



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0030535

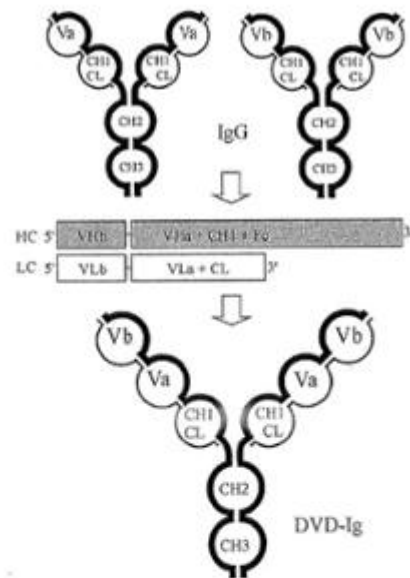
(51)⁷ C07K 16/18; C07K 16/46; C07K 16/22; (13) B
A61K 39/00

-
- (21) 1-2015-01824 (22) 31/10/2013
(86) PCT/US2013/067873 31/10/2013 (87) WO2014/071074 08/05/2014
(30) 61/721,072 01/11/2012 US; 61/787,927 15/03/2013 US
(45) 25/12/2021 405 (43) 25/08/2015 329A
(73) ABBVIE INC. (US)
1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, United States of America
(72) HICKSON, Jonathan, A. (US); HAASCH, Deanna, L. (US); GUPTA, Supriya (US);
CHARI, Ravi (US); ZAMIRI, Camellia (US); GU, Jijie (US); AMBROSI, Dominic,
J. (US); LAPPE, Susan, E. (US); LI, Yingchun (US); NAUMOVSKI, Louie (US);
Cao, Xianhua (CN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

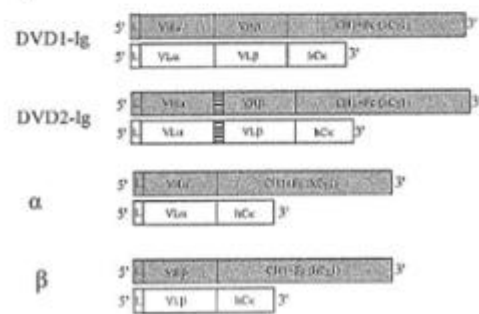
(54) PROTEIN GẮN KẾT ĐA HÓA TRỊ VÀ ĐA ĐẶC HIỆU, VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến protein gắn kết đa hoá trị và đa đặc hiệu, phương pháp sản xuất protein gắn kết này và chế phẩm chứa chúng. Các protein gắn kết này là hữu hiệu trong chẩn đoán, kiểm tra, ức chế, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư, khối u và/hoặc các bệnh phụ thuộc sự hình thành mạch khác được đặc trưng bởi sự biểu hiện hoặc hoạt tính bất thường của DLL4 và/hoặc VEGF.

A



B



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các protein gắn kết đa hoá trị và đa đặc hiệu, phương pháp sản xuất protein gắn kết và chế phẩm chứa chúng. Các protein gắn kết này là hữu hiệu trong chẩn đoán, ức chế, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư, khối u và/hoặc các bệnh phụ thuộc sự hình thành mạch khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein được thiết kế, như các protein gắn kết đa đặc hiệu có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều kháng nguyên, là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các protein gắn kết đa đặc hiệu như vậy có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật dung hợp tế bào, tiếp hợp hoá học hoặc ADN tái tổ hợp. Có nhiều cấu trúc protein gắn kết đa đặc hiệu đã được biết đến trong lĩnh vực này; tuy nhiên nhiều cấu trúc và phương pháp như vậy có các bất lợi rõ rệt.

Các kháng thể đặc hiệu kép đã được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật quadroma. Tuy nhiên, sự có mặt của các sản phẩm phụ ghép cặp sai lệch và hiệu suất sản xuất giảm một cách đáng kể với kỹ thuật này đồng nghĩa với việc là các quy trình tinh chế tinh vi được đòi hỏi. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được tạo ra bằng việc tiếp hợp hoá học hai mAb khác nhau. Tuy nhiên, phương pháp này không tạo ra các chế phẩm đồng nhất.

Các phương pháp khác được sử dụng trước đây bao gồm việc ghép cặp hai kháng thể bố mẹ với cầu liên kết ngang hai chức khác loại, việc tạo ra các phân tử Fv chuỗi đơn liên tiếp, các diabody, các diabody đặc hiệu kép, các diabody chuỗi đơn và các diabody kép. Tuy nhiên, mỗi trong số các phương pháp này có các bất lợi. Ngoài ra, cấu trúc kháng thể đa hoá trị bao gồm hai đoạn lặp Fab trong chuỗi nặng của IgG và có khả năng gắn kết bốn phân tử kháng nguyên đã được mô tả (xem công bố đơn quốc tế số WO 0177342 và ấn phẩm: Miller et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

Các hệ thụ thể phổi tử đã được phát triển đồng thời để duy trì tính đặc hiệu. Các tương tác của chúng hoạt hoá việc truyền tín hiệu đặc hiệu đối với hoạt tính sinh học cụ thể. Tuy nhiên, các protein gắn kết không thụ thể phổi tử như các kháng thể đặc hiệu đơn, protein gắn kết đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, các tổ hợp kháng thể không cạnh tranh hoặc các protein gắn kết thụ thể khác với miền ngoại bào (extracellular domain-ECD) của thụ thể có thể nhận biết các epitop khác biệt với vị trí gắn kết thụ thể phổi tử. Việc gắn kết với (các) epitop khác biệt trên ECD của thụ thể có thể tải nạp các thay đổi cấu hình vào miền nội bào, mà có thể dẫn đến dòng thác truyền tín hiệu mới không mong muốn.

Patent Mỹ số 7,612,181 (toàn bộ nội dung của nó được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn) đề xuất họ protein gắn kết mới có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều kháng nguyên với ái lực ở mức cao, mà được gọi là các protein gắn kết miền biến đổi kép (protein gắn kết DVD) hoặc globulin miễn dịch miền biến đổi kép (DVD-IgTM). Các phân tử DVD là các protein tương tự Ig đặc hiệu kép hoá trị bốn có khả năng gắn kết hai epitop khác biệt trên cùng phân tử hoặc hai phân tử khác nhau theo cách đồng thời. Các DVD là các protein gắn kết đơn nhất gồm có hai miền biến đổi được dung hợp với đầu tận cùng N của kháng thể hoá trị hai. Miền biến đổi có thể được dung hợp trực tiếp với miền khác hoặc được kết nối qua các liên kết peptit tổng hợp có chiều dài và thành phần axit amin khác nhau. Các DVD có thể được thiết kế với các miền Fc nguyên vẹn và chức năng, sau đó cho phép làm trung gian chức năng tác quan thích hợp. Dạng DVD, do tính linh hoạt lựa chọn cặp kháng thể của nó, việc định hướng của hai miền gắn kết kháng nguyên và chiều dài của cầu liên kết mà kết nối chúng, có thể tạo ra các phương thức điều trị mới.

Trong khi nhiều cấu trúc được đề xuất trong lĩnh vực này, một số có lợi và bất lợi, các cấu trúc đặc hiệu được đòi hỏi để tạo ra protein gắn kết đa hoá trị với các đặc tính đặc hiệu và gắn kết với các đích đặc hiệu. Ngoài ra, các trình tự miền biến đổi mới còn có thể cải thiện các đặc tính của protein gắn kết. Cụ thể là, các DVD được cải thiện mà gắn kết với DLL4 và VEGF có thể chứng tỏ là có lợi. Do đó, được bộc lộ trong bản mô tả này là các globulin miễn dịch miền biến đổi kép có sử dụng khung protein gắn kết được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,612,181 (toàn bộ nội dung

của nó được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn) và chứa chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai cụ thể, mỗi chuỗi bao gồm các trình tự miền biến đổi thứ nhất và thứ hai (ví dụ, các trình tự được liệt kê trong Bảng 2) mà tạo thành các vị trí gắn kết chức năng đối với VEGF và DLL4. Theo một số phương án, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai bao gồm các trình tự miền biến đổi thứ nhất và thứ hai mà mỗi trình tự chứa ba CDR từ một trong số các trình tự được liệt kê trong Bảng 2 và tạo thành các vị trí gắn kết chức năng đối với VEGF và DLL4.

DLL4 là phối tử có liên quan đến việc dẫn truyền tín hiệu từ tế bào đến tế bào thông qua con đường thụ thể Notch. Sự truyền thông tin từ tế bào-đến-tế bào được đòi hỏi đối với nhiều quy trình sinh học như sự biệt hoá, sự tăng sinh và cân bằng nội môi. Con đường dẫn truyền tín hiệu Notch là một hệ thống mà được sử dụng bởi một khoảng rộng các sinh vật có nhân chuẩn. Con đường này, đặc biệt là thụ thể Notch, cũng mang tính quyết định đối với sự hình thành mạch khối u chức năng. Do đó, việc ức chế chức năng của thụ thể Notch, việc phong bế thụ thể Notch và/hoặc việc phong bế con đường dẫn truyền tín hiệu Notch là các chiến lược tiềm năng đối với các chế phẩm và liệu pháp điều trị chống bệnh ung thư. Các chất ức chế phân tử nhỏ của thụ thể Notch thường được chứng minh là độc bởi vì chúng ngăn chặn sự biểu hiện của các thụ thể Notch ở mô kiểu hoang (bình thường) trong toàn bộ cơ thể. Do đó, các thành viên khác nhau của con đường dẫn truyền tín hiệu Notch nên được xem là các đích tiềm năng đối với các liệu pháp điều trị. Phối tử hệ mạch đối với thụ thể Notch là Delta 4 hoặc Delta-tương tự 4 (DLL4). Được biểu hiện một cách lớn hơn trong hệ mạch, DLL4 là yếu tố quyết định đối với sự phát triển mạch (Yan et al., *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000)). Chuột dị hợp tử đối với DLL4 bị chết trong thời kỳ phôi thai do các thiếu hụt lớn trong sự phát triển mạch (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2469-2473 (2004)).

Sự biểu hiện của DLL4 có thể do VEGF gây ra (Liu et al., *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14- 25 (2003); Lobov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007)). VEGF là protein tín hiệu được tạo ra bởi tế bào có liên quan đến sự hình thành mạch. Ngoài ra, DLL4 có thể điều hoà theo cách âm tính việc dẫn truyền tín hiệu VEGF, một phần thông qua việc ngăn chặn VEGFR2 và cảm ứng VEGFR1 (Harrington et al., *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007)). Sự phối hợp tuyệt vời giữa DLL4 và VEGF là thiết yếu đối với sự hình thành mạch chức năng, tạo ra các đích tiềm năng DLL4 và VEGF tham gia vào liệu pháp điều trị.

Ngoài vai trò sinh lý của chúng, DLL4 và VEGF cũng được điều hoà tăng trong mạch máu khối u (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006)). Đã chỉ ra rằng việc phong bế DLL4 ức chế sự sinh trưởng của khối u sơ cấp trong nhiều mô hình (Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Scehnet et al., *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007)). Việc ức chế DLL4 thậm chí hữu hiệu chống lại khối u mà kháng liệu pháp điều trị kháng VEGF. Do đó, việc ức chế kết hợp cả DLL4 và VEGF có thể tạo ra liệu pháp điều trị kháng khối u được tăng cường. Thú vị là, khác với việc ức chế VEGF ở chỗ làm giảm sự hình thành mạch khối u, việc phong bế DLL4 dẫn đến sự gia tăng mật độ hệ mạch khối u trong đó mạch là khác thường, có thể không trợ giúp việc vận chuyển máu hiệu quả và không có chức năng một cách hữu hiệu. Do đó, sự phá vỡ VEGF và DLL4 tạo ra phương pháp tác dụng khác nhau để điều trị chống bệnh ung thư hiệu lực.

Trong khi các kháng thể và các cấu trúc gắn kết khác nhau là đã được biết đến trong lĩnh vực này, vẫn có nhu cầu hướng đích tốt hơn và hiệu quả gắn kết với VEGF và DLL4 tốt hơn, ví dụ để điều trị bệnh ung thư và sự hình thành khối u. Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực này đối với protein gắn kết đa hoá trị được cải tiến có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, protein gắn kết mới được đề xuất, trong đó protein gắn kết này có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng, ví dụ, gắn kết với DLL4 và VEGF với ái lực gắn kết và/hoặc hiệu lực trung hoà được cải thiện.

Sáng chế đề xuất protein gắn kết có khả năng hướng đích hai epitop, trong đó protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết epitop của DLL4 và VEGF với ái lực cao được đề xuất. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm khung protein gắn kết miền biến đổi kép mà chứa CDR và các trình tự miền biến đổi được liệt kê trong Bảng 2. Theo một phương án, khung protein gắn kết miền biến đổi kép bao gồm khung được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,612,181 (toàn bộ nội dung của patent này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit mà có thể gắn kết hai epitop của hai protein khác nhau (VEGF và DLL4), trong đó chuỗi polypeptit bao gồm VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là axit amin hoặc polypeptit, X2 là vùng Fc và n bằng 0 hoặc 1. Theo một số phương án, VD1 và VD2 trong protein gắn kết là miền biến đổi của chuỗi nặng. Theo một số phương án, VD1 và VD2 có khả năng gắn kết epitop của DLL4 và epitop của VEGF. Theo một số phương án, C là miền ổn định của chuỗi nặng, như CH1. Theo một số phương án, X1 là cầu liên kết với điều kiện rằng X1 không phải là CH1.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm chuỗi polypeptit mà gắn kết epitop của DLL4 và epitop của VEGF, trong đó chuỗi polypeptit bao gồm VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, trong đó VD1 bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng thứ nhất, VD2 bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng thứ hai, C bao gồm miền ổn định của chuỗi nặng, X1 bao gồm cầu liên kết và X2 bao gồm vùng Fc. Theo một phương án, X1 là cầu liên kết với điều kiện rằng nó không phải là CH1. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2, mỗi chuỗi bao gồm ba CDR được chọn từ các CDR trong SEQ ID NO: 39, 41,

43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53 (nghĩa là, CDR từ 1 đến 3 từ một trong số các SEQ ID NO), trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 39. Theo một phương án khác, protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm chuỗi polypeptit mà gắn kết epitop của DLL4 và epitop của VEGF, trong đó chuỗi polypeptit bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 bao gồm miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ nhất, VD2 bao gồm miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ hai, C bao gồm miền ổn định của chuỗi nhẹ, X1 bao gồm cầu liên kết và X2 không bao gồm vùng Fc. Theo một phương án, X1 là cầu liên kết với điều kiện rằng nó không phải là CH1 hoặc CL. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2, mỗi miền bao gồm ba CDR được chọn từ các CDR trong SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54 (nghĩa là, CDR từ 1 đến 3 từ một trong số các SEQ ID NO), trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 40. Theo một phương án khác, protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2, mỗi miền bao gồm SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 40.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein gắn kết mà gắn kết epitop của DLL4 và epitop của VEGF. Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, trong đó mỗi trong số các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai độc lập bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là cầu liên kết, X2 là vùng Fc, và n bằng 0 hoặc 1, trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai.

Theo một phương án, X2 bao gồm vùng Fc khi $n=1$, và X2 không bao gồm vùng Fc khi $n=0$. Theo một số phương án, trình tự X1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai là giống nhau. Theo các phương án khác, trình tự X1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai là khác nhau. Theo một số phương án, X1 trên ít nhất một trong số chuỗi polypeptit không phải là miền CH1 và/hoặc miền CL. Theo một phương án, trình tự X1 là cầu liên kết ngắn (ví dụ, 6, 5, 4, 3, hoặc 2 axit amin). Theo một phương án khác, trình tự X1 là cầu liên kết dài (ví dụ, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30 axit amin hoặc nhiều hơn). Theo một phương án khác, trình tự X1 trên một trong số hai chuỗi polypeptit là cầu liên kết ngắn và trình tự X1 trên chuỗi polypeptit là cầu liên kết dài. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2, mỗi miền bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53 (nghĩa là, CDR từ 1 đến 3 từ một trong số các SEQ ID NO), trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 39; và miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2 bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54 (nghĩa là, CDR từ 1 đến 3 từ một trong số các SEQ ID NO), trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 40. Theo một phương án khác, protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39, và miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2 bao gồm SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 40.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất protein gắn kết mà có khả năng gắn kết VEGF và DLL4. Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, trong đó mỗi trong số chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai độc lập bao gồm $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là cầu liên kết, X2 là vùng Fc, và n bằng 0 hoặc 1, trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi

polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai. Theo một phương án, miền biến đổi mà tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng đối với VEGF bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 41 và ba CDR từ SEQ ID NO: 42 (ví dụ, CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 41 và CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 42 có mặt trên các chuỗi riêng biệt, với các CDR trên mỗi chuỗi được sắp xếp theo thứ tự được xác định rõ và được tách biệt bởi trình tự khung thích hợp để tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng). Theo một phương án, miền biến đổi mà tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng đối với DLL4 bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 39 và ba CDR từ SEQ ID NO: 40 (ví dụ, CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 39 và CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 40 có mặt trên các chuỗi riêng biệt, với các CDR trên mỗi chuỗi được sắp xếp theo thứ tự được xác định rõ và được tách biệt bởi các trình tự khung thích hợp để tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng). Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm vị trí gắn kết đích chức năng đối với VEGF bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 41 và ba CDR từ SEQ ID NO: 42 (ví dụ, CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 41 và CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 42), và vị trí gắn kết đích chức năng đối với DLL4 bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 39 và ba CDR từ SEQ ID NO: 40 (ví dụ, CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 39 và CDR từ 1 đến 3 từ SEQ ID NO: 40). Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm vị trí gắn kết đích chức năng đối với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42, và vị trí gắn kết đích chức năng đối với DLL4 bao gồm SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm SEQ ID NO: 56 và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm SEQ ID NO: 64. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm SEQ ID NO: 73 và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm SEQ ID NO: 74. Theo một số phương án, miền biến đổi mà tạo thành vị trí gắn kết đối với DLL4 bao gồm các miền từ công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20110217237, và/hoặc miền biến đổi mà tạo thành vị trí gắn kết đối với VEGF bao gồm các vị trí từ công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100076178, nội dung của các công bố này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm h1A11.1-SL-Av. Theo một phương án, protein gắn kết h1A11.1-SL-Av bao gồm vùng Fc từ thể đột biến IgG1 LALA của người.

Sự phát triển và tạo ra protein gắn kết thích hợp để dùng làm chất trị liệu cho người, ví dụ, làm chất chống ung thư/kháng khối u, có thể đòi hỏi nhiều hơn việc nhận dạng protein gắn kết có khả năng gắn kết với đích hoặc các đích mong muốn. Ví dụ, ứng viên có thể gắn kết (các) đích của nó nhưng thể hiện khả năng ức chế hoặc trung hoà đích mong muốn của nó là giảm, có thể chứng tỏ việc điều chế theo cách ổn định là khó khăn, có thể thể hiện các đặc tính dược động học không mong muốn hoặc có thể chứng tỏ khó có thể sản xuất trong hệ biểu hiện thích hợp (ví dụ, sự biểu hiện ở tế bào chủ như CHO). Do đó, các yếu tố để xem xét phát triển chất điều trị thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở (a) động học gắn kết (tốc độ on, tốc độ off và ái lực) đối với các miền gắn kết kháng nguyên bên trong và bên ngoài, (b) hiệu lực trong các thử nghiệm hoá sinh và sinh học tế bào khác nhau, (c) hiệu quả in vivo trong các mô hình khối u liên quan, (d) các đặc tính dược động học và dược lực học, (e) khả năng sản xuất, bao gồm mức biểu hiện protein ở các dòng tế bào chọn lọc, khả năng tạo thang, sự cải biến sau dịch mã, các đặc tính lý hoá như tỷ lệ phần trăm monome, độ tan và độ ổn định (độ ổn định nội tại, đông lạnh/rã đông, lưu trữ v.v), (f) các đặc tính bào chế, (g) nguy cơ gây miễn dịch tiềm năng và (h) các đặc tính gây độc của phân tử. Phương thức gắn kết và hoá trị cũng có thể được đánh giá, do có thể tác động đến các đặc tính gắn kết và hiệu lực tế bào của phân tử. Đối với một số protein gắn kết, các thay đổi nhỏ trong các trình tự axit amin của miền biến đổi, miền ổn định và/hoặc các cầu liên kết thậm chí có thể tác động một cách tiềm năng (theo cách tích cực hoặc tiêu cực) đến một hoặc nhiều trong số các nhân tố này và do đó tổ hợp của các nhân tố này có thể được đánh giá để chọn ra ứng viên dẫn đầu. Khi ứng viên dẫn đầu được nhận dạng, việc đánh giá in vivo tiếp theo về các đặc tính điều trị được thực hiện, bao gồm đánh giá tính an toàn, hiệu quả và hiệu lực ở đối tượng động vật và con người.

Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74, thể hiện tổ hợp của các đặc tính ưu việt xét đến vấn đề này, như động học gắn kết (nghĩa là, hằng số phân ly) vượt trội hơn ngưỡng hữu ích về mặt điều trị, khả năng trung hoà được cải thiện, hiệu quả in vivo được tăng cường, khả năng bào chế ưu

viết, mẫu glycosyl hoá có thể mong muốn, protein được động học tuyệt vời và sự biểu hiện hiệu quả ở tế bào chủ, so với protein gắn kết được đánh giá khác bao gồm các miền biến đổi và/hoặc cầu liên kết khác nhau. Protein gắn kết được so sánh có thể bao gồm các protein có cùng các trình tự miền biến đổi và sự định hướng nhưng với các cầu liên kết khác nhau, cũng như các trình tự có sự định hướng miền gắn kết thay đổi và/hoặc các trình tự miền biến đổi khác (ví dụ, các trình tự trưởng thành về mặt ái lực, các trình tự đầy đủ của người, v.v). Theo một số phương án, các đặc tính ưu việt này phụ thuộc vào việc lựa chọn các trình tự miền biến đổi cụ thể (ví dụ, SEQ ID NO: từ 39 đến 42), các hướng cụ thể của các miền gắn kết VEGF và DLL4 ở các vị trí bên trong và bên ngoài (ví dụ, hướng được đề xuất trong SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64), các trình tự cầu liên kết cụ thể (ví dụ, miền biến đổi của chuỗi nặng và trình tự cầu liên kết ngắn được sử dụng trong SEQ ID NO: 56 và miền biến đổi của chuỗi nhẹ và trình tự cầu liên kết dài được sử dụng trong SEQ ID NO: 64), và/hoặc các trình tự miền ổn định cụ thể (ví dụ, các trình tự miền ổn định được sử dụng trong SEQ ID NO: 73 và 74). Theo một số phương án, chỉ đơn thuần làm thay đổi trình tự cầu liên kết có thể có tác động đáng kể đối với các đặc tính chức năng. Ví dụ, việc lựa chọn trình tự cầu liên kết được sử dụng trong SEQ ID NO: 73 và 74 (cùng với các miền biến đổi và cố định được bao gồm trong các SEQ ID NO) có thể tạo ra sự cải thiện bất ngờ về các đặc tính điều trị ở người của protein gắn kết. Ví dụ, Bảng 9 chứng minh hiệu quả của các trình tự cầu liên kết khác nhau đối với hiệu quả kháng khối u in vivo, như được xác định trong mô hình ghép khác loài bệnh ung thư tuyến đại trực tràng và u nguyên bào đệm. Do đó, ví dụ, bằng cách sử dụng các trình tự trong các SEQ ID NO: 56 và 64, hoặc trong các SEQ ID NO: 73 và 74 (bao gồm trình tự cầu liên kết được bao gồm trong đó), có thể tạo ra việc tăng bất ngờ hiệu quả kháng khối u in vivo.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này thể hiện ái lực gắn kết, khả năng phong bế và/hoặc hiệu lực trung hoà mong muốn đối với VEGF và/hoặc DLL4, ví dụ các mức gần như có thể so sánh được với các mức quan sát được đối với các kháng thể kháng VEGF (ví dụ, AVASTIN®) hoặc DLL4 (ví dụ, kháng thể h1A11.1). Theo một số phương án, protein gắn kết thể

hiệu ái lực, khả năng phong bế và/hoặc hiệu lực trung hoà đối với VEGF và/hoặc DLL4 tăng, so với protein gắn kết DVD-Ig bao gồm các trình tự miền biến đổi hoặc cầu liên kết khác. Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm vị trí gắn kết đích chức năng đối với VEGF bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 41 và ba CDR từ SEQ ID NO: 42, và vị trí gắn kết đích chức năng đối với DLL4 bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 39 và ba CDR từ SEQ ID NO: 40; hoặc bao gồm vị trí gắn kết đích chức năng đối với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 41 và SEQ ID NO: 42, và vị trí gắn kết đích chức năng đối với DLL4 bao gồm SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 40; hoặc bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64; hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74. Ví dụ, protein gắn kết (ví dụ, protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74) có thể có khả năng gắn kết với VEGF với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $7,0 \times 10^{-10}M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính VEGF với IC50 lớn nhất khoảng 3,8nM, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh VEGFR1; và/hoặc có khả năng gắn kết với DLL4 với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $1,0 \times 10^{-8}M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính DLL4 với IC50 lớn nhất khoảng 1,09nM, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh Notch.

Theo một số phương án, protein gắn kết (ví dụ, protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74) có thể có hiệu lực làm trung hoà gia tăng đối với DLL4 khi cũng với sự có mặt của VEGF, như so với hỗn hợp gồm các kháng thể VEGF và DLL4 (ví dụ, các kháng thể bố mẹ được sử dụng để tạo ra miền biến đổi đối với protein gắn kết). Theo một số phương án, protein gắn kết có thể thể hiện sự gia tăng thứ tự về cường độ đối với hiệu lực trung hoà đối với DLL4 khi cũng có mặt VEGF, so với hỗn hợp gồm các kháng thể VEGF và DLL4 (ví dụ, các kháng thể bố mẹ được sử dụng để tạo ra miền biến đổi đối với protein gắn kết). Ví dụ, Bảng 24 chứng tỏ rằng protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74 có thể thể hiện sự gia tăng thứ tự về cường độ đối với DLL4 khi cũng có mặt ít nhất khoảng 1,2nM VEGF (ví dụ, ít nhất khoảng 1,2, 1,5, 2, 2,5, 5, 10, 50, 150, hoặc nhiều hơn), so với hỗn hợp gồm các kháng thể

VEGF và DLL4 (các kháng thể bố mẹ được sử dụng để tạo ra miền biến đổi đối với protein gắn kết). Hiệu lực trung hoà DLL4 này có thể có lợi bởi vì, trường hợp điều trị in vivo đối với khối u, hàm lượng VEGF ở vùng lân cận của khối u thường cao hơn so với tổng thể nói chung, cho phép việc hướng đích được cải thiện đồng thời hoạt tính trung hoà DLL4 chức năng gia tăng ở vị trí khối u.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết (ví dụ, protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74) thể hiện các đặc tính được cải thiện ví dụ, tính an toàn được cải thiện, độ ổn định gia tăng, hiệu lực lớn hơn, đáp ứng viêm hoặc miễn dịch giảm, hoặc các đặc tính điều trị khác có lợi in vivo ở người, so với các phương pháp điều trị khác đối với bệnh ung thư và/hoặc khối u được tạo mạch. Các phương pháp điều trị thích hợp để so sánh có thể bao gồm việc dùng chất chống ung thư phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng VEGF (ví dụ, AVASTIN®) và/hoặc DLL4 (ví dụ, kháng thể h1A11.1), hoặc protein gắn kết DVD-Ig bao gồm các trình tự miền biến đổi và/hoặc cầu liên kết khác. Theo một số phương án, protein gắn kết thể hiện các đặc tính được cải thiện so với tiêu chuẩn điều trị chăm sóc hiện tại đối với bệnh ung thư và/hoặc khối u được tạo mạch. Ví dụ, protein gắn kết có thể thể hiện động học gắn kết được cải thiện, hiệu quả điều trị in vivo tốt hơn, khả năng bào chế được tăng cường (bao gồm sự kết tụ giảm và độ ổn định lưu trữ được cải thiện), được động học được cải thiện, đáp ứng viêm hoặc miễn dịch giảm và/hoặc mức biểu hiện tế bào chủ được tăng cường.

Theo một số phương án, protein gắn kết (ví dụ, protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74) thể hiện tác dụng ưu việt (ví dụ, cộng hợp và/hoặc siêu cộng hợp) khi kết hợp với một hoặc nhiều chất chống ung thư, so với kháng thể kháng VEGF hoặc kháng thể kháng DLL4 kết hợp với một hoặc nhiều chất chống ung thư hoặc so với protein gắn kết DVD-Ig bao gồm các trình tự miền biến đổi và/hoặc cầu liên kết khác kết hợp với một hoặc nhiều chất chống ung thư. Ví dụ, các đặc tính gắn kết ưu việt có thể là các đặc tính được nhận dạng trong các Bảng từ 27 đến 30 và 34. Ví dụ, protein gắn kết có thể thể hiện sự ức chế sinh trưởng khối u hoặc làm chậm sự sinh trưởng khối u ít nhất khoảng 50% hoặc lớn hơn (ví dụ, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 60,

65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150% hoặc lớn hơn) sau khi dùng riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất chống ung thư, so với khối u không được điều trị. Chất chống ung thư có thể, ví dụ là một hoặc nhiều trong số Irinotecan, FOLFIRI, Temozolomit, Gemcitabin, Paclitaxel, 5-FU, và Capecitabin, hoặc phân tử nhỏ hoặc chất sinh học bất kỳ khác được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư cụ thể. Protein gắn kết riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất chống ung thư có thể được sử dụng làm thuốc để điều trị, ví dụ, bệnh ung thư ruột kết, u nguyên bào thần kinh đệm, bệnh ung thư tuyến tụy, hoặc bệnh ung thư vú.

Theo một phương án, protein gắn kết miền biến đổi kép (Dual Variable Domain -DVD-Ig) bao gồm hai chuỗi polypeptit thứ nhất và hai chuỗi polypeptit thứ hai như được mô tả trong đoạn trên đây (nghĩa là, bao gồm bốn chuỗi polypeptit), trong đó mỗi trong số các chuỗi polypeptit độc lập bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là cầu liên kết, X2 là vùng Fc, và n bằng 0 hoặc 1. Theo một số phương án, chuỗi thứ nhất là chuỗi nặng và được ghép cặp với chuỗi thứ hai mà là chuỗi nhẹ. Protein gắn kết DVD-Ig bao gồm bốn vị trí gắn kết đích chức năng. Theo một số phương án, cầu liên kết X1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai là giống nhau hoặc khác nhau. Theo một số phương án, protein gắn kết DVD-Ig bao gồm ít nhất hai trình tự miền biến đổi (ví dụ, VD1 và VD2) có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều epitop (ví dụ, hai, ba hoặc bốn) protein giống nhau hoặc khác nhau, theo hướng bất kỳ. Theo một số phương án, VD1 và VD2 được chọn một cách độc lập. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2, mỗi chuỗi bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 39, và miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2 bao gồm ba CDR từ SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm ba CDR trong SEQ ID NO: 40. Theo một phương án khác, protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF. Theo một phương án, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và VD2, mỗi miền bao gồm SEQ ID NO: 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, hoặc 53, trong đó ít nhất một trong số

miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39, và miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và VD2, mỗi chuỗi bao gồm SEQ ID NO: 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, hoặc 54, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 40.

Theo một phương án khác, protein gắn kết miền biến đổi kép bao gồm trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong Bảng 2, trong đó ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nặng VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 39 và/hoặc ít nhất một trong số miền biến đổi của chuỗi nhẹ VD1 và/hoặc VD2 bao gồm SEQ ID NO: 40.

Theo một phương án khác, bất kỳ trong số các phương án chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, hai chuỗi hoặc bốn chuỗi bao gồm ít nhất một cầu liên kết X1 bao gồm cầu liên kết được chọn từ SEQ ID NO: từ 1 đến 38. Theo một phương án, X2 là vùng Fc. Theo một phương án khác, X2 là vùng Fc biến thể.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc, nếu có mặt trong polypeptit thứ nhất, là vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc trình tự biến thể. Theo phương án khác nữa, vùng Fc là vùng Fc từ IgG1, vùng Fc từ IgG2, vùng Fc từ IgG3, vùng Fc từ IgG4, vùng Fc từ IgA, vùng Fc từ IgM, vùng Fc từ IgE, hoặc vùng Fc từ IgD. Theo một số phương án, vùng Fc là vùng Fc từ thể đột biến IgG1 LALA của người, mà là thể đột biến của kháng thể b12 bảo vệ kháng lại virus HIV.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra protein gắn kết mà gắn kết hai protein đích khác nhau. Theo một phương án, phương pháp tạo ra protein gắn kết bao gồm các bước a) thu được kháng thể bố mẹ thứ nhất, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết epitop thứ nhất; b) thu được kháng thể bố mẹ thứ hai, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết epitop thứ hai; c) tạo ra (các) cấu trúc mã hoá bất kỳ trong số các protein gắn kết được mô tả trong bản mô tả này; và d) biểu hiện các chuỗi polypeptit, sao cho protein gắn kết mà gắn kết epitop thứ nhất và thứ hai được tạo ra.

Theo bất kỳ trong số các phương án trong bản mô tả này, miền biến đổi của chuỗi nặng VD1, nếu có mặt và miền biến đổi của chuỗi nhẹ, nếu có mặt, có thể là từ

kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó; VD2 miền biến đổi của chuỗi nặng, nếu có mặt, và miền biến đổi của chuỗi nhẹ, nếu có mặt, có thể là từ kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Các kháng thể bố mẹ thứ nhất và thứ hai có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Theo một phương án, kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết kháng nguyên thứ nhất và kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo một phương án, các kháng nguyên thứ nhất và thứ hai là các kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án khác, kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết kháng nguyên thứ nhất với hiệu lực khác với hiệu lực mà kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án khác nữa, kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết kháng nguyên thứ nhất với ái lực khác với ái lực mà kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án khác, kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, và kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể của người, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm giống người và/hoặc kháng thể trưởng thành về mặt ái lực.

Theo một phương án khác, protein gắn kết có ít nhất một đặc tính mong muốn được thể hiện bởi kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc bởi kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó. Theo cách khác, kháng thể bố mẹ thứ nhất hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó và kháng thể bố mẹ thứ hai hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó có ít nhất một đặc tính mong muốn được thể hiện bởi protein gắn kết. Theo một phương án, đặc tính mong muốn là một hoặc nhiều tham số kháng thể. Theo một phương án khác, tham số kháng thể là tính đặc hiệu của kháng nguyên, ái lực với kháng nguyên, hiệu lực, chức năng sinh học, nhận biết epitop, độ ổn định, độ tan, hiệu quả sản xuất, tính gây miễn dịch, dược động học, sinh khả dụng, khả năng phản ứng chéo mô hoặc gắn kết kháng nguyên trực giao. Theo một phương án, protein gắn kết là đa hoá trị. Theo một phương án khác, protein gắn kết là đa đặc hiệu. Protein gắn kết đa đặc hiệu hoặc

đa hoá trị được mô tả trong bản mô tả này có các đặc tính có thể mong muốn đặc biệt là theo quan điểm điều trị. Ví dụ, protein gắn kết đa hoá trị hoặc đa đặc hiệu có thể (1) được đồng hoá (và/hoặc dị hoá) bằng tế bào biểu hiện kháng nguyên mà các kháng thể này gắn kết với nó nhanh hơn so với kháng thể hoá trị hai; (2) là chất chủ vận gắn kết protein; và/hoặc (3) gây chết tế bào và/hoặc gây chết tế bào theo lập trình biểu hiện kháng nguyên mà protein gắn kết đa hoá trị có khả năng gắn kết. Thuật ngữ “kháng thể bố mẹ”, mà tạo ra ít nhất một kháng nguyên gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết đa hoá trị hoặc đa đặc hiệu, có thể là kháng nguyên mà được đồng hoá (và/hoặc dị hoá) bằng tế bào biểu hiện kháng nguyên mà kháng thể gắn kết; và/hoặc có thể là chất chủ vận, kháng thể gây chết tế bào và/hoặc kháng thể gây chết tế bào theo lập trình và protein gắn kết đa hoá trị và/hoặc đa đặc hiệu như được mô tả trong bản mô tả này có thể thể hiện (các) cải thiện ở một hoặc nhiều trong số các đặc tính này. Hơn nữa, kháng thể bố mẹ có thể thiếu một hoặc nhiều bất kỳ trong số các đặc tính này, nhưng có thể đạt được một hoặc nhiều trong số chúng khi được tạo cấu trúc như protein cấu trúc đa hoá trị như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, protein gắn kết có hằng số tốc độ on (K_{on}) với một hoặc nhiều đích ít nhất khoảng $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; ít nhất khoảng $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; ít nhất khoảng $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; ít nhất khoảng $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; hoặc ít nhất khoảng $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo một phương án, protein gắn kết có hằng số tốc độ on (K_{on}) với một hoặc nhiều đích từ khoảng từ $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; khoảng từ $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; khoảng từ $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; hoặc khoảng từ $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án khác, protein gắn kết có hằng số tốc độ off (K_{off}) đối với một hoặc nhiều đích lớn nhất khoảng 10^{-2} s^{-1} ; lớn nhất khoảng 10^{-3} s^{-1} ; lớn nhất khoảng 10^{-4} s^{-1} ; lớn nhất khoảng 10^{-5} s^{-1} ; hoặc lớn nhất khoảng 10^{-6} s^{-1} , như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo một phương án, protein gắn kết có hằng số tốc độ off (K_{off}) với một hoặc nhiều đích khoảng từ 10^{-2} s^{-1} đến 10^{-3} s^{-1} ; khoảng từ 10^{-3} s^{-1} đến 10^{-4} s^{-1} ; khoảng từ 10^{-4} s^{-1} đến 10^{-5} s^{-1} ; hoặc khoảng từ

10^{-5} s^{-1} đến 10^{-6} s^{-1} , như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án khác, protein gắn kết có hằng số phân ly cân bằng (K_D) với một hoặc nhiều đích lớn nhất là khoảng 10^{-7} M ; lớn nhất khoảng 10^{-8} M ; lớn nhất khoảng 10^{-9} M ; lớn nhất khoảng 10^{-10} M ; lớn nhất khoảng 10^{-11} M ; hoặc lớn nhất khoảng 10^{-12} M . Theo một phương án, protein gắn kết có hằng số phân ly cân bằng (K_D) với các đích của nó là khoảng từ 10^{-7} M đến 10^{-8} M ; khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-9} M ; khoảng từ 10^{-9} M đến 10^{-10} M ; khoảng từ 10^{-10} M đến 10^{-11} M ; hoặc khoảng từ 10^{-11} M đến 10^{-12} M .

Theo một số phương án, protein gắn kết kháng DLL4/kháng VEGF thể hiện hiệu lực gia tăng (ví dụ, khả năng cản trở sự ức chế và/hoặc trung hoà hoạt tính DLL4 và/hoặc VEGF gia tăng) so với kháng thể kháng DLL4 hoặc kháng VEGF. Theo một số phương án, hiệu lực của protein gắn kết có thể được đánh giá trong thử nghiệm bất kỳ để đánh giá hoạt tính VEGF và/hoặc DLL4, ví dụ, thử nghiệm ELISA gắn kết VEGF và/hoặc DLL4, thử nghiệm BIACORE™, thử nghiệm thông báo DLL4-Notch, thử nghiệm tăng sinh/sự sống của tế bào nội mô được kích thích VEGF hoặc thử nghiệm khác bất kỳ đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, protein gắn kết thể hiện hiệu lực DLL4 gia tăng với sự có mặt của VEGF.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp được đề xuất, bao gồm bất kỳ trong số các protein gắn kết được mô tả trong bản mô tả này và còn bao gồm tác nhân. Theo một phương án, tác nhân là phân tử dính bám miễn dịch, tác nhân tạo hình ảnh, tác nhân điều trị, hoặc tác nhân gây độc tế bào. Theo một phương án, tác nhân tạo hình ảnh là chất đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu từ tính, hoặc biotin. Theo một phương án khác, chất đánh dấu phóng xạ là ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , hoặc ^{153}Sm . Theo một phương án khác nữa, tác nhân điều trị hoặc độc tế bào là chất chống chuyển hoá, tác nhân alkyl hoá, chất kháng sinh, yếu tố sinh trưởng, xytokin, chất chống tạo mạch, chất chống nguyên phân, anthraxyclin, độc tố hoặc chất gây chết tế bào theo lập trình. Theo một số

phương án, tác nhân là một hoặc nhiều trong số: irinotecan, leucovorin, 5-FU, temozolomit, gemcitabin, và paclitaxel. Theo một phương án, tác nhân là irinotecan. Theo một phương án, tác nhân là leucovorin. Theo một phương án, chất là 5-FU. Theo một phương án, tác nhân là irinotecan, leucovorin, và 5-FU. Theo một phương án, tác nhân là temozolomit. Theo một phương án, tác nhân là gemcitabin. Theo một phương án, tác nhân là paclitaxel.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp bao gồm protein gắn kết và dược chất. Theo một phương án, protein gắn kết trong thể tiếp hợp bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, trong đó mỗi trong số chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai độc lập bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là cầu liên kết, và X2 là vùng Fc, trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai, và trong đó protein gắn kết có khả năng gắn kết VEGF và DLL4. Theo một số phương án, các miền VD1 và VD2 bao gồm CDR hoặc các trình tự miền biến đổi từ bất kỳ trong số các trình tự được bộc lộ trong bảng 2, tạo cặp và sắp xếp để tạo thành các vị trí gắn kết chức năng đối với VEGF và DLL4. Theo một phương án, dược chất trong thể tiếp hợp được chọn từ nhóm gồm có chất ức chế nguyên phân, thuốc kháng sinh kháng khối u, chất điều biến miễn dịch, vectơ đối với liệu pháp điều trị gen, chất alkyl hoá, chất chống chống hình thành mạch, chất chống chuyển hoá, chất chứa bo, chất bảo vệ hoá học, hormon, chất kháng hormon, corticosteroid, chất điều trị quang hoạt, oligonucleotit, chất nuclit phóng xạ, chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế tyrosin kinaza và chất nhạy phóng xạ. Theo một phương án khác, dược chất được chọn từ nhóm gồm có Ixempra, dolastatin 10, dolastatin 15, auristatin E, auristatin PE, monomethyl auristatin D (MMAD hoặc dẫn xuất auristatin D), monomethyl auristatin E (MMAE hoặc dẫn xuất auristatin E), monomethyl auristatin F (MMAF hoặc dẫn xuất auristatin F), auristatin F phenylendiamin (AFP), auristatin EB (AEB), auristatin EFP (AEFP), AE este của axit 5-benzoylvaleric (AEVB), methotrexat, daunorubicin, vincristin, maytansin, maytansinol, C-3 este của maytansinol, ansamitocin P1, ansamitocin P2,

ansamitocin P3, ansamitocin P4, docetaxel, paclitaxel, hạt nano paclitaxel, vindesin sulfat, vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, actinomycin, actinomycin D, anthramycin, chicamycin A, DC-18, mazethramycin, neothramycin A, neothramycin B, prothracarcin B, SG2285, sibanomicin, sibiromycin, anthraxycelin, daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, calicheamicin, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-axetyl- γ_1^I , PSAG, θ_1^I , duocarmycin, dozelesin, bizelesin, và carzelesin, bleomycin, mitomycin, plicamycin, bacillus calmette-guerin (BCG), levamisol, vắc xin chữa bệnh ung thư, papillomavirut hoá trị hai tái tổ hợp ở người (HPV) loại vắc xin 16 và 18 vắc xin, papillomavirut hoá trị bốn tái tổ hợp ở người (HPV) loại 6, 11, 16, và 18 vắc xin, sipuleucel-T, xytokin, hormon tuyến cận giáp; thyroxin; insulin; proinsulin; relaxin; prorelaxin; glycoprotein hormon như hormon kích thích nang (FSH), hormon kích thích tuyến giáp (TSH), và hormon lutein hoá (LH), yếu tố sinh trưởng gan; yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi, prolactin, lactogen nhau thai, yếu tố gây chết hoại khối u, chất ức chế mullerian, peptit kết hợp gonadotropin của chuột, inhibin, activin, yếu tố phát triển nội mô mạch, integrin, thrombopoietin (TPO), yếu tố sinh trưởng thần kinh như NGF, yếu tố sinh trưởng tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biến nạp (TGF), yếu tố-I và II sinh trưởng tương tự insulin, erythropoietin (EPO), yếu tố cảm ứng xương, interferon như interferon α , β , và γ , yếu tố kích thích khuẩn lạc (CSF), đại thực bào bạch cầu hạt-C-SF (GM-CSF), và bạch cầu hạt-CSF (G-CSF), interleukin (IL) như IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, yếu tố chết hoại khối u và yếu tố polypeptit khác bao gồm LIF và phôi tử kit (KL), yếu tố kích thích khuẩn lạc, erythropoietin (epoetin), filgrastim, sargramostim, promegapoeitin, Oprelvekin, liệu pháp điều trị gen điều biến miễn dịch, axit nucleic mã hoá gen chức năng, điều trị mà được sử dụng để thay thế gen rối loạn chức năng đột biến hoặc khác (ví dụ cắt cụt) kết hợp với bệnh ung thư, axit nucleic mà mã hoá đối với hoặc theo cách khác tạo ra việc sản xuất protein điều trị để điều trị bệnh ung thư, alkyl sulfonat, busulfan, nitơ mù tạc, chlorambucil, xyclophosphamit, estramustin, ifosfamid, mechlorethamin, và melphalan, nguồn nitơ, Carmustin, foteMustin, loMustin, niMustin, streptozocin, triazin và hydrazin, Dacarbazin, procarbazine, temozolomit, etylenimim, thiopeta, diaziqunon, mitomycin C, dẫn xuất metylamin, epoxit, altretamin, dianhydrogalactitol, dibromodulcitol, angiostatin, ABX EFG, C1-

1033, PKI-166, vắc xin EGF, EKB-569, GW2016, ICR-62, EMD 55900, CP358, PD153035, AG1478, IMC-C225, OSI-774, Erlotinib, angiostatin, arrestin, endostatin, BAY 12-9566 và w/flouraxil hoặc doxorubicin, canstatin, carboxyamidotriazol và với paclitaxel, EMD121974, S-24, vitaxin, axit dimethylxanthenon axetic, IM862, Interleukin-12, Interleukin-2, NM-3, HuMV833, PTK787, RhuMab, angiozym, IMC-1C11, Neovastat, marimstat, prinomastat, BMS-275291, COL-3, MM1270, SU101, SU6668, SU11248, SU5416, với paclitaxel, với gemcitabin và cisplatin, và với irinotecan và cisplatin và với radiation, tecogalan, temozolomit và PEG interferon α 2b, tetrathiomolybdat, TNP-470, thalidomit, CC-5013 và với taxotere, tumstatin, 2-methoxyestradiol, VEGF trap, chất ức chế mTOR (deforolimus, everolimus, và temsirolimus), chất ức chế tyrosin kinaza (ví dụ, imatinib, gefitinib, dasatinib, sunitinib, nilotinib, lapatinib, sorafenib, phosphoinositit 3-kinaza (PI3K), chất đối kháng axit folic, methotrexat, axit 4-amino-folic, lometrexol, pemetrexed, trimetrexat, chất đối kháng pyrimidin, Azacitidin, capecitabin, Cytarabin, decitabin, 5-flouracil, 5-flo-2'-deoxyuridin 5'-Phosphat, 5-flouridin triPhosphat, gemcitabin, foxuridin, chất chủ vận purin azathioprin, Cladribin, mercaptopurin, fludarabin, pentostatin, 6-thioguanin, chất ức chế adenosin deaminaza, Cladribin, Fludarabin, Nelarabin, Pentostatin, borophycin, bortezomib, chất bảo vệ hoá học, Amifostin, Dexrazoxan, mesna, androgens, estrogen, medroxyprogesteron Axetat, progestin, aminoglutethimit, anastrozol, bicalutamit, clotrianiza, cyproteron Axetat, degarelix, exemestan, flutamit, fulvestrant, goserelin, letrozol, leuprolit, lupron, medroxyprogesteron Axetat, Megestrol Axetat, tamoxifen, triptorelin, asparaginaza, Dacarbazin, hydroxyure, levamisol, mitotan, procarbazon, tretinoin, glucocorticoit, Prednison, chromagen, thuốc nhuộm, oligonucleotit đối nghĩa nếu xuất hiện tự nhiên hoặc được tổng hợp bằng cách sử dụng nucleotit tiêu chuẩn và/hoặc không tiêu chuẩn (bao gồm ARN can thiệp (RNAi)), ARN sợi kép (dsRNA), ARN can thiệp nhón (siRNA), vi ARN (miRNA), aptame, CpG oligonucleotit, ribozym, angiozym, ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}Pb , Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111

1, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , taxan, cisplatin, metronidazol, misonidazol, desmetylmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomycin C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamit, 5-bromodeoxyuridin (BUdR), 5-iododeoxyuridin (IUdR), bromodeoxycytidin, flodeoxyuridin (FUdR), hydroxyure, dẫn xuất hematoporphyrin, Photofrin(r), dẫn xuất benzoporphyrin, NPe6, thiếc etioporphyrin (SnET2), pheorbide a, bacterioclophyll a, naphthaloxyanin, phthaloxyanin, kẽm phthaloxyanin, camptothecin, irinotecan, topotecan, amsacrin, daunorubicin, doxorubicin, epipodophyllotoxins, ellipticin, epirubicin, Etoposid, razoxan, Teniposid, Axitinib, Bosutinib, Cediranib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Imatinib, Lapatinib, Lestaurtinib, Nilotinib, Semaxanib, Sunitinib, Vandetanib, abrin, chuỗi abrin A, Aleurit fordii protein độc tố alpha, amatoxicotin, curcin, dianthin protein, chuỗi diphtheria A độc tố bệnh bạch hầu, các mảnh hoạt hoá không gắn kết của deoxyribonucleaza bệnh bạch hầu (Dnase), gelonin, mitogellin, chuỗi modeccin A, chất ức chế momordica charantia, neomycin, onconaza, phenomycin, Phytolaca americana protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), protein kháng virus cây thương lục Mỹ, chuỗi A Pseudomonas nội độc tố Pseudomonas ngoại độc tố từ Pseudomonas aeruginosa, restrictocin, ricin, chuỗi ricin A, ribonucleaza (Rnaza), chất ức chế sapaonaria officinalis, saporin, alpha-sarcin, Staphylococcal enterotoxin-A, cisplatin độc tố bệnh uốn ván, carboplatin, và oxaliplatin (Eloxatin, Sanofi Aventis), chất ức chế proteasom, PS-341, chất ức chế HDAC, vorinostat, belinostat, entinostat, mocetinostat, panobinostat, chất ức chế COX-2, ure được thể, chất ức chế protein sốc nhiệt, Geldanamycin, chất ức chế vỏ tuyến thượng thận, tricothecene, A12, 19D12, Cp751-871, H7C10, alphaIR3, ScFV/FC, EM/164, Matuzumab, Erbitux, Vectibix, mAb 806, Nimotuxumab, AVEO, AMG102, 5D5 (OA-5d5), H244G11, Ab #14 (MM 121-14), Herceptin, 1B4C3; 2D1D12, NVP-AEW541-A, BMS-536,924 (1H-benzoimidazol-2-yl)-1H-pyridin-2-on), BMS-554,417, Xycloligan, TAE226,

PQ401, Iressa, CI-1033 (PD 183805), Lapatinib (GW-572016), Tykerb, Tarceva, PKI-166, PD-158780, EKB-569, Tyrphostin AG 1478 (4-(3-Cloanillino)-6,7-dimetoxyquinazolin), PHA665752, ARQ 197, Capecitabin, 5-Triflometyl-2'-deoxyuridin, Methotrexat natri, Raltitrexed, Pemetrexed, Tegafur, Xytosin Arabinosit (Cytarabin), 5-azacytidin, 6-mercaptopurin (Mercaptopurin, 6-MP), Azathioprin, 6-thioguanin, Pentostatin, Fludarabin Phosphat, Cladribin (2-CdA, 2-clodeoxyadenosin), chất ức chế ribonucleotit Reductaza, Xyclophosphamit, Neosar, ifosfamid, Thiotepa, BCNU→ 1,3-bis(2-cloetyl)-1-nitosoure, CCNU→1, -(2-cloetyl)-3-xyclohexyl-1-nitosoure (metyl CCNU), Hexametylmelamin, busulfan, Procarbazin HCL, Dacarbazin (DTIC), chlorambucil, melphalan, carboplatin, oxaliplatin, doxorubicin HCL, daunorubicin xitrat, mitoxantron HCL, actinomycin D, Etoposit, topotecan HCL, Teniposit, irinotecan HCL(CPT-II), vincristin, Vinblastin Sulfat, Vinorelbin tartrat, vindesin sulphat, paclitaxel, docetaxel, Abraxan, ixabepilon, imatinib mesylat, sunitinib malat, sorafenib toslat, nilotinib Hydroclorua monohydrat, L-asparaginaza, alpha interferon, Avastin, IL-2, Aldesleukin, Proleukin, IL-12, Toremifen xitrat, Fulvestrant, Raloxifen HCL, anastrozol, letrozol, Fadrozol (CGS 16949A), exemestan, leuprolit Axetat, Lupron, goserelin Axetat, triptorelin pamoat, buserelin, Nafarelin, cetrorelix, bicalutamid, nilutamid, megestrol Axetat, chất tương tự somatostatin, preindinsolon, dexamethason, ketoconazol, sirolimus, temsirolimus (CCI-779), deforolimus (AP23573), Irinotecan; Leucovorin; Folfiri; 5-FU; Enalapril; Nifedipin; Clonidin; Temozolomit; Gemcitabin; Capecitabin; Paclitaxel; Regorafenib; Pertuzumab và everolimus (RAD001).

Theo một số phương án, dược phẩm được bọc lộ bao gồm một hoặc nhiều protein gắn kết như được bọc lộ trong bản mô tả này và một hoặc nhiều tác nhân khác, ví dụ, tác nhân hoá trị liệu. Ví dụ, dược phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều protein gắn kết trong dung dịch với một hoặc nhiều tác nhân khác. Theo một số phương án, tác nhân này là một hoặc nhiều trong số: irinotecan, leucovorin, 5-FU, temozolomit, gemcitabin, và paclitaxel. Theo một phương án, tác nhân là irinotecan. Theo một phương án, tác nhân là leucovorin. Theo một phương án, tác nhân là 5-FU.

Theo một phương án, tác nhân là irinotecan, leucovorin, và 5-FU. Theo một phương án, tác nhân là temozolomit. Theo một phương án, chất là gemcitabin. Theo một phương án, tác nhân là paclitaxel.

Theo một phương án khác, protein gắn kết là protein gắn kết dạng tinh thể và tồn tại như tinh thể. Theo một phương án, tinh thể là tinh thể giải phóng có kiểm soát được phẩm không chứa chất mang. Theo một phương án khác, protein gắn kết dạng tinh thể có chu kỳ nửa phân rã lớn hơn in vivo so với bản sao có thể hoà tan của protein gắn kết. Theo phương án khác nữa, protein dạng tinh thể vẫn có hoạt tính sinh học.

Theo một phương án khác, protein gắn kết được mô tả trong bản mô tả này được glycosyl hoá. Ví dụ, mẫu glycosyl hoá là mẫu glycosyl hoá của người.

Axit nucleic được phân lập mã hoá bất kỳ trong số các protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này cũng được đề xuất. Phương án khác đề xuất vectơ bao gồm axit nucleic được phân lập được bộc lộ trong bản mô tả này trong đó vectơ là pcDNA; pTT (Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2); pTT3 (pTT với nhiều vị trí tạo khuẩn lạc bổ sung; pEFBOS (Mizushima and Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18(17); pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO; pEF6 TOPO; pBOS; pHybE; hoặc pBJ. Theo một phương án, vectơ là vectơ được bộc lộ trong công bố patent Mỹ số 20090239259.

Theo khía cạnh khác, tế bào chủ được biến nạp với vectơ được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào nhân sơ, ví dụ, *E. Coli*. Theo một phương án khác, tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào sinh vật nguyên sinh, tế bào động vật, tế bào thực vật hoặc tế bào nấm. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CHO, COS, NS0, SP2, PER.C6, hoặc tế bào nấm, như *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc tế bào côn trùng, như Sf9. Theo một phương án, hai hoặc nhiều protein gắn kết, ví dụ, với các tính đặc hiệu khác nhau, được tạo ra trong tế bào chủ tái tổ hợp đơn lẻ. Ví dụ, sự biểu hiện của hỗn hợp gồm các kháng thể cũng được gọi là Oligoclonics™ (Merus B.V., The Netherlands) các patent Mỹ số 7,262,028 và 7,429,486.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này bao gồm việc nuôi cấy bất kỳ trong số các tế bào chủ được bọc lộ trong bản mô tả này trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện đủ để tạo ra protein gắn kết. Theo một phương án, từ 50% đến 75% protein gắn kết được tạo ra bằng phương pháp này là protein gắn kết hoá trị bốn đặc hiệu kép. Theo một phương án khác, từ 75% đến 90% protein gắn kết được tạo ra bằng phương pháp này là protein gắn kết hoá trị bốn đặc hiệu kép. Theo một phương án khác, từ 90% đến 95% protein gắn kết được tạo ra là protein gắn kết hoá trị bốn đặc hiệu kép.

Một phương án đề xuất chế phẩm để giải phóng protein gắn kết trong đó chế phẩm bao gồm protein gắn kết dạng tinh thể, thành phần và ít nhất một chất mang polyme. Theo một phương án, chất mang polyme là poly(axit acrylic), poly(xyanoacrylat), poly(axit amin), poly(anhydrit), poly(depsipeptit), poly(este), poly(axit lactic), poly(axit lactic-co-glycolic) hoặc PLGA, poly(b-hydroxybutyryl), poly(caprolacton), poly(dioxanon), poly(etylen glycol), poly((hydroxypropyl)metacrylamit, poly[(hữu cơ)phosphazen], poly(ortho este), poly(rượu vinylic), poly(vinylpyrrolidon), maleic anhydrit-alkyl vinyl ete copolyme, pluronic polyol, albumin, alginat, xenluloza, dẫn xuất xenluloza, collagen, fibrin, gelatin, axit hyaluronic, oligosacarit, glycaminoglycan, polysacarit được sulfat hoá hoặc hỗn hợp và copolyme của chúng. Theo một phương án, thành phần là albumin, sucroza, trehaloza, lactitol, gelatin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, methoxypolyetylen glycol, hoặc polyetylen glycol.

Phương án khác đề xuất phương pháp điều trị động vật có vú bao gồm bước cho động vật có vú dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm được bọc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm ít nhất một chất điều trị bổ sung để điều trị rối loạn. Ví dụ, chất bổ sung có thể là chất điều trị, chất hoá trị liệu; chất tạo hình ảnh, chất gây độc tế bào, chất ức chế hình thành mạch, chất ức chế kinaza (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất ức chế KDR và TIE-2), chất điều biến phân tử đồng kích thích (bao gồm nhưng không chỉ

giới hạn ở kháng i-B7.1, kháng-B7.2, CTLA4-Ig, kháng-CD20), chất phong bế phân tử dính bám (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở kháng thể kháng LFA-1, kháng thể kháng E/L selectin, chất ức chế phân tử nhỏ), kháng thể kháng xytokin hoặc mảnh chức năng của nó (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở kháng thể kháng IL-18, kháng TNF, hoặc kháng IL-6/thụ thể xytokin), mAb kháng VEGF; mAb kháng DLL4; methotrexat, xyclosporin, rapamycin, FK506, chất đánh dấu có thể phát hiện hoặc chất thông báo, chất đối kháng TNF, chất chống thấp khớp, chất xỏ cơ, thuốc mê, dược chất chống viêm không steroid (NSAID), thuốc làm giảm đau, thuốc gây mê, thuốc an thần, thuốc gây mê cục bộ, chất phong bế thần kinh-cơ, thuốc kháng vi sinh vật, thuốc chống bệnh vẩy nến, corticosteriot, steroid đồng hoá, erythropoietin, chất gây miễn dịch, globulin miễn dịch, chất ngăn chặn miễn dịch, hormon sinh trưởng, dược chất thay thế hormon, dược phẩm phóng xạ, thuốc chống suy nhược, thuốc chống loạn thần kinh, chất kích thích, thuốc chữa bệnh hen, chất chủ vận beta, steroid xông, epinephrin hoặc chất tương tự, xytokin, hoặc chất đối kháng xytokin. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung là chất hoá trị liệu. Theo một số phương án, chất bổ sung là một hoặc nhiều trong số: irinotecan, leucovorin, 5-FU, temozolomit, gemcitabin, và paclitaxel. Theo một phương án, chất là irinotecan. Theo một phương án, chất là leucovorin. Theo một phương án, chất là 5-FU. Theo một phương án, chất là irinotecan, leucovorin, và 5-FU. Theo một phương án, chất là temozolomit. Theo một phương án, chất là gemcitabin. Theo một phương án, chất là paclitaxel.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp được đề xuất để chẩn đoán và/hoặc điều trị đối tượng là người mắc rối loạn mà có thể được chẩn đoán và/hoặc được điều trị bằng cách hướng đích VEGF và/hoặc DLL4 (ví dụ, rối loạn hình thành mạch bất kỳ hoặc rối loạn khác bất kỳ kết hợp với sự biểu hiện khác thường của VEGF và/hoặc DLL4), bao gồm cho đối tượng là người dùng protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này sao cho hoạt tính của đích hoặc các đích, ở đối tượng là người được ức chế và một hoặc nhiều triệu chứng được giảm giảm hoặc việc điều trị đạt được. Protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị người mắc bệnh ung thư nguyên phát và di căn, bao gồm

bệnh ung thư biểu mô vú, ruột kết, trực tràng, phổi, miệng-hầu, hầu dưới, thực quản, dạ dày, tuyến tụy, gan, bàng quang và ống mật, ruột non, đường niệu (bao gồm thận, bàng quang và niệu mạc), đường sinh dục nữ giới (bao gồm cổ tử cung, tử cung và buồng trứng cũng như bệnh ung thư nhau và bệnh lá nuôi phôi thời kỳ thai nghén), đường sinh dục nam giới (bao gồm tuyến tiền liệt, túi tinh, tinh hoàn và bệnh ung thư tế bào mầm), tuyến nội tiết (bao gồm tuyến giáp, tuyến thượng thận và tuyến yên), và da cũng như khối u mạch máu, khối u ác tính, xacôm (bao gồm các khối u xuất hiện từ xương và mô mềm cũng như xacôm Kaposi), khối u não, thần kinh, mắt và màng não (bao gồm u bào hình sao, u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm, u nguyên bào võng mạc, u dây thần kinh, u nguyên bào thần kinh, u tế bào schwann và khối u màng não), các khối u xuất hiện từ khối u ác tính tạo huyết, bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào bạch huyết cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu dạng tuỷ cấp tính (AML), ung thư mô bạch huyết tế bào B, ung thư mô bạch huyết Burkitt, bệnh bạch cầu tuỷ bào mạn tính (CML), bệnh bạch cầu tế bào bạch huyết mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào tóc, ung thư mô bạch huyết Hodgkin và không Hodgkin, khối u ác tính tạo huyết, xacôm Kaposi, ung thư mô bạch huyết ác tính, u mô bào ác tính, khối u ác tính, đa u tuỷ, hội chứng cận ung thư/chứng tăng canxi huyết ác tính, hoặc khối u rắn.

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư ở người bệnh bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư ruột kết. Theo một phương án, bệnh ung thư là u nguyên bào đệm. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tuyến tụy. Theo một phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư vú. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, tạo ra việc giảm sự sinh trưởng của khối u hoặc làm chậm sự sinh trưởng của khối u mà là ít nhất gần tương đương với tác dụng cộng hợp được mong đợi của tổ hợp kháng thể kháng VEGF và kháng thể kháng DLL4. Theo một số phương án, phương pháp tạo ra sự giảm sinh trưởng của khối u hoặc làm chậm sự sinh trưởng của khối u mà lớn hơn tác dụng cộng hợp (ví dụ, mức giảm lớn hơn so

với mức giảm được mong đợi bằng cách cộng các tác dụng được dự đoán của kháng thể kháng VEGF và kháng thể kháng DLL4).

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung, ví dụ, chất hoá trị liệu hoặc sinh học. Theo một số phương án, tác nhân là một hoặc nhiều trong số: regorafenib (STIVAGRA™), pertuzumab (PERJECTA™), irinotecan, leucovorin, 5-FU, temozolomit, gemcitabin, và paclitaxel. Theo một phương án, tác nhân là irinotecan. Theo một phương án, tác nhân là leucovorin. Theo một phương án, tác nhân là 5-FU. Theo một phương án, tác nhân là irinotecan, leucovorin, và 5-FU. Theo một phương án, tác nhân là temozolomit. Theo một phương án, tác nhân là gemcitabin. Theo một phương án, tác nhân là paclitaxel. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung, làm giảm sự sinh trưởng của khối u hoặc làm chậm sự sinh trưởng của khối u mà ít nhất tương đương với tác dụng cộng hợp được mong đợi của tổ hợp gồm protein gắn kết và tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, phương pháp tạo ra mức giảm sự sinh trưởng của khối u hoặc làm chậm sự sinh trưởng của khối u mà lớn hơn tác dụng cộng hợp (ví dụ, mức giảm lớn hơn so với tác dụng được mong đợi từ việc cộng các tác dụng được dự đoán của protein gắn kết và tác nhân bổ sung).

Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư ruột kết bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều irinotecan, leucovorin, và 5-FU. Theo một số phương án, phương pháp điều trị u nguyên bào đệm bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, tùy ý kết hợp với temozolomit. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư tuyến tụy bao gồm việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bọc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, tùy ý kết hợp với gemcitabin. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư vú bao gồm

việc cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó, tùy ý kết hợp với paclitaxel.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất chống tăng huyết áp. Một hoặc nhiều chất chống tăng huyết áp có thể được chọn từ nhóm gồm có thuốc lợi tiểu, chất đối kháng thụ thể gây tiết adrenalin, chất phong bế kênh canxi, chất ức chế thận tố, chất ức chế ACE, chất đối kháng thụ thể angiotensin II, chất giãn mạch và chất chủ vận alpha-2. Ví dụ, chất có thể là một hoặc nhiều clonidin, enalapril; Nifedipin; metyldopa, hydralazin, prazosin, reserpin, moxonidin, guanfacin, perindopril/indapamit, lofexidin, và metirosin. Theo một số phương án, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất chống đông tụ. Ví dụ, chất chống đông tụ có thể là một hoặc nhiều trong số warfarin, heparin, heparin khối lượng phân tử thấp, dalteparin natri, argatroban, bivalirudin, lepirudin, và dextroza. Theo một số phương án, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất chống tăng huyết áp và một hoặc nhiều chất chống đông tụ.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị người mắc thoái hoá điểm vàng (bao gồm dạng ướt), bệnh võng mạc do đái tháo đường, và/hoặc bệnh hoặc rối loạn khác bất kỳ được đặc trưng bởi sự sinh trưởng quá mức của mạch hoặc chứng phù.

Theo một phương án, protein gắn kết hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để điều trị bệnh ung thư hoặc ngăn ngừa hoặc ức chế sự di căn từ khối u được mô tả trong bản mô tả này, khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với liệu pháp điều trị phóng xạ và/hoặc tác nhân hoá trị liệu.

Theo một phương án, tác nhân hoá trị liệu hoặc sinh học mà protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tổ hợp bao gồm các chất sau đây: axit 13-cis-Retinoic; 2-CdA; 2-Clodeoxyadenosin; 5-Azacitidin; 5-Flouracil; 5-FU; 6-Mercaptopurin; 6-MP; 6-TG; 6-Thioguanin; Abraxan; Accutane®; Actinomycin-D; Adriamycin®; Adrucil®; Afinitor®; Agrylin®; Ala-Cort®; Aldesleukin;

Alemtuzumab; ALIMTA; Alitretinoin; Alkaban-AQ®; Alkeran®; Axit All-transretinoic; Alpha Interferon; Altretamin; Amethopterin; Amifostin; Aminoglutethimit; Anagrelit; Anandron®; Anastrozol; Arabinosylxytosin; Ara-C Aranesp®; Aredia®; Arimidex®; Aromasin®; Arranon®; Arsen Trioxit; Arzerra™; Asparaginaza; ATRA; Avastin®; Azacitidin; BCG; BCNU; Bendamustin; Bevacizumab; Bexaroten; BEXXAR®; Bicalutamit; BiCNU; Blenoxane®; Bleomycin; Bortezomib; Busulfan; Busulfex®; C225; Canxi Leucovorin; Campath®; Camptosar®; Camptothecin-11; Capecitabin Carac™; Carboplatin; Carmustin; Chất xốp Carmustin; Casodex®; CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine®; Cetuximab; Chlorambucil; Cisplatin; Nhân tố Citrovorum; Cladribin; Cortison; Cosmegen®; CPT-11; Xyclophosphamit; Cyadren®; Cytarabin; Cytarabin Liposomal; Cytosar-U®; Cytoxan®; Dacarbazin; Dacogen; Dactinomycin; Darbepoetin Alfa; Dasatinib; Daunomycin; Daunorubicin; Daunorubicin Hydroclorua; Daunorubicin Liposomal; DaunoXome®; Decadron; Decitabin; Delta-Cortef®; Deltasone®; Denileukin; Diftitox; DepoCyt™; Dexamethason; Dexamethason Axetat; Dexamethason Natri Phosphat; Dexason; Dexrazoxan; DHAD; DIC; Diodex; Docetaxel; Doxil®; Doxorubicin; Doxorubicin Liposomal; Droxia™; DTIC; DTIC-Dome®; Duralone®; Efudex®; Eligard™; Ellence™; Eloxatin™; Elspar®; Emcyt®; Epirubicin; Epoetin Alfa; Erbitux; Erlotinib; Erwinia L-asparaginaza; Estramustin; Ethyol Etopophos®; Etoposit; Etoposit Phosphat; Eulexin®; Everolimus; Evista®; Exemestan; Fareston®; Faslodex®; Femara®; Filgrastim; Floxuridin; Fludara®; Fludarabin; Floplex®; Flouracil; Flouracil (kem); Fluoxymesteron; Flutamid; Axit Folinic; FUDR®; Fulvestrant; Gefitinib; Gemcitabin; Gemtuzumab ozogamicin; Gemzar; Gleevec™; Chất xốp Gliadel®; GM-CSF; Goserelin; Yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt (G-CSF); Yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (G-MCSF); Halotestin®; Herceptin®; Hexadrol; Hexalen®; Hexametylmelamin; HMM; Hycamtin®; Hydrea®; Hydrocort Axetat®; HydroCortison; HydroCortison Natri Phosphat; HydroCortison Natri Suxinat; Hydrocorton Phosphat; Hydroxyure; Ibritumomab; Ibritumomab Tiuxetan; Idamycin®; Idarubicin Ifex®; Interferon-alpha; Interferon-alpha-2b (thể tiếp hợp PEG); Ifosfamid; Interleukin-11 (IL-11);

Interleukin-2 (IL-2); Imatinib mesylat; Imidazol Carboxamit; Intron A®; Iressa®; Irinotecan; Isotretinoin; Ixabepilon; Ixempra™; KADCYCLA®; Kidrolaza (t) Lanacort®; Lapatinib; L-asparaginaza; LCR; Lenalidomit; Letrozol; Leucovorin; Leukeran; Leukine™; Leuprolit; Leurocristin; Leustatin™; Liposomal Ara-C; Liquid Pred®; LoMustin; L-PAM; L-Sarcolysin; Lupron®; Lupron Depot®; Matulane®; Maxidex; Mechlorethamin; Mechlorethamin Hydroclorua; Medralone®; Medrol®; Megace®; Megestrol; Megestrol Axetat; Melphalan; Mercaptopurin; Mesna; Mesnex™; Methotrexate; Methotrexate Natri; Metylprednisolon; Meticorten®; Mitomycin; Mitomycin-C; Mitoxantron M-Prednisol®; MTC; MTX; Mustargen®; Mustin; Mutamycin®; Myleran®; Mylocel™; Mylotarg®; Navelbine®; Nelarabin; Neosar®; Neulasta™; Neumega®; Neupogen®; Nexavar®; Nilandron®; Nilotinib; Nilutamid; Nipent®; Nitrogen Mustard Novaldex®; Novantron®; Nplat; Octreotit; Octreotit Axetat; Ofatumumab; Oncospar®; Oncovin®; Ontak®; Onxal™; Oprelvekin; orcapred®; orcasone®; Oxaliplatin; Paclitaxel; Paclitaxel Protein-gắn kết; Pamidronat; Panitumumab; Panretin®; Paraplatin®; Pazopanib; Pediapred®; PEG Interferon; Pegaspargaza; Pegfilgrastim; PEG-INTRON™; PEG-L-asparaginaza; PEMETREXED; Pentostatin; Phenylalanin mù tạc; Platinol®; Platinol-AQ®; Prednisolon; Prednison; Prelone®; Procarbazin; PROCRIT®; Proleukin®; Prolifeprospan 20 với mô ghép Carmustin; Purinethol®; Raloxifen; Revlimid®; Rheumatrex®; Rituxan®; Rituximab; Roferon-A®; Romiplostim; Rubex®; Rubidomycin Hydroclorua; Sandostatin®; Sandostatin LAR®; Sargramostim; Solu-Cortef®; Solu-Medrol®; Sorafenib; SPRYCEL™; STI-571; Streptozocin; SU11248; Sunitinib; Sutent®; Tamoxifen Tarceva®; Targretin®; Tasigna®; Taxol®; Taxotere®; Temodar®; Temozolomit Temsirolimus; Teniposit; TESPA; Thalidomit; Thalomid®; TheraCys®; Thioguanin; Thioguanin Tabloid®; Thiophosphoamit; Thioplex®; Thiotepa; TICE®; Toposar®; Topotecan; Toremifen; Torisel®; Tositumomab; Trastuzumab; Treanda®; Tretinoin; Trexall™; Trisenox®; TSPA; TYKERB®; VCR; Vectibix™; Velban®; Velcade®; VePesid®; Vesanoid®; Viadur™; Vidaza®; Vinblastin; Vinblastin Sulfat; Vincasar Pfs®; Vincristin; Vinorelbin; Vinorelbin tartrat; VLB; VM-26; Vorinostat; Votrient; VP-16; Vumon®; Xeloda®; Zanosar®; Zevalin™; Zinecard®; Zoladex®; Axit Zoledronic; Zolinza;

hoặc Zometa®, và/hoặc chất khác bất kỳ không được liệt kê một cách cụ thể trong bản mô tả này mà hướng đích các con đường tương tự.

Theo một phương án khác, phương pháp điều trị người bệnh mắc rối loạn bao gồm bước cho dùng một hoặc nhiều protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này riêng hoặc dùng (các) protein gắn kết trước, đồng thời hoặc sau khi dùng tác nhân thứ hai. Theo phương án cụ thể, được phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này được dùng cho người bệnh qua đường miệng, ngoài đường tiêu hoá, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khớp, trong phế quản, trong màng bụng, trong bao khớp, trong sụn, trong khoang, trong khoang cơ thể, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ, trong dạ dày, trong gan, trong tim, trong xương, trong xương chậu, trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong xương sống, trong hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong bàng quang, trong tĩnh mạch liều cao, âm đạo, trực tràng, khoang miệng, dưới lưỡi, trong mũi, hoặc qua da.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của một hoặc nhiều kháng nguyên hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm được đề xuất, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên hoặc mảnh của nó là DLL4 và/hoặc VEGF. Phương pháp bao gồm bước thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với kháng nguyên hoặc mảnh của nó, bằng thử nghiệm miễn dịch. Thử nghiệm miễn dịch (i) dùng ít nhất một protein gắn kết và ít nhất một chất đánh dấu có thể phát hiện và (ii) bao gồm so sánh tín hiệu được tạo ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện được như chỉ dấu trực tiếp hoặc gián tiếp cho thấy sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm với tín hiệu được sinh ra như chỉ dấu trực tiếp hoặc gián tiếp cho thấy sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu đối chứng hoặc mẫu hiệu chỉnh. Mẫu hiệu chỉnh theo cách tùy ý là một phần của dãy các mẫu hiệu chỉnh mà trong mỗi trường hợp các mẫu hiệu chỉnh này khác với các mẫu hiệu chỉnh khác trong dãy ở nồng độ kháng nguyên, hoặc mảnh của nó. Phương pháp có thể bao gồm (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một chất bắt giữ, mà gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, để tạo ra phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên

hoặc mảnh của nó (ii) cho phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên hoặc mảnh của nó tiếp xúc với ít nhất một chất phát hiện, mà bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện và gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, mà không được gắn kết bởi chất bắt giữ, để tạo thành phức hệ phát hiện và (iii) xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện được tạo thành trong bước (ii), trong đó ít nhất một chất bắt giữ và/hoặc ít nhất một chất phát hiện là ít nhất một protein gắn kết.

Theo cách khác, theo một số phương án phương pháp xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm có thể bao gồm (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một chất bắt giữ, mà gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, để tạo thành phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên hoặc mảnh của nó và đồng thời hoặc lần lượt, theo thứ tự, cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với kháng nguyên được đánh dấu theo cách phát hiện hoặc mảnh của nó, mà có thể cạnh tranh với kháng nguyên bất kỳ hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm để gắn kết với ít nhất một chất bắt giữ, trong đó kháng nguyên bất kỳ hoặc mảnh của nó, có mặt trong mẫu thử nghiệm và kháng nguyên được đánh dấu theo cách phát hiện cạnh tranh với nhau để tạo thành phức hệ phát hiện và (ii) xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện được tạo thành trong (i), trong đó ít nhất một chất bắt giữ là ít nhất một protein gắn kết và trong đó tín hiệu được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện bắt giữ là tỷ lệ nghịch với lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm.

Theo các phương án khác nhau, mẫu thử nghiệm có thể là từ người bệnh, trong trường hợp mà phương pháp còn có thể bao gồm việc chẩn đoán, tiên đoán, hoặc đánh giá hiệu quả của việc điều trị/phòng bệnh của người bệnh. Nếu phương pháp còn bao gồm việc đánh giá hiệu quả của việc điều trị/phòng bệnh của người bệnh, phương pháp này tùy ý còn bao gồm bước cải biến việc điều trị/phòng bệnh

của người bệnh nếu cần để cải thiện hiệu quả. Phương pháp có thể được làm thích ứng để sử dụng trong hệ tự động hoặc hệ thống bán tự động. Do đó, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để xác định liệu đối tượng có hoặc có nguy cơ phát triển bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu hay không. Cụ thể là, phương pháp này có thể bao gồm các bước:

(a) xác định nồng độ hoặc lượng của một hoặc nhiều chất phân tích hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm từ đối tượng (ví dụ, sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, hoặc phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này); và

(b) so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích hoặc (các) mảnh của nó, như được xác định ở bước (a) với hàm lượng định trước, trong đó nếu nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích được xác định ở bước (a) là tốt hơn so với lượng định trước, thì đối tượng được xác định là không mắc hoặc không có nguy cơ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu. Tuy nhiên, nếu nồng độ hoặc lượng của (các) chất phân tích được xác định ở bước (a) là không tốt hơn so với lượng định trước, thì đối tượng được xác định là có hoặc có nguy cơ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu.

Ngoài ra, được đề xuất trong bản mô tả này là các phương pháp kiểm tra sự tiến triển của bệnh ở đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) xác định nồng độ hoặc lượng của một hoặc nhiều chất phân tích trong mẫu thử nghiệm từ đối tượng;

(b) xác định nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích trong mẫu thử nghiệm sau đó từ cùng đối tượng; và

(c) so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b) với nồng độ hoặc lượng các chất phân tích được xác định ở bước (a), trong đó nếu nồng độ hoặc lượng được xác định ở bước (b) là không thay đổi hoặc không tốt hơn khi so với nồng độ hoặc lượng được xác định ở bước (a), thì bệnh ở đối tượng được xác định là tiếp tục, tiến triển hoặc trở nên tồi tệ hơn. Bằng cách so sánh,

nếu nồng độ hoặc lượng như được xác định ở bước (b) là tốt hơn khi so với nồng độ hoặc lượng như được xác định ở bước (a), thì bệnh ở đối tượng được xác định là bị gián đoạn, thoái lui hoặc được cải thiện.

Tuỳ ý, phương pháp kiểm tra sự tiến triển của bệnh còn bao gồm việc so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b), ví dụ với lượng định trước. Hơn nữa, tuỳ ý là phương pháp bao gồm việc điều trị đối tượng bằng một hoặc nhiều được phẩm trong khoảng thời gian nếu việc so sánh thể hiện rằng nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b), ví dụ, là không tốt hơn so với lượng định trước.

Cũng được đề xuất là kit để phân tích sự có mặt hoặc nồng độ của một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc mảnh của nó ở mẫu thử nghiệm, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên là DLL4 và/hoặc VEGF. Kit bao gồm ít nhất một protein gắn kết, như được mô tả trong bản mô tả này, để phân tích kháng nguyên hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm, và hướng dẫn để phân tích kháng nguyên hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm. Theo một phương án, ít nhất một protein gắn kết tuỳ ý được đánh dấu theo cách có thể phát hiện được.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 được biểu thị dưới dạng sơ đồ các cấu trúc protein gắn kết miền biến đổi kép (DVD) và cho thấy cách tạo ra protein gắn kết DVD từ hai kháng thể bố mẹ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất protein gắn kết đa hoá trị và/hoặc đặc hiệu kép có khả năng gắn kết epitop trên hai protein khác nhau. Protein gắn kết miền biến đổi kép (cũng được dùng để chỉ DVD, protein gắn kết DVD hoặc globulin miễn dịch miền biến đổi kép (DVD-IgTM)), và được phẩm của nó, cũng như các axit nucleic, vector biểu hiện tái tổ hợp và tế bào chủ để tạo ra protein gắn kết DVD cũng được đề xuất. Phương pháp sử dụng protein gắn kết DVD để phát hiện các kháng nguyên đặc hiệu, in vitro hoặc in vivo cũng được đề xuất.

Trừ khi có chỉ định khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có các nghĩa mà được hiểu một cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Trong trường hợp có thể có nhiều nghĩa tiềm tàng bất kỳ, các định nghĩa được đề xuất trong bản mô tả này có quyền quyết định so với định nghĩa trong từ điển hoặc ngoại lai. Trừ khi có chỉ định khác, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm số ít. Việc sử dụng từ “hoặc” có nghĩa là “và/hoặc” từ phi có chỉ định khác. Việc sử dụng thuật ngữ “việc bao gồm”, cũng như các dạng khác, như “bao gồm” và “được bao gồm”, là không bị hạn chế. Khoảng bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này sẽ được hiểu để bao gồm các điểm cuối và tất cả các trị số ở giữa các điểm cuối.

Các tiêu đề của phần được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích cấu tạo và không nhằm giới hạn đối tượng được mô tả. Tất cả các tài liệu hoặc các phần của tài liệu, được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở patent, đơn yêu cầu cấp patent, bài báo, sách và các hiệp ước, được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Khi các tài liệu được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo trái với nội dung được chứa trong bản mô tả này, thì bản mô tả này sẽ thay thế các nội dung trái ngược bất kỳ.

Thông thường, danh pháp được sử dụng liên quan đến việc nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, miễn dịch, vi sinh vật, gen và protein và hoá học và lai axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này là đã được biết đến và thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các phương pháp và kỹ thuật được đề xuất trong bản mô tả này thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã được biết đến trong lĩnh vực này và như được mô tả trong các tài liệu tham chiếu chung khác nhau và cụ thể hơn mà được trích dẫn và được mô tả trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ định khác. Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, như được hoàn thành chung trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả trong bản mô tả này, Trừ khi có chỉ định khác. Danh pháp được sử dụng liên quan đến và các quy trình và kỹ thuật phòng thí nghiệm về hoá học phân tích, hoá hữu cơ tổng hợp và hoá học y khoa và dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này là đã được biết đến và được sử dụng thông thường trong lĩnh vực này, trừ khi có chỉ định khác.

Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng đối với tổng hợp hoá học, phân tích hoá học, được phẩm, bào chế và phân phối và điều trị người bệnh.

Để bản mô tả này được hiểu một cách dễ dàng hơn, các thuật ngữ lựa chọn được xác định dưới đây.

Thuật ngữ “kháng thể” dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch (Ig), mà thường gồm có bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) hoặc mảnh chức năng, thể đột biến, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, mà vẫn có dấu hiệu gắn kết epitop của phân tử Ig. Mảnh, thể đột biến, biến thể hoặc dạng kháng thể dẫn xuất là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Theo phương án về kháng thể có chiều dài ddaayf ddur, mỗi chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng cố định chuỗi nặng (CH). CH gồm có ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng cố định chuỗi nhẹ (CL). CL gồm có miền CL đơn. VH và VL còn có thể được chia thành các bùng siêu biến, vùng xác định hỗ trợ (CDR), được đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn nhiều hơn, vùng khung (FR). Thông thường, mỗi VH và VL gồm có ba CDR và bốn FR, được bố trí từ đầu cuối amino đến đầu cuối carboxy theo thứ tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc loại bất kỳ trong số (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2), hoặc phân nhóm.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” dùng để chỉ kháng thể mà gắn kết một kháng nguyên (hoặc epitop) trên một trong số hai nhánh gắn kết của nó (một cặp HC/LC), và gắn kết kháng nguyên khác nhau (hoặc epitop) trên nhánh gắn kết thứ hai của nó (cặp HC/LC khác). Kháng thể đặc hiệu kép có hai nhánh gắn kết kháng nguyên khác biệt (trong trình tự đặc hiệu và CDR) và có hoá trị một đối với mỗi kháng nguyên mà nó gắn kết. Các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm các kháng thể được sinh ra bằng công nghệ quadroma (Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934): 537-40), bằng việc tiếp hợp hoá học của hai kháng thể đơn dòng khác nhau (Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31), hoặc phương pháp “knob-into-hole” hoặc các phương pháp tương tự mà đưa các đột biến vào vùng Fc (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-6448).

Kháng thể “trưởng thành về mặt ái lực” là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều CDR của nó mà thu được sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể bố mẹ mà không có (các) thay đổi này. Các kháng thể trưởng thành về mặt ái lực lấy làm ví dụ sẽ có các ái lực nanomol hoặc thậm chí picomol đối với kháng nguyên đích. Các kháng thể trưởng thành về mặt ái lực được tạo ra bằng các quy trình đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ấn phẩm: Marks et al. (1992) *BioTechnology* 10:779-783 mô tả sự trưởng thành về mặt ái lực đối bằng cách di chuyển miền VH và VL. Sự phát sinh đột biến ngẫu nhiên của CDR và/hoặc các gốc khung được mô tả bởi Barbas et al. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene* 169:147-155; Yelton et al. (1995) *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.* 154(7):3310-9; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896 và đột biến ở các vị trí phát sinh đột biến lựa chọn, vị trí tiếp xúc hoặc vị trí siêu đột biến với hoạt tính làm tăng cường các gốc axit amin được mô tả trong patent Mỹ số 6,914,128.

Thuật ngữ “kháng thể ghép CDR” dùng để chỉ kháng thể mà bao gồm các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trong đó các trình tự của một hoặc nhiều vùng CDR của VH và/hoặc VL được thay thế bằng các trình tự CDR của kháng thể khác. Ví dụ, hai kháng thể có thể là từ các loài khác nhau, như các kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của chuột trong đó một hoặc nhiều CDR của chuột đã được thay thế bằng các trình tự CDR của người.

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống người” dùng để chỉ kháng thể từ các loài không phải người mà đã được thay đổi là “tương tự với người” nhiều hơn, nghĩa là tương tự hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một loại kháng thể được làm giống người là kháng thể ghép CDR, trong đó các trình tự CDR không phải của người được đưa vào trong các trình tự VH và VL của người để thay thế các trình tự CDR tương ứng của người. “Kháng thể được làm giống người” cũng là kháng thể hoặc biến thể, dẫn chất, chất tương tự hoặc mảnh của nó mà bao gồm các trình tự vùng khung (FR) có hầu như giống nhau (ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% giống nhau) với trình tự axit amin của trình tự FR kháng thể của người và ít nhất một CDR có sự giống nhau đáng kể

(ví dụ, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% giống nhau) với trình tự axit amin của CDR không phải của người. Kháng thể được làm giống người hầu như có thể bao gồm tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) trong đó trình tự của tất cả hoặc hầu như tất cả trong số các vùng CDR tương ứng với các trình tự của globulin miễn dịch không phải của người (nghĩa là, kháng thể cho) và trình tự của tất cả hoặc hầu như tất cả trong số các vùng FR là trình tự của globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm giống người cũng có thể bao gồm các vùng CH1, bản lề, CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng từ kháng thể của người. Theo một phương án, kháng thể được làm giống người cũng bao gồm ít nhất một phần vùng Fc globulin miễn dịch của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống người chỉ chứa chuỗi nhẹ được làm giống người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống người chỉ chứa chuỗi nặng được làm giống người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống người chỉ chứa miền biến đổi được làm giống người của miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc được làm giống người của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống người chứa chuỗi nhẹ cũng như ít nhất miền biến đổi của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống người chứa chuỗi nặng cũng như ít nhất là miền biến đổi của chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ “protein gắn kết miền biến đổi kép” và “globulin miễn dịch miền biến đổi kép” dùng để chỉ protein gắn kết mà có hai miền biến đổi trong mỗi trong số hai nhánh gắn kết của nó (ví dụ, cặp HC/LC) (xem WO 02/02773), mỗi trong số chúng có khả năng gắn kết với một kháng nguyên. Theo một phương án, mỗi miền biến đổi gắn kết các kháng nguyên hoặc epitop khác nhau. Theo một phương án khác, mỗi miền biến đổi gắn kết cùng kháng nguyên hoặc epitop. Theo một phương án khác, protein gắn kết miền biến đổi kép có hai nhánh gắn kết kháng nguyên giống nhau, với tính đặc hiệu giống nhau và trình tự CDR giống nhau và có hoá trị hai đối với mỗi kháng nguyên mà nó gắn kết. Theo một phương án, protein gắn kết DVD có thể là đơn đặc hiệu, nghĩa là, có khả năng gắn kết một kháng nguyên hoặc đa đặc hiệu, nghĩa là có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều kháng nguyên. Protein gắn kết DVD bao gồm hai DVD polypeptit chuỗi nặng và hai DVD polypeptit chuỗi nhẹ

được đề cập đến như là DVD-IgTM. Theo một phương án, mỗi một nửa trong số bốn chuỗi protein gắn kết DVD bao gồm DVD polypeptit chuỗi nặng và DVD polypeptit chuỗi nhẹ và hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, mỗi vị trí gắn kết bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng và miền biến đổi của chuỗi nhẹ với tổng số gồm 6 CDR tham gia vào gắn kết kháng nguyên/vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể kháng idiotyp” dùng để chỉ kháng thể xuất hiện kháng trình tự axit amin của vị trí kết hợp kháng nguyên của kháng thể khác. Kháng thể kháng idiotypic có thể được dùng để làm tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng kháng nguyên.

Thuật ngữ “hoạt tính sinh học” dùng để chỉ một hoặc nhiều đặc tính sinh học bất kỳ của phân tử (bất kể có mặt trong tự nhiên như được tìm thấy in vivo, hoặc được cung cấp hoặc được cho phép bằng các phương pháp tái tổ hợp). Các đặc tính sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gắn kết thụ thể, gây tăng sinh tế bào, ức chế sự sinh trưởng của tế bào, gây xytokin khác, gây chết tế bào theo lập trình và hoạt tính enzym.

Thuật ngữ “trung hoà” dùng để chỉ việc kháng lại hoạt tính sinh học của kháng nguyên khi protein gắn kết gắn kết một cách đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một phương án, protein gắn kết trung hoà gắn kết với kháng nguyên (ví dụ, xytokin) và làm giảm hoạt tính sinh học của nó ít nhất khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 85% hoặc nhiều hơn.

“Tính đặc hiệu” dùng để chỉ khả năng của protein gắn kết gắn kết theo cách chọn lọc kháng nguyên.

“Ái lực” là cường độ tương tác giữa protein gắn kết và kháng nguyên và được xác định bằng trình tự CDR của protein gắn kết cũng như theo bản chất của kháng nguyên, như kích cỡ, hình dạng và/hoặc điện tích của nó. Protein gắn kết có thể được chọn lọc theo ái lực mà tạo ra các điểm cuối điều trị mong muốn trong khi làm giảm thiểu tác dụng phụ bất lợi. Ái lực có thể được đo bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “hiệu lực” dùng để chỉ khả năng của protein gắn kết để đạt được tác dụng mong muốn và là phép đo hiệu quả điều trị của nó. Hiệu lực có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “khả năng phản ứng chéo” dùng để chỉ khả năng của protein gắn kết để gắn kết với một đích khác với đích mà nó kháng. Thông thường, protein gắn kết sẽ gắn kết (các) mô/(các) kháng nguyên đích của nó với ái lực cao một cách thích hợp, nhưng sẽ thể hiện ái lực thấp một cách thích hợp đối với các mô/các kháng nguyên không phải đích. Thông thường, protein gắn kết riêng rẽ được chọn để đáp ứng hai tiêu chuẩn: (1) kháng nguyên gắn kết, như được quan sát bằng cách sử dụng các phương pháp nhuộm đã được biết đến trong lĩnh vực này, với mô thích hợp đối với sự biểu hiện đã biết của đích kháng thể và (2) mẫu nhuộm tương tự giữa các mô người và các loài động (ví dụ, chuột và khỉ cynomolgus) từ cùng cơ quan. Các phương pháp này và các phương pháp khác đánh giá khả năng phản ứng chéo là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “chức năng sinh học” dùng để chỉ các tác dụng đặc hiệu *in vitro* hoặc *in vivo* của protein gắn kết. Protein gắn kết có thể hướng đích vài nhóm kháng nguyên và đạt được hiệu quả điều trị mong muốn qua nhiều cơ chế tác dụng. Protein gắn kết có thể hướng đích các protein có thể hoà tan, kháng nguyên bề mặt tế bào và/hoặc các lắng đọng protein ngoại bào. Protein gắn kết có thể chủ vận, đối kháng hoặc trung hoà hoạt tính của các đích của chúng. Protein gắn kết có thể trợ giúp thanh thải các đích mà chúng gắn kết hoặc có thể dẫn đến tính độc tế bào khi gắn kết với tế bào. Các phần của hai hoặc nhiều kháng nguyên có thể được hợp nhất thành dạng đa hoá trị để đạt được nhiều hơn một chức năng khác biệt trong phân tử protein gắn kết đơn. Các thử nghiệm *in vitro* và mô hình *in vivo* được sử dụng để đánh giá chức năng sinh học là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Protein gắn kết “ổn định” là protein trong đó protein gắn kết hầu như giữ lại độ ổn định vật lý, độ ổn định hoá học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi lưu trữ. Protein gắn kết đa hoá trị mà là ổn định *in vitro* ở các nhiệt độ khác nhau trong

khoảng thời gian kéo dài là có thể mong muốn. Các phương pháp làm ổn định protein gắn kết và đánh giá độ ổn định của chúng ở các nhiệt độ khác nhau là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “độ tan” dùng để chỉ khả năng của protein vẫn được phân tán trong dung dịch trong nước. Độ tan của protein trong chế phẩm chứa nước phụ thuộc vào sự phân bố hợp lý các gốc axit amin kỵ nước và ưa nước và do đó, độ tan có thể tương quan với việc tạo ra các protein gấp nếp một cách đúng đắn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có khả năng phát hiện sự tăng hoặc giảm độ tan của protein gắn kết bằng cách sử dụng các kỹ thuật HPLC thông thường và các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Protein gắn kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều tế bào chủ hoặc có thể được tạo ra *in vitro*, và hiệu suất tương đối/nỗ lực xác định “hiệu quả sản xuất”. Các nhân tố tác động đến hiệu quả sản xuất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, loại tế bào chủ (nhân sơ hoặc có nhân chuẩn), lực chọn vector biểu hiện, lựa chọn trình tự nucleotit và các phương pháp được dùng. Các vật liệu và phương pháp được sử dụng trong việc tạo ra protein gắn kết, cũng như việc xác định hiệu quả sản xuất, là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “gây miễn dịch” có nghĩa là khả năng của một chất để gây ra đáp ứng miễn dịch. Việc dùng protein gắn kết trong điều trị có thể dẫn đến tác động nhất định đối với đáp ứng miễn dịch. Các yếu tố hiệu lực mà có thể gây miễn dịch ở dạng đa hoá trị có thể được phân tích trong quá trình chọn kháng thể bố mẹ và các bước làm giảm nguy cơ này có thể được thực hiện để tối ưu hoá các kháng thể bố mẹ trước khi hợp nhất các trình tự của chúng thành dạng protein gắn kết. Các phương pháp làm giảm tính gây miễn dịch của kháng thể và protein gắn kết là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “chất đánh dấu” và “chất đánh dấu có thể phát hiện” có nghĩa là phần được gắn vào thành viên của cặp gắn kết đặc hiệu, như kháng thể hoặc chất

phân tích của nó để tạo ra phản ứng (ví dụ, gắn kết) giữa các thành viên của cặp gắn kết đặc hiệu, có thể phát hiện. Thành viên được gắn kết của cặp gắn kết đặc hiệu được dùng để chỉ “được đánh theo cách phát hiện.” Do đó, thuật ngữ “protein gắn kết được đánh dấu” dùng để chỉ protein có chất đánh dấu được hợp nhất mà tạo ra sự nhận dạng của protein gắn kết. Theo một phương án, chất đánh dấu là chất đánh dấu có thể phát hiện mà có thể tạo ra tín hiệu mà có thể phát hiện được bằng mắt thường hoặc thiết bị ví dụ, sự hợp nhất của axit amin được chất đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc gắn vào polypeptit của phần biotinyl mà có thể được phát hiện bằng avidin được đánh dấu (ví dụ, streptavidin chứa chất đánh dấu huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được phát hiện bằng các phương pháp quang học hoặc đo màu). Các ví dụ về chất đánh dấu đối với polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau đây: chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , hoặc ^{153}Sm); thể nhuộm sắc, chất đánh dấu huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, phospho lanthanit), chất đánh dấu enzym (ví dụ, peroxidaza từ cây cải ngựa, luciferaza, phosphataza kiềm); chất đánh dấu hoá huỳnh quang; các nhóm biotinyl; polypeptit epitop định trước được nhận biết bằng chất thông báo thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp leuxin khoá, vị trí gắn kết đối với các kháng thể thứ cấp, miền gắn kết kim loại, nhãn epitop); và chất từ tính, như gadolini chelat. Các ví dụ đại diện của chất đánh dấu thường được dùng cho các thử nghiệm miễn dịch bao gồm các phần mà tạo ra ánh sáng, ví dụ, hợp chất acridini và các phần mà tạo ra huỳnh quang, ví dụ, fluorescein. Về việc này, tự bản thân phần có thể không được đánh dấu theo cách phát hiện nhưng có thể trở nên có thể phát hiện khi phản ứng với phần khác nữa.

Thuật ngữ “thể tiếp hợp” dùng để chỉ protein gắn kết, như kháng thể hoặc DVD-Ig, mà được liên kết về mặt hoá học với phần hoá học thứ hai, như chất điều trị hoặc độc tế bào. Thuật ngữ “chất” bao gồm hợp chất hoá học, hỗn hợp gồm các hợp chất hoá học, đại phân tử sinh học hoặc phần chiết được chiết từ vật liệu sinh học. Các ví dụ về các chất điều trị hoặc độc tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, emetin, mitomycin, Etoposid, Teniposid, vincristin, Vinblastin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dion,

mitoxantron, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoid, procain, tetracain, lidocain, propranolol, metoprolol, atenolol, bisoprolol, và puromycin và các chất tương tự hoặc tương đồng của nó. Khi được dùng trong ngữ cảnh về thử nghiệm miễn dịch, thể tiếp hợp có thể là kháng thể được đánh dấu theo cách phát hiện hoặc DVD-Ig được sử dụng làm chất phát hiện.

Thuật ngữ “tinh thể” và “được kết tinh” dùng để chỉ protein gắn kết (ví dụ, kháng thể), hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, mà tồn tại ở dạng tinh thể. Các tinh thể là một dạng của trạng thái rắn của vật liệu, mà khác biệt với các dạng khác như trạng thái rắn vô định hình hoặc trạng thái tinh thể dạng lỏng. Tinh thể gồm có các dãy thông thường, lặp lại, ba chiều của nguyên tử, ion, phân tử (ví dụ, protein như kháng thể), hoặc bộ phân tử (ví dụ, phức hệ kháng nguyên/kháng thể). Các dãy ba chiều này được bố trí theo các mối quan hệ toán học đặc hiệu mà được hiểu trong lĩnh vực này. Đơn vị cơ bản hoặc khối xây dựng, mà được lặp lại trong tinh thể được gọi là đơn vị không đối xứng. Việc lặp lại đơn vị không đối xứng trong cách bố trí mà phù hợp với tính đối xứng tinh thể học được xác định tạo ra “tế bào đơn vị” của tinh thể. Việc lặp lại tế bào đơn vị bằng việc dịch thông thường trong tất cả ba kích thước tạo ra tinh thể. Xem Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, A PRACTICAL APPROACH, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Thuật ngữ “vector” dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết. Một loại vector là “plasmid”, mà dùng để chỉ vòng ADN sợi kép mạch vòng mà các mảnh ADN bổ sung có thể được chèn. Loại vector khác là vector virus, trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được chèn thành hệ gen virus. Các vector khác bao gồm vector ARC. Một số vector có khả năng sao chép độc lập trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú bổ sung). Các vector khác (ví dụ, vector không phải động vật có vú bổ sung) có thể được tích hợp vào trong hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào trong tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Một số vector có khả năng dẫn sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết một cách chặt chẽ. Các vector được dùng để chỉ trong bản mô tả này là “vector biểu hiện tái tổ

hợp” (hoặc đơn giản là, “vector biểu hiện”). Nói chung, vector biểu hiện hữu ích trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “plasmit” và “vector” có thể được sử dụng thay thế cho nhau như plasmit hầu hết là dạng vector được sử dụng một cách thông thường. Tuy nhiên, các dạng khác của vector biểu hiện cũng được bao gồm, như vector virus (ví dụ, retrovirus thiếu sao chép, adenovirus và virus kết hợp adeno), mà phục vụ chức năng tương đương. Nhóm vector pHybE (đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 61/021,282) có thể được sử dụng đối với kháng thể bố mẹ và protein gắn kết DVD tạo khuẩn lạc. V1, thu được từ pJP183; pHybE-hCg1,z,non-a V2, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc kháng thể và các chuỗi nặng DVD với vùng cố định kiểu hoang dại. V2, thu được từ pJP191; pHybE-hCk V3, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc kháng thể và chuỗi nhẹ DVD với vùng cố định kappa. V3, thu được từ pJP192; pHybE-hCl V2, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc kháng thể và chuỗi nhẹ DVD với vùng cố định lambda. V4, tạo thành với peptit tín hiệu lambda và vùng cố định kappa, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc chuỗi nhẹ DVD với miền V lai lambda-kappa. V5, tạo thành với peptit tín hiệu kappa và vùng cố định lambda, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc chuỗi nhẹ DVD với miền V lai kappa-lambda. V7, thu được từ pJP183; pHybE-hCg1,z,non-a V2, có thể được sử dụng để tạo khuẩn lạc kháng thể và chuỗi nặng DVD với vùng cố định đột biến (234,235 AA).

Thuật ngữ “tế bào chủ tái tổ hợp” hoặc “tế bào chủ” dùng để chỉ tế bào mà ADN ngoại sinh đã được đưa vào. Các thuật ngữ này dùng để chỉ không chỉ tế bào cụ thể mà còn chỉ thể hệ của tế bào này. Bởi vì một số cải biến có thể xảy ra trong nhiều thế hệ liên tiếp do sự đột biến hoặc tác động môi trường, thế hệ này trên thực tế có thể không giống với tế bào bố mẹ, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào chủ” như được sử dụng trong bản mô tả này. Theo một phương án, tế bào chủ bao gồm tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn. Theo một phương án, tế bào nhân chuẩn bao gồm tế bào của sinh vật nguyên sinh, nấm, thực vật và động vật. Theo một phương án khác, tế bào chủ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dòng tế bào nhân sơ *E.Coli*; dòng tế bào động vật có vú CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 và PER.C6; dòng tế bào côn trùng Sf9; và tế bào nấm *Saccharomyces cerevisiae*.

Thuật ngữ “chuyển nhiễm” bao gồm nhiều kỹ thuật được sử dụng một cách thông thường để đưa axit nucleic ngoại sinh (ví dụ, ADN) vào trong tế bào chủ, ví dụ, đục lỗ bằng xung điện, kết tủa canxi-Phosphat, chuyển nhiễm DEAE-dextran và tương tự.

Thuật ngữ “xytokin” dùng để chỉ protein được giải phóng bởi một quần thể tế bào mà hoạt động trên quần thể tế bào khác như chất trung gian nội bào. Thuật ngữ “xytokin” bao gồm protein từ các nguồn tự nhiên hoặc từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp và thể tương đương có hoạt tính sinh học của xytokin trình tự nguyên thể.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” có nghĩa là lượng chất từ vật sống hoặc vật sống trước đây. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, (ví dụ, máu nguyên vẹn), huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch ối, hoạt dịch, tế bào nội mô, bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, tế bào khác, cơ quan, mô, tuỷ xương, hạch bạch huyết và lá lách.

Thuật ngữ “thành phần” dùng để chỉ yếu tố của chế phẩm. Liên quan đến kit chẩn đoán, ví dụ, thành phần có thể là kháng thể bất giữ, kháng thể phát hiện hoặc tiếp hợp, mẫu đối chứng, chất hiệu chỉnh, dãy các chất hiệu chỉnh, panen nhạy, vật chứa, chất đệm, chất pha loãng, muối, enzym, đồng nhân tố đối với enzym, chất phát hiện, thuốc thử/dung dịch điều trị, chất nền (ví dụ, như dung dịch), dung dịch ngừng và tương tự mà có thể được bao gồm trong kit để thử nghiệm mẫu thử nghiệm. Do đó, “thành phần” có thể bao gồm, theo một số phương án, polypeptit hoặc chất phân tích khác như trên đây, mà được gắn cố định vào vật mang dạng rắn, như bằng cách gắn kết với kháng thể kháng chất phân tích (ví dụ, kháng polypeptit). Theo một số phương án, một hoặc nhiều thành phần có thể ở dạng dung dịch hoặc được làm đông khô.

“Đối chứng” dùng để chỉ chế phẩm mà không bao gồm chất phân tích (“đối chứng âm tính”) hoặc bao gồm chất phân tích (“đối chứng dương tính”). Đối chứng dương tính có thể bao gồm chất phân tích với nồng độ đã biết. “Mẫu đối chứng,” “đối chứng dương tính” và “chất hiệu chỉnh” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này dùng để chỉ chế phẩm chứa chất phân tích với nồng độ đã biết. “Đối chứng dương tính” có thể được sử dụng để thiết lập các đặc tính hiệu suất thử

nghiệm và là chất chỉ thị hữu ích của tính nguyên vẹn của thuốc thử (ví dụ, chất phân tích).

“Giới hạn định trước” và “hàm lượng định trước” thường dùng để chỉ trị số giới hạn thử nghiệm được sử dụng để đánh giá hiệu quả chẩn đoán/dự đoán/điều trị thu được bằng cách so sánh các kết quả thử nghiệm đối với giới hạn/hàm lượng định trước, trong đó giới hạn/hàm lượng định trước đã được liên kết hoặc kết hợp với các tham số lâm sàng khác nhau (ví dụ, mức trầm trọng của bệnh, sự tiến triển/không tiến triển/cải thiện, v.v). Mặc dù sáng chế có thể đưa ra các hàm lượng định trước lấy làm ví dụ, cần biết rõ rằng trị số giới hạn có thể thay đổi phụ thuộc vào bản chất của thử nghiệm miễn dịch (ví dụ, kháng thể được dùng, v.v). Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ cách để làm thích ứng bản mô tả này đối với các thử nghiệm miễn dịch khác để thu được trị số giới hạn đặc hiệu thử nghiệm miễn dịch đối với các thử nghiệm miễn dịch khác dựa vào bản mô tả này. Bất kể trị số chính xác về giới hạn/hàm lượng định trước có thể thay đổi giữa các thử nghiệm, mối tương quan như được mô tả trong bản mô tả này (nếu có) có thể áp dụng chung.

“Thuốc thử tiền điều trị,” ví dụ, thuốc thử tiêu, kết tủa và/hoặc hoà tan, như được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán như được mô tả trong bản mô tả này, là thuốc thử mà làm tan tế bào bất kỳ và/hoặc hoà tan chất phân tích bất kỳ mà có mặt trong mẫu thử nghiệm. Tiền điều trị là không nhất thiết đối với tất cả các mẫu, như được mô tả hơn nữa trong bản mô tả này. Trong số các chất khác, việc hoà tan chất phân tích (ví dụ, polypeptit quan tâm) có thể gây ra sự giải phóng chất phân tích ra khỏi protein gắn kết nội sinh có mặt trong mẫu. Thuốc thử tiền điều trị có thể là đồng nhất (không cần phải có bước chia tách) hoặc khác loại (cần phải có bước chia tách). Theo một số phương án, khi sử dụng thuốc thử tiền điều trị khác loại, chất phân tích kết tủa-protein gắn kết được loại bỏ ra khỏi mẫu thử nghiệm trước khi diễn ra bước thử nghiệm tiếp theo.

“Thuốc thử đối chứng chất lượng” trong bối cảnh về thử nghiệm miễn dịch và kit được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất hiệu chỉnh, đối chứng và panen nhạy. Một hoặc nhiều “chất hiệu chỉnh” hoặc “tiêu chuẩn” thường được sử dụng để thiết lập các đường cong (tiêu chuẩn) hiệu chỉnh để

nội suy nồng độ của phân tử đích, như kháng thể hoặc chất phân tích. Theo một số phương án, chất hiệu chỉnh đơn lẻ, mà gần với giới hạn dương tính/âm tính định trước, có thể được sử dụng. Theo cách khác, theo các phương án khác, nhiều chất hiệu chỉnh (nghĩa là, nhiều hơn một chất hiệu chỉnh hoặc lượng thay đổi của (các) chất hiệu chỉnh) có thể được sử dụng để thiết lập “panen nhảy” hoặc “gradient nhảy”.

Thuật ngữ “đôi tác gắn kết đặc hiệu” dùng để chỉ thành viên của cặp gắn kết. Cặp gắn kết đặc hiệu bao gồm hai phân tử khác nhau mà gắn kết một cách đặc hiệu với nhau qua các phương tiện hoá học hoặc vật lý. Theo các phương án khác nhau, ngoài gắn kết đặc hiệu kháng nguyên và kháng thể, các cặp gắn kết đặc hiệu khác có thể bao gồm biotin và avidin (hoặc streptavidin), carbohydrat và lectin, trình tự nucleotit bổ sung, tác quan và các phân tử thụ thể, đồng nhân tố và các enzym, chất ức chế enzym và enzym và tương tự. Hơn nữa, các cặp gắn kết đặc hiệu có thể bao gồm, theo một số phương án, các thành viên mà là thể tương tự của các thành viên gắn kết đặc hiệu ban đầu, ví dụ, thể tương tự chất phân tích. Các thành viên gắn kết đặc hiệu phản ứng miễn dịch bao gồm kháng nguyên, mảnh kháng nguyên và kháng thể, bao gồm các kháng thể đơn dòng và đa dòng cũng như các phức hệ, các mảnh và biến thể (bao gồm các mảnh biến thể) của nó, khi được phân lập hoặc được tạo ra về mặt tái tổ hợp.

Thuật ngữ “vùng Fc” có nghĩa là vùng đầu cuối C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, mà có thể được sinh ra bằng cách phân giải papain của kháng thể nguyên vẹn. Vùng Fc có thể là vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc biến thể. Vùng Fc của globulin miễn dịch thường bao gồm hai miền ổn định, miền CH₂ và miền CH₃ và tùy ý bao gồm miền CH₄. Việc thay thế của các gốc axit amin trong phần Fc để làm thay đổi chức năng tác quan của kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ, các patent Mỹ số 5,648,260 và 5,624,821). Vùng Fc làm trung gian vài chức năng tác quan quan trọng, ví dụ, cảm ứng xytokin, tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào, tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và tỷ lệ chu kỳ nửa phân rã/thanh thải của kháng thể và phức hệ kháng nguyên-kháng thể. Trong một số trường hợp, chức năng tác quan là có thể mong

muốn đối với globulin miễn dịch điều trị nhưng trong các trường hợp khác có thể là không nhất thiết hoặc thậm chí có hại, phụ thuộc vào các mục đích điều trị.

Thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của protein gắn kết có nghĩa là một hoặc nhiều mảnh protein gắn kết (ví dụ, kháng thể) mà giữ lại khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với kháng nguyên. Chức năng gắn kết kháng nguyên của protein gắn kết có thể được thực hiện bởi các mảnh kháng thể có chiều dài đầy đủ, cũng như các dạng đặc hiệu kép, đặc hiệu gấp hai hoặc đa đặc hiệu. Các ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của protein gắn kết bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hoá trị một gồm có các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hoá trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm có các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm có các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể, (v) mảnh dAb, mà bao gồm miền biến đổi đơn; và (vi) vùng xác định bổ trợ được phân lập (CDR). Hơn nữa, mặc dù hai miền của khung Fv, VL và VH được mã hoá bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu liên kết tổng hợp mà cho phép chúng được tạo ra như chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH ghép cặp để tạo thành các phân tử hoá trị một (đã được biết là chuỗi đơn Fv (scFv)). Các kháng thể chuỗi đơn cũng được dự định được bao gồm trong thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các dạng khác của kháng thể chuỗi đơn, như diabody cũng được bao gồm. Ngoài ra, các kháng thể chuỗi đơn cũng bao gồm “các kháng thể mạch thẳng” bao gồm cặp mảnh Fv liên tiếp (VH-CH1-VH-CH1) mà cùng với polypeptit chuỗi nhẹ bổ sung, tạo thành cặp vùng gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “protein gắn kết đa hoá trị” có nghĩa là protein gắn kết bao gồm hai hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, protein gắn kết đa hoá trị được thao tác để có ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên và không phải là kháng thể xuất hiện tự nhiên. Thuật ngữ “protein gắn kết đa đặc hiệu” dùng để chỉ protein gắn kết có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều đích liên quan hoặc không liên quan. Theo một phương án, protein gắn kết DVD được đề xuất trong bản mô tả này

bao gồm hai hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên và là protein gắn kết hoá trị bốn hoặc đa hoá trị.

Thuật ngữ “cầu liên kết” có nghĩa là gốc axit amin hoặc polypeptit bao gồm hai hoặc nhiều gốc axit amin được kết hợp bởi các liên kết peptit mà được sử dụng để liên kết hai polypeptit (ví dụ, hai miền VH hoặc hai miền VL). Các ví dụ về các polypeptit cầu liên kết là đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Thuật ngữ “đánh số theo Kabat”, “định nghĩa Kabat” và “đánh dấu Kabat” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Các thuật ngữ này, mà được nhận biết trong lĩnh vực này, dùng để chỉ hệ thống đánh số các gốc axit amin mà thay đổi nhiều hơn (nghĩa là, siêu biến) so với các gốc axit amin khác trong vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 and, Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Đối với vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng siêu biến nằm trong khoảng từ các vị trí axit amin từ 31 đến 35 đối với CDR1, các vị trí axit amin từ 50 đến 65 đối với CDR2, và các vị trí axit amin từ 95 đến 102 đối với CDR3. Đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng siêu biến nằm trong khoảng từ các vị trí axit amin từ 24 đến 34 đối với CDR1, vị trí axit amin từ 50 đến 56 đối với CDR2, và vị trí axit amin từ 89 đến 97 đối với CDR3.

Thuật ngữ “CDR” có nghĩa là vùng xác định hỗ trợ nằm trong trình tự vùng biến đổi globulin miễn dịch. Có ba CDR trong mỗi trong số các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mà được thiết kế là CDR1, CDR2 và CDR3, đối với mỗi trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ. Thuật ngữ “bộ CDR” dùng để chỉ nhóm gồm ba CDR mà xuất hiện trong vùng biến đổi đơn có khả năng gắn kết kháng nguyên. Các đường biên chính xác của các CDR đã được xác định theo cách khác nhau theo các hệ thống khác. Hệ thống được mô tả bởi Kabat (Kabat et al. (1987) và (1991)) không chỉ tạo ra hệ thống đánh số gốc rõ ràng có thể áp dụng cho vùng biến đổi bất kỳ của kháng thể, mà cũng tạo ra các đường biên gốc chính xác tạo thành ba

CDR. Các CDR có thể được dùng để chỉ Kabat CDR. Chothia và các đồng tác giả (Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877-883) đã phát hiện ra rằng một số phần phụ nằm trong Kabat CDR nhận các cấu hình xương peptit gần như giống nhau, mặc dù có sự khác biệt rất lớn ở mức trình tự axit amin. Các phần phụ này được thiết kế là L1, L2 và L3 hoặc H1, H2 và H3 trong đó “L” và “H” lần lượt thiết kế các vùng chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các vùng này có thể được dùng để chỉ các Chothia CDR, mà có các đường biên mà xếp chồng với các Kabat CDR. Các đường biên khác tạo thành CDR xếp chồng với Kabat CDR đã được mô tả bởi Padlan (1995) *FASEB J.* 9:133-139 và MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5):732-45). Các định nghĩa về đường biên CDR khác nữa có thể không tiếp theo một cách nghiêm ngặt một trong số các hệ thống trong bản mô tả này, nhưng tuy nhiên sẽ xếp chồng với Kabat CDR, mặc dù chúng có thể được rút ngắn hoặc được kéo dài theo các phát hiện dự đoán hoặc thử nghiệm mà các gốc cụ thể hoặc nhóm gốc hoặc thậm chí toàn bộ CDR không tác động một cách đáng kể đến việc gắn kết kháng nguyên. Các phương pháp được sử dụng trong bản mô tả này có thể sử dụng các CDR được xác định theo bất kỳ trong số các hệ thống này, mặc dù một số phương án sử dụng Kabat hoặc Chothia xác định CDR.

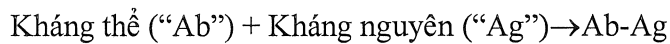
Thuật ngữ “epitop” có nghĩa là vùng kháng nguyên mà được gắn kết bởi protein gắn kết, ví dụ, vùng có khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T. Theo một số phương án, các thể quyết định epitop bao gồm việc phân nhóm bề mặt có hoạt tính về mặt hoá học của các phân tử như axit amin, mạch bên đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, theo một số phương án, có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều và/hoặc các đặc điểm mang điện đặc hiệu. Theo một phương án, epitop bao gồm các gốc axit amin của vùng kháng nguyên (hoặc mảnh của nó) đã được biết đến để gắn kết vị trí hỗ trợ trên đối tác gắn kết đặc hiệu. Mảnh kháng nguyên có thể chứa nhiều hơn một epitop. Theo một số phương án, protein gắn kết gắn kết một cách đặc hiệu kháng nguyên khi nó nhận ra kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức hệ protein và/hoặc đại phân tử. Protein gắn kết “gắn kết với cùng epitop” nếu các kháng thể cạnh tranh chéo (ví dụ, kháng thể ngăn ngừa kháng thể khác không gắn kết với protein gắn kết, hoặc ức chế tác dụng

điều biến đối với kháng thể khác gắn kết với protein gắn kết). Các phương pháp nhận biết và tổ chức lại việc nhận biết epitop là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

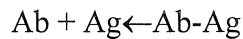
“Được động học” dùng để chỉ quy trình mà được chất được hấp thụ, được phân bố, được chuyển hoá và được tiết bởi sinh vật. Theo một số phương án, để tạo ra phân tử protein gắn kết đa hoá trị với profin được động học mong muốn, các kháng thể đơn dòng bổ mẹ với profin được động học mong muốn tương tự là được chọn. Profin PK của kháng thể đơn dòng bổ mẹ được chọn có thể được xác định một cách dễ dàng, ví dụ bằng cách sử dụng loài gặm nhấm trong các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

“Mức sinh khả dụng” dùng để chỉ lượng được chất có hoạt tính mà đến được đích của nó sau khi dùng. Mức sinh khả dụng là hàm số của vài đặc tính được mô tả trên đây, bao gồm độ ổn định, độ tan, tính gây miễn dịch và được động học và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (US 20090311253).

Thuật ngữ “cộng hưởng plasmon bề mặt” có nghĩa là hiện tượng quang học mà cho phép phân tích các tương tác đặc hiệu sinh học theo thời gian thực bằng việc phát hiện các thay đổi về nồng độ protein trong cơ chất cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare Co., Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). Để mô tả kỹ hơn, xem ấn phẩm: Jönsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26. Thuật ngữ “ K_{on} ” có nghĩa là hằng số tốc độ on đối với sự kết hợp của protein gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc DVD) với kháng nguyên để tạo thành phức hệ gắn kết (ví dụ, phức hệ DVD/kháng nguyên). Thuật ngữ “ K_{on} ” cũng có nghĩa là “hằng số tốc độ kết hợp” hoặc “ k_a ”, như được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Trị số này cho biết tốc độ gắn kết của protein gắn kết với kháng nguyên đích của nó hoặc tốc độ hình thành phức hệ giữa protein gắn kết, (ví dụ, kháng thể) và kháng nguyên. Điều này cũng được thể hiện bằng phương trình dưới đây:



Thuật ngữ “ K_{off} ” có nghĩa là hằng số tốc độ off đối với sự phân ly hoặc “hằng số tốc độ phân ly” của protein gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc DVD) từ phức hệ gắn kết (ví dụ, phức hệ DVD/kháng nguyên), như đã được biết đến trong lĩnh vực này. Trị số này cho biết tốc độ phân ly của protein gắn kết (ví dụ, kháng thể) từ kháng nguyên đích của nó hoặc sự chia tách của phức hệ Ab-Ag theo thời gian thành kháng thể và kháng nguyên tự do, như được thể hiện theo phương trình dưới đây:



Thuật ngữ “ K_D ” và “hằng số phân ly cân bằng” có nghĩa là trị số thu được trong phép đo chuẩn độ khi cân bằng hoặc bằng cách chia hằng số tốc độ phân ly (K_{off}) cho hằng số tốc độ kết hợp (K_{on}). Hằng số tốc độ kết hợp, hằng số tốc độ phân ly và hằng số phân ly cân bằng, được sử dụng để thể hiện ái lực gắn kết của protein gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc DVD) với kháng nguyên. Các phương pháp xác định hằng số tốc độ kết hợp và phân ly là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật dựa trên huỳnh quang tạo ra độ nhạy ở mức cao và khả năng thử nghiệm các mẫu trong chất đệm sinh lý khi cân bằng. Các phương pháp thử nghiệm và thiết bị khác như thử nghiệm BIAcore® (phân tích tương tác phân tử sinh học), có thể được sử dụng (ví dụ, thiết bị sẵn có từ BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden). Ngoài ra, thử nghiệm KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), sẵn có từ Sapidyn Instruments (Boise, Idaho), cũng có thể được sử dụng.

Thuật ngữ “biến thể” có nghĩa là polypeptit mà khác với polypeptit đã nêu trong trình tự axit amin bằng cách bổ sung (ví dụ, lồng vào), loại bớt hoặc thay thế bảo toàn các axit amin, nhưng vẫn giữ lại hoạt tính sinh học của polypeptit đã nêu (ví dụ, kháng thể VEGF biến thể có thể cạnh tranh với kháng thể kháng VEGF để gắn kết với VEGF). Sự thay thế bảo toàn của axit amin, nghĩa là, thay thế axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính tương tự (ví dụ, tính ưa nước và/hoặc mức độ hoặc sự phân phối của các vùng mang điện tích) được nhận biết trong lĩnh vực này như thường bao gồm sự thay đổi nhỏ. Các thay đổi nhỏ này có thể được nhận dạng một

phần bằng cách xét đến chỉ số chữa bệnh bằng nước của axit amin, như được hiểu trong lĩnh vực này (xem, ví dụ ấn phẩm: Kyte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132). Theo một khía cạnh, các axit amin có chỉ số chữa bệnh bằng nước bằng ± 2 được thế. Tính ưa nước của axit amin cũng có thể được sử dụng để biểu lộ các thay thế mà có thể dẫn đến protein mà giữ lại chức năng sinh học. Việc xem xét khả năng ưa nước của axit amin trong ngữ cảnh của peptit cho phép tính toán khả năng ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của peptit đó, phép đo hữu ích mà đã được báo cáo là tương quan rõ rệt với tính kháng nguyên và tính gây miễn dịch (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,554,101). Việc thay thế axit amin có trị số ưa nước tương tự có thể dẫn đến các peptit giữ lại hoạt tính sinh học, ví dụ tính gây miễn dịch, như được hiểu trong lĩnh vực này. Theo một khía cạnh, sự thay thế được thực hiện với các axit amin có trị số ưa nước nằm trong khoảng ± 2 so với nhau. Chỉ số kỵ nước và trị số ưa nước của axit amin bị tác động bởi mạch bên cụ thể của axit amin đó. Phù hợp với sự quan sát đó, sự thay thế axit amin mà có thể tương thích với chức năng sinh học được hiểu là phụ thuộc vào tính tương tự tương đối của axit amin và cụ thể là mạch bên của các axit amin này, như được biểu thị bởi tính kỵ nước, tính ưa nước, điện tích, kích cỡ và các đặc tính khác. Thuật ngữ “biến thể” cũng bao gồm các polypeptit hoặc mảnh của nó mà đã được xử lý theo cách khác nhau, như sự phân giải protein, phosphoryl hoá hoặc sự cải biến sau dịch mã, mà vẫn giữ được hoạt tính sinh học và/hoặc hoạt tính kháng nguyên, ví dụ, khả năng gắn kết với VEGF và/hoặc DLL4. Thuật ngữ “biến thể” bao gồm các mảnh biến thể, trừ khi có chỉ định khác. Biến thể có thể giống 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, hoặc 75% với trình tự kiểu đại.

1. Tạo ra protein gắn kết

Protein gắn kết có khả năng gắn kết hai kháng nguyên khác nhau và phương pháp tạo ra chúng được đề xuất. Protein gắn kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau. Vector biểu hiện, tế bào chủ và phương pháp tạo ra protein gắn kết cũng được đề xuất.

A. Tạo ra kháng thể đơn dòng bố mẹ

Miền biến đổi của protein gắn kết DVD có thể thu được từ các kháng thể bố mẹ (Ab), bao gồm các Ab đa dòng và Ab đơn dòng (mAb) có khả năng gắn kết kháng nguyên quan tâm. Các kháng thể này có thể xuất hiện tự nhiên hoặc có thể được sinh ra bằng công nghệ tái tổ hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này quen thuộc nhiều phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sử dụng kỹ thuật lai, phương pháp kháng thể bạch huyết chọn lọc (SLAM), sử dụng thể thực khuẩn, nấm men hoặc thể hiển thể dung hợp ARN-protein hoặc thư viện khác, gây miễn dịch động vật không phải con người bao gồm ít nhất một số locus globulin miễn dịch của người và tạo ra kháng thể khảm, ghép CDR và được làm giống người. Xem ví dụ, công bố patent Mỹ số 20090311253 A1. Miền biến đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đột biến ái lực.

B. Tiêu chuẩn lựa chọn kháng thể đơn dòng bố mẹ

Phương án được đề xuất bao gồm việc chọn kháng thể bố mẹ với ít nhất một hoặc nhiều đặc tính mong muốn trong phân tử protein gắn kết DVD. Theo một phương án, đặc tính mong muốn là một hoặc nhiều tham số kháng thể, như ví dụ, tính đặc hiệu kháng nguyên, ái lực với kháng nguyên, hiệu lực, chức năng sinh học, nhận biết epitop, độ ổn định, độ tan, hiệu quả sản xuất, tính gây miễn dịch, được động học, mức sinh khả dụng, khả năng phản ứng ngang mô hoặc gắn kết kháng nguyên vuông. Xem ví dụ, công bố patent Mỹ số 20090311253.

C. Phân tử gắn kết protein

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết có thể được thiết kế sao cho hai miền biến đổi của chuỗi nhẹ khác nhau (VL) từ hai kháng thể đơn dòng bố mẹ khác nhau được liên kết theo cách trực tiếp liên tiếp hoặc qua cầu liên kết bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, tiếp theo miền ổn định của chuỗi nhẹ CL. Tương tự, chuỗi nặng bao gồm hai miền biến đổi của chuỗi nặng khác nhau (VH) được liên kết liên tiếp, trực tiếp hoặc qua cầu liên kết, tiếp theo miền ổn định CH1 và vùng Fc (Fig.1).

Theo các phương án khác nhau, miền biến đổi có thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp từ các kháng thể bố mẹ được tạo ra bởi bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, miền biến đổi là miền biến đổi của chuỗi nhẹ nặng hoặc chuỗi nhẹ của chuột. Theo một phương án khác, miền biến đổi là miền chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được ghép CDR hoặc biến đổi được làm giống người. Theo một phương án, miền biến đổi là miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc nhẹ của người.

Theo các phương án khác nhau, trình tự cầu liên kết có thể là axit amin đơn lẻ hoặc trình tự polypeptit. Theo một phương án, việc lựa chọn trình tự cầu liên kết được dựa trên sự phân tích cấu trúc tinh thể của vài phân tử Fab. Có sự liên kết linh hoạt tự nhiên giữa miền biến đổi và miền ổn định CH1/CL trong cấu trúc phân tử Fab hoặc kháng thể. Thông thường, liên kết tự nhiên này bao gồm khoảng từ 10 đến 12 gốc axit amin, được góp phần từ 4 đến 6 gốc từ đầu cuối C của miền V và từ 4 đến 6 gốc từ đầu tận cùng N của miền CL/CH1. Theo một số phương án, protein gắn kết DVD được tạo ra bằng cách sử dụng từ 5 đến 6 gốc axit amin đầu tận cùng N hoặc từ 11 đến 12 gốc axit amin, của CL hoặc CH1 lần lượt làm cầu liên kết trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các gốc đầu tận cùng N của các miền CL hoặc CH1, cụ thể là từ 5 đến 6 gốc axit amin, có thể nhận cấu hình dạng vòng mà không nhận các cấu trúc thứ cấp mạnh và do đó có thể có tác dụng như cầu liên kết linh hoạt giữa hai miền biến đổi. Gốc đầu tận cùng N của các miền CL hoặc CH1 là sự kéo dài tự nhiên của miền biến đổi, do chúng là một phần của trình tự Ig và do đó việc sử dụng chúng làm giảm thiểu đến một mức độ lớn tính gây miễn dịch hiệu lực bất kỳ xuất hiện từ cầu liên kết và phần ghép nối.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm ít nhất một cầu liên kết bao gồm một hoặc nhiều SEQ ID NO: từ 1 đến 38 (Bảng 1). Theo một phương án, X2 là vùng Fc. Theo một phương án khác, X2 là vùng Fc biến thể.

Bảng 1: Danh mục trình tự cầu liên kết

SEQ ID NO:	Trình tự	SEQ ID NO:	Trình tự
1	ASTKGPSVFPLAP	20	RADAAAAGGPGS
2	ASTKGP	21	RADAAAA
3	GGGGSG	22	SAKTPKLEEGEFSEARV
4	GGGGSGGGGS	23	ADAAP
5	GGGGSGGGSGGGG	24	ADAAPTVSIFPP
6	TVAAPSVFIFPP	25	TVAAP
7	TVAAP	26	TVAAPSVFIFPP
8	GGGGSG	27	QPKAAP
9	GGSGGGGSG	28	QPKAAPSVTLFPP
10	GGSGGGGSGGGGS	29	AKTTPP
11	GGSGG	30	AKTTPPSVTPLAP
12	GGSGGGGSGGGGS	31	AKTTAP
13	AKTTPKLEEGEFSEAR	32	AKTTAPSVYPLAP
14	AKTTPKLEEGEFSEARV	33	GGGGSGGGGSGGGGS
15	AKTTPKLGG	34	GENKVEYAPALMALS
16	SAKTPKLGG	35	GPAKELTPLKEAKVS
17	SAKTPP	36	GHEAAAVMQVQYPAS
18	RADAAP	37	TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP
19	RADAAPTVS	38	ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP

Các trình tự cầu liên kết khác có thể bao gồm trình tự bất kỳ có chiều dài bất kỳ thu được từ miền CL/CH1 nhưng không phải tất cả các gốc của miền CL/CH1; ví dụ từ 5 đến 12 gốc axit amin thứ nhất của miền CL/CH1. Theo ví dụ khác, cầu liên kết chuỗi nhẹ có thể được chọn từ C_K hoặc C_L; và cầu liên kết chuỗi nặng có thể thu được từ CH1 của isotyp bất kỳ, bao gồm C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_α1, C_α2, C_δ, C_ε, và C_μ. Các trình tự cầu liên kết cũng có thể thu được các protein khác như các protein tương tự Ig (ví dụ, TCR, FcR, KIR); trình tự được tạo thành chủ yếu từ G/S (ví dụ, các đoạn lặp G4S); các trình tự thu được từ vùng bản lề; và các trình tự tự nhiên khác từ các protein khác. Các trình tự cầu liên kết khác có thể bao gồm trình tự bất kỳ có

chiều dài bất kỳ bao gồm đoạn lặp G/S (ví dụ, trình tự bao gồm các đoạn lặp GGGS motif), hoặc các cầu liên kết peptit khác bất kỳ.

Theo một phương án, miền ổn định được liên kết với hai miền biến đổi liên kết bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Theo một phương án, trình tự bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng liên kết được liên kết với miền ổn định của chuỗi nặng và trình tự bao gồm miền biến đổi của chuỗi nhẹ liên kết được liên kết với miền ổn định của chuỗi nhẹ. Theo một phương án, miền ổn định lần lượt là các miền ổn định của chuỗi nặng của người và miền ổn định của chuỗi nhẹ của người. Theo một phương án, chuỗi nặng DVD còn được liên kết với vùng Fc. Vùng Fc có thể là vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc vùng Fc biến thể. Theo một phương án khác, vùng Fc là vùng Fc của người. Theo một phương án khác, vùng Fc bao gồm vùng Fc từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, hoặc IgD.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chức năng của nó được bộc lộ, bao gồm kháng thể có vị trí gắn kết chức năng đối với một trong số các kháng nguyên đích được liệt kê trong bảng 2 và bao gồm vùng cặp VH và VL được chọn từ các cặp được liệt kê trong bảng 2, hoặc bao gồm các vùng CDR của các vùng VH và VL. Ví dụ, kháng thể có thể bao gồm các vùng VH và VL từ bảng 2 mà tạo thành vị trí gắn kết chức năng đối với DLL4. Theo một phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên chức năng giữ lại vùng miền biến đổi (ví dụ, các vùng CDR được lấy từ các trình tự VH và VL cặp trong bảng 2) đủ để gắn kết kháng nguyên đích. Mảnh gắn kết kháng nguyên chức năng có thể bao gồm kháng thể được làm giống người, hoàn toàn của người, được camel hoá, chuỗi đơn, khảm, tổng hợp, tái tổ hợp, lai, đột biến, đột biến trở lại hoặc ghép CDR hoặc Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, VHH (cũng được dùng để chỉ nanobody), hoặc mảnh kháng thể khác mà giữ lại chức năng gắn kết kháng nguyên, bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

Theo một phương án, protein gắn kết được bộc lộ bao gồm miền biến đổi được chọn từ các protein trong bảng 2. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi thứ nhất và chuỗi thứ hai và hai vị trí gắn kết chức năng, như được mô tả trên đây và trong đó các chuỗi thứ nhất và thứ hai của protein gắn kết tạo thành hai

vị trí gắn kết chức năng đối với một hoặc nhiều kháng nguyên đích được liệt kê trong bảng 2. Theo một phương án, mỗi vị trí gắn kết chức năng bao gồm các trình tự VH và VL cặp được chọn từ các cặp được liệt kê trong bảng 2 (ví dụ, các trình tự VH và VL cặp tạo thành vị trí gắn kết đối với DLL4), hoặc bao gồm các vùng CDR của các vùng VH và VL. Theo một số phương án, chuỗi thứ nhất bao gồm trình tự VH thứ nhất và trình tự VH thứ hai được chọn từ bảng 2, hoặc chứa các trình tự CDR từ các trình tự VH và chuỗi thứ hai bao gồm trình tự VL thứ nhất và trình tự VL thứ hai được chọn từ bảng 2, hoặc chứa các trình tự CDR từ các trình tự VL. Theo các phương án khác, cách bố trí VH-VL của các vị trí gắn kết thứ nhất hoặc thứ hai được bật nhẹ ngang qua hai chuỗi, sao cho mỗi chuỗi bao gồm miền VH từ một vị trí gắn kết và miền VL từ vị trí gắn kết khác, trong khi vẫn giữ lại hai vị trí gắn kết chức năng.

Theo một phương án, hai DVD polypeptit chuỗi nặng và hai DVD polypeptit chuỗi nhẹ được tổ hợp để tạo thành protein gắn kết DVD. Bảng 2 liệt kê các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể lấy làm ví dụ hữu ích để điều trị bệnh. Theo một phương án, DVD bao gồm ít nhất hai trong số các vùng VH và/hoặc VL được liệt kê trong bảng 2, theo hướng bất kỳ, là được đề xuất, trong đó ít nhất một trong số các trình tự VH và/hoặc VL là SEQ ID NO: 39 hoặc SEQ ID NO: 40. Theo một số phương án, VD1 và VD2 được chọn một cách độc lập. Các trình tự miền VH và VL được đề xuất dưới đây bao gồm các vùng xác định hỗ trợ (CDR) và các trình tự khung. Theo một số phương án, một hoặc nhiều CDR và/hoặc trình tự khung được thay thế, mà không bị mất chức năng, bằng các CDR và/hoặc trình tự khung khác từ protein gắn kết mà đã được biết đến trong lĩnh vực này để gắn kết cùng kháng nguyên.

Bảng 2: Danh mục trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể kháng DLL4 và kháng VEGF để tạo ra protein gắn kết, bao gồm protein gắn kết đa hoá trị (trình tự CDR được in đậm)

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
39	h1A11.1	DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNFP MAW VRQAPGKGLEWVATISS SDGTTYRDSVKGR FTISR D NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG YYNSPF AYW GQGTLVTVSS
40	h1A11.1	DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYS NLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYC QQYNNYP PTFGQGTKLEIKR
41	Av	VEGF VH (seq 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYA ADFKRR FTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAK YPHYGSS HWYFDV WGQGTLLTVSS
42	Av	VEGF VL (seq 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNY LNWYQQ KPGKAPKVLIIYFT SSLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYC QQYSTVP WTFGQGTKVEIKR
43	AB285VH	VEGF VH (seq 2)	EVTLRSGPALVKPTQTLTLCTASGYTFTNYGMN WV RQPPGKGLEWVGWINTYTGEPTYA ADFKRR FTFSLDT SKSQAVLTMTNMDPVDATYYCAK YPHYGSS SHWY FDVWGQGTLLTVSS
44	AB285VL	VEGF VL (seq 2)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCSASQDISNYLNWYQ QKPGQAPKVLIIYFT SSLHSGV PDRFSGSGSGTDFTLT ISSLPQAEADVAVYYC QQYSTVP WTFGGGTKVEIKR
45	AB288VH	VEGF VH (seq 3)	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKASGYTFTNYGMN W VRQMPGKGLEWVGWINTYTGEPTYA ADFKRQ FTFSL DTSFSTAFLQWSSLKASDTAMYYCAK YPHYGSS SHW YFDVWGQGTMTVTVSS

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
46	AB288VL	VEGF VL (seq 3)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCSASQDISNYLNWYQQ KPGQAPRVLIYFTSSLHSDVPARFSGSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYCQQYSTVPWTFGQGTRLEIKR
47	AB305VH	VEGF VH (seq 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNW VRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHW YFDVWGQGTLVTVSS
48	AB305VL	VEGF VL (seq 4)	EIVMTQSPGTLSPGERATLSCSASQDISNYLNWYQQ KPGQAPRVLIYFTSSLHSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVFYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
49	AB308VH	VEGF VH (seq 5)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGYTFTNYGMNW VRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL DTAKSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSH WYFDVWGQGTLVTVSS
50	AB308VL	VEGF VL (seq 5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDVATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
51	AB318VH	VEGF VH (seq 6)	EVQLVESGGGLVQPANSLKLSCAASGYTFTNYGMNW VRQSPKKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLD TAKSTAYLQMDSLRSEDATATYYCAKYPHYYGSSHWY FDVWGQGVLTVTVSS
52	AB318VL	VEGF VL (seq 6)	DIRMTQSPASLSASLGETVNEICSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPQVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTQFSLKINS LQSEDVATYYCQQYSTVPWTFGGGTKLELKR

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng protein	Trình tự
			1234567890123456789012345678901234567890
53	AB333VH	VEGF VH (seq 7)	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTNYGMN WVKQRPBGHLEWVGVWINTYTGEPTYAADFRRKFTFT LDTSSSTAYIQLISLTTEDSAIIYYCAKYPHYGSSHWY FDVWGQGTLTSA
54	AB333VL	VEGF VL (seq 7)	DILMTQSPAILSVPGERVVFSCSASQDISNYLNWYQQ RTNGAPRVLIYFTSSLHSGVPSRFSGGSGTDFTLINS VESEDIADYYCQYSTVPWTFGAGTKLELKR

Theo một số phương án, protein gắn kết DVD được đề xuất, bao gồm vùng VH được chọn từ SEQ ID NO: từ 55 đến 63. Theo một số phương án, protein gắn kết DVD bao gồm vùng VL được chọn từ SEQ ID NO: từ 64 đến 73. Theo một số phương án, protein gắn kết DVD bao gồm vùng VH được chọn từ SEQ ID NO: từ 55 đến 63 và 74 và vùng VL được chọn từ SEQ ID NO: từ 64 đến 73. Các trình tự axit amin đối với các miền VH và VL được thể hiện dưới đây trong bảng 3.

Bảng 3: protein gắn kết DVD được dẫn kháng epitop của DLL4 và VEGF
(Trình tự cầu liên kết được gạch dưới; trình tự CDR được in đậm)

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng Protein	Trình tự
			1234567890123456789012345678901234567890
55	h1A11.1-L-Av VH	DLL4 VH và VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAW VRQAPGKGLEWVATISSDGTYYRDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYW GQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLA EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVG WINTYTGEPTYAADFRRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWY FDVWGQGTLLTVSS

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng Protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
56	h1A11.1-S-Av VH	DLL4 VH và VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAW VRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYW GQGTLVTVSS <u>ASTKGPE</u> EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRR FTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAV YYCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLLTVSS
57	h1A11.1-GS10-Av VH	DLL4 VH và VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAW VRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYW GQGTLVTVSS <u>GGGGSGGGGSE</u> EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN TYTGEPTYAADFKRR FTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE DTAVYYCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLLTVSS
58	h1A11.1-GS14-Av VH	DLL4 VH và VEGF VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAW VRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYW GQGTLVTVSS <u>GGGGSGGGGSGGGGE</u> EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEW VGWINTYTG EPTYAADFKRR FTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWFYFDVWGQGTLL TVSS
59	Av-L-h1A11.1 VH	VEGF VH và DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRR FTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGTLLTVSS <u>ASTKGPSVFPLA</u> PEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPGK GLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGTLLTV VSS

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng Protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
60	Av-S-h1A11.1 VH	VEGF VH và DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGT LVTVSS <u>ASTKGPEV</u> QLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPGKGLEWVA TISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGT LVTVSS
61	Av-GS6-h1A11.1 VH	VEGF VH và DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGT LVTVSS <u>GGGGSG</u> EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPGKGLEWV ATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGT LVTVSS
62	Av-GS10-h1A11.1 VH	VEGF VH và DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGT LVTVSS <u>GGGGSGGGGSE</u> VQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPGKG LEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGT LVT VSS
63	Av-GS14-h1A11.1 VH	VEGF VH và DLL4 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS HWYFDVWGQGT LVTVSS <u>GGGGSGGGGSGGGG</u> EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQA PGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAYWGQGT LVTVSS

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng Protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
64	h1A11.1-L-Av VL	DLL4 VL và VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGKLEIKR <u>TVAAP</u> <u>SVFIFPP</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNY LNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIK R
65	h1A11.1-S-Av VL	DLL4 VL và VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGKLEIKR <u>TVAAP</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIKR
66	h1A11.1-GS10-Av VL	DLL4 VL và VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGKLEIKR <u>GGSG</u> <u>GGSG</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYL NWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIKR
67	h1A11.1-GS14-Av VL	DLL4 VL và VEGF VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGKLEIKR <u>GGSG</u> <u>GGSGGGGS</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGK VEIKR
68	Av-L-h1A11.1 VL	VEGF VL và DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIKR <u>TVAAP</u> <u>VFIFPP</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGKLEIK R

SEQ ID số	ID đơn nhất ABT	Vùng Protein	Trình tự 1234567890123456789012345678901234567890
69	Av-S-h1A11.1 VL	VEGF VL và DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR TVAAPD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQ KPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKR
70	Av-GS6-h1A11.1 VL	VEGF VL và DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR GGS GG DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKR
71	Av-GS10-h1A11.1 VL	VEGF VL và DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR GGS GG GGS GG DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNL AWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIKR
72	Av-GS14-h1A11.1 VL	VEGF VL và DLL4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR GGS GG GGS GGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYS NLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKL EIKR

Bảng 3a: Protein gắn kết có chiều dài đầy đủ được dẫn kháng epitop của DLL4 và VEGF

73	h1A11.1-SL-Av chuỗi nhẹ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAP KLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QYNNYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITTC SASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKVLITYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSTVP WTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK STYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
74	h1A11.1-SL-Av chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFPMAWVRQAPG KGLEWVATISSD GTTYRDSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGYYNS PFAYWGQ GLTVTVSS ASTKGPEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL EWVGWINTYT GEPTYAADFKRR FTFSLDTSKSTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKYPHY YGSSH WYFDVWGQGLTVTVSS ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP TVTSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPK CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVK GFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Bảng 3a cung cấp các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ đối với protein gắn kết kháng trực tiếp VEGF và DLL4. Các trình tự cầu liên kết được gạch dưới, trong khi các trình tự CDR và vùng cố định được in đậm.

Phần mô tả chi tiết về protein gắn kết DVD đặc hiệu có khả năng gắn kết các đích đặc hiệu và phương pháp tạo ra chúng, được đưa ra trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

D. Tạo ra protein gắn kết

Protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, protein gắn kết có thể được biểu hiện ở tế bào chủ, trong đó (các) vector biểu hiện mã hoá các chuỗi nặng DVD và nhẹ DVD được chuyển nhiễm vào trong tế bào chủ bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Theo một số phương án, protein gắn kết DVD được đề xuất trong bản mô tả này được biểu hiện ở tế bào chủ nhân sơ. Theo các phương án khác, protein gắn kết DVD được biểu hiện ở tế bào nhân chuẩn, ví dụ tế bào chủ động vật có vú.

Trong hệ lấy làm ví dụ đối với sự biểu hiện tái tổ hợp của DVD protein, vector biểu hiện tái tổ hợp mã hoá chuỗi nặng DVD và chuỗi nhẹ DVD được đưa vào trong tế bào DHFR-CHO bằng việc chuyển nhiễm qua trung gian canxi phosphat. Nằm trong vector biểu hiện tái tổ hợp, các gen chuỗi nặng và nhẹ DVD được liên kết theo cách chặt chẽ với gen tăng cường CMV/yếu tố điều hoà đoạn khởi đầu AdMLP để điều khiển mức phiên mã ở mức cao của gen. Vector biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, mà cho phép lựa chọn các tế bào CHO mà đã được chuyển nhiễm với vector bằng cách sử dụng sự lựa chọn methotrexat/khuếch đại. Các tế bào chủ được chọn được nuôi cấy để cho phép biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ DVD và DVD protein nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp, chuyển nhiễm tế bào chủ, chọn lọc đối với thể biến nạp, nuôi cấy tế bào chủ và thu hồi DVD protein từ môi trường nuôi cấy. Theo các phương án khác nhau, phương pháp tổng hợp DVD protein bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đến khi DVD protein được tổng hợp cũng được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp còn có thể bao gồm việc phân lập DVD protein từ môi trường nuôi cấy.

Dấu hiệu của protein gắn kết DVD là dấu hiệu mà có thể được tạo ra và được tinh chế theo cùng cách với kháng thể thông thường. Theo một số phương án, việc tạo ra protein gắn kết DVD dẫn đến sản phẩm chính đơn lẻ đồng nhất với hoạt tính đặc hiệu kép mong muốn, mà không cần thiết đối với việc cải biến trình tự của vùng

cố định hoặc các cải biến hoá học. Các phương pháp khác được mô tả trên đây để tạo ra protein gắn kết có chiều dài đầy đủ “đặc hiệu kép”, “đa đặc hiệu” và “đa hoá trị đa đặc hiệu” có thể dẫn đến việc tạo ra nội bào hoặc tiết của hỗn hợp gồm protein gắn kết bất hoạt được ghép, đơn đặc hiệu, đa đặc hiệu, đa hoá trị, có chiều dài đầy đủ và protein gắn kết có chiều dài đầy đủ đa hoá trị với tổ hợp của các vị trí gắn kết khác nhau.

Theo một số phương án, việc thiết kế DVD protein được đề xuất trong bản mô tả này dẫn đến chuỗi nhẹ miền biến đổi kép và chuỗi nặng miền biến đổi kép mà chủ yếu lắp ghép với “protein gắn kết có chiều dài đầy đủ đa hoá trị đặc hiệu kép” mong muốn sau khi biểu hiện ở tế bào chủ.

Theo một số phương án, ít nhất 50%, ít nhất 75% hoặc ít nhất 90% (hoặc tỷ lệ phần trăm bất kỳ nằm giữa khoảng này) phân tử globulin miễn dịch miền biến đổi kép được biểu hiện hoặc được lắp ghép là protein hoá trị bốn đặc hiệu kép mong muốn và do đó có tính hữu ích thương mại được tăng cường. Do đó, theo một số phương án, phương pháp biểu hiện chuỗi nhẹ miền biến đổi kép và chuỗi nặng miền biến đổi kép trong tế bào đơn lẻ dẫn đến sản phẩm chính đơn lẻ của “protein gắn kết có chiều dài đầy đủ hoá trị bốn đặc hiệu kép” được đề xuất.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp biểu hiện chuỗi nhẹ miền biến đổi kép và chuỗi nặng miền biến đổi kép ở tế bào đơn lẻ dẫn đến “sản phẩm chính” của “protein gắn kết có chiều dài đầy đủ hoá trị bốn đặc hiệu kép”, trong đó “sản phẩm chính” là lớn hơn 50%, như lớn hơn 75% hoặc lớn hơn 90% (hoặc tỷ lệ phần trăm bất kỳ nằm giữa các khoảng này), của tất cả các protein được lắp ghép, bao gồm chuỗi nhẹ miền biến đổi kép và chuỗi nặng miền biến đổi kép được đề xuất.

II. Sử dụng protein gắn kết

Khả năng của chúng được biết là gắn kết với một, hai hoặc nhiều kháng nguyên, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng, theo một số phương án, để phát hiện (các) kháng nguyên trong mẫu (ví dụ, mẫu sinh học, như huyết thanh hoặc huyết tương), bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch thông thường, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm

phóng xạ miễn dịch (RIA), hoặc hoá học miễn dịch mô. Theo một số phương án, protein gắn kết được đánh dấu một cách trực tiếp hoặc gián tiếp bằng chất có thể phát hiện để tạo thuận lợi cho việc phát hiện kháng thể được gắn kết hoặc không được gắn kết. Các chất có thể phát hiện thích hợp bao gồm các enzym khác nhau, các nhóm prosthetic, vật liệu huỳnh quang, vật liệu phát quang và vật liệu hoạt tính phóng xạ. Các ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza từ cây cải ngựa, phosphataza kiềm, β -galactosidaza hoặc axetylcholinsteraza; các ví dụ về các phức hệ nhóm prosthetic thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về các vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin fluorescein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin. Ví dụ về vật liệu phát quang là luminol và ví dụ về vật liệu hoạt tính phóng xạ bao gồm ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , và ^{153}Sm .

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có khả năng trung hoà hoạt tính của các đích kháng nguyên của chúng *in vitro* và/hoặc *in vivo*. Do đó, theo một số phương án, protein gắn kết có thể được sử dụng để ức chế hoạt tính kháng nguyên, ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng nguyên, ở đối tượng là con người hoặc ở đối tượng động vật có vú mà có kháng nguyên mà protein gắn kết phản ứng ngang. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính kháng nguyên ở đối tượng là người hoặc động vật không phải người mắc bệnh hoặc rối loạn trong đó kháng nguyên là có hại. Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng cho đối tượng là người hoặc động vật không phải người đối với các mục đích chẩn đoán hoặc điều trị (ví dụ, để phát hiện hoặc điều trị bệnh, như bệnh được đặc trưng bởi sự biểu hiện bất thường của VEGF và/hoặc DLL4).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “rối loạn trong đó hoạt tính kháng nguyên là có hại” được dự định để bao gồm bệnh và/hoặc rối loạn khác trong đó sự có mặt của kháng nguyên ở đối tượng mắc rối loạn đã được thể hiện là hoặc được cho là có thể đáp ứng đối với sinh lý bệnh của rối loạn và/hoặc nhân tố mà góp phần vào việc làm cho rối loạn tồi tệ hơn. Do đó, rối loạn trong đó hoạt tính kháng nguyên là có hại là rối loạn trong đó việc giảm hoạt tính kháng nguyên được mong

đội để làm nhẹ bớt các triệu chứng và/hoặc sự tiến triển của rối loạn. Các rối loạn này có thể được chứng minh, ví dụ, bằng việc làm gia tăng nồng độ của kháng nguyên trong dịch sinh học của đối tượng mắc rối loạn (ví dụ, sự gia tăng về nồng độ kháng nguyên trong huyết thanh, huyết tương, hoạt dịch, v.v của đối tượng). Các ví dụ không hạn chế về rối loạn mà có thể được điều trị bằng protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm các rối loạn được mô tả dưới đây và phần liên quan đến được phẩm bao gồm protein gắn kết.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết DVD là hữu ích làm chất điều trị để làm gia tăng sự gắn kết với kháng nguyên gây hại và/hoặc phong bế một cách đồng thời hai đích kháng nguyên khác nhau (DLL4 và/hoặc VEGF) làm tăng cường hiệu quả/an toàn và/hoặc làm tăng tổng thể của người bệnh.

Ngoài ra, theo một số phương án, DVD protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng để phân phối hiệu quả mô (ví dụ, hướng đích chất đánh dấu mô và/hoặc chất trung gian bệnh đối với PK cục bộ được tăng cường, do đó tạo ra hiệu quả cao hơn và/hoặc độc tố thấp hơn), bao gồm việc phân phối trong tế bào (ví dụ, hướng đích DVD với phân tử trong tế bào). Theo một số phương án, protein gắn kết DVD cũng có thể có tác dụng làm protein mang để phân phối kháng nguyên vào vị trí đặc hiệu qua việc gắn kết với epitop không trung hoà của kháng nguyên đó và cũng làm gia tăng chu kỳ nửa phân rã của kháng nguyên. Hơn nữa, protein gắn kết DVD có thể được thiết kế, theo một số phương án, để được liên kết về mặt vật lý với thiết bị y tế được cấy ghép vào trong người bệnh hoặc hướng đích các thiết bị y tế này (xem ấn phẩm: Burke et al. (2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58(3): 437-446; Hildebrand et al. (2006) *Surface and Coatings Technol.* 200(22-23): 6318-6324; Drug/ device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) *Biomaterials* 27(11):2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices, Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397).

A. Sử dụng protein gắn kết ở các bệnh khác nhau

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này là hữu ích làm phân tử điều trị để điều trị các bệnh hoặc rối loạn khác nhau, ví dụ các bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện có hại hoặc mức biểu hiện của DLL4 và/hoặc VEGF. Theo một số phương án, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng để chẩn đoán, điều trị hoặc làm tăng cường liệu pháp điều trị khối u và/hoặc có thể là có lợi trong việc điều trị bệnh ung thư nguyên phát và/hoặc di căn. Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng để chẩn đoán, điều trị hoặc làm tăng cường việc điều trị tình trạng bệnh ung thư. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng để chẩn đoán, điều trị hoặc làm tăng cường việc điều trị của bất kỳ bệnh hoặc rối loạn khác được đặc trưng bởi sự hình thành mạch khác thường (ví dụ, rối loạn miễn dịch hoặc viêm nói chung, làm lành vết thương). Theo các phương án khác nhau, việc dùng một hoặc nhiều protein gắn kết dẫn đến gắn kết với VEGF và/hoặc DLL4, mà có thể trung hoà hoặc mặt khác làm giảm hàm lượng VEGF và/hoặc DLL4 ở người bệnh mắc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi hàm lượng VEGF và/hoặc DLL4 quá mức.

Không nhằm giới hạn sáng chế, các thông tin hơn nữa về một số tình trạng bệnh được đề xuất.

1. Các rối loạn ung thư

Liệu pháp điều trị kháng thể đơn dòng đã xuất hiện như phương thức điều trị quan trọng đối với bệnh ung thư (von Mehren et al. (2003) *Annu. Rev. Med.* 54:343-69). Việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép, như được bộc lộ trong bản mô tả này, mà hướng đích hai chất trung gian gây ung thư riêng biệt, cũng sẽ tạo ra lợi ích bổ sung so với liệu pháp điều trị đơn.

Theo các phương án khác nhau, bệnh ung thư mà có thể được chẩn đoán và/hoặc điều trị bằng chế phẩm và phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư nguyên phát hoặc di căn, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư tuyến, bệnh ung thư họng miệng, bệnh

ung thư hầu dưới, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư ống mật, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư đường tiết niệu (bao gồm thận, bàng quang và đường niệu), bệnh ung thư đường sinh dục ở nữ giới (bao gồm cổ tử cung, tử cung và buồng trứng cũng như bệnh ung thư nhau và bệnh lá nuôi phôi thời kỳ thai nghén), bệnh ung thư đường sinh dục ở nam giới (bao gồm tuyến tiền liệt, túi tinh dịch, tinh hoàn và bệnh ung thư tế bào mầm), bệnh ung thư tuyến nội tiết (bao gồm tuyến giáp, tuyến thượng thận và tuyến yên), bệnh ung thư da, khối u mạch máu, khối u ác tính, xacôm (bao gồm các xacôm xuất hiện từ xương và mô mềm cũng như xacôm Kaposi), khối u não, thần kinh, mắt và màng não (bao gồm u bào hình sao, u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm, u nguyên bào võng mạc, u dây thần kinh, u nguyên bào thần kinh, u tế bào schwann và khối u màng não), khối u rắn xuất hiện từ khối u ác tính tạo huyết như bệnh bạch cầu, và ung thư mô bạch huyết (ung thư mô bạch huyết Hodgkin và không Hodgkin), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư trực tràng, khối u ác tính tạo huyết, bệnh bạch cầu, ung thư mô bạch huyết, bệnh thiếu betalipoprotein huyết, chứng xanh tím đầu chi, các quy trình ký sinh cấp tính và mạn tính hoặc lây nhiễm, bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào bạch huyết cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu dạng tuỷ cấp tính (AML), ung thư mô bạch huyết tế bào B, ung thư mô bạch huyết Burkitt, bệnh bạch cầu tuỷ bào mạn tính (CML), bệnh bạch cầu tế bào bạch huyết mạn tính (CLL), bệnh ung thư biểu mô đại trực tràng, bệnh bạch cầu tế bào tóc, bệnh Hodgkin, xacôm Kaposi, ung thư mô bạch huyết ác tính, u mô bào ác tính, khối u ác tính, đa u tuỷ, ung thư mô bạch huyết không Hodgkin, bệnh ung thư biểu mô tuyến tụy, hội chứng cận ung thư/chứng tăng canxi huyết ác tính, xacôm, khối u rắn, hoặc các bệnh độc lập hoặc phụ thuộc vào sự hình thành mạch khác bất kỳ được đặc trưng bởi hoạt tính DLL4 hoặc VEGF khác thường.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết DVD mà gắn kết DLL4 và/hoặc VEG, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh ung thư và/hoặc ngăn ngừa sự di căn, khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với liệu pháp điều trị phóng xạ và/hoặc các chất hoá trị liệu khác.

2. Thoái hoá điểm vàng

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm và phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị thoái hoá điểm vàng, bao gồm thoái hoá điểm vàng (ướt) do tân mạch. Thoái hoá điểm vàng là tình trạng bệnh mà dẫn đến mất tầm nhìn ở trung tâm trường nhìn do tổn hại võng mạc. Thoái hoá điểm vàng (ướt) do tân mạch là do sự sinh trưởng mạch máu khác thường, cuối cùng dẫn đến chảy máu và rò rỉ protein dưới điểm vàng mà có thể gây ra tổn hại không thuận nghịch cho cơ quan nhận kích thích ánh sáng.

Theo các phương án khác nhau, DVD mà gắn kết DLL4 và/hoặc VEGF, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị thoái hoá điểm vàng, khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với chất điều trị khác.

3. Bệnh đái tháo đường và bệnh võng mạc do đái tháo đường

Bệnh đái tháo đường typ 1 là dạng bệnh đái tháo đường do việc phá huỷ tự miễn dịch của tế bào beta tạo ra insulin trong tuyến tụy. Việc thiếu tiếp theo insulin dẫn đến glucoza máu và niệu gia tăng. Bệnh võng mạc do đái tháo đường tham gia vào việc làm tổn hại võng mạc như biến chứng của bệnh đái tháo đường.

Bệnh võng mạc do đái tháo đường là kết quả của các thay đổi nhỏ trong hệ mạch của võng mạc mà là kết quả của việc chết tế bào ngoại mạch do glyxerit huyết quá mức gây ra và làm yếu thành mạch. Khi bệnh tiến triển, bệnh võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh trầm trọng bước vào giai đoạn tiến triển mà ở đó mạch máu tăng sinh. Nếu không điều trị, mạch máu mới có thể bị chảy máu, tầm nhìn mờ và gây tổn hại tiếp theo cho võng mạc. Sự tăng sinh mạch sợi cũng có thể gây ra việc bong võng mạc. Mạch máu tăng sinh cũng có thể được sinh trưởng thành khoang mắt phía trước và gây ra bệnh tăng nhãn áp do tân mạch.

Việc dẫn truyền tín hiệu VEGF và DLL4 được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc làm trung gian rối loạn chức năng nội mạch do đái tháo đường và bệnh mạch, bao gồm tham gia vào sinh bệnh học của bệnh thần kinh và bệnh võng mạc do đái tháo đường. *J. Exp. Med.* 209(5): 1011-28 (2012); *Nephrol. Dial.*

Transplant. 18 (8): 1427-1430 (2003); *PNAS* 109(27): E1868-77 (2012); công bố patent Mỹ số 20110189176 (Skokos et al). Do đó, VEGF và DLL4 có thể thể hiện các đích hiệu lực để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh đái tháo đường và/hoặc bệnh vồng mạc do đái tháo đường bằng cách sử dụng DVD của sáng chế (ví dụ, để nhận dạng hàm lượng huyết thanh và/hoặc làm thay đổi hàm lượng VEGF và/hoặc DLL4 ở người bệnh). Theo các phương án khác nhau, DVD mà gắn kết DLL4 và/hoặc VEGF, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh đái tháo đường typ 1 và/hoặc bệnh vồng mạc do đái tháo đường, khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với chất điều trị khác.

4. Chứng xơ vữa động mạch

VEGF và DLL4 được cho là có liên quan đến sự tiến triển chứng xơ vữa động mạch. *Circulation* 98(20):2108-16 (1998); *PNAS* 109(27): E1868-77 (2012). Cụ thể là, sự biểu hiện VEGF đã được thể hiện trong các thương tổn do xơ vữa động mạch ở động mạch vành của người, gợi ý vai trò đối với VEGF trong sự tiến triển chứng xơ vữa động mạch vành của người, cũng như trong quá trình làm thông nghẽn ở bệnh nghẽn động mạch vành. Tương tự, đã chỉ ra rằng sự ức chế dẫn truyền DLL4 bằng cách sử dụng kháng thể kháng DLL4 trung hoà làm giảm sự phát triển của chứng xơ vữa động mạch và làm giảm sự vôi hoá mảng bám. Do đó, hàm lượng VEGF và DLL4 có thể là các đích hiệu lực để chẩn đoán và/hoặc điều trị chứng xơ vữa động mạch bằng cách sử dụng DVD của sáng chế (ví dụ, để nhận dạng hàm lượng huyết thanh và/hoặc làm thay đổi hàm lượng của VEGF và/hoặc DLL4 ở người bệnh). Theo các phương án khác nhau, DVD mà gắn kết DLL4 và/hoặc VEGF, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để chẩn đoán và/hoặc điều trị chứng xơ vữa động mạch, khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với chất điều trị khác.

III. Dược phẩm

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều protein gắn kết, riêng hoặc kết hợp với chất phòng bệnh, chất điều trị và/hoặc chất mang được dụng được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án khác nhau, các ví dụ không hạn chế về sử dụng dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm

việc chẩn đoán, phát hiện và/hoặc kiểm tra rối loạn, ngăn ngừa, điều trị, quản lý và/hoặc làm giảm rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó và/hoặc trong nghiên cứu. Dược phẩm, riêng hoặc kết hợp với các chất phòng bệnh, chất điều trị và/hoặc chất mang dược dụng, là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (công bố patent Mỹ số 20090311253 A1).

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều axit amin, một hoặc nhiều polysacarit và/hoặc polysorbat, và protein gắn kết có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/ml, bao gồm các điểm cuối (ví dụ, từ 0,1 đến 10, từ 1 đến 10, từ .01 đến 50, từ 1 đến 50, từ 1 đến 100, từ 10 đến 100, từ 25 đến 100, từ 25 đến 50, hoặc từ 50 đến 100mg/ml), khi dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, bao gồm các điểm cuối (ví dụ, độ pH khoảng từ 5,0 đến 6,0, từ 5,5 đến 6,0, từ 5,0 đến 6,5, từ 5,5 đến 6,5 hoặc từ 6,0 đến 7,0). Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, trong đó mỗi trong số các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai độc lập bao gồm VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, C là miền ổn định, X1 là cầu liên kết, X2 là vùng Fc, và n bằng 0 hoặc 1, trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm SEQ ID NO: 56 và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm SEQ ID NO: 64. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm SEQ ID NO: 73 và chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm SEQ ID NO: 74. Theo một phương án, ít nhất một axit amin trong dược phẩm là histidin và có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 20mM, từ 10 đến 15mM, từ 15 đến 20mM, hoặc khoảng 15mM. Theo một phương án, ít nhất một polysacarit trong dược phẩm là sucroza và có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 8,0% khối lượng/thể tích (khối lượng/thể tích). Theo một phương án, polysorbat trong dược phẩm là polysorbat 80 và ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 0,06% khối lượng/thể tích. Theo một phương án, ít nhất một axit amin trong dược phẩm là arginin và có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 1,5% khối lượng/thể tích (ví

dự, từ 0,5 đến 1,5, từ 1,0 đến 1,5, hoặc từ 0,5 đến 1,0 khối lượng/thể tích). Theo một phương án, protein gắn kết có mặt trong dược phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/ml, (ví dụ, khoảng từ 1 đến 100mg/ml, hoặc khoảng từ 1 đến 15mg/ml, hoặc khoảng từ 1 đến 7,5mg/ml, hoặc khoảng từ 2,5 đến 7,5mg/ml, hoặc khoảng từ 5 đến 7,5mg/ml, hoặc khoảng từ 25 đến 100mg/ml, hoặc khoảng từ 20 đến 60mg/ml, hoặc khoảng từ 25 đến 50mg/ml, hoặc khoảng 25mg/ml, hoặc khoảng 50mg/ml, hoặc khoảng từ 0,1 đến 60mg/ml hoặc khoảng từ 0,1 đến 25mg/ml, hoặc khoảng từ 1,0 đến 60mg/ml, hoặc khoảng từ 0,5 đến 60mg/ml, hoặc khoảng từ 0,1 đến 2,0mg/ml, hoặc khoảng từ 0,5 đến 2,0mg/ml, hoặc khoảng từ 1 đến 5mg/ml, hoặc khoảng từ 1 đến 7,5mg/ml, hoặc khoảng từ 1 đến 15mg/ml, hoặc khoảng 0,5mg/ml, hoặc khoảng 10mg/m).

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm là dược phẩm trong nước, dược phẩm dạng đông khô hoặc dược phẩm dạng đông khô và khử hydrat. Theo một phương án, dung dịch hydrat hoá là dextroza và/hoặc nước muối (ví dụ, dextroza ở nồng độ khoảng 5% khối lượng/thể tích và/hoặc nước muối ở nồng độ khoảng 0,9% khối lượng/thể tích). Theo một phương án, dược phẩm bao gồm khoảng 15mM histidin, khoảng 0,03% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80, khoảng 4% (khối lượng/thể tích) sucroza, và khoảng từ 0,1 đến 25mg/ml protein gắn kết, hoặc khoảng từ 1 đến 15mg/ml protein gắn kết, và có độ pH khoảng 6, trong đó protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64 hoặc SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74. Theo một phương án, protein gắn kết bao gồm h1A11.1-SL-Av. Theo một phương án, protein gắn kết h1A11.1-SL-Av bao gồm vùng Fc từ thể đột biến IgG1 LALA của người. Theo một phương án, dược phẩm còn bao gồm ít nhất một chất bổ sung.

Theo các phương án khác nhau, dược phẩm được sử dụng chứa khoảng 25mg/ml protein gắn kết (ví dụ, protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64 hoặc SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74), khoảng 15mM histidin, 0,03% polysorbat 80 (khối lượng/thể tích, khối lượng/thể tích), 4,0% sucroza (khối lượng/thể tích), và độ pH khoảng 6,0. Theo một số phương án, dược phẩm không bao gồm arginin. Theo một số phương án, dược phẩm thể hiện độ ổn định lạnh đông-

tan giá được cải thiện ngoài mong đợi, độ ổn định được phẩm dạng lỏng và/hoặc độ ổn định được phẩm đông khô, so với các được phẩm khác bao gồm các thành phần hoặc nồng độ khác.

Theo một số phương án, được phẩm được mô tả trên đây và chứa protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 64, hoặc bao gồm SEQ ID NO: 73 và SEQ ID NO: 74, thể hiện sự cải thiện ngoài mong đợi về khả năng bảo chế. Ví dụ, được phẩm tránh được việc tạo gel không mong muốn hoặc hình thành các khối kết tụ ở mức cao khi được lưu trữ ở 5°C. Theo một số phương án, được phẩm là ổn định trong các điều kiện lưu trữ (5°C) và thúc đẩy (40°C).

Các phương pháp dùng chất phòng bệnh hoặc điều trị bệnh được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng qua đường miệng, dùng ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), dùng ngoài màng cứng, dùng trong khối u, dùng trong màng nhầy (ví dụ, trong mũi và đường miệng) và dùng qua phổi (ví dụ, hợp chất sol khí được dùng bằng dụng cụ xông hoặc sol khí). Việc bào chế được phẩm để dùng cho đường dùng cụ thể và vật liệu và kỹ thuật cần thiết cho các phương pháp dùng khác nhau là sẵn có và đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (công bố patent Mỹ số 20090311253 A1).

Theo các phương án khác nhau, chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc phòng bệnh). Ví dụ, trong tĩnh mạch liều cao đơn lẻ được dùng, vài liều được chia có thể được dùng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm theo tỷ lệ hoặc tăng như được chỉ định bởi tình trạng khẩn cấp của trường hợp điều trị. Theo một số phương án, được phẩm dùng ngoài đường tiêu hoá được bào chế ở dạng liều đơn vị để dễ dàng dùng và tính đồng nhất của liều. Thuật ngữ “dạng liều đơn vị” dùng để chỉ các đơn vị rời rạc về mặt vật lý thích hợp như các liều đơn vị cho đối tượng động vật có vú sẽ được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng hoạt chất định trước được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn khi kết hợp với chất mang được dụng được đòi hỏi.

Khoảng không hạn chế lấy làm ví dụ đối với lượng hữu hiệu về mặt điều trị hoặc phòng bệnh của protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này là khoảng từ

0,1 đến 100mg/kg, (ví dụ, khoảng từ 0,1 đến 0,5, từ 0,1 đến 1, từ 0,1 đến 10, từ 0,1 đến 20, từ 0,1 đến 50, từ 0,1 đến 75, từ 1 đến 10, từ 1 đến 15, từ 1 đến 7,5, từ 1,25 đến 15, từ 1,25 đến 7,5, từ 2,5 đến 7,5, từ 2,5 đến 15, từ 5 đến 15, từ 5 đến 7,5, từ 1 đến 20, từ 1 đến 50, từ 7 đến 75, từ 1 đến 100, từ 5 đến 10, từ 5 đến 15, từ 5 đến 20, từ 5 đến 25, từ 5 đến 50, từ 5 đến 75, từ 10 đến 20, từ 10 đến 50, từ 10 đến 75, hoặc từ 10 đến 100 mg/kg, hoặc nồng độ bất kỳ nằm giữa các khoảng này). Theo một số phương án, protein gắn kết có mặt trong dược phẩm ở nồng độ hữu hiệu về mặt điều trị ví dụ, nồng độ khoảng từ 0,1 đến 100mg/ml (ví dụ, khoảng từ 0,1 đến 0,5, từ 0,1 đến 1, từ 0,1 đến 10, từ 0,1 đến 20, từ 0,1 đến 50, từ 0,1 đến 75, từ 1 đến 10, từ 1 đến 20, từ 1 đến 50, từ 1 đến 75, từ 1 đến 100, từ 5 đến 10, từ 5 đến 15, từ 5 đến 20, từ 5 đến 25, từ 5 đến 50, từ 5 đến 75, từ 10 đến 20, từ 10 đến 50, từ 10 đến 75, hoặc từ 10 đến 100mg/ml, hoặc nồng độ bất kỳ nằm giữa các khoảng này). Lưu ý rằng trị số liều có thể thay đổi với loại và/hoặc mức trầm trọng của tình trạng bệnh sẽ được giảm giảm. Nên được hiểu hơn nữa rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều cụ thể có thể được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cá nhân và/hoặc phán quyết chuyên nghiệp của người dùng hoặc giám sát việc dùng dược phẩm và các khoảng liều được đưa ra trong bản mô tả này chỉ lấy làm ví dụ và không được dự định làm giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của dược phẩm đã nêu.

IV. Điều trị phối hợp

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được dùng riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện hoặc mức biểu hiện có hại của DLL4 và/hoặc VEGF. Theo một số phương án, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị để chẩn đoán, điều trị hoặc làm tăng cường điều trị kháng khối u và/hoặc điều trị bệnh ung thư nguyên phát và/hoặc di căn. Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị để chẩn đoán, điều trị hoặc làm tăng cường việc điều trị đối với tình trạng bệnh ung thư. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị để chẩn đoán, điều trị hoặc làm

tăng cường việc điều trị của bất kỳ bệnh hoặc rối loạn khác được đặc trưng bởi sự hình thành mạch khác thường (ví dụ, các rối loạn tự miễn dịch và viêm nói chung, làm lành vết thương). Theo các phương án khác nhau, việc dùng một hoặc nhiều protein gắn kết kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị dẫn đến trung hoà hoặc làm giảm hàm lượng VEGF và/hoặc DLL4 ở người bệnh mắc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi hàm lượng VEGF và/hoặc DLL4 quá mức, cũng như các thay đổi điều trị khác là kết quả của việc dùng protein gắn kết và/hoặc một hoặc nhiều chất điều trị.

Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cho mục đích được dự định. Ví dụ, chất bổ sung có thể là chất điều trị được nhận biết trong lĩnh vực này là hữu ích để điều trị bệnh ung thư. Liệu pháp điều trị tổ hợp cũng có thể bao gồm nhiều hơn một chất bổ sung, ví dụ, hai, ba, bốn, năm chất bổ sung hoặc nhiều hơn.

Theo các phương án khác nhau, chất điều trị kết hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất chống hình thành mạch, chất chống tạo hình, liệu pháp điều trị phóng xạ, liệu pháp hoá học trị liệu như chất alkyl hoá ADN, cisplatin, carboplatin, chất kháng tubulin, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicin, gemcitabin, gemzar, anthracyclin, adriamycin, chất ức chế topoisomeraza I, chất ức chế topoisomeraza II, 5-flouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan, chất ức chế thụ thể tyrosin kinaza (ví dụ, erlotinib, gefitinib), và ARN can thiệp nhỏ.

Các ví dụ không hạn chế về chất hoá trị liệu mà protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này có thể kết hợp bao gồm các chất sau đây: axit 13-cis-Retinoic; 2-CdA; 2-Clodeoxyadenosin; 5-Azacitidin; 5-Flouracil; 5-FU; 6-Mercaptopurin; 6-MP; 6-TG; 6-Thioguanin; Abraxan; Accutane®; Actinomycin-D; Adriamycin®; Adrucil®; Afinitor®; Agrylin®; Ala-Cort®; Aldesleukin; Alemtuzumab; ALIMTA; Alitretinoin; Alkaban-AQ®; Alkeran®; Axit All-transretinoic; Alpha Interferon; Altretamin; Amethopterin; Amifostin; Aminoglutethimide; Anagrelit; Anandron®; Anastrozol; Arabinosylxytosin; Ara-C Aranesp®; Aredia®; Arimidex®; Aromasin®; Arranon®; Arsen Trioxit; Arzerra™; Asparaginaza; ATRA; Avastin®; Azacitidin; BCG; BCNU; Bendamustin; Bevacizumab; Bexaroten; BEXXAR®; Bicalutamid; BiCNU; Blenoxane®; Bleomycin; Bortezomib; Busulfan; Busulfex®;

C225; Canxi Leucovorin; Campath®; Camptosar®; Camptothecin-11; Capecitabin;
 Carac™; Carboplatin; Carmustin; Chất xốp Carmustin; Casodex®; CC-5013; CCI-
 779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine®; Cetuximab; Chlorambucil; Cisplatin;
 Nhân tố Citrovorum; Cladribin; Cortison; Cosmegen®; CPT-11; Xyclophosphamit;
 Cytadren®; Cytarabin; Cytarabin Liposomal; Cytosar-U®; Cytoxan®; Dacarbazin;
 Dacogen; Dactinomycin; Darbepoetin Alfa; Dasatinib; Daunomycin; Daunorubicin;
 Daunorubicin Hydroclorua; Daunorubicin Liposomal; DaunoXome®; Decadron;
 Decitabin; Delta-Cortef®; Deltasone®; Denileukin; Diftitox; DepoCyt™;
 Dexamethason; Dexamethason Axetat; Dexamethason Natri Phosphat; Dexason;
 Dexrazoxan; DHAD; DIC; Diodes; Docetaxel; Doxil®; Doxorubicin; Doxorubicin
 Liposomal; Droxia™; DTIC; DTIC-Dome®; Duralone®; Efudex®; Eligard™;
 Ellence™; Eloxatin™; Elspar®; Emcyt®; Epirubicin; Epoetin Alfa; Erbitux;
 Erlotinib; Erwinia L-asparaginaza; Estramustin; Ethyo;l Etopophos®; Etoposit;
 Etoposit Phosphat; Eulexin®; Everolimus; Evista®; Exemestan; Fareston®;
 Faslodex®; Femara®; Filgrastim; Floxuridin; Fludara®; Fludarabin; Floplex®;
 Flouracil; Flouracil (kem); Fluoxymesteron; Flutamat; Axit Folinic; FUDR®;
 Fulvestrant; Gefitinib; Gemcitabin; Gemtuzumab ozogamicin; Gemzar; Gleevec™;
 Chất xốp Gliadel®; GM-CSF; Goserelin; Yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt
 (G-CSF); Yếu tố kích thích khuẩn lạc đại thực bào bạch cầu hạt (G-MCSF);
 Halotestin®; Herceptin®; Hexadrol; Hexalen®; Hexametylmelamin; HMM;
 Hycamtin®; Hydrea®; Hydrocort Axetat®; HydroCortison; HydroCortison Natri
 Phosphat; HydroCortison Natri Suxinat; Hydrocorton Phosphat; Hydroxyure;
 Ibritumomab; Ibritumomab Tiuxetan; Idamycin®; Idarubicin Ifex®; Interferon-
 alpha; Interferon-alpha-2b (Tiếp hợp PEG); Ifosfamid; Interleukin-11 (IL-11);
 Interleukin-2 (IL-2); Imatinib mesylat; Imidazol Carboxamid; Intron A®; Iressa®;
 Irinotecan; Isotretinoin; Ixabepilon; Ixempra™; KADCYCLA®; Kidrolaza (t)
 Lanacort®; Lapatinib; L-asparaginaza; LCR; Lenalidomit; Letrozol; Leucovorin;
 Leukeran; Leukine™; Leuprolit; Leurocristin; Leustatin™; Liposomal Ara-C;
 Liquid Pred®; LoMustin; L-PAM; L-Sarcocystin; Lupron®; Lupron Depot®;
 Matulane®; Maxidex; Mechlorethamin; Mechlorethamin Hydroclorua; Medralone®;
 Medrol®; Megace®; Megestrol; Megestrol Axetat; Melphalan; Mercaptopurin;

Mesna; Mesnex™; Methotrexate; Methotrexate Natri; Methylprednisolon; Meticorten®; Mitomycin; Mitomycin-C; Mitoxantron M-Prednisol®; MTC; MTX; Mustargen®; Mustin; Mutamycin®; Myleran®; Mylocel™; Mylotarg®; Navelbine®; Nelarabin; Neosar®; Neulasta™; Neumega®; Neupogen®; Nexavar®; Nilandron®; Nilotinib; Nilutamid; Nipent®; Nitrogen Mustard Novaldex®; Novantron®; Nplat; Octreotit; Octreotit Axetat; Ofatumumab; Oncospar®; Oncovin®; Ontak®; Onxal™; Oprelvekin; orcapred®; orcasone®; Oxaliplatin; Paclitaxel; Paclitaxel Protein-gắn kết; Pamidronat; Panitumumab; Panretin®; Paraplatin®; Pazopanib; PEDIAPRED®; PEG Interferon; Pegaspargaza; Pegfilgrastim; PEG-INTRON™; PEG-L-asparaginaza; PEMETREXED; Pentostatin; Phenylalanin mù tạc; Platinol®; Platinol-AQ®; Prednisolon; Prednison; Prelone®; Procarbazine; PROCRIT®; Proleukin®; Prolifeprospan 20 với mô ghép Carmustin; Purinethol®; Raloxifen; Revlimid®; Rheumatrex®; Rituxan®; Rituximab; Roferon-A®; Romiplostim; Rubex®; Rubidomycin Hydroclorua; Sandostatin®; Sandostatin LAR®; Sargramostim; Solu-Cortef®; Solu-Medrol®; Sorafenib; SPRYCEL™; STI-571; Streptozocin; SU11248; Sunitinib; Sutent®; Tamoxifen Tarceva®; Targretin®; Tasigna®; Taxol®; Taxotere®; Temodar®; Temozolomit Temsirolimus; Teniposid; TESPA; Thalidomit; Thalomid®; TheraCys®; Thioguanin; Thioguanin Tabloid®; Thiophosphoamid; Thioplex®; Thiotepa; TICE®; Toposar®; Topotecan; Toremifen; Torisel®; Tositumomab; Trastuzumab; Treanda®; Tretinoin; Trexall™; Trisenox®; TSPA; TYKERB®; VCR; Vectibix™; Velban®; Velcade®; VePesid®; Vesanoid®; Viadur™; Vidaza®; Vinblastin; Vinblastin Sulfat; Vincasar Pfs®; Vincristin; Vinorelbin; Vinorelbin tartrat; VLB; VM-26; Vorinostat; Votrient; VP-16; Vumon®; Xeloda®; Zanosar®; Zevalin™; Zinecard®; Zoladex®; Axit Zoledronic; Zolinza; hoặc Zometa®.

Theo một phương án, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều trong số: Temozolomit®, irinotecan, leucovorin, 5-FU, gemcitabin, và paclitaxel. Theo một phương án, protein gắn kết h1A11.1-SL-Av được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều trong số: Temozolomit®, irinotecan, leucovorin, 5-FU, gemcitabin, và paclitaxel.

Theo các phương án khác nhau, protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được kết hợp với một tác nhân, như methotrexat, 6-MP, azathioprin sulphasalazin, mesalazin, olsalazin cloquinin/hydroxycloquin, pencillamin, aurothiomalat (trong cơ và qua đường miệng), azathioprin, cochicin, corticosteroit (qua đường miệng, xông và tiêm cục bộ), chất chủ vận thụ thể gây tiết adrenalin beta-2 (salbutamol, terbutalin, salmeteral), xanthin (theophyllin, aminophyllin), cromoglycat, nedocromil, ketotifen, ipratropium, oxitropium, xyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolat mofetil, leflunomit, NSAID, ví dụ, ibuprofen, corticosteroit như prednisolon, chất ức chế phosphodiesteraza, chất chủ vận adenosin, chất kháng huyết khối, chất ức chế bổ sung, chất gây tiết adrenalin, chất mà cản trở việc dẫn truyền bởi xytokin tiền viêm như TNF- α hoặc IL-1 (ví dụ, IRAK, NIK, IKK, p38 hoặc chất ức chế MAP kinaza), chất ức chế enzym chuyển hoá IL-1 β , chất ức chế enzym chuyển hoá TNF α (TACE), chất ức chế dẫn truyền tế bào T như chất ức chế kinaza, chất ức chế proteinaza kim loại, sulfasalazin, azathioprin, 6-mercaptopurin, chất ức chế enzym chuyển hoá angiotensin, thụ thể xytokin có thể hoà tan hoặc dẫn xuất của nó (ví dụ, thụ thể p55 hoặc p75 TNF có thể hoà tan hoặc dẫn xuất p75TNFR1IgG (Enbrel™) hoặc p55TNFR1IgG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), xytokin chống viêm (ví dụ, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 và TGF β), celecoxib, axit folic, hydroxycloquin sulfat, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxen, valdecoxib, sulfasalazin, metylprednisolon, meloxicam, metylprednisolon Axetat, vàng natri thiomalat, aspirin, triamcinolon acetonit, propoxyphen napsylat/apap, folat, nabumeton, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac natri, oxaprozin, oxycodon hcl, hydrocodon bitartrate/apap, diclofenac natri/misoprostol, fentanyl, anakinra, thể tái tổ hợp ở người, tramadol hcl, salsalat, sulindac, cyanocobalamin/fa/pyridoxin, acetaminophen, alendronat natri, prednisolon, morphin sulfat, lidocain Hydroclorua, indomethacin, glucosamin sulf/chondroitin, amitriptylin hcl, sulfadiazin, oxycodon hcl/acetaminophen, olopatadin hcl, misoprostol, naproxen natri, omeprazol, xyclophosphamit, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, kháng IL-18, kháng IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, hoặc

Mesopram. Theo một số phương án, các tổ hợp có thể bao gồm methotrexat hoặc leflunomit và xyclosporin.

Theo một số phương án, được phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm “lượng hữu hiệu về mặt điều trị” hoặc “lượng hữu hiệu về mặt phòng bệnh” của protein gắn kết được đề xuất trong bản mô tả này. “Lượng hữu hiệu về mặt điều trị” dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu về mặt điều trị của protein gắn kết có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính và thể trọng của cá thể và khả năng của protein gắn kết để gây ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu về mặt điều trị cũng là lượng trong đó các dụng độc hoặc có hại bất kỳ của kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên, có tác dụng nhiều hơn theo hiệu quả có lợi về mặt điều trị. “Lượng hữu hiệu về mặt phòng bệnh” dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Thông thường, khi liều phòng bệnh được sử dụng ở đối tượng trước hoặc ở giai đoạn bệnh sớm hơn, lượng hữu hiệu về mặt phòng bệnh sẽ nhỏ hơn lượng hữu hiệu về mặt điều trị.

V. Chẩn đoán

Sáng chế cũng đề xuất các ứng dụng chẩn đoán, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp thử nghiệm chẩn đoán bằng cách sử dụng một hoặc nhiều protein gắn kết, kit chẩn đoán chứa một hoặc nhiều protein gắn kết, và phương pháp và kit để sử dụng trong các hệ tự động và/hoặc bán tự động. Theo một số phương án, phương pháp và kit có thể được dùng trong việc phát hiện, kiểm tra và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn ở cá thể.

A. Phương pháp thử nghiệm

Theo các phương án khác nhau, các phương pháp được đề xuất để xác định sự có mặt, lượng và/hoặc nồng độ của ít nhất một chất phân tích hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm bằng cách sử dụng ít nhất một protein gắn kết. Các thử

nghiệm lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm miễn dịch và/hoặc phương pháp dùng phép đo phổ khối.

Ví dụ, thử nghiệm miễn dịch được đề xuất bởi sáng chế có thể bao gồm thử nghiệm miễn dịch xăng-đuych, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch ức chế cạnh tranh, thử nghiệm miễn dịch phân cực huỳnh quang (FPIA), các kỹ thuật thử nghiệm miễn dịch đa enzym (EMIT), truyền năng lượng cộng hưởng phát sáng sinh học (BRET) và thử nghiệm phát sáng hoá học tương đồng, trong số các thử nghiệm khác.

Theo một số phương án, phương pháp xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm là được đề xuất, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên hoặc mảnh của nó là DLL4 và/hoặc VEGF. Phương pháp bao gồm việc thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, bằng thử nghiệm miễn dịch. Thử nghiệm miễn dịch (i) dùng ít nhất một protein gắn kết và ít nhất một chất đánh dấu có thể phát hiện và (ii) bao gồm so sánh tín hiệu được tạo ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện dùng làm chỉ dấu trực tiếp hoặc gián tiếp cho biết sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm với tín hiệu được sinh ra dùng làm chỉ dấu trực tiếp hoặc gián tiếp cho biết sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu đối chứng hoặc mẫu hiệu chỉnh. Mẫu hiệu chỉnh tùy ý là một phần của dãy các mẫu hiệu chỉnh mà mỗi trong số các mẫu hiệu chỉnh khác với các mẫu hiệu chỉnh khác trong dãy theo nồng độ kháng nguyên, hoặc mảnh của nó. Phương pháp có thể bao gồm (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một chất bắt giữ, mà gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, để tạo thành phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên hoặc mảnh của nó (ii) cho phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên hoặc mảnh của nó tiếp xúc với ít nhất một chất phát hiện, mà bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện và gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, mà không được gắn kết bởi chất bắt giữ, để tạo thành phức hệ phát hiện và (iii) xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu

được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện được tạo thành trong (ii), trong đó ít nhất một chất bắt giữ và/hoặc ít nhất một chất phát hiện là ít nhất một protein gắn kết.

Theo cách khác, theo một số phương án, phương pháp xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm có thể bao gồm (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một chất bắt giữ, mà gắn kết với epitop trên kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, để tạo ra phức hệ bao gồm chất bắt giữ và kháng nguyên hoặc mảnh của nó và theo cách đồng thời hoặc theo trình tự, theo thứ tự, cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với kháng nguyên được đánh dấu theo cách phát hiện hoặc mảnh của nó, mà có thể cạnh tranh với kháng nguyên bất kỳ hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm để gắn kết với ít nhất một chất bắt giữ, trong đó kháng nguyên bất kỳ hoặc mảnh của nó, có mặt trong mẫu thử nghiệm và kháng nguyên được đánh dấu theo cách phát hiện cạnh tranh với nhau để tạo thành phức hệ phát hiện và (ii) xác định sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên, hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện được tạo thành trong (i), trong đó ít nhất một chất bắt giữ là ít nhất một protein gắn kết và trong đó tín hiệu được sinh ra bởi chất đánh dấu có thể phát hiện trong phức hệ phát hiện bắt giữ là tỷ lệ nghịch với lượng hoặc nồng độ của kháng nguyên hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm.

Theo các phương án khác nhau, mẫu thử nghiệm có thể là từ người bệnh, trong trường hợp mà phương pháp còn có thể bao gồm việc chẩn đoán, tiên đoán, hoặc đánh giá hiệu quả của việc điều trị/phòng bệnh của người bệnh. Nếu phương pháp còn bao gồm đánh giá hiệu quả của việc điều trị/phòng bệnh của người bệnh, phương pháp tùy ý còn bao gồm bước cải biến việc điều trị/phòng bệnh của người bệnh nếu cần để cải thiện hiệu quả. Phương pháp có thể được làm thích ứng để sử dụng trong hệ thống tự động hoặc hệ thống bán tự động. Do đó, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để xác định nếu đối tượng có hoặc ở nguy cơ phát triển bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu. Cụ thể là, phương pháp có thể bao gồm các bước:

(a) xác định nồng độ hoặc lượng một hoặc nhiều chất phân tích hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm từ đối tượng (ví dụ, sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, hoặc phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này); và (b) so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích, hoặc (các) mảnh của nó, như được xác định ở bước (a) với lượng định trước, trong đó, nếu nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích được xác định ở bước (a) là tốt hơn so với lượng định trước, thì đối tượng được xác định là không có hoặc ở nguy cơ đối với bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu. Tuy nhiên, nếu nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích được xác định ở bước (a) là không tốt hơn so với nồng độ định trước, thì đối tượng được xác định là có hoặc ở nguy cơ đối với bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh đã nêu.

Ngoài ra, được đề xuất trong bản mô tả này là các phương pháp kiểm tra sự tiến triển của bệnh ở đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm các bước:

(a) xác định nồng độ hoặc lượng trong mẫu thử nghiệm từ đối tượng chứa một hoặc nhiều (các) chất phân tích;

(b) xác định nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích trong mẫu thử nghiệm sau từ cùng đối tượng; và

(c) so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b) với nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích được xác định ở bước (a), trong đó nếu nồng độ hoặc lượng được xác định ở bước (b) là không đổi hoặc tốt hơn so với nồng độ hoặc lượng được xác định ở bước (a), thì bệnh ở đối tượng được xác định đã bị tiếp tục, tiến triển hoặc trở nên xấu. Bằng cách so sánh, nếu nồng độ hoặc lượng như được xác định ở bước (b) là tốt hơn khi so với nồng độ hoặc lượng như được xác định ở bước (a), thì bệnh ở đối tượng được xác định đã bị gián đoạn, hồi quy hoặc được cải thiện.

Tuỳ ý là, phương pháp kiểm tra sự tiến triển của bệnh còn bao gồm việc so sánh nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b), ví dụ, với hàm lượng định trước. Hơn nữa, tuỳ ý phương pháp bao gồm việc điều trị đối tượng bằng một hoặc nhiều được phẩm trong khoảng thời gian xem liệu việc so sánh

có thể hiện rằng nồng độ hoặc lượng (các) chất phân tích như được xác định ở bước (b), ví dụ, được thay đổi theo cách tốt hơn so với hàm lượng định trước.

Theo một số phương án, sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của chất phân tích hoặc mảnh của nó được phát hiện trong mẫu bằng cách sử dụng chất đánh dấu có thể phát hiện như chất đánh dấu phát sáng hoá học (hợp chất acridini). Theo một số phương án, tín hiệu quang hóa mà được sinh ra có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật không thường đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dựa trên cường độ tín hiệu được sinh ra, lượng hoặc nồng độ của chất phân tích trong mẫu có thể được định lượng. Cụ thể là, theo một số phương án, lượng chất phân tích trong mẫu có thể tỷ lệ với cường độ của tín hiệu được sinh ra. Theo một số phương án, lượng chất phân tích có mặt có thể được định lượng bằng cách so sánh lượng ánh sáng được sinh ra với đường cong tiêu chuẩn đối với chất phân tích hoặc bằng việc so sánh với chất chuẩn tham chiếu hoặc chất hiệu chỉnh. Đường cong tiêu chuẩn có thể được sinh ra bằng cách sử dụng dung dịch pha loãng theo dãy nồng độ hoặc dung dịch có nồng độ đã biết của chất phân tích bằng phép đo phổ khối, phương pháp đo trọng lực và các kỹ thuật khác đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Thông thường, thử nghiệm miễn dịch chất phân tích có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dạng bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực này, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, dạng xăng-đuych. Ví dụ, trong thử nghiệm miễn dịch, một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được sử dụng để bắt giữ chất phân tích (hoặc mảnh của nó) trong mẫu thử nghiệm (các protein gắn kết này thường được gọi là protein gắn kết “bắt giữ”) và một hoặc nhiều protein gắn kết có thể được sử dụng để gắn kết chất đánh dấu có thể phát hiện (cụ thể là, có thể định lượng) với xăng-đuych (protein gắn kết thường được gọi là protein gắn kết “phát hiện”, “thể tiếp hợp” hoặc “các thể tiếp hợp”). Do đó, trong ngữ cảnh về dạng thử nghiệm miễn dịch xăng-đuych lấy làm ví dụ, DVD (hoặc mảnh, biến thể hoặc mảnh biến thể của nó) như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng như protein gắn kết bắt giữ, protein gắn kết phát hiện hoặc cả hai. Ví dụ, DVD có miền thứ nhất mà có thể gắn kết epitop trên chất phân tích thứ nhất (hoặc mảnh của nó) và miền thứ hai mà có thể gắn kết epitop

trên chất phân tích thứ hai (hoặc mảnh của nó) có thể được sử dụng như protein gắn kết bất giữ và/hoặc phát hiện để phát hiện và tùy ý định lượng, một hoặc nhiều chất phân tích (ví dụ, DLL4 và/hoặc VEGF). Trong ví dụ khác, việc dùng DVD có các ái lực khác nhau nằm trong thử nghiệm xăng-đuych có thể tạo ra lợi ích mong muốn. Trong ngữ cảnh về thử nghiệm miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này, thường có thể là hữu ích hoặc mong muốn để hợp nhất một hoặc nhiều cầu liên kết nằm trong cấu trúc của DVD. Khi có mặt, tốt nhất là cầu liên kết sẽ có chiều dài đầy đủ và tính linh hoạt cấu trúc để cho phép việc gắn kết của epitop bằng các miền bên trong cũng như việc gắn kết của epitop khác bằng các miền bên ngoài. Về việc này, nếu DVD có thể gắn kết hai chất phân tích khác nhau và một chất phân tích lớn hơn so với chất phân tích còn lại, mong muốn chất phân tích lớn hơn được gắn kết bởi các miền bên ngoài.

Theo các phương án khác nhau, mẫu được thử nghiệm (ví dụ, mẫu được cho là chứa chất phân tích hoặc mảnh của nó) có thể được tiếp xúc với ít nhất một protein gắn kết bất giữ và ít nhất một protein gắn kết phát hiện một cách đồng thời hoặc theo trình tự và thứ tự bất kỳ. Ví dụ, mẫu thử nghiệm có thể là thứ nhất được tiếp xúc với ít nhất một protein gắn kết bất giữ và sau đó (theo trình tự) với ít nhất một protein gắn kết phát hiện. Theo cách khác, mẫu thử nghiệm thứ nhất có thể được tiếp xúc với ít nhất một protein gắn kết phát hiện và sau đó (theo trình tự) với ít nhất một protein gắn kết bất giữ. Theo phương án khác nữa, mẫu thử nghiệm có thể được tiếp xúc một cách đồng thời với protein gắn kết bất giữ và protein gắn kết phát hiện. Theo các phương án khác nhau, thử nghiệm miễn dịch ức chế cạnh tranh bao gồm một hoặc nhiều DVD được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt, lượng hoặc nồng độ của một hoặc nhiều chất phân tích hoặc mảnh của nó (ví dụ, DLL4 và/hoặc VEGF).

Theo các phương án khác nhau, chất đánh dấu có thể phát hiện có thể được gắn kết với protein gắn kết theo cách trực tiếp hoặc qua chất gắn kết. Ví dụ về chất gắn kết mà có thể được sử dụng là EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, Hydroclorua), mà có bán sẵn trên thị trường từ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Chất cặp đôi mà có thể được sử dụng là đã được biết

đến trong lĩnh vực này. Các phương pháp gắn kết chất đánh dấu có thể phát hiện với protein gắn kết là đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Theo các phương án khác nhau, sự có mặt hoặc lượng chất đánh dấu được gắn kết với phức bao gồm chất phân tích và DVD trong thử nghiệm phát hiện có thể được định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, nếu chất đánh dấu enzym được sử dụng, thì phức hệ đánh dấu có thể được cho phản ứng với chất nền để đánh dấu mà tạo ra phản ứng có thể định lượng như tạo màu. Nếu chất đánh dấu là chất đánh dấu hoạt tính phóng xạ, thì chất đánh dấu có thể được định lượng bằng cách sử dụng các phương tiện thích hợp, như bộ đếm nhấp nháy. Nếu chất đánh dấu là chất đánh dấu huỳnh quang, thì chất đánh dấu có thể được định lượng bằng cách kích thích chất đánh dấu và phát hiện tín hiệu huỳnh quang. Nếu chất đánh dấu là chất đánh dấu quang hoá, thì chất đánh dấu có thể được định lượng bằng cách phát hiện ánh sáng được phát ra bằng mắt thường hoặc bằng cách sử dụng bộ phát sáng, màng tia x, màng hình ảnh tốc độ cao, máy ảnh CCD, v.v. Theo một số phương án, khi lượng chất đánh dấu trong phức hệ đã được định lượng, nồng độ của chất phân tích hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm có thể được xác định bằng các phương tiện thích hợp, như bằng việc sử dụng đường cong tiêu chuẩn mà đã được tạo ra bằng cách sử dụng dãy pha loãng của chất phân tích hoặc mảnh của nó có nồng độ đã biết hoặc bằng bộ định cỡ khác bất kỳ.

Theo một phương án, thử nghiệm miễn dịch vi hạt quang hoá, cụ thể là thử nghiệm dùng bộ phân tích tự động ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), là được sử dụng.

Theo một số phương án, phương pháp dùng phép đo phổ khối được đề xuất bởi sáng chế và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở MALDI (khử thẩm hút/ion hoá laze do chất nền hỗ trợ) và SELDI (khử thẩm hút/ion hoá laze tăng cường bề mặt).

Các phương pháp thu gom, xử lý, gia công và phân tích các mẫu thử nghiệm sinh học bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch và phép đo phổ khối là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được đề xuất đối với thực tiễn của sáng chế (US 2009-0311253 A1).

B. Kit

Theo các phương án khác nhau, kit để thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với sự có mặt, lượng và/hoặc nồng độ của ít nhất một chất phân tích hoặc mảnh của nó, trong mẫu thử nghiệm cũng được đề xuất. Theo một số phương án, kit bao gồm ít nhất một thành phần để thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với chất phân tích hoặc mảnh của nó, và hướng dẫn để đánh giá mẫu thử nghiệm đối với chất phân tích, hoặc mảnh của nó. Ít nhất một thành phần để thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với chất phân tích, hoặc mảnh của nó, có thể bao gồm được phẩm bao gồm protein gắn kết, như được bộc lộ trong bản mô tả này, và/hoặc mảnh, biến thể hoặc mảnh biến thể của nó. Theo một số phương án, thành phần tùy ý được giữ cố định trên pha rắn.

Tùy ý là, theo một số phương án, kit có thể bao gồm chất hiệu chỉnh hoặc đối chứng, mà có thể bao gồm chất phân tích được phân lập hoặc được tinh chế. Theo một số phương án, kit có thể bao gồm ít nhất một thành phần để thử nghiệm mẫu thử nghiệm đối với chất phân tích bằng thử nghiệm miễn dịch và/hoặc phép đo phổ khối. Các thành phần của kit, bao gồm chất phân tích, protein gắn kết và/hoặc protein gắn kết kháng chất phân tích hoặc mảnh của nó, tùy ý có thể được đánh dấu bằng cách sử dụng chất đánh dấu có thể phát hiện đã được biết đến trong lĩnh vực này (US 2009-0311253 A1).

C. Tự động hoá

Theo các phương án khác nhau, kit (hoặc thành phần của nó) và phương pháp xác định sự có mặt, lượng và/hoặc nồng độ của ít nhất một chất phân tích trong mẫu thử nghiệm có thể được làm thích ứng để sử dụng trong nhiều hệ tự động và bán tự động, như được mô tả ví dụ, trong các patent Mỹ số 5,089,424 và 5,006,309, và như được bán trên thị trường, ví dụ, bởi Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) như ARCHITECT®.

Nền tự động hoặc bán tự động khác mà có thể được sử dụng với protein gắn kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AxSYM®, IMx® (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,294,404, PRISM®, EIA (hạt), và Quantum™ II (tất cả từ Abbott Laboratories), cũng như các nền khác đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ngoài ra, các thử

nghiệm, kit và thành phần của kit có thể được dùng ở các dạng khác, ví dụ, đối với hệ thử nghiệm điện hoá và/hoặc giữ bằng tay khác hoặc điểm chăm sóc. Sáng chế là, ví dụ có khả năng áp dụng cho Abbott Point thương mại của Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) hệ thử nghiệm miễn dịch điện hoá mà thực hiện thử nghiệm miễn dịch xăng-đuych. Bộ cảm biến miễn dịch và phương pháp sản xuất của chúng và việc vận hành trong thiết bị thử nghiệm sử dụng đơn được mô tả, ví dụ trong patent Mỹ số 5,063,081, 7,419,821, và 7,682,833; và công bố patent Mỹ số 20040018577, 20060160164 và 20090311253.

Sẽ xuất hiện một cách dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các cải biến và sự thích ứng thích hợp khác của các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là hiển nhiên và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các thể tương đương thích hợp mà không tách rời phạm vi của các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này. Khi mô tả một số phương án chi tiết, các phương án này sẽ được hiểu một cách rõ ràng hơn bằng việc tham chiếu đến các ví dụ sau đây, mà được bao gồm chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo cấu trúc phân tử DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Các trình tự miễn biến đổi từ mAb kháng DLL4 được làm giống người (h1A11.1) và mAb kháng VEGF (Av) được sử dụng để thiết kế các miền VH và VL của các phân tử kháng DLL4/kháng VEGF DVD. Các vùng biến đổi được tổng hợp bằng cách sử dụng PCR hai bước. Các đoạn mỗi được thiết kế với các vùng nhánh tương đồng để tạo dòng vector và vùng cầu liên kết giữa mỗi cặp biến đổi DVD. Sự biến nạp vi khuẩn được thực hiện để nhận dạng các dòng dương tính và các cấu trúc được thu hoạch và được tinh chế để sử dụng trong việc biến nạp của động vật có vú bằng cách sử dụng các phương thức tiêu chuẩn đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Miền biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ được tạo dòng trong khung thành chuỗi nặng IgG1 đột biến của người (L234, 235A) và vùng cố định chuỗi nhẹ kappa, một cách tương ứng để sinh ra các phân tử kháng DLL4/kháng VEGF DVD (Bảng 4).

Bảng 4. Các cấu trúc kháng DLL4/kháng VEGF DVD

Tên DVD	Chuỗi nặng (HC)	Chuỗi nhẹ (LC)
h1A11.1-LL-Av	h1A11.1-L-Av HC	h1A11.1-L-Av LC
h1A11.1-LS-Av	h1A11.1-L-Av HC	h1A11.1-S-Av LC
h1A11.1-SL-Av	h1A11.1-S-Av HC	h1A11.1-L-Av LC
h1A11.1-SS-Av	h1A11.1-S-Av HC	h1A11.1-S-Av LC
h1A11.1-GS10-Av	h1A11.1-GS10-Av HC	h1A11.1-GS10-Av LC
h1A11.1-GS14-Av	h1A11.1-GS14-Av HC	h1A11.1-GS14-Av LC
Av-LL-h1A11.1	Av-L-h1A11.1 HC	Av-L-h1A11.1 LC
Av-LS-h1A11.1	Av-L-h1A11.1 HC	Av-S-h1A11.1 LC
Av-SL-h1A11.1	Av-S-h1A11.1 HC	Av-L-h1A11.1 LC
Av-SS-h1A11.1	Av-S-h1A11.1 HC	Av-S-h1A11.1 LC
Av-GS6-h1A11.1	Av-GS6-h1A11.1 HC	Av-GS6-h1A11.1 LC
Av-GS10-h1A11.1	Av-GS10-h1A11.1 HC	Av-GS10-h1A11.1 LC
Av-GS14-h1A11.1	Av-GS14-h1A11.1 HC	Av-GS14-h1A11.1 LC

Ví dụ 2: Xác định ái lực của các cấu trúc DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Thử nghiệm BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) được sử dụng để đánh giá việc gắn kết của các DVD với miền ngoại bào DLL4 tái tổ hợp được tinh chế (ECD) hoặc với VEGF₁₆₅, như được xác định bằng phép đo dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt được thực hiện đối với Biacore 2000, Biacore 3000 hoặc Biacore T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) ở 25°C. Đối với phép đo động học gắn kết DLL4, chất đệm thử nghiệm là HBS-EPB: 10mM Hepes, độ pH=7,5, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,005% Tween 20, 0,1mg/ml BSA (Sigma A7906). Đối với phép đo động học gắn kết VEGF, chất đệm thử nghiệm là HBS-EP+(3N01B): 10mM Hepes, độ pH=7,5, 300mM NaCl, 3mM EDTA, 0,05% Tween 20, 0,1mg/ml BSA (Sigma

A7906). Ví dụ, khoảng 9000 RU kháng thể đa dòng đặc hiệu Fc của dê kháng người (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) được pha loãng trong 10mM natri Axetat (độ pH=4,5) được giữ cố định một cách trực tiếp ngang qua chip cảm biến sinh học loại nghiên cứu CM5 bằng cách sử dụng kit ghép cặp amin tiêu chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất và các quy trình ở 25ug/ml. Các phần không được phản ứng trên bề mặt bộ cảm biến sinh học được phong bế bằng etanolamin. Đối với phân tích động học, các phương trình tốc độ thu được từ mô hình gắn kết 1:1 Langmuir được khớp một cách đồng thời với đa tiêm kháng nguyên (bằng cách sử dụng phép phân tích khớp toàn bộ) kèm sử dụng Scrubber 2 (BioLogic Software), phần mềm Biacore Biaevaluation 4.0.1 hoặc phần mềm đánh giá Biacore T100. Các kháng thể được tinh chế được pha loãng trong dung dịch đệm chạy mẫu để bắt giữ ngang qua bề mặt phản ứng Fc dê kháng người. Các kháng thể được bắt giữ ở dạng phối tử (1ug/ml) được tiêm qua chất nền phản ứng ở tốc độ dòng 10ul/phút. Trong quá trình thử nghiệm, tất cả các phép đo được tham chiếu kháng bề mặt bắt giữ đơn lẻ (nghĩa là không có kháng thể bắt giữ). Hằng số tốc độ kết hợp và phân ly, K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) và K_{off} (s^{-1}) được xác định ở tốc độ dòng liên tục 80ul/phút. Hằng số tốc độ thu được bằng phép đo gắn kết động học ở các nồng độ kháng nguyên khác nhau nằm trong khoảng từ 1,23 đến 900nM, như dãy pha loãng gấp 3 lần và bao gồm dung dịch tiêm chỉ chứa chất đệm (được sử dụng để tham chiếu kép). Hằng số phân ly cân bằng K_D (M) của phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên đích sau đó được tính toán dựa vào hằng số tốc độ động học bằng công thức sau đây: $K_D = K_{off}/K_{on}$. Việc gắn kết được ghi chép dưới dạng hàm số của thời gian và hằng số tốc độ động học được tính toán. Trong thử nghiệm này, tốc độ on nhanh như $10^6 M^{-1}s^{-1}$ và tốc độ off chậm như $10^{-6} s^{-1}$ có thể đo được. Ái lực gắn kết kháng nguyên của DVD kháng DLL4/kháng VEGF được tổng kết trong bảng 5 và 6.

Bảng 5. Động học Biacore của protein gắn kết DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Tên DVD	BIAcore DLL4 ₅₂₉ của người			BIAcore VEGF ₁₆₅ của người		
	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)
Av	N/A	N/A	N/A	1,19E+05	3,47E-05	2,9E-10
h1A11.1	1,60E+05	1,93E-03	1,2E-08	N/A	N/A	N/A
h1A11.1-LL-Av	2,05E+05	2,63E-03	1,2E-08	5,19E+04	2,44E-05	4,7E-10
h1A11.1-LS-Av	2,15E+05	2,36E-03	1,1E-08	2,26E+04	2,83E-05	1,3E-09
h1A11.1-SL-Av	2,17E+05	2,24E-03	1,0E-08	4,57E+04	3,20E-05	7,0E-10
h1A11.1-SS-Av	1,92E+05	2,25E-03	1,2E-08	7,32E+03	542E-05	7,4E-09
h1A11.GS10-Av	2,52E+05	2,33E-03	9,3E-09	1,92E+04	4,26E-05	2,2E-09
h1A11.1-GS14-Av	2,40E+05	2,33E-03	9,7E-09	2,87E+04	3,72E-05	1,3E-09
Av-GS6-h1A11.1	1,41E+04	7,03E-04	5,0E-08	1,94E+05	3,72E-05	1,9E-10
Av-GS10-h1A11.1	3,45E+04	1,01E-03	2,9E-08	1,84E+05	3,59E-05	1,9E-10
Av-GS14-h1A11.1	3,97E+04	1,34E-03	3,4E-08	1,82E+05	3,08E-05	1,7E-10

N/A: không thể áp dụng

Bảng 6. Động học Biacore bổ sung của DVD h1A11.1-SL-Av

Tên DVD	BIAcore DLL4 ₅₂₉ của khỉ cynomolgus			DLL4 ₅₃₀ của chuột BIAcore		
	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	K _D (M)
h1A11.1-SL-Av	4,43E+05	2,49E-03	5,6E-09	3,22E+05	7,74E-03	2,4E-08

Ví dụ 3: Mô tả đặc điểm *In vitro* của các phân tử DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Ví dụ 3.1: Hoạt tính gắn kết DLL4 như được xác định bằng phép đo dòng tế bào (FACS)

Dòng tế bào HEK293G ổn định biểu hiện quá mức DLL4 đủ chiều dài được thu hoạch từ bình thốt cổ nuôi cấy mô, rửa bốn lần và tái tạo huyền phù trong nước muối đệm Phosphat (PBS) chứa 1% albumin huyết thanh bò và 1mM CaCl_2 (chất đệm FACS). Ủ $1,5 \times 10^5$ tế bào bằng protein gắn kết DVD ở các nồng độ khác nhau trong chất đệm FACS trong 60 phút trên nước đá. Rửa tế bào hai lần và 50uL mảnh IgG F(ab')₂ kháng chuột được tiếp hợp R-phycoerythrin (pha loãng 1:200 trong chất đệm FACS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.#112-116-072) được bổ sung vào. Sau khi ủ trên nước đá (4°C, 60 phút), rửa tế bào ba lần và tái tạo huyền phù trong chất đệm FACS. Đo huỳnh quang bằng cách sử dụng Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và trị số EC_{50} được báo cáo là nồng độ của kháng thể để đạt được 50% kháng thể tối đa gắn kết với tế bào biểu hiện DLL4.

Ví dụ 3.2: Hoạt tính phong bế DLL4 của protein DVD kháng DLL4/kháng VEGF như được xác định bằng việc ức chế sự tương tác Notch-1 với miền ngoại bào DLL4 có thể hoà tan

Phủ đĩa 96 giếng Nunc-Immuno (#439454 đối với huDLL4 ELISA) và đĩa 96 giếng Costar (#9018 đối với muDLL4 ELISA) bằng 16nM human Notch-1 (R&D Systems #3647-TK, 100µl/giếng trong D-PBS) và ủ qua đêm ở 4°C. Sau đó, rửa đĩa 3X bằng chất đệm rửa (PBS, 0,05% Tween-20) và được phong bế bằng 200µl/giếng chất đệm phong bế (D-PBS, 1% BSA, 1mM CaCl_2 , 0,05% Tween-20) trong 1 giờ ở 25°C. Trong khi phong bế, miền ngoại bào DLL4 được đánh dấu biotin (14nM) được trộn với kháng thể (30pM-66nM, dãy pha loãng gấp 3 lần trong chất đệm phong bế) trong 1 giờ ở 25°C kèm lắc. Rửa đĩa thử nghiệm sau khi phong bế và ủ bằng hỗn hợp DLL4/kháng thể (100µl/giếng, 1 giờ ở 25°C kèm lắc). Rửa đĩa một lần nữa và thêm 100µl/giếng streptavidin được tiếp hợp với HRP (Fitzgerald #65R-S104PHRPx, pha loãng 1:5.000 trong chất đệm phong bế) trong 1 giờ ở 25°C kèm lắc. Sau khi rửa lần cuối, phát triển đĩa bằng cách sử dụng 100µl/giếng chất nền (TMB Sigma #T8665),

và làm ngừng phản ứng bằng cách sử dụng 100µl/giếng 1N HCl, và đọc khả năng hút ở 450nm. Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và trị số IC₅₀ được báo cáo như nồng độ của kháng thể cần để đạt được việc giảm 50% DLL4 gắn kết với Notch1.

Ví dụ 3.3: Hoạt tính phong bế DLL4 của protein DVD kháng DLL4/kháng VEGF như được xác định bằng việc ức chế sự hoạt hoá Notch phụ thuộc DLL4 bằng cách sử dụng thử nghiệm thông báo Notch

Cấy đĩa nuôi cấy mô đáy trong suốt màu đen 96 giếng qua đêm bằng tế bào EA.hy926 được thiết kế biểu hiện luciferaza được điều khiển bởi đoạn khởi đầu đáp ứng Notch (7.000 tế bào/giếng). Các kháng thể được pha loãng theo dãy nồng độ từ 200nM được trộn trong 15 phút với thể tích ngang bằng của dung dịch chứa tế bào HEK293G biểu hiện DLL4 đủ chiều dài (5.000 tế bào/giếng). Đồng nuôi cấy tế bào 293G/DLL4 với tế bào thông báo EA.hy926 Notch trong 24 giờ với sự có mặt của kháng thể thử nghiệm. Hoạt tính luciferaza được phân tích bằng cách sử dụng chất nền Promega (Promega # E2940). Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và trị số IC₅₀ được thông báo là nồng độ kháng thể cần để đạt được việc giảm 50% sự hoạt hoá Notch do DLL4 gây ra.

Ví dụ 3.4: Hoạt tính gắn kết VEGF của protein DVD kháng DLL4/kháng VEGF như được xác định bằng ELISA bắt giữ

Ủ đĩa ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) qua đêm ở 4°C với kháng thể kháng Fc của người (5µg/ml trong PBS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Rửa đĩa ba lần trong chất đệm rửa (PBS chứa 0,05% Tween 20), và phong bế trong 1 giờ ở 25°C trong chất đệm phong bế (PBS chứa 1% BSA). Rửa giếng ba lần và mỗi kháng thể hoặc DVD được pha loãng theo dãy trong PBS chứa 0,1% BSA trước khi ủ ở 25°C trong 1 giờ. Rửa giếng ba lần và thêm VEGF biotinyl hoá (2nM) vào đĩa và ủ trong 1 giờ ở 25°C. Rửa giếng ba lần và sau đó ủ trong 1 giờ ở 25°C bằng streptavidin-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Rửa giếng ba lần và thêm 100µl ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) vào/giếng. Sau khi nhuộm màu, làm ngừng phản ứng bằng 1M HCl và đo độ hấp thụ ở 450nm.

Ví dụ 3.5: Hoạt tính phong bế VEGF của protein DVD kháng DLL4/kháng VEGF được xác định bằng việc ức chế sự tương tác của VEGF với VEGFR1

Ủ các đĩa ELISA (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY) qua đêm ở 4°C với 100µl PBS chứa protein dung hợp Fc miễn ngoại bào VEGFR1 tái tổ hợp (5µg/ml, hệ R&D, Minneapolis, MN). Rửa đĩa ba lần trong chất đệm rửa (PBS chứa 0,05% Tween 20), và phong bế trong 1 giờ ở 25°C trong chất đệm phong bế (PBS chứa 1% BSA). Mỗi kháng thể và DVD được pha loãng theo dãy nồng độ trong PBS chứa 0,1% BSA và ủ bằng 50µl 2nM VEGF biotinyl hoá trong 1 giờ ở 25°C. Sau đó, thêm hỗn hợp gồm kháng thể và VEGF biotinyl hoá hoặc DVD và VEGF biotinyl hoá (100µl) vào giếng được phủ VEGFR1-Fc và ủ ở 25°C trong 10 phút. Rửa giếng ba lần và sau đó ủ trong 1 giờ ở 25°C với 100µl streptavidin-HRP (KPL #474-3000, Gaithersburg, MD). Rửa giếng ba lần và thêm 100µl ULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL) vào/giếng. Sau khi nhuộm màu, làm ngừng phản ứng bằng 1M HCl và đo độ hấp thụ ở 450nm.

Ví dụ 3.6: Hoạt tính phong bế VEGF của protein DVD kháng DLL4/kháng VEGF được xác định bằng việc ức chế sự tăng sinh/sự sống sót của tế bào nội mô được kích thích bởi VEGF

Trước khi cấy vào đĩa để thử nghiệm, TIME (ATCC) hoặc HUVEC (đường đi 2-6) tế bào nội mô được giữ trong EBM-2 (Lonza-Clonetics, Walkersville, MD) được bổ sung với EGM-2 SingleQuots (Lonza-Clonetics, Walkersville, MD, #CC-4176). Cấy tế bào ở 10.000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng màu đen được phủ collagen trong 100µl EMB-2 với 0,1% FBS với sự không có mặt của yếu tố sinh trưởng. Ngày tiếp theo, thay thế môi trường bằng 0,1% FBS với sự không có mặt của yếu tố sinh trưởng. Ngày tiếp theo, thay thế môi trường bằng 100µl EMB-2 (không có yếu tố sinh trưởng hoặc huyết thanh) và ủ trong bốn giờ trước khi bổ sung VEGF và kháng thể hoặc DVD. Kháng thể đơn dòng kháng VEGF hoặc DVD được pha loãng theo dãy nồng độ trong EMB-2 bằng 0,1% BSA và ủ sơ bộ bằng VEGF₁₆₅ tái tổ hợp ở người (50ng/ml) trong 1 giờ ở 25°C trong 50µl. Sau đó, thêm hỗn hợp kháng thể và VEGF hoặc DVD và VEGF vào tế bào (50µl), và ủ đĩa ở 37°C trong không khí ẩm, 5% CO₂ trong 72 giờ. Đo trực tiếp sự sống sót/tăng sinh tế bào bằng cách đánh

giá hàm lượng ATP bằng cách sử dụng kit ATPlite (Perkin Elmer, Waltham, MA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hoạt tính *in vitro* của DVD kháng DLL4/kháng VEGF, như được đặc trưng bởi các thử nghiệm được kể đến trên đây, được tổng kết trong bảng 7.

Bảng 7. Mô tả đặc điểm *In Vitro* của DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Tên DVD	DLL4 của người			VEGF của người		
	Gắn kết	Phong bế chức năng		Gắn kết	Phong bế chức năng	
	FACS EC ₅₀ (nM)	ELISA cạnh tranh Notch IC ₅₀ (nM)	Hoạt hoá Notch IC ₅₀ (nM)	ELISA EC ₅₀ (nM)	ELISA cạnh tranh VEGFR1 IC ₅₀ (nM)	Sự tăng sinh tế bào nội mô IC ₅₀ (nM)
Av-LL-h1A11.1		2,43				
Av-LS-h1A11.1		2,77				
Av-SL-h1A11.1		7,38				
Av-SS-h1A11.1		3503				
h1A11.1-LL-Av	5,04	0,79	4,56	0,12	3,8	0,42
h1A11.1-LS-Av	5	0,76	4,59	0,16	7,7	0,57
h1A11.1-SL-Av	4,35	1,09	5,34	0,55	3,8	0,61
h1A11.1-SS-Av	3,75	0,91	7,47	2,5	26	4,2
h1A11.1-GS10-Av		0,65		0,99	37,2	1,21
h1A11.1-GS14-Av		0,68		0,41	20,2	0,84
Av-GS6-h1A11.1		3,41		0,25	7,44	4,14
Av-GS10-h1A11.1		1,5		0,12	2,01	0,57
Av-GS14-h1A11.1		1,54		0,17	4,69	0,48

Ví dụ 4: Kết quả được động học *In vivo* của DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Các đặc tính được động học của h1A11.1-SL-Av DVD được đánh giá ở khi cynomolgus (n=2 đối với mỗi nhóm liều) và chuột CD1 (n=6 đối với mỗi nhóm liều) sau khi dùng liều cao trong tĩnh mạch. Profin được động học h1A11.1-SL-Av DVD ở chuột CD1 và khi cynomolgus là đặc trưng của kháng thể đơn dòng truyền thống (bảng 8).

Bảng 8: Các thông số PK trung bình của h1A11.1-SL-Av DVD sau khi dùng liều cao trong tĩnh mạch

Loài	liều	AUC	Cmax	Vss	CL	T1/2	MRT
Chuột	1	30,4	16,6	56,6	33,6	1,4	1,8
	3	203,1	68,9	46,2	14,9	2,3	3,1
	10	570,3	187,2	102,8	18,3	4,7	5,9
	30	4488,1	496,2	94,4	6,8	9,8	13,7
Khỉ	1	109,7	30,3	35,9	10,5	3,1	3,9
	3	403,9	92,8	33,9	7,5	4,3	4,6
	10	1957,1	395,1	35,9	5,1	5,0	7,1
	30	8626,9	1344,4	27,0	3,7	5,5	7,8

Liều: mg/kg; AUC: diện tích dưới đường cong nồng độ từ 0 đến vô cực ($d \cdot \text{ug/mL}$); Cmax: nồng độ quan sát thứ nhất sau dùng liều (ug/mL); Vss: thể tích phân phối (mL/kg); CL: thanh thải (mL/ngày/kg); T1/2: chu kỳ nửa phân rã cuối cùng (ngày); MRT: thời gian cư trú trung bình từ 0 đến vô cực (ngày).

Ví dụ 5: Hiệu quả kháng khối u *In vivo* của DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Tác dụng của DVD kháng DLL4/kháng VEGF đối với sự sinh trưởng khối u được đánh giá ban đầu đối với khối u ghép khác loài ung thư tuyến đại trực tràng của người HT-29 ở chuột trụi lông giống cái cắt tuyến yên. Tóm lại, chủng ngừa 2×10^6 tế bào dưới da vào trong hông bên phải phía sau. Cho phép khối u được thiết lập trong 25 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10/\text{nhóm}$) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 214 mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được dùng liều trong màng bụng hằng tuần trong bốn tuần, với thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 9.

Tác dụng của DVD kháng DLL4/kháng VEGF đối với sự sinh trưởng khối u tiếp theo được đánh giá đối với khối u ghép khác loài u nguyên bào sợi U87-MG của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, tiêm truyền 3×10^6 tế bào dưới da vào trong hông bên phải phía sau. Khối u được cho phép thiết lập trong 17 ngày, ở thời điểm mà thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng

cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10/\text{nhóm}$) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 221mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều trong màng bụng hàng tuần trong bốn tuần, với thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Kết quả như được thể hiện trong bảng 9.

Bảng 9. Hiệu quả của DVD kháng DLL4/kháng VEGF trong mô hình ghép khác loài ung thư tuyến đại trực tràng HT-29 và u nguyên bào đệm U87-MG

Điều trị	Đường, chế độ liều	HT-29		U87-MG	
		%TGI ^a	%TGD ^b	%TGI ^c	%TGD ^b
h1A11.1-LL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	59**	42***	74***	100***
h1A11.1-LS-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	59**	42***	77***	124***
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	68***	61***	81***	100***
h1A11.1-SS-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	47*	49*	64***	48***

Từ khoá trong bảng 9: a. %TGI = phần trăm ức chế sinh trưởng khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa trên số đo phù hợp với kích thước sau ngày 29. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị đối lại nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian từ điểm giữa đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian từ điểm giữa đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000mm^3 . Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp loại log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. c. %TGI = phần trăm ức chế sinh trưởng khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích

khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào số đo phù hợp với kích thước sau ngày 24. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$)

Ví dụ 6: Hiệu quả kết hợp *In vivo* của DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Tác dụng của DVD kháng DLL4/kháng VEGF kết hợp với hoá học trị liệu đối với sự sinh trưởng khối u được đánh giá ở mô hình ghép khác loài u nguyên bào đệm U87-MG của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 3×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được để phát triển trong 22 ngày, tại thời điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo thước cặp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 207 mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được dùng liều trong màng bụng với liều đơn temozolomit® và/hoặc hằng bốn tuần một liều DVD kháng DLL4/kháng VEGF, với thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Hiệu quả kết hợp của DVD kháng DLL4/kháng VEGF và Temozolomit trong mô hình ghép khác loài u nguyên bào đệm U87-MG

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b
Temozolomit	5 mg/kg IP, qdX1	65***	45***
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	69***	100***
Temozolomit + h1A11.1-SL-Av	5 mg/kg IP, qdX1 + 6,7 mg/kg IP, q7dX4	78***	147***

Từ khoá ở bảng 10: a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào số đo

phù hợp với kích thước sau ngày 19. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trẻ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian từ điểm giữa đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian từ điểm giữa đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000 mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh kiểu log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị (* p < 0,01, ** p < 0,001, *** p < 0,0001).

Ví dụ 7: Mô tả đặc điểm trước bào chế của DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Độ ổn định khi lưu trữ (5°C) và độ ổn định khi tăng nhiệt độ (40°C) của DVD kháng DLL4/kháng VEGF DVD (h1A11.1-SL-Av) được đánh giá trong các chế phẩm và dịch cô đặc protein được liệt kê dưới đây. Độ ổn định được đánh giá bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC) và % kết tụ, % monome, % mảnh và tổng các loại được thu hồi được định lượng. Nói chung, được phẩm bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7 và nồng độ protein nằm trong khoảng từ 1,0 đến 118mg/ml.

Ở nhiệt độ 5°C và 40°C và ở nồng độ protein 50, 30, và 10mg/ml, hỗn hợp bào chế chứa: 15mM Axetat độ pH=5; 15mM Phosphat độ pH=7; 30 mM Axetat, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween 80 ở độ pH=5; 30 mM histidin, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween 80 ở độ pH=6; PBS (nước muối đệm phosphat). Tất cả hỗn hợp bào chế chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật khi lưu trữ. Ở nhiệt độ 5°C và 40°C và ở nồng độ protein 60, 50, 30, và 10mg/ml, hỗn hợp bào chế chứa 15mM histidin độ pH=6 (cũng chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong khi lưu trữ). Ở 5°C và nồng độ protein 118mg/ml, hỗn hợp bào chế chứa 15mM histidin độ pH=6 (cũng chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật khi lưu trữ). Ở 40°C và nồng độ protein 1,0mg/ml, hỗn hợp bào chế chứa 10mM xitrat + 10mM Phosphat ở các độ pH=5, 6, 7. Hỗn hợp bào chế với protein được lọc để loại bỏ vi sinh vật có thể có.

Độ ổn định lạnh đông-tan giá được thực hiện bằng cách cho protein trong hỗn hợp bào chế vào bốn chu kỳ đông lạnh ở -80°C trong ít nhất 20 giờ và tan đông trong bể nước 30°C. Hỗn hợp bào chế mà được thử nghiệm đối với độ ổn định lạnh đông-

tan giá được liệt kê dưới đây. Độ ổn định được đánh giá bằng SE-HPLC và % kết tụ, % monome, % mảnh và tổng các loại được thu hồi được định lượng. Hỗn hợp bào chế chứa 15mM histidin độ pH=6 ở 60mg/ml protein (cũng chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật) và 10mM xitrat + 10mM Phosphat ở các độ pH=5, 6, 7 và 1,0mg/ml protein (được lọc để loại bỏ vi sinh vật có thể có).

Cuối cùng, phép đo nhiệt lượng quét vi phân để đo độ ổn định nhiệt được thực hiện đối với protein trong 10mM xitrat + 10mM chất đệm Phosphat ở các độ pH=5, 6, 7 và 1,0mg/ml protein. Nhiệt độ khởi phát không gấp và nhiệt độ trung điểm không gấp (T_m) của mỗi miền protein được định lượng.

Dựa vào các dữ liệu trong các bảng 11 và 12, h1A11.1-SL-Av thoả mã các tiêu chuẩn trước bào chế đối với độ ổn định DVD-Ig.

Bảng 11: Độ ổn định khi tăng nhiệt độ ở 40°C của h1A11.1-SL-Av ở các nồng độ khác nhau và trong các chất đệm, tá dược và độ pH khác nhau

Nồng độ Protein (mg/ml)	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% mảnh	Tổng diện tích
---	Thăm tách sơ bộ	---	---	---	2,71	96,31	0,98	53058
50, 30, 10	T0	---	ace	5	2,89	96,08	1,03	48033
50, 30, 10	T0	---	his	6	2,81	96,23	0,96	46995
50, 30, 10	T0	---	phos	7	2,91	96,09	1,00	52571
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	2,54	96,50	0,96	50185
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	2,37	96,62	1,01	50771
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2,90	96,08	1,01	49170
50	T7d	40	ace	5	5,19	93,32	1,49	49028
30	T7d	40	ace	5	3,86	94,68	1,47	48171
10	T7d	40	ace	5	2,60	95,97	1,43	48379
50	T7d	40	his	6	5,25	93,46	1,29	47731
30	T7d	40	his	6	4,13	94,58	1,29	46684
10	T7d	40	his	6	2,73	95,84	1,42	46877
50	T7d	40	phos	7	9,02	89,52	1,46	53429

30	T7d	40	phos	7	6,11	92,40	1,49	51923
10	T7d	40	phos	7	3,94	94,57	1,49	53098
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	5,42	92,85	1,73	50373
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	4,07	94,06	1,87	48768
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	2,66	95,20	2,14	49396
50	T7d	40	his-suc-tw	6	3,44	95,02	1,54	50040
30	T7d	40	his-suc-tw	6	4,16	94,14	1,70	48715
10	T7d	40	his-suc-tw	6	2,86	95,24	1,90	49871
50	T7d	40	PBS	7	8,13	90,28	1,60	49207
30	T7d	40	PBS	7	5,82	92,55	1,63	48853
10	T7d	40	PBS	7	3,62	94,82	1,56	48166
50	T21d	40	ace	5	6,65	90,83	2,51	48536
30	T21d	40	ace	5	4,55	92,91	2,54	48520
10	T21d	40	ace	5	2,71	94,70	2,59	48395
50	T21d	40	his	6	7,01	90,71	2,27	46729
30	T21d	40	his	6	4,69	93,10	2,21	46687
10	T21d	40	his	6	2,77	94,93	2,30	46866
50	T21d	40	phos	7	13,39	83,83	2,78	52244
30	T21d	40	phos	7	9,38	87,76	2,86	53556
10	T21d	40	phos	7	4,77	92,32	2,91	52536
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	6,37	90,34	3,30	48268
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	4,27	91,91	3,82	47211
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	2,26	93,02	4,72	46322
50	T21d	40	his-suc-tw	6	6,84	89,82	3,34	47140
30	T21d	40	his-suc-tw	6	4,60	91,90	3,50	47416
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2,67	93,66	3,67	48166
50	T21d	40	PBS	7	12,13	84,81	3,06	49845
30	T21d	40	PBS	7	8,09	88,78	3,13	48108
10	T21d	40	PBS	7	4,20	92,63	3,17	48803

Từ khoá của chất đệm (tất cả các chất đệm chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật):

ace = 15mM Axetat độ pH=5; **his** = 15mM histidin độ pH=6; **phos** = 15mM Phosphat độ pH=7

ace-suc-tw = 30mM Axetat, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tw80

his-suc-tw = 30mM histidin, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tw80

PBS = nước muối đệm phosphat

Bảng 12. Độ ổn định lưu trữ ở 5°C của h1A11.1-SL-Av ở các nồng độ khác nhau và trong các chất đệm, tá dược và độ pH khác nhau (từ khoá chất đệm tương tự như trong bảng 11)

Nồng độ protein (mg/ml)	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% mảnh	Tổng diện tích
---	Thăm tách sơ bộ	---	---	---	2,71	96,31	0,98	53058
50, 30, 10	T0	---	ace	5	2,89	96,08	1,03	48033
50, 30, 10	T0	---	his	6	2,81	96,23	0,96	46995
50, 30, 10	T0	---	phos	7	2,91	96,09	1,00	52571
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	2,54	96,50	0,96	50185
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	2,37	96,62	1,01	50771
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	2,90	96,08	1,01	49170
50	T7d	5	ace	5	2,96	95,99	1,05	49118
30	T7d	5	ace	5	2,74	96,21	1,06	48434
10	T7d	5	ace	5	2,62	96,23	1,15	48915
50	T7d	5	his	6	2,93	95,87	1,20	47967
30	T7d	5	his	6	2,75	96,06	1,19	47182
10	T7d	5	his	6	2,55	96,31	1,13	47395
50	T7d	5	phos	7	3,15	95,64	1,21	53843
30	T7d	5	phos	7	3,10	95,76	1,14	53372
10	T7d	5	phos	7	2,91	95,96	1,13	53269
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	2,75	96,13	1,12	50236
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	2,62	96,11	1,27	50026
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	2,56	96,18	1,26	49290
50	T7d	5	his-suc-tw	6	2,84	96,10	1,07	50129
30	T7d	5	his-suc-tw	6	2,58	96,19	1,23	49272
10	T7d	5	his-suc-tw	6	2,64	96,08	1,28	50926
50	T7d	5	PBS	7	3,26	95,59	1,15	49502

Nồng độ protein (mg/ml)	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% mảnh	Tổng diện tích
30	T7d	5	PBS	7	3,07	95,64	1,29	49724
10	T7d	5	PBS	7	2,83	95,87	1,29	49563
50	T21d	5	ace	5	2,57	95,76	1,67	49722
30	T21d	5	ace	5	2,37	96,03	1,60	48882
10	T21d	5	ace	5	2,22	96,09	1,69	49255
50	T21d	5	his	6	2,63	95,63	1,74	44884
30	T21d	5	his	6	2,42	95,95	1,62	47510
10	T21d	5	his	6	2,19	96,08	1,73	47015
50	T21d	5	phos	7	3,06	94,96	1,98	53449
30	T21d	5	phos	7	2,69	95,46	1,85	52938
10	T21d	5	phos	7	2,35	95,84	1,81	52703
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	2,25	95,76	1,99	50960
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	2,08	95,90	2,02	49042
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	1,97	95,84	2,19	49851
50	T21d	5	his-suc-tw	6	2,24	95,62	2,14	49983
30	T21d	5	his-suc-tw	6	2,09	95,86	2,05	48813
10	T21d	5	his-suc-tw	6	1,97	95,83	2,19	49984
50	T21d	5	PBS	7	2,84	95,07	2,09	50641
30	T21d	5	PBS	7	2,27	95,62	2,12	48441
10	T21d	5	PBS	7	1,99	95,94	2,07	48978
50	T10mo	5	his	6	8,05	91,04	0,91	45552
30	T10mo	5	his	6	5,81	93,29	0,90	46607
10	T10mo	5	his	6	3,62	95,46	0,92	46207
50	T10mo	5	his-suc-tw	6	8,08	90,26	1,67	45430
30	T10mo	5	his-suc-tw	6	5,98	92,43	1,58	42967
10	T10mo	5	his-suc-tw	6	3,95	94,25	1,80	42567

Bảng 13. Độ ổn định lưu trữ ở 5°C, độ ổn định khi tăng nhiệt độ ở 40°C, và độ ổn định lạnh đông-tan giá của h1A11.1-SL-Av ở các nồng độ khác nhau và trong chất đệm và độ pH khác nhau

Nồng độ Protein (mg/ml)	Thời gian/FT	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% Mảnh	Tổng diện tích
1	T0	---	cit-phos	5	7,07	92,14	0,80	46824
1	T8d	40	cit-phos	5	2,23	96,39	1,38	47090
1	T22d	40	cit-phos	5	7,10	89,62	3,28	47956
1	FT2	---	cit-phos	5	7,91	90,75	1,34	46502
1	FT4	---	cit-phos	5	7,41	92,18	0,41	52181
1	T0	---	cit-phos	6	7,17	92,33	0,50	45809
1	T8d	40	cit-phos	6	2,56	96,03	1,42	46783
1	T22d	40	cit-phos	6	5,79	91,73	2,48	47401
1	FT2	---	cit-phos	6	7,14	91,48	1,38	45256
1	FT4	---	cit-phos	6	7,09	92,56	0,34	45004
1	T0	---	cit-phos	7	6,82	92,67	0,51	47025
1	T8d	40	cit-phos	7	2,52	95,95	1,53	48080
1	T22d	40	cit-phos	7	5,52	91,58	2,90	48706
1	FT2	---	cit-phos	7	7,23	91,52	1,25	46732
1	FT4	---	cit-phos	7	7,15	92,49	0,36	46561
60 và 118	T0	---	his	6	8,03	91,15	0,82	43528
60	T7d	40	his	6	7,17	91,76	1,07	45333
60	T21d	40	his	6	15,77	82,13	2,10	44729
60	T7d	5	his	6	3,83	95,32	0,86	46774
60	T26d	5	his	6	7,14	92,56	0,30	63982
118	T5mo	5	his	6	12,82	86,65	0,53	55869
60	T5mo	5	his	6	9,46	90,03	0,51	64573
60	FT2	---	his	6	6,71	92,59	0,70	42259
60	FT4	---	his	6	6,33	93,62	0,05	41054

Từ khoá:

FT = lạnh đông tan giá

FT2 = phân tích sau hai chu kỳ lạnh đông và tan giá; lạnh đông ở -80°C và tan giá trong bể nước 30°C

FT4 = phân tích sau bốn chu kỳ lạnh đông và tan giá; lạnh đông ở -80°C và tan giá trong bể nước 30°C

cit-phos = 10mM xitrat + 10mM Phosphat

his = 15mM histidin + 0,02% natri azit (azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật)

Bảng 14. Dữ liệu của phép đo nhiệt lượng bằng quét vi phân của h1A11.1-SL-Av ở 1mg/ml trong 10mM xitrat + 10mM phosphat ở các độ pH khác nhau

Độ pH	Khởi phát ($^{\circ}\text{C}$)	Tm1 ($^{\circ}\text{C}$)	Tm2 ($^{\circ}\text{C}$)	Tm3 ($^{\circ}\text{C}$)	Tm4 ($^{\circ}\text{C}$)
5	55	68,2	68,86	75,56	81,18
6	58	69,04	70,47	75,24	82,04
7	59	69,52	70,94	74,44	82,06

Ví dụ 8: Lựa chọn hỗn hợp bào chế đối với các DVD kháng DLL4/kháng VEGF

Vật liệu và phương pháp. Độ ổn định của protein kháng DLL4/kháng VEGF DVD-Ig h1A11.1-SL-Av được đánh giá trong sáu hỗn hợp bào chế được liệt kê trong bảng 15. Tất cả các hỗn hợp bào chế được tạo ra trong 15mM chất đệm histidin. Các hỗn hợp bào chế từ F1 đến F4 được tạo ra ở nồng độ protein 50mg/ml. Trong các hỗn hợp bào chế này, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0, nồng độ polysorbat 80 nằm trong khoảng từ 0 đến 0,05% khối lượng/thể tích, nồng độ sucroza nằm trong khoảng từ 0 đến 7,5% khối lượng/thể tích, và nồng độ arginin nằm trong khoảng từ 0 đến 1% khối lượng/thể tích. Hỗn hợp bào chế F4 được tạo ra

trong 15mM chất đệm histidin ở độ pH=6,0 mà không cần phải có chất làm ổn định bất kỳ và đóng vai trò làm mẫu đối chứng nghiên cứu để đánh giá độ ổn định của hỗn hợp bào chế dạng lỏng 50mg/ml. Ngoài ra, hai hỗn hợp bào chế được tạo ra ở nồng độ protein 25mg/ml ở độ pH=6,0 (các hỗn hợp bào chế F5 và F6). Thành phần của polysorbat 80 và sucroza là khác một chút trong hai hỗn hợp bào chế này; nồng độ của polysorbat 80 nằm trong khoảng từ 0,025% khối lượng/thể tích đến 0,03% khối lượng/thể tích và nồng độ của sucroza nằm trong khoảng từ 3,8% khối lượng/thể tích đến 4% khối lượng/thể tích. Hỗn hợp bào chế từ F1 đến F5 sử dụng vật liệu từ quy trình bào chế trước trong khi được phẩm F6 được bào chế bằng vật liệu từ quy trình tối ưu hơn. Dược phẩm chứa hỗn hợp bào chế F5 và F6 là rất giống nhau, nhưng sự khác nhau về độ ổn định được quan sát giữa hai dược phẩm này. Do các dược phẩm được bào chế từ các quy trình khác nhau, đây có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác nhau về độ ổn định quan sát được.

Bảng 15. Mô tả thành phần dược phẩm

Độ nhận dạng dược phẩm	Nồng độ DVD kháng DLL4/ kháng VEGF (mg/mL)	Chất đệm	Độ pH	Polysorbat 80 (Tween 80) (%) khối lượng/thể tích)	Sucroza (% khối lượng/thể tích)	Arginin (% khối lượng/thể tích)
F1	50	15 mM Histidin	6,0	0,05	7,5	0
F2	50	15 mM Histidin	5,5	0,05	7,5	0
F3	50	15 mM Histidin	6,0	0,05	7,5	1
F4	50	15 mM Histidin	6,0	0	0	0
F5	25	15 mM Histidin	6,0	0,025	3,8	0
F6	25	15 mM Histidin	6,0	0,03	4,0	0

Trong các dược phẩm trên đây, 15mM chất đệm histidin được chọn bởi vì nó tạo ra khả năng đệm thích hợp để duy trì độ pH hỗn hợp bào chế đích. Sucroza được đánh giá là chất chất làm ổn định chống lại ứng suất lạnh đông-tan giá (chất chống lạnh đông) và ứng suất gây ra do quy trình đông khô (chất chống khô lạnh). Polysorbat 80 (chất hoạt động bề mặt) và arginin được bổ sung vào để làm ổn định một cách hiệu lực dược phẩm chống kết tụ và sự hình thành hạt.

Độ ổn định của dược phẩm dạng lỏng được đánh giá trong quá trình lạnh đông /tan giá và ở -80, 5, 25 và 40°C bằng danh sách rộng các thử nghiệm phân tích bao gồm vẻ bề ngoài bằng mắt thường, % kết tụ bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC), tính đa dạng điện tích bằng sắc ký trao đổi cation (CEX-HPLC), phân mảnh bằng điện di mao dẫn SDS giảm (CE-SDS), và hạt dưới tầm nhìn bằng hình ảnh vi dòng (MFI) hoặc độ che khuất ánh sáng (HIAC). Các kết quả này được đưa ra trong các bảng từ 16 đến 19.

Bảng 16. Kết quả về độ ổn định lạnh đông-tan giá và được phẩm dạng lỏng ở -80°C

Số dạng phẩm nhận được	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài bằng mắt thường	% kết tụ theo SE-HPLC	CEX-HPLC				% tinh khiết (CE-SDS giảm)	Số lượng hạt dưới tầm nhìn bằng MFI/HIAC			Hiệu lực gắn kết theo ELISA	
				% vùng axit	% đỉnh chính	% vùng bazo	≥2µm/mL		≥10µm/mL	≥25µm/mL	% DLL4	% VEGF	
F1	0	EFVP	1,0	21,6	61,7	16,7	97,7	3333	5	0	93	113	
	3FT	EFVP	1,1	21,5	61,8	16,6	97,7	2388	50	5	NP	NP	
	1	EFVP	1,1	21,0	62,1	16,8	97,8	1364	15	5	NP	NP	
	3	EFVP	1,1	21,0	62,3	16,6	97,6	714	20	0	NP	NP	
F2	0	EFVP	1,3	21,4	61,8	16,8	97,5	1589	15	0	93	113	
	3FT	EFVP	1,3	21,4	61,8	16,9	97,6	435	5	5	NP	NP	
	1	EFVP	1,4	21,0	62,0	17,0	97,8	315	0	0	NP	NP	
	3	EFVP	1,5	20,9	61,9	17,2	97,7	699	5	0	NP	NP	
F3	0	EFVP	1,1	21,5	61,7	16,7	97,6	784	0	0	93	113	
	3FT	EFVP	1,1	21,3	61,8	16,9	97,5	490	10	0	NP	NP	
	1	EFVP	1,1	21,0	61,9	17,1	97,9	250	0	0	NP	NP	
	3	EFVP	1,2	21,0	61,8	17,2	97,7	1219	35	0	NP	NP	
F4	0	EFVP	1,2	21,6	61,8	16,6	97,4	23707	370	5	93	113	
	3FT	TMTC	1,5	21,4	61,8	16,8	97,4	105467	5906	30	NP	NP	
	1	TMTC	1,2	21,1	62,0	16,9	97,8	42024	1329	60	NP	NP	

	3	TMTC	1,5	21,1	61,9	17,0	97,8	40065	3203	625	NP	NP
F5	0	EFVP	0,9	21,6	61,6	16,7	97,7	2808	5	5	93	113
	3FT	EFVP	1,2	21,5	61,8	16,8	97,6	1949	0	0	NP	NP
	1	EFVP	1,1	21,0	62,2	16,8	97,8	270	5	0	NP	NP
	3	EFVP	1,1	21,0	62,2	16,8	97,6	759	0	0	NP	NP
F6	0	EFVP	1,0	21,6	56,4	22,0	98,1	426	58	1	109	97
	3FT	EFVP	1,1	21,7	55,9	22,4	98,2	193	24	0	115	100
	1	EFVP	1,0	21,6	55,8	22,7	98,2	50	3	0	NP	NP
	3	EFVP	1,1	22,0	55,9	22,1	98,3	254	31	0	89	96

Từ khóa: EFVP: hầu như không có hạt có thể nhìn thấy được, TMTC: quá nhiều để đếm, NP: không được thực hiện

Bảng 17. Kết quả về độ ổn định được phẩm dạng lỏng ở 5°C

Số nhận dạng phẩm	Thời gian (tháng)	Vé ngoài bằng mắt thường	% kết tụ theo SE-HPLC	CEX-HPLC			% khiết (CE- SDS giảm)	Số lượng hạt dưới tầm nhìn theo MFI/HIAC			Khả năng gắn kết theo ELISA	
				% vùng axit	% đỉnh chính	% vùng bazơ		≥2 µm/mL	≥10 µm/mL	≥25 µm/mL	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1,0	21,6	61,7	16,7	97,7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	2,0	21,2	62,4	16,3	97,8	1064	0	0	NP	NP
	3	EFVP	3,0	21,6	62,5	15,9	97,6	3452	15	0	NP	NP
F2	0	EFVP	1,3	21,4	61,8	16,8	97,5	1589	15	0	93	113

	1	EFVP	2,1	20,9	62,3	16,8	97,8	230	5	5	NP	NP
	3	EFVP	3,0	21,1	62,5	16,3	97,8	1454	0	0	NP	NP
	0	EFVP	1,1	21,5	61,7	16,7	97,6	784	0	0	93	113
F3	1	EFVP	2,0	20,8	62,0	17,2	97,8	225	5	0	NP	NP
	3	EFVP	3,2	20,8	61,1	18,1	97,6	1369	5	0	NP	NP
	0	EFVP	1,2	21,6	61,8	16,6	97,4	23707	370	5	93	113
F4	1	EFVP	2,0	21,3	62,3	16,5	97,8	1189	0	0	NP	NP
	3	EFVP	3,3	21,6	62,6	15,8	97,8	6046	145	0	NP	NP
	0	EFVP	0,9	21,6	61,6	16,7	97,7	2808	5	5	93	113
F5	1	EFVP	1,5	21,2	61,9	16,8	97,8	709	10	0	NP	NP
	3	EFVP	2,2	21,4	62,4	16,1	97,6	3203	50	0	NP	NP
	0	EFVP	1,0	21,6	57,0	21,5	98,1	426	58	1	109	97
F6*	1	EFVP	1,1	21,6	55,9	22,5	98,1	2458	164	1	116	99
	3	EFVP	1,2	22,4	55,9	21,7	98,0	34	1	0	101	100

Từ khoá: EFVP: hầu như không có hạt có thể nhìn thấy, NP: không được thực hiện

Bảng 18. Kết quả độ ổn định được phẩm dạng lỏng ở 25°C

Số dạng phẩm	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài bằng mắt thường	% Kết tụ theo SE-HPLC	CEX-HPLC				% tinh khiết (CE-SDS giảm)	Số lượng hạt dưới tầm nhìn theo MF/HIAC			Khả năng gắn kết theo ELISA	
				% Vùng axit	% Đỉnh chính	% Vùng bazơ			$\geq 2\mu\text{m/mL}$	$\geq 10\mu\text{m/mL}$	$\geq 25\mu\text{m/mL}$	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1,0	21,6	61,7	16,7		97,7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	4,3	23,5	62,2	14,2		97,4	1559	5	5	NP	NP
	3	EFVP	6,7	29,2	57,0	13,9		96,3	9358	964	150	NP	NP
F2	0	EFVP	1,3	21,4	61,8	16,8		97,5	1589	15	0	93	113
	1	EFVP	4,4	22,8	61,6	15,6		97,4	1149	5	0	NP	NP
	3	EFVP	7,1	27,2	56,6	16,2		95,4	6170	95	0	NP	NP
F3	0	EFVP	1,1	21,5	61,7	16,7		97,6	784	0	0	93	113
	1	EFVP	4,9	21,5	58,3	20,2		97,3	834	10	0	NP	NP
	3	EFVP	9,3	24,7	52,2	23,0		96,4	3677	150	10	NP	NP
F4	0	EFVP	1,2	21,6	61,8	16,6		97,4	23707	370	5	93	113
	1	EFVP	4,5	23,5	61,8	14,7		97,2	89299	3053	165	NP	NP
	3	EFVP	7,5	28,6	57,4	14,1		96,6	10527	1279	275	NP	NP
F5	0	EFVP	0,9	21,6	61,6	16,7		97,7	2808	5	5	93	113

	1	EFVP	2,6	23,5	62,0	14,6	97,2	944	15	0	NP	NP
	3	EFVP	3,9	29,4	57,7	12,9	96,2	13575	1259	225	NP	NP
	0	EFVP	1,0	21,6	57,0	21,5	98,1	426	58	1	109	97
F6	1	EFVP	1,2	23,5	54,8	21,7	97,7	386	50	0	100	96
	3	EFVP	1,6	28,8	52,5	18,7	96,2	40	1	0	94	100

Từ khoá: EFVP: hầu như không có hạt có thể nhìn thấy, NP: Không được thực hiện

Bảng 19. Kết quả về độ ổn định được phẩm dạng lỏng ở 40°C

Số nhận dạng phẩm	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài bằng mắt thường	% Kết tụ theo SE-HPLC	CEX-HPLC				% tinh khiết (CE-SDS giảm)	Số lượng hạt dưới tầm nhìn theo MFI/HIAC			Khả năng gắn kết theo ELISA	
				% Vùng axit	% Đỉnh chính	% Vùng bazơ			$\geq 2\mu\text{m/m}$ L	$\geq 10\mu\text{m/m}$ L	$\geq 25\mu\text{m/m}$ L	% DLL4	% VEGF
F1	0	EFVP	1,0	21,6	61,7	16,7	97,7	97,7	3333	5	0	93	113
	1	EFVP	7,2	35,8	43,0	21,2	95,0	95,0	1219	15	0	94	104
	3	EFVP	12,8	57,0	23,0	20,0	85,9	85,9	21464	635	30	73	72
F2	0	EFVP	1,3	21,4	61,8	16,8	97,5	97,5	1589	15	0	93	113
	1	EFVP	7,9	33,8	40,9	25,3	95,1	95,1	655	5	0	95	97
	3	EFVP	13,3	52,8	22,7	24,5	86,7	86,7	6041	90	0	68	73
F3	0	EFVP	1,1	21,5	61,7	16,7	97,6	97,6	784	0	0	93	113
	1	EFVP	11,3	32,1	42,3	25,6	95,0	95,0	1464	5	0	97	101

	3	EFVP	18,1	48,6	25,2	26,2	86,3	9103	165	15	81	72
F4	0	EFVP	1,2	21,6	61,8	16,6	97,4	23707	370	5	93	113
	1	EFVP	7,7	34,9	44,2	20,9	94,8	61754	5051	670	101	97
	3	EFVP	13,5	52,8	25,9	21,4	86,3	14000	1729	480	73	76
F5	0	EFVP	0,9	21,6	61,6	16,7	97,7	2808	5	5	93	113
	1	EFVP	3,9	37,0	44,4	18,6	95,0	974	20	0	92	95
	3	EFVP	7,4	59,6	24,5	15,9	87,0	11836	610	55	68	69
F6	0	EFVP	1,0	21,6	56,4	22,0	98,1	426	58	1	109	97
	1	EFVP	1,9	35,0	42,8	22,2	94,5	60	0	0	96	95

Từ khoá: EFVP: Hầu như không có hạt có thể nhìn thấy

Thử nghiệm độ ổn định dược phẩm đông khô. Độ ổn định của dược phẩm được chọn chứa protein gắn kết h1A11.1-SL-Av cũng được đánh giá sau khi dược phẩm được làm đông khô. Độ ổn định sản phẩm dược phẩm đông khô được đánh giá đối với tất cả dược phẩm chứa sucroza (F1, F2, F3, F5 và F6). Độ ổn định được đánh giá sau 2 tuần lưu trữ ở 55°C. Độ ổn định được thử nghiệm bằng danh sách rộng các thử nghiệm phân tích bao gồm vẽ bề ngoài bằng mắt thường (trước và sau khi hoàn nguyên), thời gian hoàn nguyên, % Kết tụ theo sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC), tính đa dạng điện tích theo sắc ký trao đổi cation (CEX-HPLC), phân mảnh theo điện di mao dẫn SDS giảm (CE-SDS), hạt dưới tầm nhìn theo hình ảnh vi dòng (MFI) hoặc độ che khuất ánh sáng (HIAC), và hàm lượng nước theo chuẩn độ Karl Fischer.

Các kết quả thử nghiệm độ ổn định chế phẩm đông khô được đưa ra trong bảng 20. Thời gian hoàn nguyên đối với tất cả các dược phẩm được đánh giá là khoảng từ 1 đến 2 phút. Sự gia tăng kết tụ không đáng kể theo SEC và % vùng bazơ theo CEX được quan sát đối với tất cả các dược phẩm trong điều kiện lưu trữ ứng suất 55°C. Sự thay đổi tối thiểu được quan sát trong tất cả các thuộc tính ổn định sản phẩm được đo khác.

Bảng 20. Kết quả về độ ổn định được phẩm đông khô ở 55°C

Số nhận dạng được phẩm	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài bằng mắt thường		% Kết tụ theo SE-HPLC	CEX-HPLC			% tinh khiết (CE-SDS giảm)	Số lượng hạt dưới tầm nhìn theo MF/HiAC		
		Trước hoàn nguyên	Sau hoàn nguyên		% Vùng axit	% Đỉnh chính	% Vùng bazơ		≥2 µm/mL	≥10 µm/mL	≥25 µm/mL
F1	0	WTOWC	EFVP	1,1	21,3	61,9	16,8	97,6	749	20	10
	2 tuần ở 55°C	WTOWC	EFVP	1,6	20,6	58,1	21,3	97,5	1639	15	0
F2	0	WTOWC	EFVP	1,3	21,2	61,8	17,0	97,6	1254	15	0
	2 tuần ở 55°C	WTOWC	EFVP	2,0	20,4	57,8	21,8	97,6	1609	10	0
F3	0	WTOWC	EFVP	1,1	21,2	61,9	16,9	97,6	719	5	0
	2 tuần ở 55°C	WTOWC	EFVP	1,4	20,8	59,5	19,8	97,5	475	10	5
F5	0	WTOWC	EFVP	1,0	21,3	61,8	16,9	97,5	844	35	5
	2 tuần ở 55°C	WTOWC	EFVP	1,5	20,5	58,0	21,5	97,7	270	5	0
F6	0	WTOWC	EFVP	1,0	21,5	56,5	22,0	98,2	205	7	0
	2 tuần ở 55°C	WTOWC	EFVP	1,5	21,1	53,4	25,5	98,2	126	5	1

Từ khoá: WTOWC: bánh từ trắng đến trắng mờ, EFVP: hầu như không có hạt có thể nhìn thấy

Độ ổn định của chế phẩm F6 (đông khô, 200 protein gắn kết h1A11.1-SL-Av/lọ nhỏ) chế phẩm F6 cũng được đánh giá trong thời gian 12 tháng. Chế phẩm là ổn định trong khoảng thời gian ổn định.

Thử nghiệm độ ổn định dung dịch dạng liều. Proten gắn kết kháng DLL4/kháng VEGF được thử nghiệm đối với việc dùng trong tĩnh mạch (IV). Trước khi dùng, sản phẩm dược phẩm đông khô được hoàn nguyên với nước vô trùng để tiêm (SWFI). Tiếp theo, sản phẩm đã hoàn nguyên được pha loãng trong dung dịch mà thích hợp để tiêm trong tĩnh mạch. Nồng độ cuối cùng mà dung dịch dạng liều được pha loãng được xác định dựa trên liều lâm sàng được dùng.

Nghiên cứu được thực hiện để đánh giá độ ổn định proten gắn kết h1A11.1-SL-Av kháng DLL4/kháng VEGF được pha loãng khi trong dung dịch liều chứa một trong số hai chất pha loãng dùng trong tĩnh mạch được sử dụng thông thường, nước muối 0,9% và 5% dextroza (D5W). Nồng độ protein được đánh giá là 0,5 và 1mg/ml. Để đánh giá độ ổn định và tính tương thích của dung dịch dạng liều với các thành phần truyền, dung dịch dạng liều/điều kiện thử nghiệm được tạo ra và được lưu trữ trong các túi dùng trong tĩnh mạch (n=2) trong 6 giờ ở RT/RL, và tiếp theo, nghiên cứu truyền bắt chước được thực hiện bằng cách sử dụng các thành phần thường được dùng để truyền, bao gồm bộ lọc nội dòng. Kéo các mẫu thử nghiệm một cách trực tiếp từ túi sau khi tạo ra dung dịch dạng liều trong túi dùng trong tĩnh mạch (T0). Ngoài ra, mẫu được gom khi kết thúc quy trình truyền 30 phút được thử nghiệm. Mẫu được thử nghiệm bằng panen thử nghiệm phân tích bao gồm vẽ bề ngoài bằng mắt thường, % Kết tụ theo sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC) và hạt dưới tầm nhìn theo độ che khuất ánh sáng (HIAC).

Các kết quả nghiên cứu độ ổn định dung dịch dạng liều được đưa ra trong Bảng 21. Mức kết tụ trong nguyên liệu ban đầu bằng 0,7%. Sau đó, dung dịch dạng liều được tạo ra trong nước muối, xu hướng trong cho biết sự gia tăng về mức kết tụ khi pha loãng trong nước muối (T0) và khi kết thúc việc truyền được quan sát. Ngoài ra, số lượng hạt dưới tầm quan sát trong các mẫu này là cao. Khi so sánh, dung dịch dạng liều được tạo ra trong 5% dextroza (D5W) thể hiện % kết tụ thấp hơn theo cách thích hợp với xu hướng ổn định chấp nhận được đối với hạt.

Bảng 21. Kết quả ổn định khi sử dụng lâm sàng

Chất pha loãng	Nồng độ dung dịch liều (mg/mL)	Thử nghiệm→	Vết bề ngoài bằng mắt thường	% Kết tụ theo SE-HPLC	Số lượng hạt dưới tầm nhìn theo HIAC		
		Thời điểm↓			≥ 2 $\mu\text{m/mL}$	≥ 10 $\mu\text{m/mL}$	≥ 25 $\mu\text{m/mL}$
Nước muối 0,9%	0,5mg/ml (Bag #1)	T0	EFVP	2,7	2139	86	8
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	4,7	4398	63	1
	0,5mg/ml (Bag #2)	T0	EFVP	2,7	2729	189	12
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	3,5	1879	31	2
	1,0mg/ml (Bag #1)	T0	EFVP	2,4	1774	85	3
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	3,0	2300	24	0
	1,0mg/ml (Bag #2)	T0	EFVP	1,8	914	23	0
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	2,5	3056	42	2
5% Dextroza	0,5mg/ml (Bag #1)	T0	EFVP	0,6	1679	31	0
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	0,6	7	0	0
	0,5mg/ml (Bag #2)	T0	EFVP	0,6	2944	135	0
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	0,6	3	0	0
	1mg/ml (Bag #1)	T0	EFVP	0,6	1652	23	0
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	0,6	2	0	0
	1mg/ml (Bag #2)	T0	EFVP	0,6	2105	38	0
		Sau khi truyền bằng bơm	EFVP	0,6	6	0	0

EFVP: Hầu như không có hạt có thể nhìn thấy

Ví dụ 9: Mô tả đặc điểm tiền dược phẩm kéo dài

Việc mô tả đặc điểm đối với tiền dược phẩm kéo dài đối với DVD kháng DLL4/-kháng VEGF được thực hiện để thăm dò ảnh hưởng của các điều kiện bảo

chế khác nhau đến độ ổn định của DVD. Các dữ liệu đối với h1A11.1-LS-Av được thể hiện trong các bảng 22 và 23. Độ ổn định lưu trữ (5°C) và độ ổn định tăng cường (40°C) của DVD được đánh giá trong dược phẩm và nồng độ protein được liệt kê dưới đây. Độ ổn định được đánh giá bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC) và % kết tụ, % monome, % mảnh và tổng các loại được định lượng. Nói chung, các dược phẩm bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7 và nồng độ protein nằm trong khoảng từ 10 đến 50mg/ml.

Ở nhiệt độ 5°C và 40°C và ở nồng độ 50, 30, và 10mg/ml, các dược phẩm sau đây được đánh giá: 15mM Axetat độ pH=5, 15mM histidin độ pH=6, 15mM Phosphat độ pH=7, 30mM Axetat, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween 80 ở độ pH=5, 30mM histidin, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween 80 ở độ pH=6, và PBS (nước muối đệm Phosphat). Tất cả dược phẩm chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật trong khi lưu trữ.

Dựa vào các dữ liệu trong các bảng 22 và 23, h1A11.1-LS-Av thỏa mãn các tiêu chuẩn tiền dược phẩm đối với độ ổn định DVD-Ig.

Bảng 22. Độ ổn định tăng cường ở 40°C của h1A11.1-LS-Av

Nồng độ Protein (mg/ml)	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% mảnh	Tổng diện tích
---	Thẩm tách sơ bộ	---	---	---	0,21	98,42	1,36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0,28	98,41	1,31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0,46	98,23	1,31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0,74	97,86	1,40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0,24	98,16	1,60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0,30	98,11	1,59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0,52	98,05	1,43	50085
50	T7d	40	ace	5	1,63	96,74	1,63	55563
30	T7d	40	ace	5	1,13	97,24	1,62	55194
10	T7d	40	ace	5	0,84	97,49	1,67	55029
50	T7d	40	his	6	2,00	96,62	1,38	53566

30	T7d	40	his	6	1,17	97,46	1,38	52443
10	T7d	40	his	6	0,60	98,00	1,40	53812
50	T7d	40	phos	7	4,31	94,02	1,67	52934
30	T7d	40	phos	7	2,85	95,46	1,69	52663
10	T7d	40	phos	7	1,20	97,11	1,69	52411
50	T7d	40	ace-suc-tw	5	1,10	96,23	2,66	54837
30	T7d	40	ace-suc-tw	5	0,77	96,40	2,83	52474
10	T7d	40	ace-suc-tw	5	0,43	96,39	3,17	50855
50	T7d	40	his-suc-tw	6	1,69	96,27	2,05	53017
30	T7d	40	his-suc-tw	6	1,14	96,84	2,02	52153
10	T7d	40	his-suc-tw	6	0,59	97,30	2,11	52208
50	T7d	40	PBS	7	2,77	95,30	1,93	51623
30	T7d	40	PBS	7	1,73	96,28	1,99	49973
10	T7d	40	PBS	7	0,78	97,25	1,97	50851
50	T21d	40	ace	5	3,66	94,30	2,04	55920
30	T21d	40	ace	5	2,56	95,33	2,10	54188
10	T21d	40	ace	5	1,85	96,00	2,15	55213
50	T21d	40	his	6	4,14	94,28	1,58	54807
30	T21d	40	his	6	2,67	95,79	1,54	53071
10	T21d	40	his	6	1,59	96,82	1,58	54053
50	T21d	40	phos	7	8,52	89,32	2,16	53273
30	T21d	40	phos	7	5,58	92,54	1,89	53162
10	T21d	40	phos	7	3,01	94,89	2,10	52747
50	T21d	40	ace-suc-tw	5	4,12	93,78	2,10	56278
30	T21d	40	ace-suc-tw	5	2,93	94,94	2,13	55481
10	T21d	40	ace-suc-tw	5	1,99	95,75	2,26	54696
50	T21d	40	his-suc-tw	6	4,94	93,21	1,85	54034
30	T21d	40	his-suc-tw	6	n/a	n/a	n/a	n/a
10	T21d	40	his-suc-tw	6	2,00	96,30	1,70	52686
50	T21d	40	PBS	7	8,44	89,65	1,90	51697
30	T21d	40	PBS	7	5,54	92,43	2,03	50282
10	T21d	40	PBS	7	2,89	95,05	2,06	51580

Từ khoá của chất đệm (tất cả chất đệm chứa 0,02% natri azit để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật): **ace** = 15mM Axetat độ pH=5; **his** = 15mM histidin độ pH=6; **phos** = 15mM Phosphat độ pH=7; **ace-suc-tw** = 30mM

Axetat, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween80; **his-suc-tw** = 30mM histidin, 80mg/ml sucroza, 0,02% Tween80; **PBS** = nước muối đệm Phosphat

Bảng 23. Độ ổn định khi lưu trữ ở 5°C của h1A11.1-LS-Av

Nồng độ Protein (mg/ml)	Thời gian	Nhiệt độ (°C)	Chất đệm	Độ pH	% kết tụ	% Monome	% mảnh	Tổng diện tích
---	Tiền thẩm tách	---	---	---	0,21	98,42	1,36	56054
50, 30, 10	T0	---	ace	5	0,28	98,41	1,31	56381
50, 30, 10	T0	---	his	6	0,46	98,23	1,31	54316
50, 30, 10	T0	---	phos	7	0,74	97,86	1,40	53212
50, 30, 10	T0	---	ace-suc-tw	5	0,24	98,16	1,60	56244
50, 30, 10	T0	---	his-suc-tw	6	0,30	98,11	1,59	54076
50, 30, 10	T0	---	PBS	7	0,52	98,05	1,43	50085
50	T7d	5	ace	5	0,18	98,17	1,64	57599
30	T7d	5	ace	5	0,16	98,21	1,64	55889
10	T7d	5	ace	5	0,13	98,17	1,70	53289
50	T7d	5	his	6	0,18	98,14	1,68	55742
30	T7d	5	his	6	0,12	98,06	1,82	53603
10	T7d	5	his	6	0,13	98,07	1,80	53505
50	T7d	5	phos	7	0,23	97,72	2,05	54355
30	T7d	5	phos	7	0,18	97,77	2,04	53561
10	T7d	5	phos	7	0,13	97,72	2,15	53151
50	T7d	5	ace-suc-tw	5	0,09	97,40	2,51	57158
30	T7d	5	ace-suc-tw	5	0,08	97,43	2,49	55025
10	T7d	5	ace-suc-tw	5	0,08	97,34	2,58	53882
50	T7d	5	his-suc-tw	6	0,10	97,48	2,43	55272
30	T7d	5	his-suc-tw	6	0,08	97,63	2,29	52763
10	T7d	5	his-suc-tw	6	0,05	97,41	2,53	52903
50	T7d	5	PBS	7	0,12	97,31	2,58	51698
30	T7d	5	PBS	7	0,09	97,24	2,67	50144
10	T7d	5	PBS	7	0,08	97,28	2,64	50428
50	T21d	5	ace	5	0,87	98,45	0,68	57706

30	T21d	5	ace	5	0,80	98,55	0,65	56566
10	T21d	5	ace	5	0,83	98,47	0,70	54226
50	T21d	5	his	6	1,05	98,29	0,66	55911
30	T21d	5	his	6	0,92	98,40	0,68	54225
10	T21d	5	his	6	0,90	98,41	0,70	54128
50	T21d	5	phos	7	1,25	98,09	0,66	54980
30	T21d	5	phos	7	1,20	98,11	0,69	53903
10	T21d	5	phos	7	1,01	98,29	0,69	53271
50	T21d	5	ace-suc-tw	5	0,92	98,36	0,72	61574
30	T21d	5	ace-suc-tw	5	0,89	98,39	0,72	55532
10	T21d	5	ace-suc-tw	5	0,83	98,46	0,71	55841
50	T21d	5	his-suc-tw	6	1,00	98,27	0,73	55484
30	T21d	5	his-suc-tw	6	0,92	98,37	0,70	53335
10	T21d	5	his-suc-tw	6	0,82	98,49	0,69	53736
50	T21d	5	PBS	7	1,49	97,79	0,71	52405
30	T21d	5	PBS	7	1,29	98,02	0,70	51284
10	T21d	5	PBS	7	1,12	98,18	0,70	51377

Từ khoá của chất đệm đối với bảng 23 là tương tự như trong bảng 22.

Ví dụ 10: Tác dụng của VEGF đối với hoạt tính trung hoà của DVD kháng DLL4/kháng VEGF trong thử nghiệm tế bào DLL4

Để đánh giá xem liệu việc gắn kết VEGF có tác động đến hiệu lực làm trung hoà DLL4 của DVD kháng DLL4/kháng VEGF, VEGF được bao gồm trong thử nghiệm thông báo DLL4-Notch như được mô tả trong ví dụ 3.3. Tóm lại, tế bào HEK293G biểu hiện DLL4 của người được đồng nuôi cấy với tế bào thông báo EA.hy926 Notch trong 24 giờ với sự có mặt của h1A11.1-SL-Av DVD hoặc hỗn hợp gồm mAb kháng DLL4 (h1A11.1) và mAb kháng VEGF (Av) được pha loãng theo dãy nồng độ từ 300nM. VEGF₁₆₅ tái tổ hợp ở người (isoform ghép liên quan về mặt sinh lý của người của VEGF) hoặc protein đối chứng âm tính (BSG2) cũng được bao gồm. Khả năng trung hoà DLL4 được xác định bằng cách đánh giá trị số IC₅₀, nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được việc giảm 50% sự hoạt hoá Notch do DLL4 gây ra. Như được thể hiện trong bảng 24, sự có mặt của 6 hoặc 150 nM VEGF làm gia tăng rất lớn khả năng làm trung hoà DLL4 của h1A11.1-SL-Av DVD. Hiệu lực

gia tăng này là đơn nhất với DVD kháng DLL4/kháng VEGF như hỗn hợp mAb bố mẹ thể hiện hiệu lực tự với hoặc không có VEGF được bao gồm.

Bảng 24. VEGF làm tăng cường hiệu lực DLL4 của DVD kháng DLL4/kháng VEGF nhưng không làm tăng cường hiệu lực hỗn hợp kháng DLL4/kháng VEGF

	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	6 nM VEGF	6 nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	12,50	0,61	16,76
Hỗn hợp h1A11.1 + Av	8,64	9,97	9,55
	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	150 nM VEGF	150 nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	12,69	0,40	14,11
Hỗn hợp h1A11.1 + Av	9,17	10,32	10,93

Trong thử nghiệm khác, mảnh Fab hoá trị một của h1A11.1-SL-Av DVD cũng được đánh giá trong thử nghiệm tế bào trung hoà DLL4. Trái với DVD Ig, DVD Fab hoá trị một có hiệu lực làm trung hoà DLL4 yếu hơn. Sự có mặt của VEGF cải thiện hiệu lực của DVD-Fab, nhưng không cải thiện đến mức độ như được nhận thấy với DVD-Ig (Bảng 25).

Bảng 25. Tác dụng của VEGF đối với hiệu lực làm trung hoà DLL4 của DVD Ig và DVD Fab kháng DLL4/kháng VEGF

	IC ₅₀ (nM)		
	0nM VEGF	150 nM VEGF	150 nM BSG2
h1A11.1-SL-Av	13,46	0,41	16,55
h1A11.1-SL-Av Fab	> 40*	4,56	> 40*

* IC₅₀ chính xác có thể không xác định được do không có khả năng làm trung hoà một cách hoàn toàn DLL4

Trong thử nghiệm khác, nồng độ VEGF được chuẩn độ theo dãy và được áp dụng cho thử nghiệm thông báo DLL4-Notch được mô tả trên đây. Như được thể hiện trong bảng 26, VEGF có thể làm tăng cường hoạt tính làm trung hoà DLL4 của h1A11.1-SL-Av DVD ở nồng độ thấp như 1,2nM.

Bảng 26. VEGF làm tăng cường hiệu lực làm trung hoà DLL4 của DVD kháng DLL4/kháng VEGF DVD

		h1A11.1-SL-Av
	nM	IC ₅₀ (nM)
BSG2	150	11,0
VEGF	150	0,6
	30	0,7
	6	0,6
	1,2	1,1
	0,24	12,7
	0,048	12,3
	0,0096	11,5
	0	11,8

Ví dụ 11: Hiệu quả kết hợp *in vivo* của các DVD-Ig DLL4-VEGF

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài ruột kết SW-48 của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 5×10^6 được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được để phát triển trong 13 ngày, ở điểm mà thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10/\text{nhóm}$) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 211mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được dùng liều với irinotecan, mAb kháng VEGF và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF ở liều và chế độ trong bảng 27. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trong bảng 27.

Bảng 27. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và irinotecan trong mô hình ghép khác loài ruột kết SW-48

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b
Irinotecan	60 mg/kg IP, q3dX4	77***	106***
mAb kháng VEGF	10 mg/kg IP, q7dX4	39*	50*
h1A11.1-SL-Av	13.3 mg/kg IP, q7dX4	72***	150***
mAb kháng VEGF + Irinotecan	10 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	78***	150***
h1A11.1-SL-Av + Irinotecan	13.3 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	90***	228***

Từ khoá bảng 27: a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp với kích thước sau ngày 18. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000 mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp loại theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001. “q3dX4” chỉ ra việc dùng ba ngày một lần trong bốn chu kỳ (nghĩa là, 4 liều), trong khi “q7dX4” chỉ ra việc dùng bảy ngày một lần trong bốn chu kỳ.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng của khối u cũng được đánh giá đối với khối u ghép

khác loại ruột kết HCT-116 của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 5×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được để phát triển trong 14 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=9$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 192mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với 5-FU, leucovorin, irinotecan, mAb kháng VEGF, và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF ở liều và chế độ trong bảng 28. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 28.

Bảng 28. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và FOLFIRI trong mô hình ghép khác loài ruột kết HCT-116

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a
5-FU Leucovorin Irinotecan (FOLFIRI)	50 mg/kg IV, q7dX3 25 mg/kg PO, q7dX3 30 mg/kg IV, q7dX3	63***
MAB kháng VEGF	5 mg/kg IP, q7dX4	49***
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	67***
MAB kháng VEGF + FOLFIRI	5 mg/kg IP, q7dX4 + (trên đây) q7dX3	81***
h1A11.1-SL-Av + FOLFIRI	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + (trên đây) q7dX3	90***

Từ khoá bảng 28: a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp theo kích thước sau ngày 26. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. “q7dX3” cho biết việc dùng bảy ngày một lần trong ba chu kỳ (nghĩa là, 3

liều), trong khi “q7dX4” cho biết việc dùng bảy ngày một lần trong bốn chu kỳ.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng của khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài ruột kết HT-29 của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 2×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào trong hông bên phải phía sau. Khối u được cho phép thiết lập trong 25 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 209mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với irinotecan và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF, ở liều và chế độ trong bảng 29. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 29.

Bảng 29. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và irinotecan trong mô hình ghép khác loài ruột kết HT-29

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b
Irinotecan	60 mg/kg IP, q3dX4	47*	60*
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	42*	45*
h1A11.1-SL-Av + Irinotecan	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + 60 mg/kg IP, q3dX4	74**	76*

Từ khoá bảng 29. a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào số đo phù hợp với kích thước sau ngày 20. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều

trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp hạng theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001. “q3dX4” cho biết việc dùng ba ngày một lần trong bốn chu kỳ (nghĩa là, 4 liều), trong khi “q7dX4” cho biết việc dùng bảy ngày một lần trong bốn chu kỳ.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng khối u như được đánh giá đối với mô hình ghép khác loài u nguyên bào đệm U87-MG của người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 3x10⁶ tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được để phát triển trong 13 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị (n=10/nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 207mm³ trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với temozolomit, mAb kháng VEGF, và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF ở liều và chế độ trong bảng 30. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 30.

Bảng 30. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và temozolomit trong mô hình ghép khác loài u nguyên bào đệm U87-MG

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b
Temozolomit	5 mg/kg IP, qdX1	65***	45***
MAb kháng VEGF	5 mg/kg IP, q7dX4	47**	45**
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	69***	100***
MAb kháng VEGF + Temozolomit	5 mg/kg IP, q7dX4 + 5 mg/kg IP, qdX1	68***	89***
h1A11.1-SL-Av + Temozolomit	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + 5 mg/kg IP, qdX1	78***	155***

Từ khoá bảng 30. a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các đồ đo phù hợp với kích thước sau ngày 19. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp hạng theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài tuyến tụy của người thu được từ người bệnh PA0123 ở chuột cái NSG. Tóm lại, các mảnh khối u đông lạnh được cấy ghép dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được cho phép phát triển trong 28 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị (n=7 /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 193mm³ trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với gemcitabin và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF, ở liều và chế độ trong bảng 31. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 31.

Bảng 31. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và gemcitabin trong mô hình ghép khác loài tuyến tụy thu được từ người bệnh PA0123

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI	%TGD ^b
Gemcitabin	100 mg/kg IP, [q3dX4]X2	48**	43**
h1A11.1-SL-Av	13,3 mg/kg IP, q7dX5	54**	75**
h1A11.1-SL-Av + Gemcitabin	13,3 mg/kg IP, q7dX5 + 100 mg/kg IP, [q3dX4]X2	75***	114***

Từ khoá bảng 31. a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp với kích thước sau ngày 38. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp hạng theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng của khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài vú người MDA-MB-231-luc ở chuột cái SCID. Tóm lại, 2×10^6 tế bào được cấy ghép vào gan bàn chân của động vật có vú. Khối u được cho phép phát triển trong 13 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị (n=10 /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 150mm³ trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với paclitaxel và/hoặc DVD-

Ig kháng DLL4-VEGF, ở liều và chế độ trong bảng 32. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Ngoài ra, thu nhận hình ảnh phát quang sinh học để kiểm tra và đánh dấu sự di căn tự phát của tế bào ung thư vào phổi và/hoặc hạch bạch huyết. Các kết quả được thể hiện trong bảng 32.

Bảng 32. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và paclitaxel trong mô hình ghép khác loài vú MDA-MB-231-luc

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b	% tỷ lệ mắc phải di căn ^c
Paclitaxel	25 mg/kg IP, q4dX3	78***	106***	40*
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	56***	85***	50*
h1A11.1-SL-Av + Paclitaxel	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + 25 mg/kg IP, q4dX3	92***	179***	0***

Bảng 32 từ khoá. a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp kích thước sau ngày 15. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào điểm cuối 1000 mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp hạng theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. c. % tỷ lệ mắc phải di căn = phần trăm động vật có tín hiệu có thể phát hiện ở phổi và/hoặc hạch bạch huyết dựa vào hình ảnh phát sáng sinh học. Nhóm đối chứng điều trị có 100%. Dựa vào ngày 22 sau phép đo kích cỡ. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép

so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá học trị liệu đối với sự sinh trưởng của khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài vú người SUM149PT ở chuột cái SCID. Tóm lại, 1×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được cho phép thiết lập trong 28 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=9$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 183mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với paclitaxel và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF, ở liều và chế độ trong bảng 33. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 33.

Bảng 33. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và paclitaxel trong mô hình ghép khác loài vú SUM149PT

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a	%TGD ^b
Paclitaxel	25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	60***	173***
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX8	88***	282***
h1A11.1-SL-Av + Paclitaxel	6,7 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	93***	459***

Từ khoá bảng 33. a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp với kích thước sau ngày 22. Trị số P (như được chỉ ra bằng dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. b. %TGD = Phần trăm trễ sinh trưởng khối u = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm điều trị và C = thời gian trung tuyến đến điểm cuối của nhóm đối chứng điều

trị. Dựa vào điểm cuối 1000mm³. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa thị) thu được từ phép so sánh xếp hạng theo log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá học trị liệu đối với sự sinh trưởng khối u được đánh giá đối với khối u ghép khác loài vú SUM149PT người ở chuột cái SCID. Tóm lại, 1×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được cho phép phát triển trong 25 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=10$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 228mm³ trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với paclitaxel, mAb kháng VEGF và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF, ở liều và chế độ trong bảng 34. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 34.

Bảng 34. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và paclitaxel trong mô hình ghép khác loài vú SUM149PT

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a
Paclitaxel	25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	50*
MAb kháng VEGF	5 mg/kg IP, q7dX8	54*
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX8	78**
MAb kháng VEGF + Paclitaxel	5 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	81**
h1A11.1-SL-Av + Paclitaxel	6,7 mg/kg IP, q7dX8 + 25 mg/kg IP, [q4dX3]X4	87**

Từ khoá bảng 34: a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào các số đo phù hợp với kích thước sau ngày 18. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa

thị) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Tác dụng của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF kết hợp với hoá trị liệu đối với sự sinh trưởng của khối u còn được đánh giá đối với khối u ghép khác loài ruột kết của người HCT-116 ở chuột cái SCID. Tóm lại, 5×10^6 tế bào được chủng ngừa dưới da vào sườn bên phải phía sau. Khối u được để phát triển trong 16 ngày, ở điểm đó thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước kẹp điện tử bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được chia thành các nhóm điều trị ($n=9$ /nhóm) sao cho mỗi nhóm có thể tích khối u trung bình tương đương 198mm^3 trước khi bắt đầu điều trị. Động vật được cho dùng liều với 5-FU, capecitabin và/hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF ở liều và chế độ trong bảng 35. Thể tích khối u được đo hai lần một tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 35.

Bảng 35. Hiệu quả kết hợp của DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và 5-FU hoặc DVD-Ig kháng DLL4-VEGF và capecitabin trong mô hình ghép khác loài ruột kết HCT-116

Điều trị	Đường, chế độ liều	%TGI ^a
5-FU	75 mg/kg IV, q7dX4	50**
Capecitabin	350 mg/kg PO, qdX14	69***
h1A11.1-SL-Av	6,7 mg/kg IP, q7dX4	66***
h1A11.1-SL-Av + 5-FU	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + 75 mg/kg IV, q7dX4	84***
h1A11.1-SL-Av + Capecitabin	6,7 mg/kg IP, q7dX4 + 350 mg/kg PO, qdX14	92***

Từ khoá bảng 35: a. %TGI = Phần trăm ức chế sự sinh trưởng của khối u = $100 - (T/C \times 100)$, trong đó T = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị và C = thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng điều trị. Dựa vào số đo phù hợp với kích thước sau ngày 21. Trị số P (như được chỉ ra bởi dấu hoa

thì) thu được từ phép so sánh thử nghiệm T Student của nhóm điều trị so với nhóm đối chứng điều trị. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ví dụ 12: Hiệu lực tế bào giữa các loài của h1A11.1-SL-Av DVD

Hiệu lực làm trung hoà giữa các loài của h1A11.1-SL-Av DVD kháng DLL4 được so với thử nghiệm dựa trên tế bào bằng cách sử dụng miễn ngoại bào DLL4 tái tổ hợp được giữ cố định (ECD) giữa các loài. Thử nghiệm này được sử dụng để so sánh hoạt tính của h1A11.1-SL-Av DVD kháng lại cùng nồng độ của DLL4 thu được từ người, chuột đồng, chuột nhà và loài khỉ cynomolgus.

Đĩa nuôi cấy mô màu đen 96 giếng với các giếng đáy trong suốt (Costar, #3904) được phủ sơ bộ bằng 100 μ L/giếng DLL4-ECD (11nM) được pha loãng trong PBS (Invitrogen, #14190), hoặc 100 μ L/giếng 11nM BSA làm đối chứng (Sigma, #A9576). Bọc kín các đĩa thử nghiệm và ủ ở 4°C trong 18 giờ. Vào ngày tiếp theo, h1A11.1-SL-AV DVD được pha loãng theo dãy trong môi trường thử nghiệm DMEM (Invitrogen, #11995) chứa 10% FBS. Các đĩa thử nghiệm đã được phủ sơ bộ được rửa một lần bằng môi trường thử nghiệm trước khi bổ sung dung dịch h1A11.1-SL-Av DVD được pha loãng theo dãy với lượng 50 μ L/giếng. Sau đó, ủ các đĩa thử nghiệm ở 25°C trong 30 phút. Trong thời gian ủ này, EA.hy926 tế bào biểu hiện renilla luciferaza đối chứng và luciferaza đom đóm đối chứng được điều khiển bởi đoạn khởi đầu đáp ứng Notch được tách ra khỏi bình nuôi cấy thót cổ bằng cách sử dụng 0,25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, #25200), được tạo huyền phù lại đến 3x10⁵ tế bào/mL trong môi trường thử nghiệm và sau đó được bổ sung một cách trực tiếp vào đĩa thử nghiệm ở 25 μ L tế bào/giếng. Sau đó, ủ đĩa thử nghiệm ở 37°C với 5% CO₂ trong 24 giờ. Các thử nghiệm đom đóm và renilla luciferaza được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega, #E2940). Sự phát sáng được đọc trên thiết bị đọc đĩa (Victor, Perkin Elmer, #1420-051), và các dữ liệu được sinh ra được chuẩn hoá thành tín hiệu phát sáng renilla luciferaza.

Như được thể hiện trong bảng 36, h1A11.1-SL-Av DVD ức chế hoạt tính DLL4 của người và khỉ cynomolgus với các hiệu lực có thể so sánh. h1A11.1-SL-Av DVD cũng ức chế DLL4 của chuột, mặc dù hoạt tính nhỏ hơn với khoảng 3 lần, so

với DLL4 của người. h1A11.1-SL-Av DVD không ức chế hoạt tính DLL4 trong các thử nghiệm tế bào.

Hiệu lực làm trung hoà giữa các loài của h1A11.1-SL-AV DVD kháng VEGF được đánh giá trong thử nghiệm tăng sinh và khả năng sống sót của tế bào NIH3T3/VEGFR-2 được kích thích VEGF.

Tế bào NIH3T3 được chuyển nhiễm ổn định với ADN bổ trợ đối với VEGFR-2 chiều dài đầy đủ của người được sử dụng đối với các thử nghiệm tăng sinh và sự sống được kích thích bằng VEGF. Môi trường nuôi cấy hợp dòng của dòng tế bào ổn định NIH3T3/VEGFR-2 được tách ra khỏi bình thót cổ nuôi cấy với 0,25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, #25200), và được tạo huyền phù lại đến $1,33 \times 10^5$ tế bào/mL với môi trường thử nghiệm: DMEM (Invitrogen, #11995) chứa 0,1% BSA (Sigma, #A9576). Tạo hạt tế bào ở 10.000 tế bào/giếng trong 75 μ L tổng thể tích vào trong đĩa nuôi cấy mô màu đen 96 giếng với đáy trong (Costar, #3904), và ủ trong 24 giờ ở 37°C với 5% CO₂. Ngày tiếp theo, VEGF protein tái tổ hợp và h1A11.1-SL-AV DVD được pha loãng với môi trường thử nghiệm, trộn trong đĩa polypropylen 96 giếng và ủ ở 25°C trong 30 phút. Cốc-tai VEGF và h1A11.1-SL-AV DVD (4X) sau đó được bổ sung vào tế bào trên đĩa thử nghiệm ở 25 μ L/giếng. Đĩa thử nghiệm chứa tế bào được xử lý sau đó được ủ ở 37°C với 5% CO₂. Sau bảy mươi hai giờ, thử nghiệm sống sót được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (ATPlite 1step, Perkin Elmer, #6016739). Sự phát sáng được đọc trên thiết bị đọc đĩa (Victor, Perkin Elmer, #1420-051).

Như được thể hiện trong bảng 36, h1A11.1-SL-AV DVD làm trung hoà hoạt tính VEGF của khỉ cynomolgus với hiệu lực tương tự so với VEGF của người. h1A11.1-SL-AV DVD không ức chế VEGF của chuột đồng và chuột nhà trong thử nghiệm tế bào.

Bảng 36: Hiệu lực tế bào giữa các loài của h1A11.1-SL-AV DVD

	Thử nghiệm hiệu lực giữa các loài, IC ₅₀ (nM) ^a
DLL4 của người	0,22 ± 0,14
DLL4 của khỉ Cynomolgus	0,12 ± 0,08
DLL4 chuột nhà	0,65 ± 0,23
DLL4 chuột đồng	Không thể phát hiện
VEGF của người	0,9 ± 0,1
VEGF khỉ Cynomolgus	1,1 ± 0,3
VEGF chuột nhà	Không thể phát hiện
VEGF chuột đồng	Không thể phát hiện

Từ khoá bảng 36: a. Các trị số từ thử nghiệm tế bào DLL4 là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn từ bốn thử nghiệm độc lập. Các trị số từ thử nghiệm tế bào VEGF là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn từ ba thử nghiệm độc lập.

Ví dụ 13: Phễu sàng lọc và lựa chọn ứng viên dẫn đầu

Việc lựa chọn ứng viên DVD-Ig dẫn đầu có thể đòi hỏi vài chu kỳ kỹ thuật phân tử, tạo ra hàng trăm phân tử ứng viên hiệu lực, tiếp theo thử nghiệm trong phễu sàng lọc mà có thể bao gồm các quy thử nghiệm để nhận dạng phân tử DVD-Ig với các đặc điểm cần thiết đối với chất điều trị, tất cả mà không có chỉ dẫn xét đến các trình tự miền biến đổi hoặc các cấu trúc khác mà sẽ tạo ra các đặc tính chức năng tối ưu. Thông thường, các đặc tính này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc đánh giá: (a) động học gắn kết (tốc độ on, tốc độ off và ái lực) đối với các miền gắn kết bên trong và bên ngoài, (b) hiệu lực trong thử nghiệm sinh học sinh hoá và tế bào khác nhau, (c) hiệu quả in vivo trong mô hình khối u liên quan, (d) các đặc tính dược động học và dược lực học, (e) khả năng sản xuất, bao gồm mức biểu hiện protein trong dòng tế bào được chọn, khả năng tạo thang, sự biến đổi sau dịch mã, các đặc tính lý hoá như tỷ lệ phần trăm monome, độ tan và độ ổn định (độ ổn định nội tại, lạnh đông /tan giá, lưu trữ, v.v), (f) các đặc tính hình thành, (g) nguy cơ gây miễn

dịch hiệu lực và (h) các đặc tính độc của phân tử. Phương thức và hoá trị gắn kết cũng có thể được đánh giá, do có thể tác động đến các đặc tính gắn kết và hiệu lực tế bào của phân tử. Mức ngưỡng được đưa ra đối với tham số được đánh giá và protein gắn kết thể hiện mức tốt hơn đối với mỗi tham số được lưu ý. Dựa vào việc sàng lọc ban đầu của hàng trăm phân tử, thường chỉ có một hoặc không xuất hiện các đặc tính mà thoả mãn tất cả các tham số được liệt kê, trong số các nhân tố khác khi xét đến khi nhận dạng ứng viên dẫn đầu để đánh giá thêm. Khi ứng viên dẫn đầu được nhận dạng, việc đánh giá in vivo hơn nữa về các đặc tính điều trị được thử nghiệm, bao gồm tính an toàn, hiệu quả và hiệu lực ở động vật và con người.

Ví dụ 14: Lựa chọn ứng viên dẫn đầu DVD-Ig kháng DLL4 /kháng VEGF

Các tác giả sáng chế đã hiểu và đánh giá khoảng 100 phân tử DVD-Ig kháng DLL4/kháng VEGF, bao gồm các cấu trúc bằng cách sử dụng các trình tự VEGF và DLL4 được liệt kê trong bảng 2, cũng như các phiên bản được ghép CDR và trưởng thành về mặt ái lực của các miền biến đổi và các trình tự miền biến đổi được làm giống người hoặc hoàn toàn của người. Các mAb kháng DLL4 bố mẹ của người thu được bằng kỹ thuật thể hiện ARN thông tin PROfusion tiếp theo sự trưởng thành về mặt ái lực bằng cách sử dụng kỹ thuật thể hiện nấm men. Các kháng thể bố mẹ ghép CDR được dựa trên mAb kháng DLL4E9.71, vài mAb kháng DLL4 được làm giống người được tạo ra dựa trên h1A11.1 và h38H12.11, và vài kháng thể h1A11 trưởng thành về mặt ái lực cũng được tạo ra. Các tác giả sáng chế cũng đánh giá nhiều trình tự cầu liên kết khác nhau trong protein gắn kết DVD-Ig. Việc sử dụng các cầu liên kết khác nhau dẫn đến các đặc tính khác nhau ở mức rộng, thậm chí giữa protein gắn kết có cùng trình tự miền biến đổi.

Trong số khoảng 100 phân tử DVD-Ig được tạo ra, 10 trong số chúng được loại trừ do không đạt được mức biểu hiện mong muốn ở tế bào HEK293 bằng việc chuyển nhiễm tạm thời, 22 không thể hiện mức gắn kết ngưỡng mong muốn với DLL4, 19 không thể hiện mức gắn kết ngưỡng mong muốn với VEGF, vài cải biến sau dịch mã gần tối ưu được thể hiện, bao gồm glycosyl hoá liên kết O. Vài DVD-Ig được loại trừ để thể hiện ái lực gắn kết thấp hơn ngưỡng được xác định. Các miền gắn kết kháng nguyên ở vị trí bên trong của DVD-Ig có thể thể hiện mức ái lực gắn

kết kháng nguyên và hiệu lực giảm. Ví dụ, tất cả các phân tử DVD-Ig của dãy h1A11/Av trong đó miền gắn kết VEGF được đặt vào ở vị trí bên ngoài và miền gắn kết DLL4 ở vị trí bên trong thể hiện ái lực gắn kết DLL4 giảm. Các DVD-Ig do đó không được chọn cho nghiên cứu này. Theo hướng đối diện (nghĩa là, miền gắn kết VEGF ở vị trí bên trong và miền gắn kết DLL4 ở vị trí bên ngoài), ái lực gắn kết VEGF của h1A11.1-SL-Av được tìm thấy là tốt hơn ngoài mong đợi, thậm chí với protein gắn kết bằng cách sử dụng cùng miền biến đổi và hướng nhưng với các trình tự cầu liên kết khác, như h1A11.1-SS-Av (cầu liên kết ngăn giữa các miền VD1 và VD2 trên chuỗi nặng và nhẹ).

Ngoài ra, sự trưởng thành về mặt ái lực được thực hiện trên h1A11 để sinh ra kháng thể bố mẹ kháng DLL4 với ái lực và độ ổn định rất cao khi ở dạng kháng thể đơn dòng, nhưng ở dạng DVD-Ig các cấu trúc này không thể hiện mức ổn định được quan sát đối với h1A11.1-SL-Av, bất kể cầu liên kết được sử dụng hoặc hướng của miền gắn kết. Tương tự, sự trưởng thành về mặt ái lực của Av (kháng VEGF) miền biến đổi một lần nữa sinh ra kháng thể đơn dòng bố mẹ ổn định thể hiện mức ổn định giảm mà không cần xét đến cầu liên kết và thao tác hướng. Ngoài ra, sự trưởng thành về mặt ái lực thậm chí ở nơi nó tạo ra động học gắn kết tốt hơn đối với các kháng thể đơn dòng, có thể không dự đoán hoạt tính của DVD-Ig trình tự. Ví dụ, khi h1A11.1 được thay thế bằng các biến thể trưởng thành về mặt ái lực của nó, thì các phân tử DVD-Ig mới này thể hiện độ ổn định giảm, rút ngắn chu kỳ nửa phân rã *in vivo* và làm giảm hoạt tính kháng khối u trong mô hình khối u. Ngoài ra, các phân tử DVD-Ig chứa h1A11 trưởng thành về mặt ái lực và/hoặc miền biến đổi Av cũng thể hiện xu hướng tạo gel gia tăng hoặc tạo thành mức kết tụ ở mức cao trong khi lưu trữ ở 5°C. Việc tạo gel và kết tụ không mong muốn này không được quan sát đối với các phân tử DVD-Ig bao gồm miền biến đổi kháng thể bố mẹ gốc (nghĩa là, miền biến đổi từ các kháng thể mà không được trưởng thành về mặt ái lực) khi được lưu trữ trong các điều kiện tương tự, cụ thể là đối với DVD-Ig h1A11.1-SL-Av.

Điều này chỉ ra rằng ái lực gắn kết kháng nguyên riêng không phải là yếu tố duy nhất cần xem xét khi chọn lọc ứng viên lâm sàng và thực vậy ái lực gắn kết có thể không dự đoán các đặc tính protein gắn kết khác, như độ ổn định, khả năng bảo

chế, các đặc tính lý hoá, hiệu lực kháng khối u in vivo và/hoặc đặc tính dược động học, mà là nhạy với thậm chí các cải biến cấu trúc không đáng kể. Ví dụ, các đặc tính làm trung hoà VEGF và DLL4 của các phân tử h1A11.1-LS-Av, h1A11.1-LL-Av và h1A11.1-SL-Av DVD-Ig có thể so sánh theo cách rộng rãi (bảng 7), nhưng h1A11.1-SL-Av thể hiện mức hiệu lực ức chế sự sinh trưởng của khối u cao nhất (Bảng 9). Ngoài ra, đối với các phân tử DVD-Ig mà vẫn có ái lực gắn kết và hiệu lực tế bào, một số trong số chúng thể hiện các đặc tính lý hoá ít ưu việt hơn. Ví dụ, mặc dù h1A11.1-LL-Av là rất tương tự với h1A11.1-SL-Av dẫn đầu điều trị, nhưng sự khác nhau giữa các cầu liên kết mà nối hai miền biến đổi trong hai cấu trúc dẫn đến các đặc tính lý hoá ít ưu việt hơn đối với h1A11.1-LL-Av. Điều này chứng minh rằng thậm chí các thay đổi nhỏ, ví dụ, với các cầu liên kết giữa hai miền biến đổi trong DVD-Ig có thể có tác động đáng kể đến các đặc tính điều trị được đánh giá.

Dựa vào sự có mặt của một số dấu hiệu mong muốn, như được đo trong các thử nghiệm được mô tả trên đây, 17 trong số khoảng 100 phân tử DVD-Ig hoặc nhiều hơn còn được thử nghiệm ở các mô hình chuột đối với hoạt tính kháng khối u và đặc tính dược động học. DVD-Ig h1A11.1-SL-Av thể hiện hiệu lực ức chế khối u ngoài mong đợi và các đặc tính dược động học so với protein gắn kết được thử nghiệm khác. Do đó, việc đánh giá các tiêu chuẩn ngoại trừ được sử dụng trong phễu sàng lọc, DVD-Ig h1A11.1-SL-Av cuối cùng xuất hiện như protein gắn kết thể hiện các đặc tính ưu việt (nghĩa là, lớn hơn ngưỡng) trong mỗi thông số được đo. Do đó, protein gắn kết được chọn để đánh giá và nghiên cứu tiếp theo.

Ví dụ 15: So sánh với các DVD-Ig VEGF/DLL4 sớm hơn

Mặc dù h1A11.1-SL-Av không được so một cách trực tiếp với 96 phân tử VEGF/DLL4 DVD-Ig ưu tiên được công bố trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100076178 (xem Bảng 5 trong công bố này), việc so sánh gián tiếp có thể được thực hiện. Ví dụ, h1A11.1-SL-Av thể hiện hoạt tính gắn kết VEGF có thể so với hoạt tính của mAb kháng VEGF Av tham chiếu (xem bảng 5). Trái lại, ít nhất hai phần ba trong số 96 phân tử VEGF/DLL4 DVD-Ig được thử nghiệm trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20100076178 có hoạt tính gắn kết VEGF yếu hơn so với mAb kháng VEGF AB014 tham chiếu. (AB014 chứa cùng trình tự miền biến đổi

như kháng thể Av). Do đó, h1A11.1-SL-Av xuất hiện thể hiện động học gắn kết được cải thiện so với phần lớn cấu trúc DVD-Ig được thử nghiệm trong đơn sớm hơn.

Các ví dụ trên đây được dự định để minh họa và không làm giới hạn sáng chế. Các phương án khác về thiết bị và phương pháp được bộc lộ sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào việc xét đến phần mô tả và thực tiễn của các thiết bị và phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này

Danh mục tài liệu tham chiếu

Nội dung của tất cả các tài liệu tham chiếu được trích dẫn (bao gồm các tài liệu chuyên ngành, patent, đơn yêu cầu cấp patent và website) mà có thể được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa ra trong bản mô tả này để tham khảo. Sáng chế sẽ dùng, trừ khi có chỉ định khác, các kỹ thuật thông thường về miễn dịch, sinh học phân tử và sinh học tế bào, mà cũng đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Sáng chế cũng kết hợp với việc tham chiếu đến các kỹ thuật đã được biết đến trong lĩnh vực sinh học phân tử và phân phối được chất. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật được mô tả trong các tài liệu công bố sau đây:

Ausubel et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY (1993);

Ausubel, F.M. et al. eds., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);

CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984);

Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);

Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);

Kabat, E.A., *et al.* (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann and Dubel eds., ANTIBODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);

Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTOR FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).

SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

Các dạng tương đương

Sáng chế có thể được thể hiện ở dạng cụ thể khác mà không tách rời tinh thần hoặc đặc điểm thiết yếu của nó. Do đó, các phương án trên đây được xét đến tất cả các khía cạnh minh hoạ tốt hơn là làm giới hạn sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo tốt hơn là bằng phần mô tả trên đây và tất cả các thay đổi mà nằm trong nghĩa và khoảng tương đương của các điểm yêu cầu bảo hộ do đó được bao gồm trong bản mô tả này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein gắn kết bao gồm các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, mỗi chuỗi độc lập bao gồm $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, trong đó:

VD1 là miền biến đổi thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi thứ hai;

C là miền ổn định;

X1 là cầu liên kết;

X2 là vùng Fc;

n bằng 0 hoặc 1,

trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai, và trong đó protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất của protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và chuỗi polypeptit thứ hai của protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 64.

2. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ thứ nhất, trong đó:

VD1 là miền biến đổi của chuỗi nặng thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi của chuỗi nặng thứ hai;

C là miền ổn định của chuỗi nặng;

X1 là cầu liên kết;

X2 là vùng Fc;

n bằng 0 hoặc 1, và

trong đó protein gắn kết bao gồm chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ thứ hai, trong đó

VD1 là miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ hai;

C là miền ổn định của chuỗi nhẹ;

X1 là cầu liên kết;

n bằng 0 hoặc 1 đối với (X1)_n;

n bằng 0 đối với (X2)_n,

trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai.

3. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết này bao gồm hai chuỗi polypeptit thứ nhất và hai chuỗi polypeptit thứ hai và bốn vị trí gắn kết đích chức năng.

4. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết này có khả năng gắn kết:

(a) VEGF với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất là khoảng $7,40 \times 10^{-9} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc

(b) DLL4 với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất là khoảng $3,40 \times 10^{-8} M$ hoặc $5,00 \times 10^{-8} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

5. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó vùng Fc của protein gắn kết là vùng Fc từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, hoặc IgD, hoặc biến thể của nó.

6. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó vùng Fc của protein gắn kết này là vùng Fc trình tự biến thể.

7. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó protein gắn kết này bao gồm các trình tự vùng cố định từ SEQ ID NO: 73 và/hoặc SEQ ID NO: 74.

8. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 74 và 73.

9. Protein gắn kết theo điểm 8, trong đó protein gắn kết này có khả năng:

(a) gắn kết với VEGF với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $7,0 \times 10^{-10}M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính VEGF với IC_{50} lớn nhất khoảng $3,8nM$, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh VEGFR1; và/hoặc

(b) gắn kết với DLL4 với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $1,0 \times 10^{-8}M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính DLL4 với IC_{50} lớn nhất khoảng $1,09nM$, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh Notch.

10. Chế phẩm bao gồm protein gắn kết theo điểm 1 và ít nhất một chất bổ sung.

11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó ít nhất một chất bổ sung đã nêu bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất gây độc tế bào, chất hoá trị liệu, chất chống tạo mạch, kháng thể kháng CTLA4, chất phong bế kênh canxi, chất ức chế ACE, FOLFIRI, paclitaxel, carboplatin, doxil, topotecan, và cisplatin.

12. Axit nucleic phân lập được hoặc nhóm các axit nucleic mã hóa protein gắn kết bao gồm các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, mỗi chuỗi độc lập bao gồm $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, trong đó:

VD1 là miền biến đổi thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi thứ hai;

C là miền ổn định;

X1 là cầu liên kết;

X2 là vùng Fc;

n bằng 0 hoặc 1,

trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai, và trong đó protein gắn kết có khả năng gắn kết DLL4 và VEGF, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất của protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 56 và chuỗi polypeptit thứ hai của protein gắn kết bao gồm SEQ ID NO: 64.

13. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó protein gắn kết đã nêu bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n thứ nhất, trong đó:

VD1 là miền biến đổi của chuỗi nặng thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi của chuỗi nặng thứ hai;

C là miền ổn định của chuỗi nặng;

X1 là cầu liên kết;

X2 là vùng Fc;

n bằng 0 hoặc 1, và

trong đó protein gắn kết đã nêu bao gồm chuỗi polypeptit thứ hai bao gồm VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n thứ hai, trong đó:

VD1 là miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ nhất;

VD2 là miền biến đổi của chuỗi nhẹ thứ hai;

C là miền ổn định của chuỗi nhẹ;

X1 là cầu liên kết;

n bằng 0 hoặc 1 đối với (X1) n ;

n bằng 0 đối với (X2) n ,

trong đó miền VD1 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ nhất và miền VD2 trên chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai tạo thành vị trí gắn kết đích chức năng thứ hai.

14. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó protein gắn kết đã nêu bao gồm hai chuỗi polypeptit thứ nhất và hai chuỗi polypeptit thứ hai và bốn vị trí gắn kết đích chức năng.

15. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó protein gắn kết đã nêu có khả năng gắn kết:

(a) VEGF với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $7,40 \times 10^{-9} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt; và/hoặc

(b) DLL4 với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $3,40 \times 10^{-8} M$ hoặc $5,00 \times 10^{-8} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

16. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó vùng Fc của protein gắn kết đã nêu là vùng Fc từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, hoặc IgD, hoặc biến thể của nó.

17. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó vùng Fc của protein gắn kết đã nêu là vùng Fc trình tự biến thể.

18. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó protein gắn kết đã nêu bao gồm trình tự vùng cố định SEQ ID NO: 73 và/hoặc SEQ ID NO: 74.

19. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12, trong đó chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của protein gắn kết đã nêu bao gồm SEQ ID NO: 74 và 73.

20. Axit nucleic hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 19, trong đó protein gắn kết đã nêu có khả năng:

(a) gắn kết với VEGF với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $7,0 \times 10^{-10} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính VEGF với IC_{50} lớn nhất khoảng $3,8 nM$, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh VEGFR1; và/hoặc

(b) gắn kết với DLL4 với hằng số phân ly (K_D) lớn nhất khoảng $1,0 \times 10^{-8} M$, như được xác định theo phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và/hoặc phong bế hoạt tính DLL4 với IC_{50} lớn nhất khoảng $1,09 nM$, như được xác định theo phương pháp ELISA cạnh tranh Notch.

21. Vector chứa axit nucleic phân lập được hoặc nhóm các axit nucleic theo điểm 12.

22. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 21.

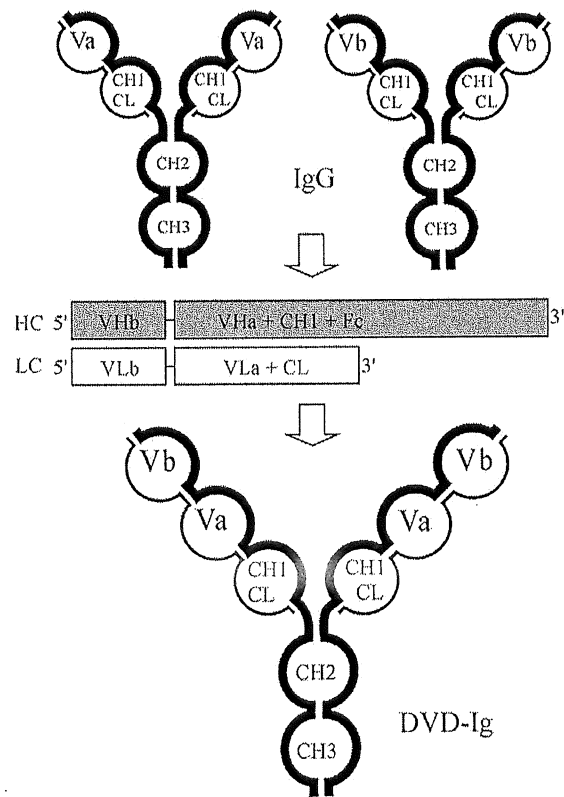
23. Tế bào chủ theo điểm 22, trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân sơ, *Escherichia coli*; tế bào nhân chuẩn, tế bào động vật, tế bào thực vật, tế bào nấm, tế bào nấm

men, tế bào Sf9, tế bào động vật có vú, tế bào chim, tế bào côn trùng, tế bào CHO, hoặc tế bào COS.

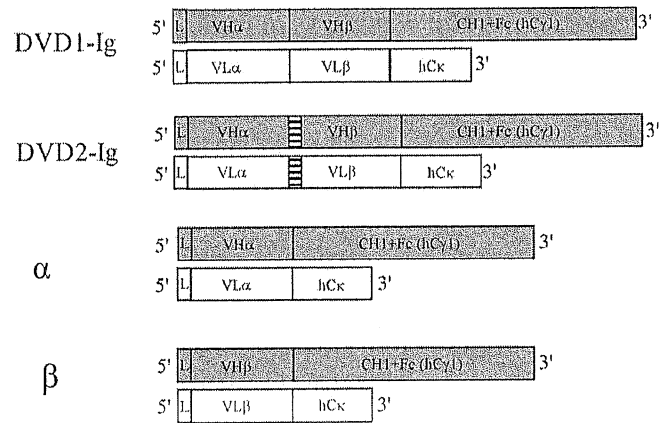
24. Phương pháp sản xuất protein gắn kết, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ ở điểm 22 trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để sản xuất được protein gắn kết này.

Fig.1

A



B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ABBVIE INC.
 <120> PROTEIN GẮN KẾT ĐA HÓA TRỊ VÀ ĐA ĐẶC HIỆU VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHỨNG
 <130> 12252.0081-00304
 <140> PCT/US13/67873
 <141> 2013-10-31
 <150> 61/787,927
 <151> 2013-03-15
 <150> 61/721,072
 <151> 2012-11-01
 <160> 76
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
 <400> 1
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
 <400> 2
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 1 5
 <210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 3
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 4
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 5
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 6
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 7

Thr Val Ala Ala Pro

1

5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 9

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 10

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 11

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 11
 Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 12
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 13
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 14
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg
 1 5 10 15

Val

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 15
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 1 5

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 16
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
 1 5 10

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 17
 Ser Ala Lys Thr Thr Pro
 1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 18

Arg Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 19

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
1 5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 20

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 21

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala
1 5

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 22

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala
1 5 10 15

Arg Val

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 23

Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 24

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 25

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 26
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 27
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro
 1 5

<210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 28
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 29
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1

5

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 30

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

1

5

10

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 31

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1

5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 32

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1

5

10

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 33

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 34

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 35

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

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 36

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 37

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Thr	Val	Ala	Ala
1				5				10					15		

Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				20			

<210> 38

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 38

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Thr
1				5				10					15		

Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
				20				25	

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 39

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	Thr	Phe	Ser	Asn	Phe
				20				25					30		

Pro	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35			40					45			

Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val
							55					60			

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 42
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 42
 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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

 <210> 43
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

 <400> 43
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Ala Val

65					70					75					80
Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								
<210> 44															
<211> 108															
<212> PRT															
<213> Trình tự nhân tạo															
<220>															
<221> nguồn															
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"															
<400> 44															
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala
65					70					75					80
Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

<211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Gln Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Phe Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 46
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 47

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 48

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val 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 Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 49

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 49

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 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 50

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 51
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
 <400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ala Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ala Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 52

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Val Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

<210> 53

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 53

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Lys Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Ile Gln Leu Ile Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 54

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ala Pro Arg Val Leu Ile
35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 55

<211> 254

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 55

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 Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro 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 Tyr Thr Phe
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
180 185 190

Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser
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 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr
225 230 235 240

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 56

<211> 247

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 56

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 Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu
 115 120 125

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

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 145 150 155 160

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

Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe
 180 185 190

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205

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

His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 57
<211> 251
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 57
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 Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

145 150 155 160
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 165 170 175

 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 180 185 190

 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205

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

 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 225 230 235 240

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

 <210> 58
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

 <400> 58
 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 Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

 Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

```
<210> 59
<211> 254
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
```

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 59

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

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

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
145 150 155 160

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala
165 170 175

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly
180 185 190

Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
195 200 205

Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 210 215 220

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 60

<211> 247

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn
145 150 155 160

Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
195 200 205

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

Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 61

<211> 247

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

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

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn
 145 150 155 160

Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 165 170 175

Val Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser
 180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
 195 200 205

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

Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 62

<211> 251
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 62
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln 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 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 130 135 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 145 150 155 160

Thr Phe Ser Asn Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 165 170 175

Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr

180 185 190
 Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 195 200 205
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 210 215 220
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr
 225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 63
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
 <400> 63
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln
 165 170 175
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp
 180 185 190
 Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 195 200 205
 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 210 215 220
 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser
 225 230 235 240
 Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250 255
 <210> 64
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
 <400> 64
 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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

[illegible]

<210> 65
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 65
 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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 130 135 140

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
 145 150 155 160

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
180 185 190

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
195 200 205

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
210 215 220

<210> 66

<211> 225

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 66

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
180 185 190

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

Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
210 215 220

Arg
225

<210> 67

<211> 229

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 67

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
145 150 155 160

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His
165 170 175

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

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

Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
210 215 220

Val Glu Ile Lys Arg
225

<210> 68

<211> 228

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 68

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

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

Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp
 165 170 175

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

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

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu

210
 Glu Ile Lys Arg
 225

<210> 69
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 69
 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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser
 130 135 140

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

145					150					155					160	
Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	
				165					170					175		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	
			180					185					190			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Pro	
		195					200					205				
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
	210					215					220					
<210> 70																
<211> 221																
<212> PRT																
<213> Trình tự nhân tạo																
<220>																
<221> nguồn																
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"																
<400> 70																
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	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	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	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	

100 105 110
 Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser
 130 135 140
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ile Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 180 185 190
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro
 195 200 205
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 210 215 220

 <210> 71
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

 <400> 71
 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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
 130 135 140
 Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro
 165 170 175
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 195 200 205
 Asn Asn Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 210 215 220
 Arg
 225
 <210> 72
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 72

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Ser Gly
100 105 110

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

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

Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp
165 170 175

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

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

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg
 225

<210> 73

<211> 334

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 73

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
165 170 175

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

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

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
210 215 220

Glu Ile Lys 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> 74

<211> 577

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 74

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 Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys 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 Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu
 115 120 125

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

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 145 150 155 160

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

Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe
 180 185 190

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn

195	200	205
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro		
210	215	220
His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly		
225	230	235
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	245	250
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	260	265
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
	275	280
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	290	295
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
305	310	315
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	325	330
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
	340	345
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
	355	360
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	370	375
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
385	390	395
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 Glu Glu Met 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

Lys

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 75
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 76
Gly Gly Gly Ser
1