dụ, các đệm được dùng để duy trì chế phẩm ở độ pH sinh lý hoặc độ pH thấp hơn một chút, thường nằm trong khoảng pH từ 5 đến 8.

Khi việc dùng ngoài đường tiêu hóa được dự định, các chế phẩm dùng trong điều trị để sử dụng theo sáng chế có thể ở dạng dung dịch nước, dùng được ngoài đường tiêu hóa, không chứa chất gây sốt và chứa protein liên kết giống kháng thể mong muốn trong chất dẫn dược dụng. Chất dẫn đặc biệt thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng trong đó protein liên kết giống kháng thể được bào chế dưới dạng dung dịch vô trùng, đẳng trương, được bảo quản hợp lý. Chế phẩm khác nữa có thể bao gồm chế phẩm chứa phân tử mong muốn, với chất như vi cầu để tiêm, hạt ăn mòn sinh học, các vi cầu tiêm được, các hạt ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), các hạt hoặc các liposom, tạo ra sự giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài

cho sản phẩm mà sau đó được phân phối thông qua chế phẩm tiêm giải phóng kéo dài. Axit hyaluronic cũng có thể được sử dụng, và điều này có thể tác dụng tăng thời gian giải phóng kéo dài trong hệ tuần hoàn. Các phương pháp thích hợp khác để đưa phân tử mong muốn bao gồm các tế bào phân phối được cấy ghép được.

Theo một phương án, dược phẩm có thể được bào chế để hít. Ví dụ, protein liên kết giống kháng thể có thể được bào chế dưới dạng bột khô để hít. Dung dịch hít chứa protein liên kết giống kháng thể có thể cũng được bào chế cùng với chất đẩy để phân phối khí dung. Theo khía cạnh khác nữa, các dung dịch có thể được tạo áp để phun.

Cũng được dự định rằng các chế phẩm nhất định có thể dùng qua đường miệng. Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết giống kháng thể được dùng theo cách này có thể được bào chế cùng với các chất mang hoặc không cùng với các chất mang thường được dùng trong chế phẩm có các dạng liều rắn như viên nén và viên nang. Ví dụ, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng phần có hoạt tính của chế phẩm ở một điểm trong đường dạ dày-ruột khi độ sinh khả dụng đạt giá trị lớn nhất và mức phân hủy trước khi đi vào hệ tuần hoàn có giá trị nhỏ nhất. Các chất khác có thể được bổ sung vào để hỗ trợ việc hấp thụ protein liên kết giống kháng thể. Các chất pha loãng, chất tạo hương vị, các sáp có điểm nóng chảy thấp, dầu thực vật, chất làm trơn, chất tạo huyền phù, chất gây vỡ viên nén, và chất liên kết cũng có thể được sử dụng.

Dược phẩm khác có thể chứa lượng hữu hiệu protein liên kết giống kháng thể trong hỗn hợp với các tá dược không độc thích hợp để sản xuất viên nén. Bằng cách hòa tan viên nén trong nước vô trùng, hoặc chất dẫn thích hợp khác, các dung dịch có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị. Các tá dược thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất pha loãng trợ, như canxi carbonat, natri carbonat hoặc bicarbonat, lactoza, hoặc canxi phosphat; hoặc các chất liên kết, như tinh bột, gelatin, hoặc acacia; hoặc các chất làm trơn như magie stearat, axit stearic, hoặc bột talc.

Các dược phẩm khác theo sáng chế cũng được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến, bao gồm dược phẩm chứa protein liên kết giống kháng thể ở các dạng giải phóng kéo dài hoặc có kiểm soát. Các kỹ thuật bào chế sử dụng các phương tiện khác có đặc tính giải phóng kéo dài hoặc có kiểm soát, như các chất mang liposom, các vi hạt ăn mòn sinh học hoặc các hạt xốp và các chế phẩm tiêm giải phóng kéo dài cũng đã được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến. Các ví dụ khác về các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các cốt polyme bán thấm của vật phẩm được tạo hình, *ví dụ*,

các màng, hoặc các vi nang. Các cốt giải phóng kéo dài có thể bao gồm các polyeste, các hydrogel, các polylactit, copolyme của axit L-glutamic và gamma etyl-L-glutamat, poly(2-hydroxyetyl-metacrylat), etylen vinyl axetat, hoặc axit poly-D(-)-3-hydroxybutyric. Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể cũng bao gồm các liposom, mà có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số vài phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dược phẩm theo sáng chế được dùng *in vivo* thường phải vô trùng. Việc vô trùng này có thể được thực hiện bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được đông khô, việc vô trùng sử dụng phương pháp này có thể được tiến hành trước, hoặc sau, đông khô và tái hoàn nguyên. Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc trong dung dịch. Ngoài ra, các dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được đặt trong thùng chứa có cửa tiếp cận vô trùng, ví dụ, túi dung dịch tiêm trong tĩnh mạch hoặc lọ có nắp có thể đâm xuyên qua bằng kim tiêm dưới da.

Ngay sau khi dược phẩm được bào chế, nó có thể được bảo quản trong các lọ nhỏ vô trùng dưới dạng dung dịch, huyền phù, gel, nhũ hóa, chất rắn, hoặc dưới dạng bột được loại nước hoặc đông khô. Các chế phẩm này có thể được bảo quản ở dạng sẵn sàng sử dụng hoặc ở dạng (ví dụ, được đông khô) cần tái hoàn nguyên trước khi dùng.

Sáng chế cũng bao gồm kit để tạo ra đơn vị dùng liều đơn. Mỗi kit này có thể bao gồm cả vật chứa thứ nhất chứa protein đã làm khô lẫn vật chứa thứ hai chứa chế phẩm nước. Cũng được bao gồm trong phạm vi sáng chế là các kit chứa các xylan có một ngăn hoặc nhiều ngăn, và đã điền đầy dược phẩm (ví dụ, xylan và xylan Lyo lỏng).

Lượng hữu hiệu của dược phẩm chứa protein liên kết giống kháng thể được dùng trong điều trị sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, hoàn cảnh và mục đích điều trị. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá rằng các mức liều thích hợp để điều trị do đó, sẽ thay đổi, tùy thuộc, một phần vào phân tử được phân phối, chỉ định đối với protein liên kết giống kháng thể được dùng, đường dùng, và kích thước (thể trọng, bề mặt cơ thể, hoặc kích thước cơ quan) và tình trạng sức khỏe (độ tuổi và tình trạng sức khỏe tổng quát) của bệnh nhân. Ngoài ra, bác sĩ lâm sàng có thể ước giá dược liều và thay đổi đường dùng để thu được hiệu quả điều trị tối ưu. Liều thông thường có thể nằm trong khoảng từ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ lên đến khoảng 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập ở trên. Theo một số phương án, liều này có thể nằm trong khoảng từ 0,1

$\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 100 mg/kg ; hoặc 1 $\mu\text{g/kg}$ đến khoảng 100 mg/kg ; hoặc 5 $\mu\text{g/kg}$, 10 $\mu\text{g/kg}$, 15 $\mu\text{g/kg}$, 20 $\mu\text{g/kg}$, 25 $\mu\text{g/kg}$, 30 $\mu\text{g/kg}$, 35 $\mu\text{g/kg}$, 40 $\mu\text{g/kg}$, 45 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 55 $\mu\text{g/kg}$, 60 $\mu\text{g/kg}$, 65 $\mu\text{g/kg}$, 70 $\mu\text{g/kg}$, 75 $\mu\text{g/kg}$, đến khoảng 100 mg/kg .

Số lần dùng sẽ phụ thuộc vào các thông số dược động học của protein liên kết giống kháng thể trong chế phẩm được dùng. Thông thường, bác sĩ lâm sàng sẽ cho dùng chế phẩm cho đến liều mà tại đó thu được tác dụng mong muốn. Do đó, chế phẩm có thể được dùng ở dạng liều đơn, dưới dạng hai hoặc nhiều liều (mà có thể chứa hoặc không chứa cùng lượng phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc dưới dạng truyền liên tục thông qua thiết bị cấy ghép hoặc ống thông. Việc tinh chỉnh thêm liều thích hợp được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này thường làm và nằm trong phạm vi công việc thường được tiến hành của họ. Các liều thích hợp có thể được chọn cụ thể thông qua việc sử dụng số liệu đáp ứng liều thích hợp.

Đường dùng của dược phẩm theo các phương pháp đã biết, *ví dụ*, qua đường miệng; thông qua tiêm trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong não (trong nhu mô), trong mạch não, trong cơ, trong mắt, trong động mạch, trong rãnh ngang gan, hoặc đường trong thương tổn; bằng các hệ giải phóng kéo dài, hoặc bằng các thiết bị cấy ghép. Nếu muốn, các chế phẩm này có thể được dùng bằng cách tiêm liều lớn hoặc truyền liên tục, hoặc bằng thiết bị cấy ghép.

Chế phẩm cũng có thể được dùng cục bộ thông qua cấy ghép màng, gạc, hoặc nguyên liệu thích hợp khác trên đó phân tử mong muốn được hấp thụ hoặc bao nang. Khi sử dụng thiết bị cấy ghép, thiết bị này có thể được cấy ghép vào mô hoặc cơ quan bất kỳ thích hợp, và phân phối phân tử mong muốn thông qua truyền, liều lớn giải phóng theo thời gian hoặc dùng liên tục.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa các phương án cụ thể của sáng chế và các cách sử dụng chúng khác nhau. Các ví dụ này chỉ dùng để minh họa và không được coi là giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Thiết kế và xử lý kỹ thuật protein liên kết giống kháng thể có vùng biến đổi kép liên kết chéo đặc hiệu kép.

Vùng biến đổi kép liên kết chéo ở dạng Fv format đã được mô tả trong patent Mỹ số 5,989,830 và được gọi là cấu hình hai đầu liên kết chéo (cross-over double head - CODH). Việc mô hình hóa phân tử cho thấy mô hình CODH tạo ra phức với hai vị trí

liên kết theo hai hướng đối nhau, mà không có những ràng buộc như thấy ở cấu hình Fv kép. Dạng CODH Fv được xét nghiệm để xác định xem liệu nó có được chuyển hóa thành các phân tử giống kháng thể hoàn toàn bằng cách bổ sung miền C_L vào chuỗi nhẹ và vùng Fc vào chuỗi nặng. Sự chuyển hóa tương tự cũng diễn ra thành công đối với các miền biến đổi kép (DVD-Ig) và TBTI tương ứng như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,612,181 và công bố đơn quốc tế số WO 2009/052081. Việc sắp xếp vùng biến đổi trong dạng CODH được thể hiện trong dưới đây, mà được thể hiện theo hướng từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi peptit:

(a) chuỗi nhẹ: NH_2-V_{L1} -liên kết- $V_{L2}-COOH$

(b) chuỗi nặng: NH_2-V_{H2} -liên kết- $V_{H1}-COOH$

Việc sắp xếp vùng biến đổi theo hướng từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy trong (a) và (b) như trên có thể phân biệt được với sự sắp xếp ở cấu hình Fv kép như được thể hiện trong (c) và (d) dưới đây:

(c) chuỗi nhẹ: NH_2-V_{L1} -Liên kết- $V_{L2}-COOH$

(d) chuỗi nặng: NH_2-V_{H1} -Liên kết- $V_{H2}-COOH$

Sự khác biệt chủ yếu cần lưu ý là vị trí khác nhau giữa vùng biến đổi của chuỗi nặng và của chuỗi nhẹ tương ứng (V_{H1}/V_{L1} và V_{H2}/V_{L2}) so với vị trí của chúng trong hai cấu hình vùng biến đổi kép. Các miền V_{L1} và V_{H1} tương ứng đều ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong cấu hình vùng biến đổi kép. Ngược lại, trong cấu hình liên kết chéo, một nửa của một cặp vùng biến đổi của kháng thể tách biệt về mặt không gian trong chuỗi protein trong cấu hình liên kết chéo. Trong cấu hình liên kết chéo này, miền V_{L1} sẽ ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ của protein nhưng miền V_{H1} ghép cặp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng trong cấu hình liên kết chéo. Mối quan hệ không gian giữa V_{L1} và V_{H1} được phát hiện thấy trong cấu hình của vùng biến đổi kép là mô hình sắp xếp được phát hiện thấy trong kháng thể tự nhiên.

Một nhược điểm tiềm ẩn của cấu hình Fv kép đó là liên kết L_L tách biệt hai vùng biến đổi kép sẽ nhô ra ở vị trí liên kết kháng nguyên trong miền Fv2 (xem Fig.1). Phần nhô ra này có thể tác động đến khả năng liên kết kháng nguyên và kết quả là khả năng tiếp cận Fv2 của kháng thể 2 sẽ bị ảnh hưởng. Khả năng tiếp cận hoặc tác động bị ảnh hưởng có thể ngăn cản liên kết của kháng nguyên. Ngoài ra, tác động này có thể lớn hơn khi kích thước của kháng thể lớn hơn. Thực vậy, trong patent Mỹ số 7,612,181 đã thông báo rằng ái lực liên kết và khả năng trung hòa của phân tử DVD-Ig tùy thuộc vào tính đặc

hiệu kháng nguyên có mặt ở đầu tận cùng N hay đầu tận cùng C. Xem patent Mỹ số 7,612,181, Ví dụ 2.

Do đó, để tạo ra protein liên kết giống kháng thể ổn định hơn và không bị mất ái lực với kháng nguyên so với kháng thể gốc, các phân tử có vùng biến đổi kép liên kết chéo có miền C_L trên chuỗi nhẹ và vùng Fc trên chuỗi nặng được thiết kế và xây dựng cấu trúc. Các polypeptit tạo ra các protein giống kháng thể này có thể có cấu trúc được thể hiện dưới đây, trong đó hướng từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi polypeptit được chỉ rõ:

(e) chuỗi nhẹ: NH_2-V_{L1} -Liên kết- $V_{L2}-C_L-COOH$

(f) chuỗi nặng: NH_2-V_{H2} -Liên kết- $V_{H1}-C_{H1}-Fc-COOH$

Để đánh giá xem thiết kế protein giống kháng thể có liên kết với kháng nguyên hay không, hai vùng biến đổi được tạo ra trước đó và được nhân hóa từ các kháng thể liên kết đặc hiệu với IL4 (kháng thể gốc kháng IL4 được nhân hóa) và IL13 (kháng thể gốc kháng IL13 được nhân hóa) được dùng để xây dựng cấu trúc các phân tử giống kháng thể đặc hiệu kép như nêu trong Bảng 1. Việc đọc trình tự của kháng thể ở chuột nhất và quy trình nhân hóa chúng được mô tả công bố đơn quốc tế số WO 2009/052081 (TBTI). Nói tóm lại, các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng IL13 ở chuột nhất, dòng B-B13 và kháng thể kháng IL4 ở chuột nhất, dòng 8F4-8 được xác định bằng cách đọc trình tự axit amin. Các trình tự ở chuột nhất này được nhân hóa và sau đó dịch mã ngược vào trong các trình tự nucleotit như được mô tả trong ví dụ 5 của công bố đơn quốc tế số WO 2009/052081, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của nó. Trình tự V_H và V_L của kháng thể gốc kháng IL13 đã nhân hóa và trình tự V_H và V_L của kháng thể gốc kháng IL13 đã nhân hóa được kết hợp lại và sắp xếp như trong Bảng 1. Các mã viết tắt ở cột 1 của Bảng 1 được tạo ra đơn giản chỉ để thảo luận các protein liên kết giống kháng thể. Các protein liên kết giống kháng thể này khác nhau ở kích thước của liên kết được chèn vào giữa hai vùng biến đổi như được nêu trong Bảng 1. Các phân tử ADN mã hóa các polypeptit được nêu trong Bảng 1 được tạo ra từ kháng thể gốc kháng IL13 và kháng thể gốc kháng IL4 được dịch mã ngược. Các miền C_{H1} , C_L , và Fc thu được từ IGHG1 (số truy cập ngân hàng gen 569F4) và IGKC (Số truy cập ngân hàng gen Q502W4).

Bảng 1. Các globulin miễn dịch hai đầu liên kết chéo

Mã viết tắt cho protein	Mô tả protein	SEQ ID NO:
-------------------------	---------------	------------

Chuỗi nhẹ của kháng thể gốc kháng IL4	V _L kháng-IL4	1
Chuỗi nặng của kháng thể gốc kháng IL4	V _H kháng-IL4	2
Chuỗi nhẹ của kháng thể gốc kháng IL13	V _L kháng-IL13	3
Chuỗi nặng của kháng thể gốc kháng IL13	V _H kháng-IL13	4
<u>Mã của chuỗi nặng</u>		
IL13(G4S)IL4 _{CH1} -Fc	V _H -(G4S) kháng-IL13-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL4	5
IL13(G4S2)IL4 _{CH1} -Fc	V _H -(G4S) ₂ kháng-IL13-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL4	6
IL4(G4S)IL13 _{CH1} -Fc	V _H -(G4S) kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	7
IL4(G4S2)IL13 _{CH1} -Fc	V _H -(G4S) ₂ kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	8
<u>Mã chuỗi nhẹ</u>		
IL13(G4S)IL4CL	V _L -(G4S) kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4	9
IL13(G4S2)IL4CL	V _L -(G4S) ₂ kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4	10
IL4(G4S)IL13CL	V _L -(G4S) kháng-IL4-V _L -CL kháng-IL13	11
IL4(G4S2)IL13CL	V _L -(G4S) ₂ kháng-IL4-V _L -CL kháng-IL13	12

Các tổ hợp protein được nêu trong Bảng 2 được biểu hiện bằng cách chuyển nhiễm tạm thời và tinh chế bằng sắc ký Protein A. Trong mỗi trường hợp, sắc ký loại theo kích thước sẽ tinh chế 1 lượng nhỏ hơn 12% khối kết tập, với hầu hết các trường hợp đều nhỏ hơn 7% khối kết tập, nhưng không phát hiện thấy globulin miễn dịch hai đầu liên kết chéo có khả năng liên kết với IL4 hoặc IL13. Tuy nhiên, không phát hiện thấy protein liên kết giống kháng thể có chức năng và các lý do giải thích cho việc không có hoạt tính cũng chưa được biết đến. Đã phỏng đoán trước rằng mô hình sắp xếp này sẽ không có tính ổn định ưu việt hơn so với các kháng thể vùng miền biến đổi kép được mô tả trong patent Mỹ số 7,612,181 và công bố đơn quốc tế số WO 2009/052081.

Bảng 2. Liên kết của CODH-Ig với IL4 và IL13

Tổ hợp protein	Khối kết tập	Liên kết với IL4	Liên kết với IL13
V _H -(G4S) kháng-IL13-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL4 V _L -(G4S) kháng-IL4-V _L -C _L kháng-IL13	5,4%	ND*	ND
V _H -(G4S) kháng-IL13 -V _H - C _{H1} -Fc kháng-IL4	6,3%	ND	ND

V _L -(G ₄ S) ₂ kháng-IL4-V _L -CL kháng-IL13			
V _H -(G ₄ S) ₂ kháng-IL13-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL4	11,5%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) kháng-IL4-V _L -CL kháng-IL13			
V _H -(G ₄ S) ₂ kháng-IL13-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL4	10,1%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) ₂ kháng-IL4-V _L -CL kháng-IL13			
V _H -(G ₄ S) kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	2,7%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4			
V _H -(G ₄ S) kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	3,6%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) ₂ kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4			
V _H -(G ₄ S) ₂ kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	2,9%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4			
V _H -(G ₄ S) ₂ kháng-IL4-V _H -C _{H1} -Fc kháng-IL13	10,8%	ND	ND
V _L -(G ₄ S) ₂ kháng-IL13-V _L -CL kháng-IL4			

* ND nghĩa là không phát hiện được

Ví dụ 2. Thiết kế protein CODV-Ig bằng cách mô hình hóa phân tử

Để thu được các protein giống kháng thể có chức năng đầy đủ bằng cách sử dụng cấu hình hai đầu liên kết chéo và có thể thay đổi để kết hợp được các miền Fc và C_{L1}, quy trình mô hình hóa phân tử được sử dụng để đánh giá các liên kết khác nhau giữa miền cố định và miền biến đổi và giữa các miền biến đổi kép trên cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Câu hỏi được đặt ra là liệu việc đưa thêm các liên kết đặc trưng giữa ranh giới giữa miền cố định/biến đổi và giữa hai ranh giới miền biến đổi/miền biến đổi ở cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có làm xuất hiện nếp gấp protein hợp lý và tạo ra phân tử giống kháng thể có chức năng trong cấu hình vùng biến đổi kép liên kết chéo (*xem* Fig.2). Nói cách khác, tiến hành đánh giá tổng số bốn liên kết độc lập và đặc trưng (*xem* Fig.2). Quy trình mô hình hóa phân tử này dựa trên sự phân cắt protein-protein có mô hình tương đồng và các mô hình thử nghiệm vùng Fv_{IL4} và Fv_{IL13}, tương ứng, kết hợp với các liên kết thích hợp giữa vùng Fv_{IL4} và Fv_{IL13} và giữa vùng Fv và vùng cố định hoặc vùng Fc.

Các liên kết độc lập được quy định tên duy nhất như sau: L₁ chỉ liên kết giữa V_L ở đầu tận cùng N và V_L ở đầu tận cùng C trên chuỗi nhẹ; L₂ chỉ liên kết giữa V_L và C_L ở đầu tận cùng C trên chuỗi nhẹ; L₃ chỉ liên kết giữa V_H ở đầu tận cùng N và V_H ở đầu tận cùng C trên chuỗi nặng; L₄ chỉ liên kết giữa V_H và C_{H1} (và Fc) ở đầu tận cùng C trên chuỗi nặng. Cần hiểu rằng các ký hiệu V_H và V_L chỉ nêu vị trí của miền trên một chuỗi protein cụ thể ở dạng cuối cùng. Ví dụ, V_{H1} và V_{H2} có thể thu được từ miền V_{L1} và V_{L2} ở kháng thể gốc và được đặt vào trong vị trí V_{H1} và V_{H2} ở CODV-Ig. Ngược lại, V_{L1} và V_{L2}

có thể thu được từ miền V_{H1} và V_{H2} ở kháng thể gốc và được đặt vào các vị trí V_{H1} và V_{H2} trong CODV-Ig. Do đó, các ký hiệu V_H và V_L chỉ vị trí hiện tại và không phải là vị trí ban đầu trong kháng thể gốc.

Chi tiết hơn, mô hình tương đồng của Fv_{IL4} được xây dựng cấu trúc trên thực thể PDB 1YLD (chuỗi nhẹ) và 1IQW (chuỗi nặng). Dime Fv_{IL4} được tái tạo trên cấu trúc tinh thể nội bộ của phức Fab_{IL13} IL13/kháng-IL13 và được tối ưu hóa. Để thu được ước giá thể tích IL4 cần khi nó liên kết với Fv_{IL4} , cấu trúc tinh thể của IL4 (1RCB.pdb) được phân nhỏ theo mô hình tương đồng của Fv_{IL4} . Tiếp theo, 20 mô hình giả định của phức chất đã tạo ra được đánh giá thêm.

Tương tự, mô hình tương đồng của Fv_{IL4} được chia nhỏ thành Fv_{IL13} được tách ra từ cấu trúc tinh thể nội bộ của phức IL13/ Fab_{IL13} . Đã phát hiện ra một giải pháp đó là xây dựng cấu trúc được phép cho liên kết tương đối ngắn đồng thời không có ảnh hưởng mặt không gian đến khả năng liên kết với kháng nguyên và vị trí của các miền cố định như đã thấy trong trường hợp của globulin miễn dịch vùng biến đổi kép (xem Fig.3). Trong mô hình sắp xếp này, Fv_{IL4} (V_{L1}) được đặt ở đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ, sau đó là Fv_{IL13} (V_{L2}) và Fc (C_{L1}) trên đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ. Trên chuỗi nặng, Fv_{IL13} (V_{H2}) được đặt ở đầu tận cùng N, sau đó là vùng Fv_{IL4} (V_{H1}) và cố định ($C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$).

Như được thể hiện trong Bảng 3, các mô hình của chuỗi nhẹ gợi ý đến việc liên kết L_1 giữa các miền V_{L1} và V_{L2} và liên kết L_2 giữa miền V_{L2} và C_{L1} nên có chiều dài từ 1 đến 3 và có chiều dài từ 0 đến 2 gốc glyxin, tương ứng. Các mô hình của chuỗi nặng gợi ý đến việc liên kết L_3 giữa các miền V_{H2} và V_{H1} và liên kết L_4 giữa các miền V_{H1} và C_{H1} nên có chiều dài từ 2 đến 6 và từ 4 đến 7 gốc glyxin, tương ứng (xem Bảng 3 và Fig.2). Trong ví dụ này, glyxin được dùng làm axit amin nguyên mẫu cho liên kết nhưng các gốc axit amin khác cũng đóng vai trò làm liên kết. Tính ổn định cấu trúc của các mô hình được đề xuất được xác nhận bằng cách tối ưu hóa cấu dạng liên kết, tối thiểu hóa, và tính toán động lực phân tử. Tổ hợp hệ thống của bốn cấu trúc chuỗi nhẹ và sáu chuỗi nặng tạo ra 24 protein liên kết giống kháng thể đặc hiệu kép, vùng biến đổi kép liên kết chéo, kháng IL4 và kháng IL13 (xem Bảng 4).

Bảng 3. Chiều dài liên kết được đề xuất

Liên kết giữa	Chèn liên kết lớn nhất	Chèn liên kết nhỏ nhất	Tên liên kết
$V_{L1}-V_{L2}$	Gly ₃	Gly	L_1

V _{L2} -C _L	Gly ₂	Không	L ₂
V _{H2} -V _{H1}	Gly ₆	Gly ₂	L ₃
V _{H1} -C _{H1}	Gly ₇	Gly ₄	L ₄

Bảng 4. CODV-Ig để biểu hiện

Mã*	Các chuỗi nặng (từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C)	SEQ ID NO:
HC1	IL13 V _H -(Gly6)-IL4 V _H -(Gly7)-C _{H1} -Fc	13
HC2	IL13 V _H -(Gly6)-IL4 V _H -(Gly4)-C _{H1} -Fc	14
HC3	IL13 V _H -(Gly2)-IL4 V _H -(Gly7)-C _{H1} -Fc	15
HC4	IL13 V _H -(Gly2)-IL4 V _H -(Gly4)-C _{H1} -Fc	16
HC5	IL13 V _H -(Gly4)-IL4 V _H -(Gly7)-C _{H1} -Fc	17
HC6	IL13 V _H -(Gly4)-IL4 V _H -(Gly4)-C _{H1} -Fc	18
Mã*	Các chuỗi nhẹ (từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C)	
LC1	IL4 V _L -(Gly3)-IL13 V _L -C _{L1}	19
LC2	IL4 V _L -(Gly)-IL13 V _L -C _{L1}	20
LC3	IL4 V _L -(Gly3)-IL13 V _L -(Gly2)-C _{L1}	21
LC4	IL4 V _L -(Gly)-IL13 V _L -(Gly2)-C _{L1}	22
C _{L1}	miền cố định C _{L1} của chuỗi nhẹ ở người	23
C _{H1} -Fc	miền cố định C _{H1} của chuỗi nặng ở người và Fc vùng	24
Gly4	liên kết peptit với 4 glyxin (GGGG)	25
Gly5	liên kết peptit với 5 glyxin (GGGGG)	26
Gly6	liên kết peptit với 6 glyxin (GGGGGG)	27
Gly7	liên kết peptit với 7 glyxin (GGGGGGG)	28
Gly8	liên kết peptit với 8 glyxin (GGGG GGGG)	29

*Mã viết tắt tiếp tục được sử dụng để thể hiện cấu trúc kết hợp. Các mã bắt đầu bằng HC là các chuỗi nặng liên kết và các mã bắt đầu bằng LC là các chuỗi nhẹ liên kết.

Trong Bảng 4, tiếp đầu ngữ "kháng" không được thể hiện nhưng nó được dự định rằng IL13 chỉ kháng thể kháng-IL13 và IL4 chỉ kháng thể kháng-IL4.

Ví dụ 3. Tạo ra plasmit biểu hiện CODV-Ig

Các phân tử axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 6 chuỗi nặng và 4 chuỗi nhẹ được mô tả trong Bảng 4 được tạo ra bằng cách tổng hợp gen ở Geneart (Regensburg, Germany). Các miền biến đổi của chuỗi nhẹ được dung hợp với vùng cố định của chuỗi nhẹ (IGKC, số truy cập ngân hàng gen Q502W4) bằng cách phân cắt bằng enzym endonucleaza giới hạn ApaLI và BsiWI và sau đó, nối vào trong vị trí ApaLI/BsiWI của vector biểu hiện episom pFF, một vector tương tự vector pTT đã được Durocher và các đồng tác giả mô tả, (2002, *Nucl. Acids Res.* 30(2): E9), tạo ra plasmit biểu hiện ở động vật có vú để biểu hiện các chuỗi nhẹ.

Các miền biến đổi của chuỗi nặng được dung hợp với biến thể "Ted" của vùng cố

định của chuỗi nặng ở người (IGHG1, Số truy cập ngân hàng gen 569F4), hoặc theo cách khác, với 6x miền C_{H1} được gắn đuôi His từ vùng cố định của chuỗi nặng ở người IGHG1 để tạo ra Fab đặc hiệu kép. Tiếp theo, miền V_H được phân cắt bằng enzym endonucleaza giới hạn, ApaLI và ApaI và sau đó, được dung hợp với IGHG1 hoặc các miền C_{H1} được gắn đuôi His tương ứng, bằng cách nối vào trong vị trí ApaLI/ApaI của vectơ biểu hiện episom pFF, tạo ra plasmit biểu hiện ở động vật có vú để biểu hiện các chuỗi nặng (IgG1 hoặc Fab tương ứng).

Ví dụ 4. Biểu hiện CODV-Ig

Plasmit biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của các cấu trúc tương ứng được sao chép trong các tế bào *E. coli* DH5a. Các plasmit được dùng để chuyển nhiễm được tạo ra từ *E. coli* sử dụng Kit Qiagen EndoFree Plasmid Mega.

Các tế bào HEK 293-FS sinh trưởng trong môi trường Freestyle (Invitrogen) được chuyển nhiễm bằng các plasmit LC và HC đã chỉ định, mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ nêu trong Bảng 4 sử dụng chất chuyển nhiễm 293fectin (Invitrogen) như được nhà sản xuất mô tả. Sau 7 ngày, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm và dịch nổi được lọc bằng lọc 0,22 μ m để loại bỏ các hạt.

Các cấu trúc CODV-IgG1 được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên các cột protein A (cột HiTrap Protein A HP, GE Life Sciences). Sau khi rửa giải khỏi cột bằng đệm axetat 100mM và NaCl 100mM, độ pH=3,5, các cấu trúc CODV-IgG1 được loại muối sử dụng cột loại muối HiPrep 26/10, được chuẩn bị trong PBS ở nồng độ 1 mg/mL và lọc sử dụng màng 0,22 μ m.

Các cấu trúc CODV Fab được tinh chế thêm bằng IMAC trên HiTrap IMAC HP Columns (GE Life Sciences). Sau khi rửa giải từ cột với gradient tuyến tính (đệm rửa giải: natri phosphat 20mM, NaCl 0,5M, imidazol 50 - 500mM, độ pH=7,4), các phần chứa protein được gom lại và loại muối sử dụng các cột loại muối HiPrep 26/10, được pha chế trong PBS ở nồng độ 1 mg/mL và lọc sử dụng màng 0,22 μ m.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 280 nm. Mỗi lô được phân tích bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử và không khử để xác định độ tinh khiết và phân tử lượng của mỗi tiểu loại và monome.

Đĩa Nunc F96-Maxisorp-Immuno được phủ bằng IgG dê kháng người (đặc hiệu Fc) [NatuTec A80-104A]. Kháng thể được pha loãng đến 10 μ g/ml trong đệm phủ carbonat (natri carbonat 50mM, độ pH=9,6) và được phân tán trong 50 μ L/lỗ. Đĩa được

dán kín bằng băng dính, và bảo quản qua đêm ở 4°C. Đĩa này được rửa ba lần bằng đệm rửa (PBS, độ pH=7,4 và Tween20 0,1%). 150 μ L dung dịch phong bế (BSA/PBS 1%) được phân bố vào mỗi lỗ để phủ đĩa này. Sau 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, đĩa này được rửa ba lần bằng đệm rửa. 100 μ L mẫu hoặc chất chuẩn (nồng độ trong khoảng từ 1500 ng/ml đến 120 ng/ml) được bổ sung vào và được phép để nguyên trong 1 phòng ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa này được rửa ba lần bằng đệm rửa. 100 μ L thể tiếp hợp IgG-FC – HRP dê kháng người [NatuTec A80-104P-60] được pha loãng theo tỷ lệ 1:10,000 được bổ sung sử dụng dung dịch ủ (BSA 0,1%, PBS, độ pH=7,4, và Tween20 0,05%). Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ phòng, đĩa này được rửa ba lần bằng đệm rửa. 100 μ L cơ chất ABTS (10 mg viên ABTS (Pierce 34026) trong Na_2HPO_4 0,1M, dung dịch axit xitric 0,05M, độ pH=5,0). Bổ sung 10 μ L H_2O_2 30%/10 ml cơ chất trước khi sử dụng) được phân tán vào mỗi lỗ, và cho phép hiện màu. Sau khi hiện màu (khoảng từ 10 đến 15 phút), 50 μ L dung dịch SDS 1% được bổ sung vào để ngừng phản ứng. Đĩa này được đọc ở A_{405} .

Ví dụ 5. Phân tích đặc tính của biến thể CODV-Ig

Để xác định xem liệu các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của protein giống kháng thể CODV-Ig có ghép cặp và gấp nếp hợp lý hay không, mức kết tập được đo bằng sắc ký loại theo kích thước phân tích (size-exclusion chromatography - SEC). SEC phân tích được tiến hành trên các cặp đã lắp ghép sử dụng ÄKTA explorer 10 (GE Healthcare) được trang bị cột TSKgel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) và cột bảo vệ TSKgel SWXL (Tosoh Bioscience). Việc phân tích được tiến hành ở tốc độ 1 ml/phút sử dụng NaCl 250mM, Na-phosphat 100mM, độ pH=6,7, và phát hiện ở 280 nm. 30 μ L mẫu protein (ở 0,5-1 mg/ml) được nạp lên cột. Để ước tính kích thước phân tử, cột được căn chỉnh sử dụng hỗn hợp chất chuẩn lọc gel (MWGF-1000, SIGMA Aldrich). Thực hiện việc đánh giá số liệu sử dụng UNICORN phần mềm v5.11.

Bảng 5 thể hiện các kết quả của bộ gồm 24 phân tử CODV-Ig được tạo ra sử dụng các hỗn hợp của vùng biến đổi kháng-IL4 và kháng-IL13 nêu trong Bảng 4. Các mã được chỉ định trong Bảng 4 là các cấu trúc liên kết được thể hiện trong Bảng 4. Đối với các cặp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo đó protein được tạo ra, mức kết tập được đo sử dụng SEC. Các kết quả được nêu trong Bảng 5, trong đó LC4 ($L_1 = 1$; $L_2 = 2$) không ghép cặp thành công với tất cả sáu chuỗi nặng. LC4 tương ứng với cấu trúc IL4 V_L -(Gly)-IL13 V_L -(Gly2)- C_{L1} có liên kết L_1 bằng 1, trong đó gốc axit amin tách riêng hai miền V_L của chuỗi nhẹ vùng biến đổi kép. Ngoài ra, LC4 có L_2 bằng 2, chứa liên kết dipeptit Gly-Gly giữa

V_L trung tâm và C_{HI} ở đầu tận cùng C.

Bảng 5. Mức kết tập trong số các cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

	HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6
LC1	>50%	>50%	ND*	ND	ND	ND
LC2	ND	ND	ND	>50%	ND	ND
LC3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LC4	7,2%	6,8%	6,8%	7,1%	6,3%	5,9%

*ND thể hiện protein không được tạo ra

Trong khi các phân tử CODV-Ig được tạo ra, thử nghiệm BIACORE một nồng độ ở nồng độ IL13 và IL4 trung bình được tiến hành để xác thực liên kết với các kháng nguyên đích. Các phân tử giống kháng thể CODV-Ig tương ứng với tổ hợp LC4:HC4 và LC4:HC6 được mô tả trong Bảng 4 được chọn để đánh giá phân tích động học đầy đủ sử dụng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt.

Như được minh họa trong Bảng 5, hầu hết phân tử CODV-Ig không được tạo ra được hoặc chỉ tạo ra dưới dạng khối kết tập (lên đến 90%). Các tổ hợp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ có mức kết tập chấp nhận được (5-10%) sau bước chạy sắc ký là các tổ hợp kết hợp từ chuỗi nhẹ IL4, V_L -(Gly)-IL13 V_L -(Gly2)- C_{L1} . Chuỗi nhẹ này là chuỗi đặc trưng nhất trong các biến thể CODV-Ig và đóng vai trò làm nền tảng để thu nhận các chuỗi nặng khác nhau có các thành phần liên kết khác nhau.

1. Phân tích động học

Hai cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được lựa chọn để phân tích động học đầy đủ. Kháng thể tái tổ hợp IL13 và IL4 ở người được mua từ Chemicon (USA). Việc phân tích đặc tính động học của kháng thể đã tinh chế được thực hiện sử dụng công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt trên BIACORE 3000 (GE Healthcare). Thử nghiệm bắt giữ sử dụng kháng thể đặc hiệu theo loài (ví dụ, MAB 1302 đặc hiệu Fc người, Chemicon) để bắt giữ và định hướng các kháng thể được nghiên cứu được dùng đến. Kháng thể bắt giữ được cố định thông qua các nhóm amin bậc một (11000 RU) trên chip CM5 dùng trong nghiên cứu (GE Life Sciences) sử dụng các quy trình chuẩn. Kháng thể được phân tích được bắt giữ ở tốc độ dòng 10 μ L/phút với giá trị RU được điều chỉnh sao cho nó sẽ tạo ra liên kết của chất phân tích ở mức độ lớn nhất bằng 30 RU. Động học liên kết được xác định dựa trên kháng thể tái tổ hợp IL4 và IL13 ở người ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 25 nM trong HBS EP (HEPES 10 mM, độ pH=7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM, và chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) ở tốc độ dòng 30 μ L/phút. Bề mặt của chip được tái

tạo bằng glyxin 10mM, độ pH=2,5. Các thông số động học được phân tích và tính toán trong gói chương trình đánh giá BIA v4.1 sử dụng dòng tế bào không có kháng thể bị bắt giữ làm đối chứng.

Bảng 6 dưới đây thể hiện động học so sánh của kháng thể BB13 gốc (kháng-IL13) và kháng thể 8D4 (kháng-IL4) (được biểu hiện dưới dạng IgG) có các miền tương ứng ở dạng CODV-Ig (Bảng 4, mã LC4:HC4 và LC4:HC6). Như được thể hiện trong Bảng 6, đặc tính liên kết của các cấu trúc CODV-Ig với kháng nguyên tương ứng, không giảm so với kháng thể gốc kháng-IL13 và kháng thể gốc kháng-IL4. Hiện tượng mất tốc độ kết hợp quan sát thấy ở dạng DVD-Ig/TBTI sử dụng cùng các trình tự Fv không xuất hiện trong cấu hình CODV-Ig. Các vị trí liên kết đối diện nhau sẽ cho phép liên kết các kháng nguyên lớn hoặc tạo cầu liên kết giữa các tế bào khác nhau có cấu hình giống kháng thể đặc hiệu kép, và cũng sẽ thích hợp để chọn nhiều kháng thể gốc hơn. Một ưu điểm nữa của CODV-Ig là không có các góc liên kết nhô về phía vị trí liên kết kháng nguyên và làm giảm khả năng tiếp cận của kháng nguyên.

Bảng 6. Phân tích động học của LC4:HC4 và LC4:HC6

Mã		Tốc độ kết hợp [1/Ms]	Tốc độ phân ly [1/s]	KD [M]
	mAb gốc kháng-IL4	2,49E+07	1,95E-04	7,83E-12
	mAb gốc kháng-IL13	1,59E+06	1,30E-04	8,18E-11
LC4:HC4	CODV-Ig với IL4	3,16E+07	2,89E-04	9,14E-12
LC4:HC4	CODV-IG với IL13	1,20E+06	1,12E-04	9,34E-11
LC4:HC6	CODV-Ig với IL4	2,97E+07	3,30E-04	1,11E-11
LC4:HC6	CODV-IG với IL13	1,39E+06	1,63E-04	1,18E-10

2. Tiêm đồng thời IL4 và IL13 để chứng minh liên kết kháng nguyên bổ sung bằng CODV-Ig

Để nghiên cứu liên kết bổ sung của hai kháng nguyên, phương pháp cùng tiêm được điều khiển bằng thuật sĩ được sử dụng trong đó một kháng nguyên được tiêm ngay sau một kháng nguyên khác sau một thời gian trễ (IL4 sau đó đến IL13 và ngược lại). Mức liên kết thu được có thể tương đương với mức liên kết thu được bằng hỗn hợp 1:1 của hai kháng nguyên ở cùng nồng độ. Để chỉ ra sự liên kết bổ sung của hai kháng nguyên IL4 và IL13 bằng các phân tử CODV-Ig, thử nghiệm BIACORE được thực hiện với tổ hợp CODV-Ig [HC4:LC4] bằng cách tiêm đồng thời cả hai kháng nguyên trong ba chu kỳ phân tích riêng biệt (xem Fig.4). Việc tiêm đồng thời được tiến hành với IL4 3,125 nM/IL13 25 nM (và ngược lại) và với hỗn hợp 1:1 của IL4 3,125 nM và IL1325 nM. Việc tiêm đồng thời đệm HBS-EP được tiến hành để làm đối chứng. Vào thời điểm 800 giây, mức liên kết giống nhau bằng 63 RU thu được sau khi tiêm hỗn hợp kháng

nguyên hoặc việc tiêm đồng thời các kháng nguyên này, bất kể trình tự tiêm ra sao. Khi protein CODV-Ig đã bão hòa kháng nguyên thứ nhất (IL4), thì thứ hai kháng nguyên (IL13) được tiêm vào và tín hiệu liên kết thứ hai được quan sát. Việc quan sát này được tái tạo khi trình tự tiêm kháng nguyên được đảo ngược. Điều này cho thấy liên kết bổ sung và không ức chế lẫn nhau của hai kháng nguyên bằng CODV-Ig. Do đó, cấu trúc CODV-Ig có khả năng liên kết đồng thời với hai kháng nguyên (*nghĩa là, có tính đặc hiệu kép*) trung hòa tất cả các vị trí liên kết (*nghĩa là, có bốn hóa trị*).

Ví dụ 6. Sự dung nạp chiều dài liên kết đối với CODV-Ig

Sự dung nạp liên kết có chiều dài khác nhau được đánh giá bằng cách xây dựng cấu trúc của các phân tử CODV-Ig có tổ hợp chiều dài liên kết khác nhau của L_1 , L_2 trên chuỗi nhẹ và L_3 và L_4 trên chuỗi nặng. Các cấu trúc CODV-Ig được tạo ra chiều dài liên kết L_3 và L_4 trong chuỗi nặng thay đổi từ 1 đến 8 gốc đối với L_3 và 0 hoặc 1 gốc đối với L_4 . Chuỗi nặng trong kháng thể kháng-IL4 là miền liên kết ở đầu tận cùng N và trong kháng thể kháng-IL13 là miền liên kết ở đầu tận cùng C, theo sau là C_{H1} -Fc. Liên kết trong chuỗi nhẹ L_1 và L_2 thay đổi từ 3 đến 12 đối với L_1 và từ 3 đến 14 gốc đối với L_2 . Chuỗi nhẹ trong kháng thể kháng-IL13 là miền liên kết ở đầu tận cùng N và trong kháng thể kháng-IL4 là miền liên kết ở đầu tận cùng C, theo sau là C_{L1} .

1. Phân tích đặc tính của các biến thể CODV-Ig

Việc xác định mức kết tập được phân tích bằng sắc ký loại theo kích thước phân tích (SEC phân tích). SEC phân tích được tiến hành sử dụng ÄKTA explorer 10 (GE Healthcare) được trang bị cột TSKgel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) và cột bảo vệ TSKgel SWXL (Tosoh Bioscience). Việc phân tích được tiến hành ở tốc độ 1 ml/phút sử dụng NaCl 250mM, Na-phosphat 100mM, độ pH=6,7, và phát hiện ở 280 nm. 30 μ L mẫu protein (ở 0,5-1 mg/ml) được nạp lên cột. Để ước tính kích thước phân tử, cột được căn chỉnh sử dụng hỗn hợp chất chuẩn lọc gel (MWGF-1000, SIGMA Aldrich). Việc đánh giá số liệu được thực hiện sử dụng UNICORN phần mềm v5.11.

Kháng thể IL13 và IL4 tái tổ hợp ở người được mua từ Chemicon (USA). TNF- α tái tổ hợp ở người được mua từ Sigma Aldrich (H8916-10 μ g), IL-1 β tái tổ hợp ở người (201-LB/CF), IL-23 tái tổ hợp ở người (1290-IL/CF), EGFR tái tổ hợp ở người (344 ER), và HER2 tái tổ hợp ở người (1129-ER-50) được mua từ hệ thống R&D Systems.

Phân tích liên kết động học bằng Biacore được thực hiện như sau. Công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt trên Biacore 3000 (GE Healthcare) được dùng để phân tích đặc

tính động học chi tiết của kháng thể đã tinh chế. Thử nghiệm bắt giữ sử dụng kháng thể đặc hiệu theo loài (ví dụ, MAB 1302 đặc hiệu với Fc người, Chemicon) để bắt giữ và định hướng các kháng thể được nghiên cứu được dùng đến. Để xác định động học liên kết với IL4 và IL13, các Fab CODV tương ứng trong Ví dụ 10, Bảng 12 được bắt giữ sử dụng kit bắt giữ Fab kháng người (GE Healthcare). Kháng thể bắt giữ được cố định thông qua các nhóm amin bậc một (11000 RU) trên chip CM5 dùng trong nghiên cứu (GE Life Sciences) sử dụng các quy trình chuẩn. Kháng thể phân tích được bắt giữ ở tốc độ dòng 10 μ L/phút với giá trị RU được điều chỉnh sao cho nó sẽ tạo ra liên kết của chất phân tích ở mức độ lớn nhất bằng 30 RU. Động học liên kết được xác định dựa trên kháng thể tái tổ hợp IL4 và IL13 ở người ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 25 nM trong HBS EP (HEPES 10 mM, độ pH=7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM, và chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) ở tốc độ dòng 30 μ L/phút. Bề mặt của chip được tái tạo bằng glyxin 10mM, độ pH=2,5. Các thông số động học được phân tích và tính toán trong gói chương trình đánh giá BIA v4.1 sử dụng dòng tế bào không có kháng thể bị bắt giữ làm đối chứng.

Ái lực liên kết của CODV-Ig, CODV-Fab, và TBTI đối với EGFR và HER2 được đo sử dụng hệ thống thử nghiệm tương tác protein Proteon XPR36 (Biorad). Các kháng nguyên này được cố định bằng cách kết hợp thông qua phản ứng amin trên các chip cảm biến GLC (Biorad). Loạt pha loãng của các biến thể của kháng thể đặc hiệu kẹp trong đệm PBSET (Biorad) được phân tích song song theo cách động học một lần và tham chiếu hai lần. Số liệu được phân tích sử dụng phần mềm quản lý Proteon v3.0 (Biorad) với mô hình Langmuir 1:1 chuyển khối hoặc mô hình chất phân tích hai hóa trị.

Bảng 7 tóm tắt các kết quả cho hiệu suất, mức độ kết tập (như được xác định bằng SEC) và ái lực liên kết cho CODV-Ig có hai tổ hợp liên kết với kích thước khác nhau. Các kết quả cho thấy rằng các phân tử CODV-Ig trong đó L_2 bằng 0 thường không thể tạo ra được, hoặc trong đó protein được tạo ra, thì có mức kết tập cao (xem lô số 101, 102, 106-111, và 132-137 trong Bảng 7). Do đó, ngược với sự phỏng đoán bằng cách mô hình hóa phân tử từ Ví dụ 2, trong đó L_2 bằng 0 nằm trong khoảng chấp nhận được, các kết quả này cho thấy sự chuyển vị trí $V_{L2}-C_L$ (hoặc L_2) cần liên kết có chiều dài nhỏ nhất một góc (xem Bảng 7).

Bảng 7. Tối ưu hóa kích thước liên kết cho CODV-Ig

Mã lô	Liên kết trên LC1*	L_1	L_2	L_3	L_4	Hiệu suất ¹ [mg/L]	Mức kết tập [%]	KD (Kháng nguyên1) IL4	KD (Kháng nguyên2) IL13
-------	--------------------	-------	-------	-------	-------	----------------------------------	--------------------	------------------------------	-------------------------------

								[pM]	[pM]
101	IL4 x IL13	0	0	0	0	n.p.	–	–	–
102	IL4 x IL13	0	0	2	4	1,0	66,4	35	125
103	IL4 x IL13	0	1	2	4	2,0	10,8	4	124
104	IL4 x IL13	0	2	2	4	1,0	10,0	3	137
105	IL4 x IL13	0	2	4	4	2,0	8,5	6	94
106	IL4 x IL13	1	0	2	4	4,2	61,0	–	–
107	IL4 x IL13	1	0	2	7	n.p.	–	–	–
108	IL4 x IL13	1	0	4	4	n.p.	–	–	–
109	IL4 x IL13	1	0	4	7	n.p.	–	–	–
110	IL4 x IL13	1	0	6	4	3,0	75,0	–	–
111	IL4 x IL13	1	0	6	7	5,6	91,0	–	–
112	IL4 x IL13	1	1	2	4	5,3	8,8	5	55
113	IL4 x IL13	1	2	0	0	2,0	1,9	6	59
114	IL4 x IL13	1	2	0	2	1,0	7,2	4	75
115	IL4 x IL13	1	2	0	4	2,0	8,0	11	62
116	IL4 x IL13	1	2	1	4	3,0	5,7	5	74
117	IL4 x IL13	1	2	12	12	4,0	9,2	7	75
118	IL4 x IL13	1	2	12	9	7,0	11,8	7	74
119	IL4 x IL13	1	2	15	15	10,0	7,9	6	64
120	IL4 x IL13	1	2	2	2	2,0	5,9	6	70
121	IL4 x IL13	1	2	2	4	7,0	7,1	11	118
122	IL4 x IL13	1	2	2	7	6,6	6,8	1	50
123	IL4 x IL13	1	2	4	4	5,8	5,9	9	93
124	IL4 x IL13	1	2	4	7	5,6	6,3	6	51
125	IL4 x IL13	1	2	6	4	7,6	6,8	8	64
126	IL4 x IL13	1	2	6	7	8,2	7,2	9	56
127	IL4 x IL13	1	2	9	12	4,0	8,7	2	83
128	IL4 x IL13	1	2	9	9	10,2	14,0	12	94
129	IL4 x IL13	1	3	2	4	4,0	4,7	5	70
130	IL4 x IL13	1	4	2	4	7,1	6,0	4	57
131	IL4 x IL13	2	2	2	4	1,0	7,3	5	50
132	IL4 x IL13	3	0	2	4	n.p.	–	–	–
133	IL4 x IL13	3	0	2	7	n.p.	–	–	–
134	IL4 x IL13	3	0	4	4	n.p.	–	–	–
135	IL4 x IL13	3	0	4	7	n.p.	–	–	–
136	IL4 x IL13	3	0	6	4	9,8	93,0	–	–
137	IL4 x IL13	3	0	6	7	5,8	90,0	–	–
138	IL4 x IL13	3	2	2	4	n.p.	–	–	–
139	IL4 x IL13	3	2	2	7	n.p.	–	–	–
140	IL4 x IL13	3	2	4	4	n.p.	–	–	–
141	IL4 x IL13	3	2	4	7	n.p.	–	–	–
142	IL4 x IL13	3	2	6	4	n.p.	–	–	–
143	IL4 x IL13	3	2	6	7	n.p.	–	–	–

* Liên kết trên chuỗi nặng phải là IL13V_H-L₃-IL4V_H-L₄-C_{H1}-Fc

¹ n.p. có nghĩa là cấu trúc không thể tạo ra được.

Ngoài ra, chiều dài liên kết trong CODV-Ig như được mô tả ở trên được phát hiện thấy là dễ tăng thêm 1 gốc axit amin hơn là tăng 2 gốc axit amin. Ví dụ, trong khi mã lô số 103 và 104 khác nhau 1 gốc axit amin trong L₂, mã lô số 103 cho thấy mức kết tụ lớn

hơn 6 lần và mã lô số 104 có mức kết tụ nhỏ hơn và có hiệu suất lớn hơn gấp 2 lần. Ngược lại, mã lô số 104 và 105, khác nhau hai gốc tron L_2 , có profin hiệu suất, mức kết tụ và liên kết tương tự nhau.

Ví dụ 7. Chuỗi nặng làm chuỗi khuôn mẫu cho CODV-Ig

Trong ví dụ từ 1 đến 5, kích thước ngắn tối ưu của liên kết trên chuỗi nhẹ gợi ý đến việc chuỗi nhẹ này sẽ đóng vai trò làm khuôn mẫu bằng cách giữ lại mô hình sắp xếp thẳng và các liên kết lớn hơn cần có trên chuỗi nặng để chuỗi nặng có thể gấp nếp hợp lý vào trong cấu hình liên kết để phù hợp với chuỗi nhẹ làm khuôn mẫu (xem Fig.5, bảng A). Việc liên kết ngắn được đặt vào vị trí cụ thể trên chuỗi nặng giữ cho mô hình sắp xếp thẳng trên chuỗi nặng để làm cho chuỗi nặng làm chuỗi "khuôn mẫu", và liệu bản thân mô hình này có lặp lại hay không và liên kết lớn hơn có cần thiết để cho phép chuỗi không làm khuôn mẫu gấp nếp hợp lý và đi kèm với chuỗi nặng hiện được dùng làm khuôn mẫu sẽ được đánh giá trong phần tiếp (xem Fig.5, bảng B).

Fig.6 minh họa các nguyên tắc thiết kế CODV-Ig dựa trên chuỗi nhẹ làm khuôn mẫu hoặc chuỗi nặng làm "khuôn mẫu". Để đánh giá bản chất di truyền của khái niệm này, các cấu trúc CODV-Ig được tạo ra có chiều dài liên kết L_3 và L_4 trong chuỗi nặng thay đổi từ 1 đến 8 gốc đối với L_3 và 0 hoặc 1 gốc đối với L_4 . Chuỗi nặng trong kháng thể kháng-IL4 là miền liên kết ở đầu tận cùng N và trong kháng thể kháng-IL13 là miền liên kết ở đầu tận cùng C, theo sau là C_{H1} -Fc. Chiều dài liên kết L_1 và L_2 trong chuỗi nhẹ thay đổi từ 3 đến 12 gốc đối với L_1 và từ 3 đến 14 gốc đối với L_2 . Chuỗi nhẹ trong kháng thể kháng-IL13 là miền liên kết ở đầu tận cùng N và trong kháng-IL4 là miền liên kết ở đầu tận cùng C theo sau là C_{L1} .

Bảng 8 tóm tắt kết quả về hiệu suất, mức độ kết tập (như được xác định bằng SEC) và ái lực liên kết cho CODV-Ig có hai tổ hợp liên kết với kích thước khác nhau và trong đó chuỗi nặng được giữ ở mô hình sắp xếp thẳng dùng làm chuỗi mẫu và chuỗi nhẹ được gấp nếp trong cấu hình liên kết chéo. Các kết quả cho thấy rằng các phân tử CODV-Ig trong đó L_4 bằng 0 thường không thể tạo ra được, hoặc nếu protein được tạo ra thì có mức kết tập cao (tương tự với các phân tử trong đó L_2 bằng 0) (xem mã lô số 207-209, 211-212, 219-224, 231-236, 243-252, và 263-266 trong Bảng 8). Một ngoại lệ đó là mã số lô 210, trong đó L_1 bằng 7, L_2 bằng 5, L_3 bằng 2, và L_4 bằng 0. Mô hình sắp xếp này tạo ra lượng vừa đủ protein có độ kết tập và khả năng liên kết ở mức chấp nhận được, điều này gợi ý rằng một số tổ hợp kích thước của liên kết có thể bù cho liên kết có chiều

dài bằng 0 ở L₄ trong một số trường hợp.

Bảng 8. Tối ưu hóa kích thước của liên kết khi chuỗi nặng dùng làm khuôn mẫu

Mã lô	Liên kết trên HC*	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức kết tập [%]	KD (Kháng nguyên1) IL4 [pM]	KD (Kháng nguyên2) IL13 [pM]
201	IL4 x IL13	5	3	1	2	6,3	12	4	72
202	IL4 x IL13	5	5	1	2	10,5	7,0	9	54
203	IL4 x IL13	7	3	1	2	19,3	9,4	80	46
204	IL4 x IL13	7	5	1	2	15,3	5,2	3	25
205	IL4 x IL13	10	3	1	2	4,7	4,0	8	58
206	IL4 x IL13	10	5	1	2	9,1	3,9	4	58
207	IL4 x IL13	5	3	2	0	6,7	25,3	3	33
208	IL4 x IL13	5	5	2	0	10,2	18,4	10	77
209	IL4 x IL13	7	3	2	0	16,2	22,2	5	47
210	IL4 x IL13	7	5	2	0	14,7	9,7	4	47
211	IL4 x IL13	10	3	2	0	2,1	12,8	7	53
212	IL4 x IL13	10	5	2	0	7,0	36,3	10	29
213	IL4 x IL13	5	3	2	2	4,0	13,2	5	27
214	IL4 x IL13	5	5	2	2	8,0	7,9	10	53
215	IL4 x IL13	7	3	2	2	14,9	11,5	4	50
216	IL4 x IL13	7	5	2	2	7,5	3,6	11	40
217	IL4 x IL13	10	3	2	2	2,4	4,4	8	79
218	IL4 x IL13	10	5	2	2	4,6	6,6	4	36
219	IL4 x IL13	3	6	3	0	2,1	51,8	8	71
220	IL4 x IL13	3	10	3	0	3,9	59,4	1	42
221	IL4 x IL13	3	14	3	0	1,9	57,6	35	81
222	IL4 x IL13	6	6	3	0	4,0	11,8	7	53
223	IL4 x IL13	6	10	3	0	10,3	16,6	6	23
224	IL4 x IL13	6	14	3	0	5,1	13,5	9	52
225	IL4 x IL13	3	6	3	2	2,8	71,6	6	68
226	IL4 x IL13	3	10	3	2	7,3	65,8	6	64
227	IL4 x IL13	3	14	3	2	1,6	53,6	7	39
228	IL4 x IL13	6	6	3	2	4,0	19,1	7	44
229	IL4 x IL13	6	10	3	2	2,2	15,4	3	14
230	IL4 x IL13	6	14	3	2	4,0	16,2	6	76
231	IL4 x IL13	5	3	5	0	n.p.	—	—	—
232	IL4 x IL13	5	5	5	0	0,6	24,9	8	70
233	IL4 x IL13	7	3	5	0	0,4	15,1	3	113
234	IL4 x IL13	7	5	5	0	1,3	30,7	3	122
235	IL4 x IL13	10	3	5	0	0,1	11,3	2	82
236	IL4 x IL13	10	5	5	0	0,4	18,6	11	112
237	IL4 x IL13	5	3	5	2	2,1	45,3	8,1	101,0
238	IL4 x IL13	5	5	5	2	0,6	45,4	9,3	67,2
239	IL4 x IL13	7	3	5	2	n.p.	—	—	—
240	IL4 x IL13	7	5	5	2	1,6	31,7	4	65
241	IL4 x IL13	10	3	5	2	0,2	14,7	7	119
242	IL4 x IL13	10	5	5	2	1,1	17,6	10	37
243	IL4 x IL13	3	6	6	0	1,6	54,3	5	50
244	IL4 x IL13	3	10	6	0	1,5	63,9	10	10

245	IL4 x IL13	3	14	6	0	1,0	61,5	10	69
246	IL4 x IL13	6	6	6	0	1,1	16,2	6	57
247	IL4 x IL13	6	10	6	0	4,7	27,9	2	41
248	IL4 x IL13	6	14	6	0	0,9	18,1	10	79
249	IL4 x IL13	10	6	6	0	0,3	8,7	3	87
250	IL4 x IL13	10	8	6	0	0,7	21,3	8	53
251	IL4 x IL13	12	6	6	0	1,3	9,7	8	70
252	IL4 x IL13	12	8	6	0	1,3	11,7	7	85
253	IL4 x IL13	3	6	6	2	5,1	66,8	6	66
254	IL4 x IL13	3	10	6	2	2,4	62,4	6	80
255	IL4 x IL13	3	14	6	2	2,0	72,1	2	60
256	IL4 x IL13	6	6	6	2	2,0	32,4	4	81
257	IL4 x IL13	6	10	6	2	1,9	29,8	7	30
258	IL4 x IL13	6	14	6	2	2,5	24,6	5	70
259	IL4 x IL13	10	6	6	2	1,4	16,4	8	71
260	IL4 x IL13	10	8	6	2	0,8	16,6	10	71
261	IL4 x IL13	12	6	6	2	1,2	12,3	5	265
262	IL4 x IL13	12	8	6	2	1,1	13,2	4	111
263	IL4 x IL13	10	6	8	0	2,4	10,8	2	74
264	IL4 x IL13	10	8	8	0	0,8	8,0	7	22
265	IL4 x IL13	12	6	8	0	1,0	9,5	8	66
266	IL4 x IL13	12	8	8	0	2,0	9,3	3	69
267	IL4 x IL13	10	6	8	2	1,4	15,0	9	170
268	IL4 x IL13	10	8	8	2	1,0	12,9	4	52
269	IL4 x IL13	12	6	8	2	1,2	8,8	5	66
270	IL4 x IL13	12	8	8	2	2,4	11,7	3	72

* Liên kết trên chuỗi nhẹ phải là IL13V_L-L₁-IL4V_L-L₂-C_{L1}

Các kết quả từ Bảng 7 và 8 cho thấy rõ ràng rằng sự có mặt của liên kết là cần thiết giữa miền biến đổi và miền cố định để gấp nếp tối ưu. Chỉ trong các mô hình sắp xếp hiếm gặp, liên kết có chiều dài bằng 0 mới được dung nhận (xem mã lô số 103-105, trong đó L₁ (LC) bằng 0, và mã lô số 210, trong đó L₄ bằng 0). Tuy nhiên, trong từng trường hợp, liên kết chuyển vị trí tương ứng vùng biến đổi và vùng cố định trên mạch còn lại có thể không bằng 0.

Các kết quả ở trên cho thấy tổ hợp L₁=7, L₂=5, L₃=1, và L₄=2 là điểm bắt đầu tốt để tối ưu CODV-Ig mới, trong đó chuỗi nặng làm khuôn mẫu. Các khoảng trong Bảng 9 được chỉ ra là các khoảng chấp nhận được để xử lý kỹ thuật thành công một CODV-Ig mới từ hai kháng thể gốc.

Bảng 9. Các khoảng của kích thước liên kết cho LC hoặc HC làm khuôn mẫu

Liên kết	LC làm khuôn mẫu		HC làm khuôn mẫu	
	Khoảng lớn nhất	Khoảng nhỏ nhất	Khoảng lớn nhất	Khoảng nhỏ nhất
L ₁	1-3	1-2	3-12	5-10

L ₂	1-4	1-2	3-14	5-8
L ₃	2-15	4-12	1-8	1-5
L ₄	2-15	2-12	1-3	1-2

Ví dụ 8. Khả năng áp dụng phổ biến của dạng CODV-Ig

Để đánh giá tính thích hợp của dạng CODV-Ig để xử lý kỹ thuật một protein liên kết giống kháng thể mới, vùng biến đổi từ rất nhiều kháng thể người và kháng thể được nhân hóa đang được biết đến có thể có tính đặc hiệu với thụ thể yếu tố sinh trưởng giống insulin 1 (insulin-like growth factor 1 receptor - IGF1R(1)), kháng thể thứ hai của thụ thể yếu tố sinh trưởng giống insulin (insulin-like growth factor 1 receptor - IGF1R(2)), thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì người 2 (human epidermal growth factor receptor 2 - HER2), thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor - EGFR), yếu tố hoại tử u alpha (tumor necrosis factor - alpha - TNF α), Interleukin 12 và 23 (IL-12/23) và interleukin 1beta (IL-1 β) được kết hợp vào trong dạng CODV-Ig (xem Bảng 10).

Bảng 10. Mã mô tả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được dùng trong CODV-Ig đặc hiệu kép

Mã*	Các chuỗi nặng (từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C)	SEQ ID NO:
HC10	IGF1R(1) V _H -(Gly)-HER2 V _H -(Gly2)-C _{HI} -Fc	32
HC11	HER2 V _H -(Gly)- IGF1R(1) V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	33
HC12	IGF1R(2) V _H -(Gly)-EGFR V _H -(Gly2)-C _{HI} -Fc	34
HC13	EGFR V _H -(Gly)- IGF1R(2) V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	35
HC14	TNF α V _H -(Gly)-IL12/23 V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	36
HC15	IL12/23 V _H -(Gly)-TNF α V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	37
HC16	TNF α V _H -(Gly)-IL1 β V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	38
HC17	IL1 β V _H -(Gly)-TNF α V _H -(Gly2)- C _{HI} -Fc	39
Mã*	Các chuỗi nhẹ (từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C)	
LC10	HER2 V _L -(Gly7)-IGF1R(1) V _L -(Gly5)-C _{LI}	40
LC11	IGF1R(1) V _L -(Gly7)- HER2 V _L -(Gly5)- C _{LI}	41
LC12	EGFR V _L -(Gly7)-IGF1R(2) V _L -(Gly5)-C _{LI}	42
LC13	IGF1R(2) V _L -(Gly7)- EGFR V _L -(Gly5)- C _{LI}	43
LC14	IL12/23 V _L -(Gly7)- TNF α V _L -(Gly5)-C _{LI}	44
LC15	TNF α V _L -(Gly7)- IL12/23 V _L -(Gly5)- C _{LI}	45
LC16	IL1 β V _L -(Gly7)- TNF α V _L -(Gly5)-C _{LI}	46
LC17	TNF α V _L -(Gly7)- IL1 β V _L -(Gly5)-C _{LI}	47
C _{LI}	miền cố định C _{LI} của chuỗi nhẹ ở người	23
C _{HI} -Fc	miền cố định C _{HI} của chuỗi nặng ở người và vùng Fc	24
Gly4	liên kết peptit với 4 glyxin (GGGG)	25
Gly5	liên kết peptit với 5 glyxin (GGGGG)	26
Gly6	liên kết peptit với 6 glyxin (GGGGGG)	27
Gly7	liên kết peptit với 7 glyxin (GGGGGGG)	28
Gly8	liên kết peptit với 8 glyxin (GGGG GGGG)	29

* Mã viết tắt tiếp tục được sử dụng để thể hiện cấu trúc kết hợp. Các mã bắt đầu bằng HC là các chuỗi nặng liên kết và các mã bắt đầu bằng LC là các chuỗi nhẹ liên kết.

Các vùng biến đổi của kháng thể từ kháng thể người và được nhân hóa đã biết được dùng để thử nghiệm khả năng áp dụng phổ biến của dạng CODV-Ig trong việc thiết kế protein liên kết giống kháng thể đặc hiệu kép. Ngoài ra, khả năng ảnh hưởng của vị trí đến vị trí của vùng biến đổi của các kháng thể nhất định ở đầu tận cùng N hoặc ở đầu tận cùng C trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cũng được đánh giá. Dựa trên thiết kế của các phân tử CODV-Ig có thành phần liên kết của $L_1=7$, $L_2=5$, $L_3=1$, và $L_4=2$, các trình tự khác nhau của kháng thể được đưa vào dạng CODV-Ig.

Hoạt tính của kháng thể đặc hiệu kép hoặc dẫn xuất của nó kháng IL1 β và TNF α được xác định bằng cách sử dụng tế bào thông báo TNF α /IL1 β HEK-Blue mua được trên thị trường. Để xác định hoạt tính của kháng thể kháng TNF α và IL1 β , các xytokin này được ủ trước trong 1 giờ với các kháng thể ở các nồng độ khác nhau và bổ sung vào 50,000 tế bào TNF α /IL1 β HEK Blue. Mức cảm ứng qua trung gian xytokin của SEAP được đo sau 24 giờ trong dịch nổi nuôi cấy bằng thử nghiệm QUANTI-Blue (InvivoGen).

Như được thể hiện trong Bảng 11, tất cả các cấu trúc đều có hiệu suất thu protein từ tốt đến tuyệt vời và có mức kết tập chấp nhận được (*xem*, cụ thể, mã lô số 301 và 302 trong Bảng 11). Ái lực đo được cho mỗi miền biến đổi của kháng thể nằm trong khoảng ái lực đã công bố hoặc được mong đợi. Trong các trường hợp ái lực được đánh giá, không phát hiện thấy ảnh hưởng vị trí. Tóm lại, như được nêu trong bảng dưới đây, ảnh hưởng vị trí không quan sát thấy với miền biến đổi bất kỳ của kháng thể được dùng hoặc khi sử dụng các miền này trên chuỗi kháng thể.

Bảng 11. Sử dụng phổ biến dạng CODV-Ig choprotein liên kết giống kháng thể đặc hiệu kép

Mã lô số ¹ DC/LC	Liên kết trên HC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (Kháng nguyên 1) [pM]	KD (Kháng nguyên 2) [pM]	IC50 [pM] Thử nghiệm tế bào của TNF α
301 HC10/LC10	IGF1R(1) x HER2	7	5	1	2	70	5,9	n.m.	153 (HER2)	–
302 HC11/LC11	HER2 x IGF1R(1)	7	5	1	2	60	1,8	163 (HER2)	n.m.	–
303 HC12/LC12	IGF1R(2) x EGFR	7	5	1	2	17	2,7	n.m.	–	–
304 HC13/LC13	EGFR x IGF1R(2)	7	5	1	2	9.5	4,3	–	n.m.	–
305 HC14/LC14	TNF α x IL12/23	7	5	1	2	7.1	7,5	321 (TNF α)	65 (IL23)	95
306 HC15/LC15	IL12/23 x TNF α	7	5	1	2	11.9	7,1	118 (IL23)	543 (TNF α)	138
307 HC16/LC16	TNF α x IL1 β	7	5	1	2	6.6	13,6	340 (TNF α)	155 (IL1 β)	136
308 HC17/LC17	IL1 β x TNF α	7	5	1	2	2.4	5,7	97.5 (IL1 β)	358 (TNF α)	138

*n.m.= không xác định được bằng Biacore.

¹ – Các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng với các mã có thể tìm thấy được trong Bảng 10.

Ví dụ 9. Giữ lại ái lực của kháng thể gốc trong dạng CODV-Ig

Các trình tự kháng thể giống nhau cho kháng thể kháng-IL4 và kháng-IL13 được kết hợp vào dạng TBTI/DVD-Ig hoặc CODV-Ig nhằm so sánh trực tiếp các cấu hình này, vị trí của liên kết, và ái lực của các phân tử thu được. Như được thể hiện trong Fig.7, ái lực ban đầu (gốc) của từng kháng thể đều được giữ lại ở dạng CODV. Như được thấy trong bảng phía trên của Fig.7, khi vùng biến đổi được đặt ở dạng TBTI/DVD-Ig, hiện tượng giảm ái lực của kháng thể IL4 nằm ở vị trí Fv2 bên trong là biểu hiện của hiện tượng giảm tốc độ kết hợp của kháng thể liên kết với kháng nguyên. Ngược lại, không có hiện tượng mất ái lực đối với dạng CODV-Ig so với các kháng thể gốc (*xem* Fig.7, bảng phía dưới).

Ví dụ 10. Khả năng thay đổi của dạng CODV-Ig thành dạng Fab

Tiếp theo, khả năng tạo ra các mảnh như mảnh Fab của dạng CODV-Ig được đánh giá. Hai vùng biến đổi của chuỗi nặng khác nhau được dung hợp với nhau thông qua liên kết L_3 và kéo dài ở đầu tận cùng C bằng liên kết L_4 . Phức V_H này sau đó được dung hợp với miền C_{H1} của IGHG1 (số truy cập ngân hàng gen Q569F4) mang trình tự năm axit amin DKTHT (SEQ ID NO: 60) ở đầu tận cùng C từ vùng bản lề, theo sau là 6 gốc histidin. Hai vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được dung hợp với nhau trong cấu hình liên kết chéo với chuỗi nặng tương ứng thông qua liên kết L_1 và kéo dài ở đầu tận cùng C bằng liên kết L_2 và sau đó, dung hợp với chuỗi cố định kappa (IGKC, số truy cập ngân hàng gen Q502W4).

Các mảnh Fab được biểu hiện bằng cách chuyển nhiễm tạm thời như được mô tả ở trên. Bảy ngày sau khi gây nhiễm, các tế bào này được loại bỏ bằng cách ly tâm, 10% thể tích/thể tích Tris-HCl 1M, độ pH=8,0, được bổ sung vào và dịch nổi được lọc qua bộ lọc 0,22 μ m để loại bỏ các hạt. Các mảnh Fab được bắt giữ sử dụng cột hiệu năng cao HisTrap (GE Healthcare) và rửa giải bằng gradient của imidazol. Các phần chứa protein được gom lại và loại muối sử dụng cột PD-10 hoặc Sephadex. Các dung dịch protein đã cô và lọc vô trùng (0,22 μ m) được điều chỉnh về 1 mg/ml và giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng.

Các ưu điểm trực tiếp được quan sát thấy đó là các phân tử giống Fab ở dạng CODV cho thấy không có xu hướng kết tập và giữ được ái lực của kháng thể gốc (*xem* Bảng 12). Các cấu trúc protein liên kết từ mã lô số 401-421 được so sánh trực tiếp với các protein giống kháng thể trong đó các vùng biến đổi của kháng thể được sắp xếp như trong phân tử CODV-Ig với chuỗi nặng làm khuôn mẫu (401, 402, 406, và 407), các mảnh giống Fab

CODV (402, 408, 413, 418, và 421), các phân tử giống kháng thể có 4 miền ở dạng TBTI/DVD-Ig (404, 409, 414, và 419), và CODV-Ig không có liên kết (405, 410, 415, và 420). Như được thể hiện trong Bảng 12, các kết quả so sánh cho thấy chắc chắn có hiện tượng mất ái lực so với các kháng thể gốc khi vùng biến đổi được kết hợp vào TBTI hoặc DVD-Ig. Ngược lại, cả các dạng giống Fab CODV-Ig lẫn CODV-Ig đều tốt hơn và có khả năng giữ được ái lực của kháng thể gốc. Các kết quả này còn khẳng định rằng các phân tử CODV-Ig cần phải có liên kết giữa vùng biến đổi và giữa vùng biến đổi và các miền cố định (xem Bảng 12).

Bảng 12. Sử dụng dạng CODV-Ig cho các mảnh giống Fab

Mã lô	Mã mẫu	Dạng	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (Kháng nguyên 1) [pM]	KD (Kháng nguyên 2) [pM]	IC50 [pM] Thử nghiệm tế bào TNF α
401	TNF α x IL12/23	CODV-Ig	7	5	1	2	7,1	7,5	321 (TNF α)	90 (IL23)	95
402	IL12/23 x TNF α	CODV-Ig	7	5	1	2	11,9	7,1	118 (IL23)	543 (TNF α)	138
403	TNF α x IL12/23	CODV-Fab	7	5	1	2	18,7	1,7	232 (TNF α)	41 (IL23)	785
404	TNF α x IL12/23	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	26,0	8,7	219 (TNF α)	399 (IL23)	—
405	TNF α x IL12/23	CODV-Ig	0	0	0	0	3,5	71	—	—	—
406	IL1 β x TNF α	CODV-Ig	7	5	1	2	2,4	5,7	98 (IL1 β)	358 (TNF α)	139
407	TNF α x IL1 β	CODV-Ig	7	5	1	2	6,6	13,6	340 (TNF α)	155 (IL1 β)	122
408	IL1 β x TNF α	CODV-Fab	7	5	1	2	8,6	0	179 (IL1 β)	—	—
409	IL1 β x TNF α	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	1,3	40,5	133 (IL1 β)	456 (TNF α)	—
410	TNF α x IL1 β	CODV-Ig	0	0	0	0	n.p.	—	—	—	—
411	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Ig	7	5	1	2	9,5	4,3	124nM (EGFR)	n.m.	—
412	IGF1R(2) x EGFR	CODV-Ig	7	5	1	2	17	2,7	n.m.	—	—
413	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Fab	7	5	1	2	13,3	0	42nM (EGFR)	n.m.	—
414	EGFR x IGF1R(2)	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	2,1	2,9	7nM (EGFR)	n.m.	—
415	EGFR x IGF1R(2)	CODV-Ig	0	0	0	0	4,4	100	—	—	—
416	HER2 x IGF1R(1)	CODV-Ig	7	5	1	2	60,0	1,8	163 (HER2)	n.m.	—
417	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	7	5	1	2	70	5,9	n.m.	41 (HER2)	—
418	HER2 x IGF1R(1)	CODV-Fab	7	5	1	2	34,4	0	190 (HER2)	n.m.	—
419	HER2 x IGF1R(1)	TBTI	(G4S)2	0	(G4S)2	0	6,3	6,8	56 (HER2)	n.m.	—
420	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	0	0	0	0	0,35	54,5	—	—	—
421	IL4 x IL13	CODV-Fab	7	5	1	2	8,7	14	12 (IL4)	48 (IL13)	—

Ví dụ 11. Thay thế miền biến đổi trong CODV-Ig và CODV-Fab

Để phân tích đặc tính của dạng CODV trong nghiên cứu tiếp hợp tế bào T, protein liên kết giống Fab CODV đặc hiệu kép (CODV-Fab) có vị trí liên kết TCR (CD3epsilon) và vị trí liên kết CD19 được tạo ra và so sánh với Fab đặc hiệu kép thu được từ dạng TBTI/DVD-Ig (B-Fab). Để nghiên cứu tầm quan trọng của hướng của vị trí liên kết (TCR x CD19 so với CD19 x TCR), cả hai hướng đều được đánh giá cho từng protein liên kết.

Các protein liên kết được phân tích đặc tính trong thử nghiệm gây độc tế bào sử dụng các tế bào NALM-6 (biểu hiện CD19) làm các tế bào đích và các tế bào T người dùng làm các tế bào tác động. Các tế bào dương tính CD3 được phân lập từ PBMC người vừa mới chuẩn bị. Các tế bào tác động và tế bào đích được trộn với nhau theo tỷ lệ 0:1 và ủ trong 20 giờ với protein liên kết đặc hiệu kép ở nồng độ đã chỉ định (*xem Fig.8*). Các tế bào đích chết theo chương trình được xác định trong thử nghiệm dựa trên FACS sử dụng màu nhuộm 7-Aminoactinomycin.

Dạng B-Fab trong cấu hình CD3-CD19 (1060) được chỉ ra là có hoạt tính trong tạo ra tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào T hướng về phía các tế bào NALM-6 với $EC_{50} = 3,7$ ng/ml. Hoạt tính cao tương tự được quan sát thấy đối với CD19-CD3 CODV-Fab (1109) với EC_{50} bằng 3,2 ng/ml (*xem Fig.8*).

Khả năng hoán đổi của cấu hình của phân tử B-Fab (Fab của dạng TBTI / DVD-Ig) theo hướng CD19-CD3 làm giảm đáng kể hoạt tính (*xem Fig.8*). Phân tử đã hoán đổi không có hoạt tính ở nồng độ lớn nhất đối với hai hướng CODV-Ig Fab và hướng khác của B-Fab. Đối với các CODV-Ig Fab và một hướng của B-Fab, đáp ứng tối đa quan sát được (nằm trong khoảng từ 1 đến 100 ng/ml). Đối với hướng CD19-CD3 của B-Fab, ngay cả ở nồng độ lớn nhất (30 μ g/ml), cũng không đạt được đáp ứng gây độc tế bào tối ưu. Như vậy có sự trái ngược hoàn toàn, sự thay đổi hướng về phía CD3-CD19 (1108) của các miền trong CODV-Fab, tạo cho phân tử hoạt tính đáng kể trong thử nghiệm này (*xem Fig.8*). Mặc dù sự hoán đổi miền trong CODV-Fab cũng làm giảm độc tính tế bào tạo ra qua trung gian tế bào T (làm tăng EC_{50} với hệ số ~ 100) nhưng ảnh hưởng này được thông báo là ít hơn nhiều so với mức quan sát được ở dạng B-Fab và phân tử này có khả năng gây độc tế bào lên mức tối đa. Số liệu này là số liệu đại diện và thu được từ ba thử nghiệm độc lập.

Ví dụ 12. Ảnh hưởng của tính giống nhau về mặt trình tự axit amin đến liên kết của CODV-

Ig

Cấu trúc được tối ưu hóa tương ứng với mã lô số 204 (xem Ví dụ 7 và Bảng 8) được chọn để nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần liên kết đến liên kết từ L_1 đến L_4 . Chiều dài liên kết lần lượt được đặt là 7, 5, 1, và 2 gốc đối với L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 (xem Bảng 13). Các trình tự thử nghiệm thu được từ các liên kết xuất hiện trong tự nhiên ở vị trí chuyển đổi giữa miền V_H và C_{H1} trong kháng thể tự nhiên hoặc giữa miền F_v và C_L của chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda của kháng thể. Trình tự thử nghiệm là ASTKGPS (SEQ ID NO: 48), thu được từ việc chuyển đổi vị trí miền V_H và C_{H1} , RTVAAPS (SEQ ID NO: 49) và GQPKAAP (SEQ ID NO: 50), thu được từ việc chuyển đổi miền F_v và C_L của chuỗi nhẹ kappa và lambda, tương ứng. Ngoài ra, một cấu trúc được tạo ra có thành phần liên kết tùy ý cho thấy rằng trình tự bất kỳ có thể được sử dụng trong các liên kết từ L_1 đến L_4 . Thành phần liên kết này thu được bằng cách phân bố ngẫu nhiên các axit amin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin, lysin, arginin, histidin, aspartat, glutamat, asparagin, glutamin, glyxin, và prolin ở 15 vị trí của bốn liên kết. Các axit amin thơm phenylalanin, tyrosin, và tryptophan, cũng như các axit amin methionin và xystein được loại bỏ một cách thận trọng để tránh khả năng làm tăng mức độ kết tập.

Mô hình ba chiều của cấu trúc cho mã lô số 204 được tạo ra để đảm bảo tính thích hợp và tinh chỉnh việc lựa chọn thành phần liên kết. Do đó, serin được chọn cho liên kết L_3 khi gốc mang điện âm và dương được quan sát thấy gần trong mô hình ba chiều. Các gốc này trong liên kết L_4 được chọn tương hợp với sự tiếp xúc với dung môi ở các vị trí này như được gợi ý bởi mô hình này. Tương tự, thành phần liên kết của L_1 và L_2 cũng không được phỏng đoán. Mô hình ba chiều của các đề xuất đã chọn cho thành phần liên kết cũng được xây dựng.

Như được thấy trong Bảng 12, thành phần liên kết có thể có ảnh hưởng mạnh đến hiệu suất. Các trình tự thu được từ chuỗi lambda trên L_1 (so sánh mã lô số 505-507 với mã lô số 501-503) là các trình tự tạo protein hữu ích hơn (tăng tới 8 lần). Thực vậy, các liên kết được tạo ra ngẫu nhiên cũng có hiệu suất tốt, như được thể hiện trong Bảng 13, mã lô số 508. Do đó, thành phần liên kết là một thông số cần được đánh giá khi tối ưu hóa CODV-Ig.

Bảng 13. Ảnh hưởng của thành phần liên kết đến CODV-Ig

Mã lô	Liên kết trên HC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 Thử nghiệm tế bào IL4 [nM]	IC50 Thử nghiệm tế bào IL13 [nM]
501	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	10,8	1,2	1	55	0,034	4,5
502	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	QP	15,8	2,9	3	61	0,049	2,4
503	IL4 x IL13	ASTKGPS (SEQ ID NO: 48)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	SS	11,6	3,5	3	52	0,047	2,1
504	IL4 x IL13	RTVAAPS (SEQ ID NO: 49)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	TK	15	1,9	8	71	0,042	1,4
505	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TKGPS (SEQ ID NO: 52)	S	RT	71,7	1,9	6	68	0,033	0,9
506	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	TVAAP (SEQ ID NO: 53)	S	TK	49,3	1,7	7	55	0,045	1,8
507	IL4 x IL13	GQPKAAP (SEQ ID NO: 50)	QPKAA (SEQ ID NO: 54)	S	RT	62,4	2	1	69	0,040	2,0
508	IL4 x IL13	HIDSPNK (SEQ ID NO: 51)	QRIEG (SEQ ID NO: 55)	V	SL	37,7	2,1	1	44	0,054	1,3

Hoạt tính của các kháng thể đặc hiệu kép hoặc dẫn xuất của nó kháng xytokin IL4 và IL13 được xác định bằng các tế bào thông báo HEK- Blue IL-4/IL-13 (InvivoGen) mua được trên thị trường. Các tế bào HEK-Blue IL-4/IL-13 này được thiết kế để theo dõi sự hoạt hóa của con đường STAT6 bởi IL-4 hoặc IL13. Việc kích thích các tế bào này bằng các xytokin sẽ tạo ra việc sản xuất phosphatase kiềm phôi tiết các gen thông báo (reporter gene secreted embryonic alkaline phosphatase - SEAP), mà có thể được xác định trong dịch nổi tế bào bằng thử nghiệm QUANTI-Blue. Để thử nghiệm hoạt tính của kháng thể kháng IL4 hoặc IL13, các xytokin này được ủ trước trong 1 giờ với kháng thể ở các nồng độ khác nhau và được bổ sung vào 50,000 tế bào HEK-Blue IL-4/IL-13. Việc tạo ra SEAP qua trung gian xytokin được xác định sau 24 giờ ủ trong dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng thử nghiệm QUANTI-Blue (InvivoGen).

Ví dụ 13. Đưa các gốc xystein vào trong các liên kết của CODV-Ig

Các số liệu đã công bố gợi ý rằng độ ổn định của kháng thể và protein thu được từ kháng thể có thể tăng lên bằng cách đưa thêm vào các cầu disulfua không có trong tự nhiên (xem tài liệu: Wozniak-Knopp *et al.*, 2012, "Stabilisation of the Fc Fragment of Human IgG1 by Engineered Intradomain Disulfide Bonds," *PLoS ONE* 7(1): e30083). Để xác định xem liệu mảnh Fc tương đương thu được từ kháng thể IgG1 ở người và được xử lý kỹ thuật vào trong phân tử CODV-Ig có thể được làm ổn định bằng cách đưa thêm vào các cầu disulfua liên chuỗi và nội chuỗi, các vị trí Fc tương đương của cấu trúc CODV-Ig Mã lô số 204 (từ Ví dụ 7) được đột biến gốc xystein, và protein đột biến này được sản xuất quá mức, tinh chế và phân tích đặc tính (xem Bảng 14).

Như được nêu trong Bảng 14, từng trong số các phân tử CODV-Ig được đột biến chứa gốc xystein bổ sung có nhiệt độ nóng chảy bằng nhiệt độ nóng chảy của cấu trúc CODV-Ig có mã lô số 204.

Ngoài ra, hai gốc xystein đồng thời được đưa vào ở vị trí Kabat 100 đối với chuỗi nhẹ và 44 đối với chuỗi nặng trên mỗi miền biến đổi như được mô tả trong tài liệu: Brinkmann *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7538-42. Các vị trí này đã được chỉ ra là bảo toàn cấu trúc trong các nếp gấp kháng thể, và do đó, việc chấp nhận sự thay thế xystein không tác động đến khả năng thu nhận của từng miền riêng lẻ.

Như được chỉ ra trong Bảng 15, các cấu trúc CODV và CODV-Ig trong đó gốc

xysteine được đưa vào vị trí Kabat 100 đối với chuỗi nhẹ và 44 đối với chuỗi nặng trên mỗi miền biến đổi có nhiệt độ nóng chảy cao hơn các cấu trúc CODV và CODV-Ig, trong đó gốc xysteine không được đưa vào ở các vị trí này (xem, ví dụ, mã lô số 704 và 706 và mã lô số 713 và 714).

1. Các phép đo tính ổn nhiệt của biến thể CODV và TBTI

Các điểm nóng chảy (T_m) của biến thể CODV và TBTI được xác định sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi phân (differential scanning fluorimetry - DSF). Các mẫu được pha loãng trong đệm D-PBS (Invitrogen) đến nồng độ cuối cùng bằng 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ và bổ sung vào 2 μl dung dịch cô đặc 40x của thuốc nhuộm SYPRO-Orange (Invitrogen) trong D-PBS trong các đĩa 96 lỗ bán trụ. Tất cả các phép đo được tiến hành làm hai bản sao sử dụng thiết bị PCR theo thời gian thực MyiQ2 (Biorad). Giá trị T_m bằng âm của đạo hàm bậc một của đường cong nhiệt độ nóng chảy iQ5 Software v2.1.

Tiếp theo, tác dụng của việc đưa gốc xystein trực tiếp vào các liên kết hoặc trong vùng biến đổi được xem xét. Trong ví dụ này, mã lô số 204 (từ Ví dụ 7 và Bảng 8) được sử dụng làm mô hình protein liên kết CODV-Ig, và xystein được thay thế cho glyxin trong L_1 , L_3 , hoặc vùng biến đổi dựa trên mô hình ba chiều. Như được nêu trong Bảng 16 dưới đây, các kết quả thể hiện mức độ ảnh hưởng đến hiệu suất và mức độ kết tập khi đưa cặp gốc xysteine vào. Tất cả các đột biến có thể đều được mô hình hóa để đảm bảo rằng liên kết disulfua được tạo ra một cách hợp lý và hình học chính xác được giữ lại cho liên kết và môi trường của chúng trong mô hình. Tuy nhiên, mã lô số 808 có hiệu suất tốt và mức độ kết tập ít, do đó gợi ý rằng cầu xystein phù hợp có thể đã được tạo ra.

Khi sáng chế được mô tả bằng phương án khác nhau, cần hiểu rằng các cải biến và thay đổi sẽ được người trong lĩnh vực kỹ thuật này tính đến. Do đó, các tác giả sáng chế dự định rằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm sẽ bao gồm tất cả các cải biến tương đương nằm trong phạm vi của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Ngoài ra, các phần tiêu đề được dùng ở đây chỉ nhằm mục đích trình bày và không được hiểu là giới hạn đối tượng được mô tả.

Mỗi phương án ở đây được mô tả có thể kết hợp với phương án bất kỳ khác hoặc các phương án bất kỳ khác trừ khi được thể hiện không giống như vậy. Cụ thể, đặc tính hoặc các đặc tính hoặc phương án hoặc các phương án được thể hiện dưới dạng được ưu tiên hoặc có

ưu điểm, trừ khi được thể hiện rõ ràng theo cách khác.

Tất cả các tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Bảng 14. Ảnh hưởng của việc làm ổn định cầu disulfua đến CODV-Ig

Mã lô	Liên kết trên HC	Các đột biến được đưa vào IGHG1	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	IC50 của thử nghiệm tế bào IL4 [nM]	IC50 của thử nghiệm tế bào IL13 [nM]	T _m [°C]
601	IL4 x IL13	P344C & A432C	7	5	1	2	21,6	0,9	n.d.	n.d.	0,032	1,7	64
602	IL4 x IL13	S376C & P397C	7	5	1	2	13,9	0,8	10	100	0,034	1,5	64
603	IL4 x IL13	P446G447 đến G446E447C448	7	5	1	2	15,7	1,3	4	64	0,036	1,4	64

Bảng 15. Ảnh hưởng của việc làm ổn định cầu disulfua đến CODV-Ig

Mã lô	Liên kết trên HC	Dạng	Các đột biến được đưa vào LC	Các đột biến được đưa vào HC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (Kháng nguyên 1) [pM]	KD (Kháng nguyên 2) [pM]	T _m [°C]
704	IL13 x IL4	CODV	–	–	7	5	1	2	15,3	5,2	3	25	64
706	IL4 x IL13	CODV	G100C & G100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3,2	17,7	8	61	68
713	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	–	–	7	5	1	2	60	1,8	163 (HER2)	–	64
714	IGF1R(1) x HER2	CODV-Ig	G100C & Q100C	G44C & G44C	7	5	1	2	3,4	7,9	362 (HER2)	–	68

Bảng 16A. Ảnh hưởng của việc làm ổn định cầu disulfua đến CODV-Ig

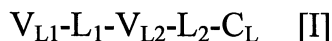
Mã lô	Liên kết trên HC	Các đột biến được đưa vào LC	Các đột biến được đưa vào HC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	Hiệu suất [mg/L]	Mức độ kết tập [%]	KD (IL4) [pM]	KD (IL13) [pM]	Tm
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	15,3	5,2	3	25	64
802	IL4 x IL13	G114C	Q43C	GGCGGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	3,0	11,3	6	34	64
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	4,0	9,4	6	20	63
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 58)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	11,1	9,6	2	33	64
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 59)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	5,8	10,6	7	45	64
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	n.p.	–	–	–	–
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	7,5	27,9	2	202	66
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	1,1	5,8	5	70	64
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	8,7	6,9	6	81	65

Bảng 16B. Ảnh hưởng của việc làm ổn định cầu disulfua đến CODV-Ig

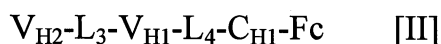
Mã lô	Liên kết trên HC	Các đột biến được đưa vào LC	Các đột biến được đưa vào HC	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	IC50 của thử nghiệm tế bào IL4 [nM]	IC50 của thử nghiệm tế bào IL13 [nM]
801	IL4 x IL13			7	5	1	2	0,045	1,8
802	IL4 x IL13	G114C	Q43C	GGCGGGG (SEQ ID NO: 56)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,027	1,2
803	IL4 x IL13	G115C	Q43C	GGCGGGG (SEQ ID NO: 57)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,036	1,5
804	IL4 x IL13	G116C	Q43C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 58)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,040	1,8
805	IL4 x IL13	G117C	Q43C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 59)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,047	1,9
806	IL4 x IL13	S60C	S122C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	–	–
807	IL4 x IL13	S60C	S123C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,048	10,1
808	IL4 x IL13	S60C	G124C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	C	GG	0,023	3,8
809	IL4 x IL13	G61C	S122C	GGGCGGG (SEQ ID NO: 28)	GGGGG (SEQ ID NO: 26)	G	GG	0,035	2,8

Yêu cầu bảo hộ

1. Protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

trong đó:

L_1 có chiều dài từ 3 đến 12 gốc axit amin;

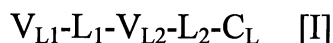
L_2 có chiều dài từ 3 đến 14 gốc axit amin;

L_3 có chiều dài từ 1 đến 8 gốc axit amin; và

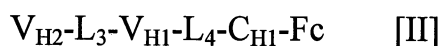
L_4 có chiều dài từ 1 đến 3 gốc axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

2. Protein liên kết giống kháng thể bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;
 V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;
 V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;
 V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;
 C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;
 C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;
 L_1, L_2, L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

trong đó:

L_1 có chiều dài từ 3 đến 12 gốc axit amin;
 L_2 có chiều dài từ 3 đến 14 gốc axit amin;
 L_3 có chiều dài từ 1 đến 8 gốc axit amin; và
 L_4 có chiều dài từ 1 đến 3 gốc axit amin;

và trong đó các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

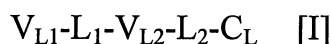
3. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó

L_1 có chiều dài từ 5 đến 10 gốc axit amin;
 L_2 có chiều dài từ 5 đến 8 gốc axit amin;
 L_3 có chiều dài từ 1 đến 5 gốc axit amin; và
 L_4 có chiều dài từ 1 đến 2 gốc axit amin.

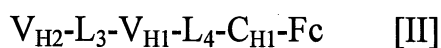
4. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

L_1 có chiều dài 7 gốc axit amin;
 L_2 có chiều dài 5 gốc axit amin;
 L_3 có chiều dài 1 gốc axit amin; và
 L_4 có chiều dài 2 gốc axit amin.

5. Protein liên kết giống kháng thể bao gồm bốn chuỗi polypeptit tạo ra bốn vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và hai chuỗi polypeptit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

Fc là vùng bản lề của globulin miễn dịch và C_{H2} , C_{H3} là các miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch; và

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

trong đó:

L_1 có chiều dài từ 1 đến 3 gốc axit amin;

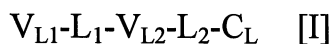
L_2 có chiều dài từ 1 đến 4 gốc axit amin;

L_3 có chiều dài từ 2 đến 15 gốc axit amin; và

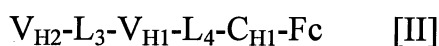
L_4 có chiều dài từ 2 đến 15 gốc axit amin;

và trong đó các polypeptit có công thức I và các polypeptit có công thức II tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

6. Protein liên kết giống kháng thể bao gồm hai chuỗi polypeptit tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



và chuỗi polypeptit thứ hai có cấu trúc được thể hiện bằng công thức:



trong đó:

V_{L1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{L2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

V_{H1} là miền biến đổi thứ nhất của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

V_{H2} là miền biến đổi thứ hai của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

C_L là miền cố định của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch;

C_{H1} là miền cố định C_{H1} của chuỗi nặng của globulin miễn dịch;

L_1 , L_2 , L_3 , và L_4 là các liên kết axit amin;

trong đó:

L_1 có chiều dài từ 1 đến 3 gốc axit amin;

L_2 có chiều dài từ 1 đến 4 gốc axit amin;

L_3 có chiều dài từ 2 đến 15 gốc axit amin; và

L_4 có chiều dài từ 2 đến 15 gốc axit amin;

và trong đó các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo ra cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng liên kết chéo.

7. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm 5 hoặc 6, trong đó:

L_1 có chiều dài từ 1 đến 2 gốc axit amin;

L_2 có chiều dài từ 1 đến 2 gốc axit amin;

L_3 có chiều dài từ 4 đến 12 gốc axit amin; và

L_4 có chiều dài từ 2 đến 12 gốc axit amin.

8. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm 5 hoặc 6, trong đó:

L_1 có chiều dài 1 axit amin;

L_2 có chiều dài 2 gốc axit amin;

L_3 có chiều dài 7 gốc axit amin; và

L_4 có chiều dài 5 gốc axit amin.

9. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6, trong đó protein liên kết này có khả năng liên kết đặc hiệu với một hoặc nhiều đích kháng nguyên, trong đó, tốt hơn nếu một hoặc nhiều đích kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm B7.1, B7.2, BAFF, BlyS, C3, C5, CCL11 (eotaxin), CCL15 (MIP-1d), CCL17 (TARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, CCL24 (MPIF-2/eotaxin-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxin-3), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CD3, CD19, CD20, CD24, CD40, CD40L, CD80, CD86, CDH1 (E-cadherin), Chitinaza, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTLA4, CX3CL1 (SCYD1), CXCL12 (SDF1), CXCL13, EGFR, FCER1A, FCER2, HER2, IGF1R, IL-1, IL-12, IL13, IL15, IL17, IL18, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL9, IL12/23, IL22, IL23, IL25, IL27, IL35, ITGB4 (b 4 integrin), LEP (leptin), MHC nhóm II, TLR2, TLR4, TLR5, TNF, TNF α , TNFSF4 (phối tử OX40), TNFSF5 (phối tử CD40), các thụ thể giống Toll, TREM1, TSLP, TWEAK, XCR1 (GPR5/CCXCR1), DNGR-1(CLEC91), và HMGB1.

10. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6, trong đó protein liên kết này có tính đặc hiệu kép và có khả năng liên kết với hai đích kháng nguyên khác nhau, trong đó tốt hơn nếu hai đích kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm IL4 và IL13, IGF1R và HER2, IGF1R và EGFR, EGFR và HER2, BK và IL13, PDL-1 và CTLA-4, CTLA4 và MHC nhóm II, IL-12 và IL-18, IL-1 α và IL-1 β , TNF α và IL12/23, TNF α và IL-12p40, TNF α và IL1 β , TNF α và IL-23, và IL17 và IL23.
11. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6, trong đó protein liên kết này có khả năng ức chế chức năng của một hoặc nhiều đích kháng nguyên.
12. Protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6, trong đó ít nhất một trong số các liên kết được chọn từ nhóm bao gồm L₁, L₂, L₃, và L₄ chứa ít nhất một gốc xystein.
13. Phân tử axit nucleic phân lập được bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6.
14. Vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 13.
15. Tế bào chủ phân lập được bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 13 hoặc vector biểu hiện theo điểm 14, trong đó tốt hơn nếu tế bào chủ này là tế bào động vật có vú hoặc tế bào côn trùng.
16. Dược phẩm bao gồm chất mang dược dụng và lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết giống kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2, 5 hoặc 6.

FIG. 1

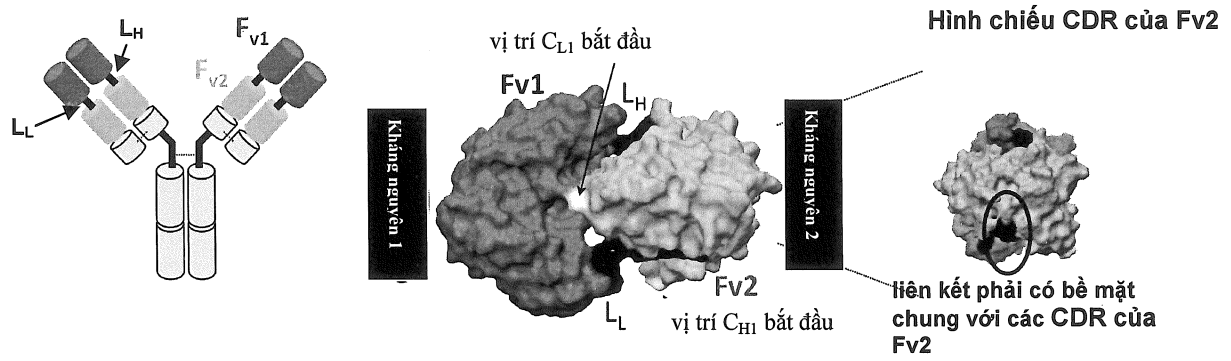


FIG. 2

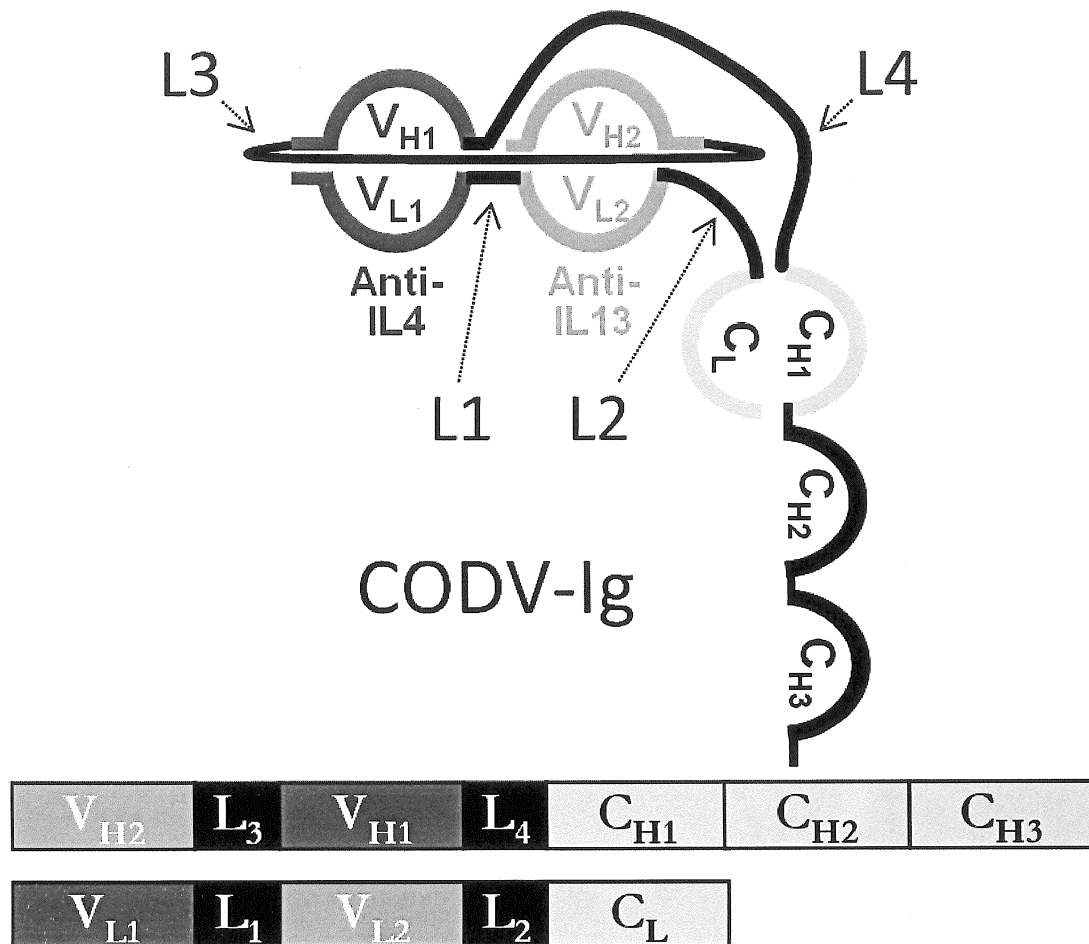


FIG. 3

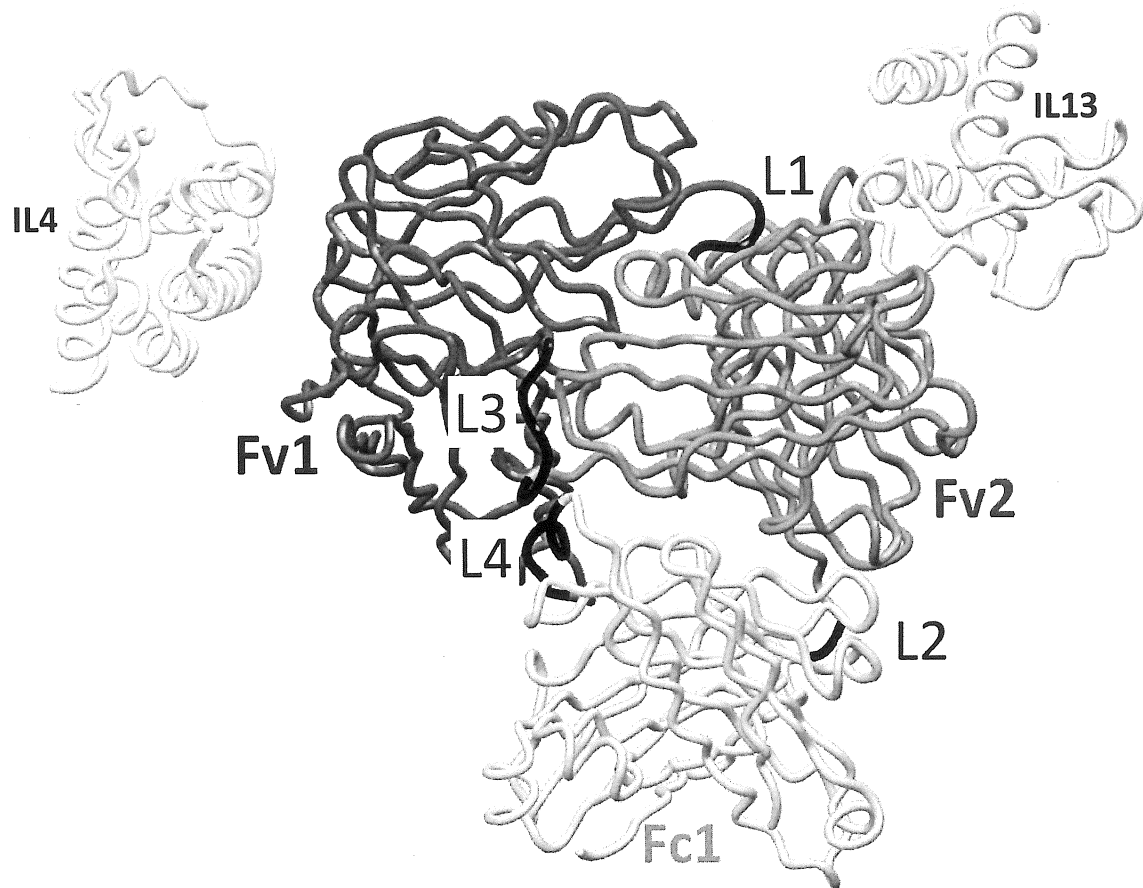


FIG. 4

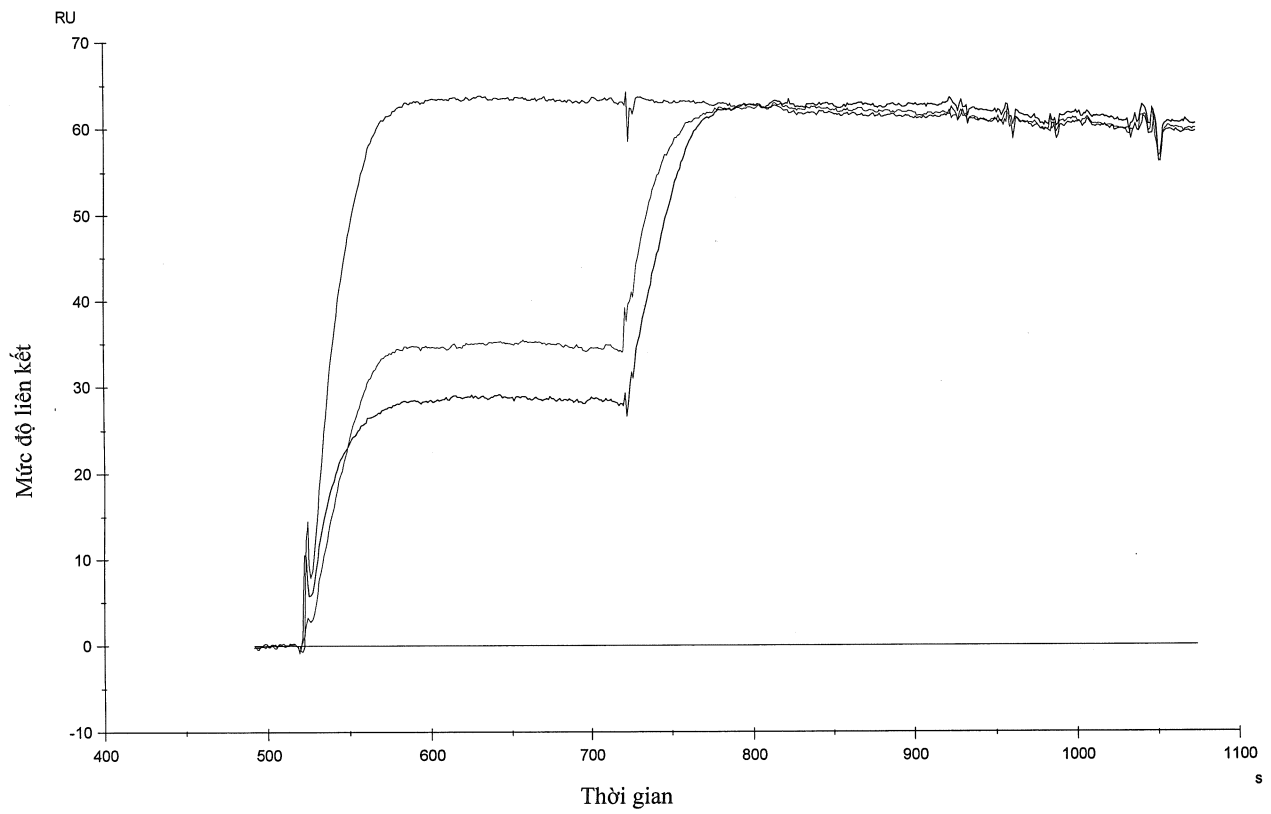


FIG. 5

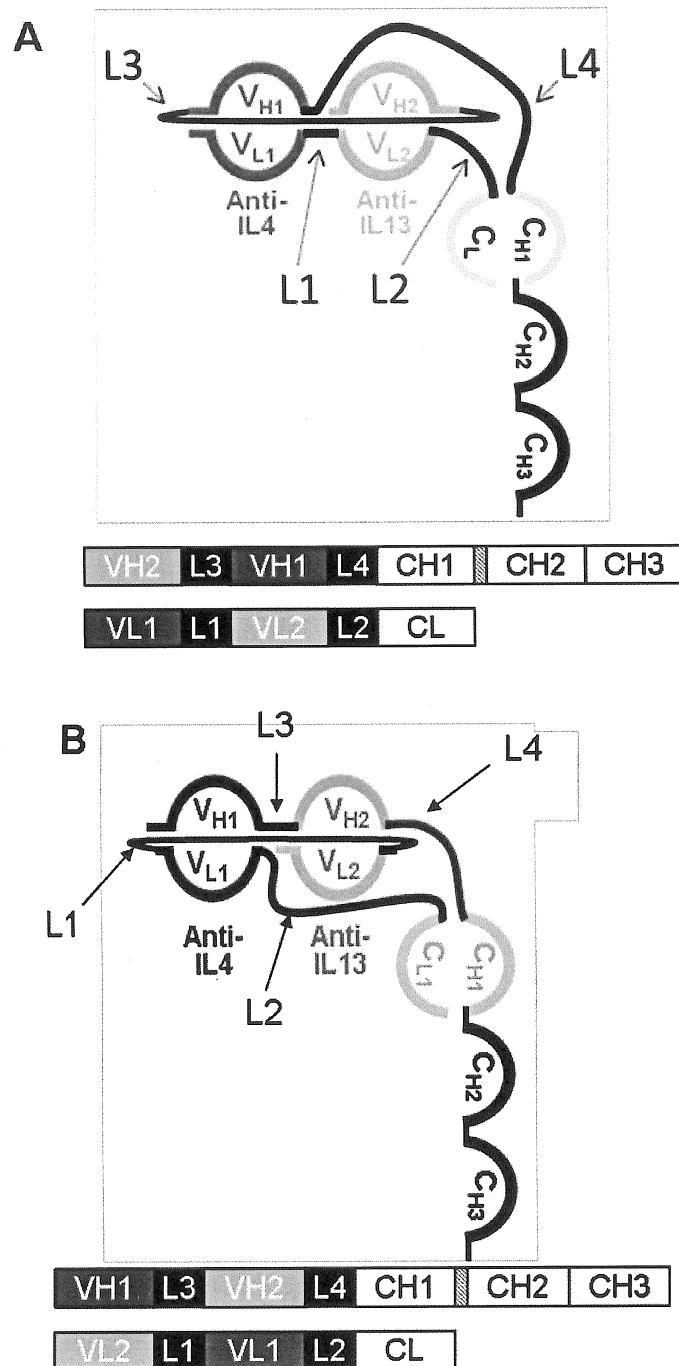


FIG. 6

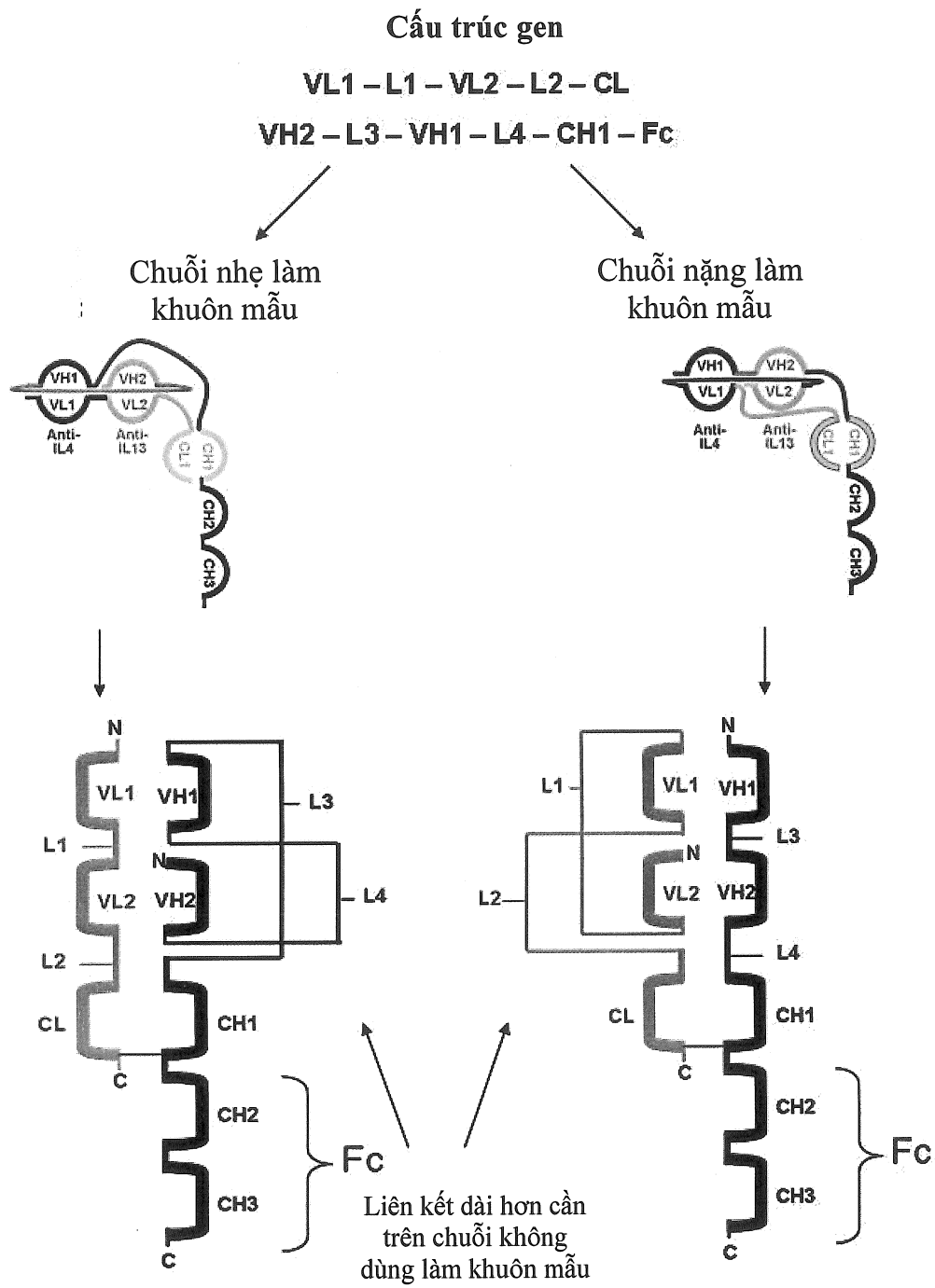
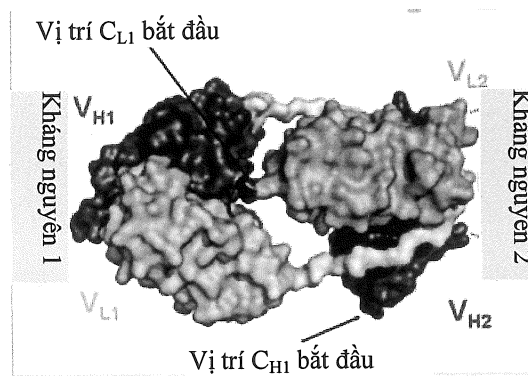
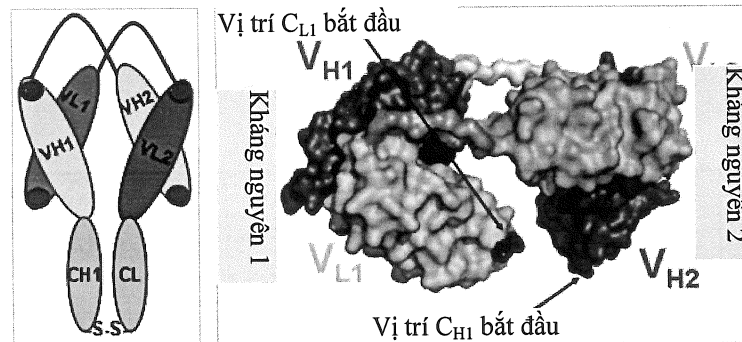


FIG. 7

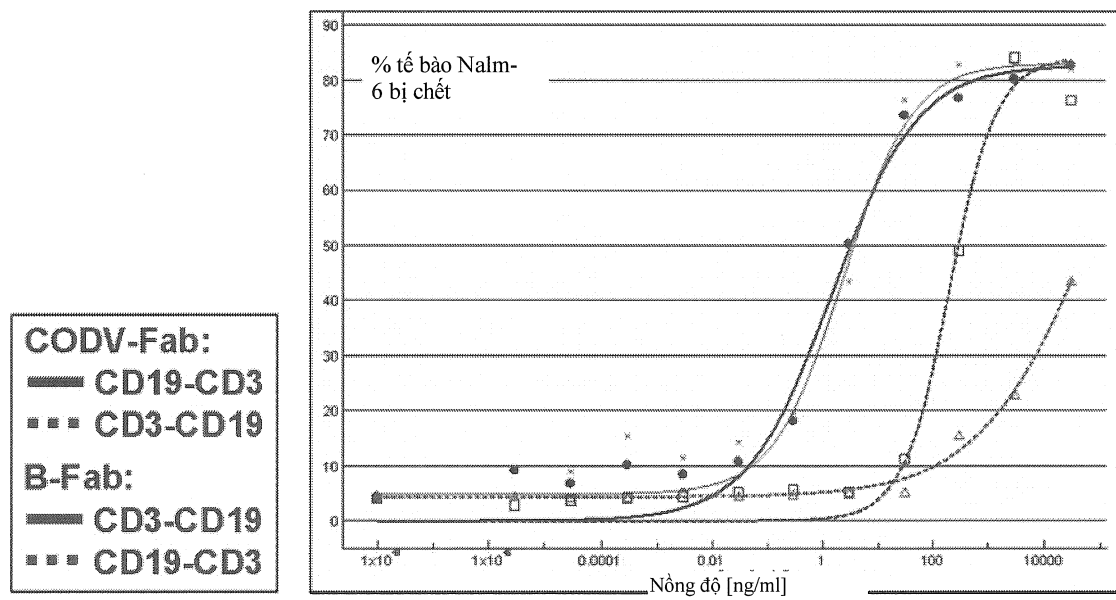


	Tốc độ kết hợp [1/Ms]	Tốc độ phân ly [1/Ms]	KD [M]
mAb gốc kháng IL4	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
mAb gốc kháng IL13	1.59E+06	1.30E-04	8.18E-11
TBTI (IL4)	5.70E+06	1.50E-04	2.63E-11
TBTI (IL13)	3.28E+06	1.70E-04	5.18E-11



	Tốc độ kết hợp [1/Ms]	Tốc độ phân ly [1/Ms]	KD [M]
mAb gốc kháng IL4	2.49E+07	1.95E-04	7.83E-12
mAb gốc kháng IL13	1.59E+06	1.30E-04	8.18E-11
CODH (IL4)	3.16E+07	2.89E-04	9.14E-12
CODH (IL13)	1.20E+06	1.12E-04	9.34E-11

FIG. 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Rao, Ercole
 Mikol, Vincent
 Corvey, Carsten
 Beil, Christian
 Lange, Christian
 Steinmetz, Anke
 Baurin, Nicolas
 Li, Danxi

<120> PROTEIN LIÊN KẾT GIỐNG KHÁNG THỂ CÓ VÙNG BIẾN ĐỔI KÉP VÀ HƯỚNG CỦA CÁC VÙNG LIÊN KẾT CHÉO NHAU VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> 11-414-WO

<140> PCT/US2012/030948

<141> 2012-03-28

<150> 61/468276

<151> 2011-03-28

<150> FR1160311

<151> 2011-11-14

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống người (VL) từ kháng thể kháng IL4

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asp	Val	Trp
			20					25						30	

Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Lys	Ala	Ser	Asn	Leu	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng V cuối nặng được làm giống người (VH) từ kháng thể kháng IL4

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng V chuỗi nhẹ được làm giống người (VL) từ kháng thể kháng IL13

<400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng V chuỗi nặng được làm giống người (VH) từ kháng thể kháng IL-13

<400> 4

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 575
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL13(G4S)IL4CHFc

<400> 5

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln
 115 120 125
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
 130 135 140
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile
 145 150 155 160
 Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro
 165 170 175
 Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr
 180 185 190
 Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser
 195 200 205
 Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu
 210 215 220
 Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 245 250 255
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 260 265 270
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

275 280 285
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 290 295 300
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 325 330 335
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 340 345 350
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 355 360 365
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 370 375 380
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 385 390 395 400
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 405 410 415
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 420 425 430
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 435 440 445
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 450 455 460
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 465 470 475 480
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 485 490 495

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
500 505 510

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
515 520 525

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
530 535 540

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
545 550 555 560

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

<210> 6

<211> 580

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL13(G4S2)IL4CHFc

<400> 6

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 130 135 140

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 145 150 155 160

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 180 185 190

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 225 230 235 240

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 260 265 270

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 275 280 285

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 290 295 300

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

305					310					315					320
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
				325					330					335	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
			340					345					350		
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
		355					360					365			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
	370					375					380				
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
	385				390					395					400
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				405					410					415	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
			420					425					430		
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
		435					440					445			
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
	450					455					460				
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
	465				470					475					480
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
				485					490					495	
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
			500					505					510		
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
		515					520					525			

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 565 570 575

Leu Ser Pro Gly
 580

<210> 7

<211> 698

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL4(G4S)IL13CHFc

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 130 135 140

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 145 150 155 160

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 165 170 175

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 180 185 190

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 195 200 205

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
 245 250 255

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 260 265 270

Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly
 275 280 285

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr
 290 295 300

Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu
 305 310 315 320

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp

				325						330									335
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp				
			340					345					350						
Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser				
		355					360					365							
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser				
	370					375					380								
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp				
385					390					395					400				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr				
				405					410					415					
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr				
			420					425					430						
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln				
		435					440					445							
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp				
	450					455					460								
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro				
465					470					475					480				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro				
				485					490					495					
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr				
			500					505					510						
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn				
		515					520					525							
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg				
	530					535						540							

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
545 550 555 560

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
565 570 575

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
595 600 605

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
610 615 620

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
645 650 655

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
660 665 670

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
675 680 685

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
690 695

<210> 8

<211> 703

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL4(G4S2)IL13CHFc

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 130 135 140

Val Ala Pro Gly Gly Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 145 150 155 160

Ser Leu Thr Asp Ser Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr
 180 185 190

Ala Asp Ala Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys
 195 200 205

Ser Gln Val Phe Leu Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala
 210 215 220

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe

225		230		235		240
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln						
		245		250		255
Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser						
		260		265		270
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile						
		275		280		285
Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro						
		290		295		300
Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr						
305		310		315		320
Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser						
		325		330		335
Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu						
		340		345		350
Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr						
		355		360		365
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro						
		370		375		380
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly						
385		390		395		400
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn						
		405		410		415
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln						
		420		425		430
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser						
		435		440		445

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 450 455 460

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 465 470 475 480

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 485 490 495

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 500 505 510

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 515 520 525

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 530 535 540

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 545 550 555 560

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 565 570 575

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 580 585 590

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 595 600 605

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 610 615 620

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 625 630 635 640

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 645 650 655

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

660 665 670
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 675 680 685
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 690 695 700
 <210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL13(G4S)IL4CL
 <400> 9
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 65 70 75 80
 Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 85 90 95
 Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 115 120 125
 Val Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn

130		135		140
Ile Asp Val Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro				
145		150	155	160
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser				
	165		170	175
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser				
	180		185	190
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His				
	195		200	205
Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg				
	210		215	220
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln				
	225		230	235
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr				
	245		250	255
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser				
	260		265	270
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr				
	275		280	285
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys				
	290		295	300
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro				
	305		310	315
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
	325		330	

<210> 10
 <211> 335
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL13(G4S2)IL4CL

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
115 120 125

Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys
130 135 140

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys
145 150 155 160

Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His
165 170 175

Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe
180 185 190

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
 195 200 205

Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 210 215 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 245 250 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 260 265 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 275 280 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 290 295 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330 335

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL4(G4S)IL13CL

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 115 120 125
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 130 135 140
 Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 165 170 175
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
 180 185 190
 Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala
 195 200 205
 Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 225 230 235 240
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

245 250 255

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
260 265 270

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
275 280 285

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
290 295 300

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
305 310 315 320

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 12
<211> 335
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của cấu trúc đầu kép liên kết ngang IL4(G4S2)IL13CL
<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser		
100	105	110
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu		
115	120	125
Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu		
130	135	140
Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys		
145	150	155
Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu		
165	170	175
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe		
180	185	190
Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr		
195	200	205
Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		
210	215	220
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
225	230	235
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
245	250	255
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
260	265	270
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
275	280	285
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
290	295	300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330 335

<210> 13
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HCl

<400> 13

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu
 115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
 130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp
 145 150 155 160
 Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp
 165 170 175
 Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190
 Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg
 195 200 205
 Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys
 210 215 220
 Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser
 245 250 255
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 260 265 270
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 275 280 285
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 290 295 300
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 305 310 315 320
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 325 330 335
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 340 345 350
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

355	360	365
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
370	375	380
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
385	390	395 400
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	405	410 415
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
	420	425 430
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
	435	440 445
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
	450	455 460
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
465	470	475 480
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
	485	490 495
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	500	505 510
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	515	520 525
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	530	535 540
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
545	550	555 560
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	565	570 575

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
580

<210> 14

<211> 580

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC2

<400> 14

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu
115 120 125

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp
145 150 155 160

Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp
 165 170 175

Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190

Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg
 195 200 205

Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys
 210 215 220

Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 260 265 270

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 275 280 285

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 290 295 300

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 305 310 315 320

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 325 330 335

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 340 345 350

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 355 360 365

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

370	375	380
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
385	390	395 400
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
	405	410 415
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
	420	425 430
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	435	440 445
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	450	455 460
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	465	470 475 480
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
	485	490 495
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	500	505 510
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	515	520 525
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	530	535 540
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	545	550 555 560
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	565	570 575
Leu Ser Pro Gly		
	580	

<210> 15
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC3

<400> 15

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
 20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
 130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg
 145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly
 165 170 175

Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser
 195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn
 210 215 220

Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 260 265 270

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 275 280 285

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 290 295 300

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 305 310 315 320

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 325 330 335

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 340 345 350

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 355 360 365

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 370 375 380

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

385 390 395 400
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 405 410 415
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 420 425 430
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 435 440 445
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 450 455 460
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 465 470 475 480
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 485 490 495
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 500 505 510
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 515 520 525
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 530 535 540
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 545 550 555 560
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 565 570 575
 Ser Pro Gly

<210> 16
 <211> 576
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC4

<400> 16

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly
165 170 175

Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val
180 185 190

Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser
 195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn
 210 215 220

Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 260 265 270

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 275 280 285

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 290 295 300

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 325 330 335

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 355 360 365

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 370 375 380

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 420 425 430
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 435 440 445
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 450 455 460
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 465 470 475 480
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 485 490 495
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 500 505 510
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 515 520 525
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 530 535 540
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 545 550 555 560
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570 575
 <210> 17
 <211> 581
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC5
 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly

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

Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 260 265 270
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 290 295 300
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 305 310 315 320
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 325 330 335
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 340 345 350
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 370 375 380
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 385 390 395 400
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 405 410 415
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 420 425 430
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

435 440 445
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 450 455 460
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 465 470 475 480
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 485 490 495
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 500 505 510
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 515 520 525
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 530 535 540
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 545 550 555 560
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575
 Ser Leu Ser Pro Gly
 580
 <210> 18
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC6
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser

20	25	30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu		
35	40	45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu		
65	70	75
Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln		
115	120	125
Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys		
130	135	140
Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Ile Lys		
145	150	155
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser		
165	170	175
Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu		
180	185	190
Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Pro		
195	200	205
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Lys Glu Tyr		
210	215	220
Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Leu		
225	230	235
		240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 275 280 285

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 325 330 335

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 340 345 350

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 355 360 365

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 370 375 380

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 385 390 395 400

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 405 410 415

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 420 425 430

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 435 440 445

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

450

455

460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 465 470 475 480

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 515 520 525

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 565 570 575

Pro Gly

<210> 19

<211> 328

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC1

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Asp Ile		
100	105	110
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg		
115	120	125
Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln		
130	135	140
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu		
145	150	155
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		
165	170	175
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val		
180	185	190
Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp		
195	200	205
Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val		
210	215	220
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
225	230	235
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
245	250	255

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 260 265 270

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 275 280 285

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 290 295 300

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 305 310 315 320

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

<210> 20

<211> 326

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC2

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu
 100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr
 130 135 140

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 145 150 155 160

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 165 170 175

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala
 180 185 190

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 210 215 220

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 225 230 235 240

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 245 250 255

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 260 265 270

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 275 280 285

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 290 295 300

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

305

310

315

320

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325

<210> 21

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC3

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Asp Ile
100 105 110

Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg
115 120 125

Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln
130 135 140

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu

145	150	155	160
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe 165 170 175			
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val 180 185 190			
Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp 195 200 205			
Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg 210 215 220			
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 225 230 235 240			
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 245 250 255			
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 260 265 270			
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 275 280 285			
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 290 295 300			
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 305 310 315 320			
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 325 330			

```
<210> 22
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC4
```

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Asp Ile Val Leu
 100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
 115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr
 130 135 140

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 145 150 155 160

Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 165 170 175

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Gln Ala
 180 185 190

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val
 210 215 220

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 225 230 235 240

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 245 250 255

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 260 265 270

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 275 280 285

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 290 295 300

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 305 310 315 320

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 24
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	195	200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
	210	215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
	225	230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	305	310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	325	

<210> 25
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit với bốn gốc glyxin

<400> 25

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit với 5 gốc axit amin glyxin

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit với 6 gốc axit amin glyxin.

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit với 7 gốc axit amin glyxin.

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 29

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

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit với 8 gốc axit amin glyxin.

<400> 29

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 32
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC10

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

225		230		235		240
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr						
		245		250		255
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser						
		260		265		270
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu						
		275		280		285
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His						
		290		295		300
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser						
305		310		315		320
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys						
		325		330		335
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu						
		340		345		350
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro						
		355		360		365
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys						
		370		375		380
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val						
385		390		395		400
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp						
		405		410		415
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr						
		420		425		430
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp						
		435		440		445

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
450 455 460

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
580

<210> 33

<211> 582

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC11

<400> 33

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 Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser
 115 120 125
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 130 135 140
 Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160
 Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe
 165 170 175
 Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
 180 185 190
 Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
 195 200 205
 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe
 210 215 220
 Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val
 225 230 235 240
 Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ala Ser Thr

				245						250						255
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
			260					265					270			
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
		275					280					285				
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
	290					295					300					
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
305					310					315					320	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
				325					330					335		
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
			340					345					350			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
		355					360					365				
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
	370					375					380					
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
385					390					395					400	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
				405					410					415		
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
			420					425					430			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
		435					440					445				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
	450					455					460					

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
580

<210> 34
<211> 571
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC12

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 115 120 125

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 130 135 140

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln
 145 150 155 160

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly
 165 170 175

Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val
 180 185 190

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Val Asn Ser Val Thr Ala
 195 200 205

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ser Ile Phe Gly Val
 210 215 220

Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255

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

260	265	270
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu 275 280 285		
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu 290 295 300		
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 305 310 315 320		
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val 325 330 335		
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 340 345 350		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 355 360 365		
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 370 375 380		
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 385 390 395 400		
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 405 410 415		
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 420 425 430		
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 435 440 445		
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 450 455 460		
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 465 470 475 480		

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570

<210> 35

<211> 571

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC13

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Ser Ile Phe Gly Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg
 165 170 175
 Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 180 185 190
 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 195 200 205
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr
 210 215 220
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 275 280 285
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

290		295		300
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr				
305		310		315 320
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val				
	325		330	335
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro				
	340		345	350
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe				
	355		360	365
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val				
	370		375	380
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe				
385		390		395 400
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro				
	405		410	415
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr				
	420		425	430
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val				
	435		440	445
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala				
	450		455	460
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg				
465		470		475 480
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly				
	485		490	495
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro				
	500		505	510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 36

<211> 572

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC14

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln
 115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
 130 135 140

Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr Trp Leu Gly Trp Val Arg
 145 150 155 160

Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Gly Ile Met Ser Pro Val
 165 170 175

Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Met
 180 185 190

Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu
 195 200 205

Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Pro Gly
 210 215 220

Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 260 265 270

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 275 280 285

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 290 295 300

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 305 310 315 320

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

				325						330						335
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
			340					345					350			
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
		355					360					365				
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
	370					375					380					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
385					390					395					400	
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
				405					410					415		
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
			420					425					430			
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
		435					440					445				
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
	450					455					460					
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
465					470					475					480	
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				485					490					495		
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
			500					505					510			
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
		515					520					525				
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
	530					535					540					

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
545 550 555 560

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

<210> 37

<211> 572

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC15

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly
165 170 175

His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
180 185 190

Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr
210 215 220

Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
245 250 255

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
260 265 270

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
275 280 285

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
290 295 300

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
305 310 315 320

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
325 330 335

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
340 345 350

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

355	360	365
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 370 375 380		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 385 390 395 400		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 405 410 415		
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 420 425 430		
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 435 440 445		
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 450 455 460		
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 465 470 475 480		
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 485 490 495		
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 500 505 510		
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 515 520 525		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 530 535 540		
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 545 550 555 560		
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 565 570		

<210> 38
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC16

 <400> 38

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Val Gln Leu Val Glu
 115 120 125

 Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140

 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg
 145 150 155 160

 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp
 165 170 175

Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu
 195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Arg Thr
 210 215 220

Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 370 375 380

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

385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
465 470 475 480

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570

```
<210> 39
<211> 571
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự chuỗi nặng để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã HC17

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 130 135 140

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His
 165 170 175

Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 180 185 190

Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala
 210 215 220

Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 405 410 415

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

420 425 430
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 435 440 445
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 450 455 460
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 465 470 475 480
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 485 490 495
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 500 505 510
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 515 520 525
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 530 535 540
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 545 550 555 560
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 565 570

 <210> 40
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC10

 <400> 40

 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	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu
		115					120					125			
Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr
	130					135					140				
Tyr	Ala	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Ile	Leu	Val
145					150					155					160
Ile	Tyr	Gly	Glu	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
				165					170					175	
Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln
			180					185					190		
Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Ser	Arg	Asp	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Gln	His	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
225					230					235					240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
275 280 285

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
290 295 300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 41

<211> 334

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC11

<400> 41

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
 85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 115 120 125

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
 130 135 140

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 145 150 155 160

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
 165 170 175

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 180 185 190

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
 195 200 205

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 245 250 255

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 260 265 270

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 275 280 285

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

290

295

300

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 305 310 315 320

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 42

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC12

<400> 42

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser
 115 120 125

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly

130		135		140
Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu				
145		150		155 160
Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe				
	165		170	175
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu				
	180		185	190
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg Leu				
	195		200	205
Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly				
	210		215	220
Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser				
225		230		235 240
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn				
	245		250	255
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala				
	260		265	270
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys				
	275		280	285
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp				
	290		295	300
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu				
305		310		315 320
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
	325		330	

<210> 43
 <211> 333
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC13

<400> 43

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg Leu Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
115 120 125

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
130 135 140

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
180 185 190

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr
195 200 205

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 44

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC14

<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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 115 120 125

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg
 130 135 140

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala
 195 200 205

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

245

250

255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325 330

<210> 45

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC15

<400> 45

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

				85						90						95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			100					105						110		
Gly	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	
		115					120					125				
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	
	130					135					140					
Ser	Trp	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	
				165					170					175		
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	
			180					185					190			
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Tyr	
		195					200					205				
Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	
	210					215					220					
Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	
				245					250					255		
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	
			260					265					270			
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	
		275					280					285				
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	
	290					295					300					

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 46

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC16

<400> 46

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
115 120 125

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg
130 135 140

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
145 150 155 160

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
180 185 190

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala
195 200 205

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
225 230 235 240

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
245 250 255

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
260 265 270

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
290 295 300

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
305 310 315 320

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
325 330

<210> 47

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ để liên kết ngang qua V-Ig kép có mã LC17

<400> 47

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr
 115 120 125

Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
 130 135 140

Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
 180 185 190

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu

195		200		205
Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly				
210		215		220
Gly Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser				
225		230		235 240
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn				
	245		250	255
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala				
	260		265	270
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys				
	275		280	285
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp				
	290		295	300
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu				
305		310		315 320
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
	325		330	

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit

<400> 49

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit

<400> 50

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 1 5

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit

<400> 51

His Ile Asp Ser Pro Asn Lys
 1 5

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit

<400> 52

Thr Lys Gly Pro Ser
 1 5

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit

<400> 53

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit

<400> 54

Gln Pro Lys Ala Ala
1 5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit

<400> 55

Gln Arg Ile Glu Gly
1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 56

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 57

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 57

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 1 5

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 58

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cầu liên kết peptit nhân tạo

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly
 1 5

<210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự axit amin từ vùng khung của IGHG1

<400> 60

Asp Lys Thr His Thr
 1 5