



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

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

(11)



1-0031810

(51)⁷ C07K 16/22; C07K 16/46; C07K 16/28 (13) B

(21) 1-2015-00099

(22) 11/07/2013

(86) PCT/EP2013/064672 11/07/2013

(87) WO2014/009465 16/01/2014

(30) 12176299.1 13/07/2012 EP

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/07/2015 328A

(73) ROCHE GLYCART AG (CH)

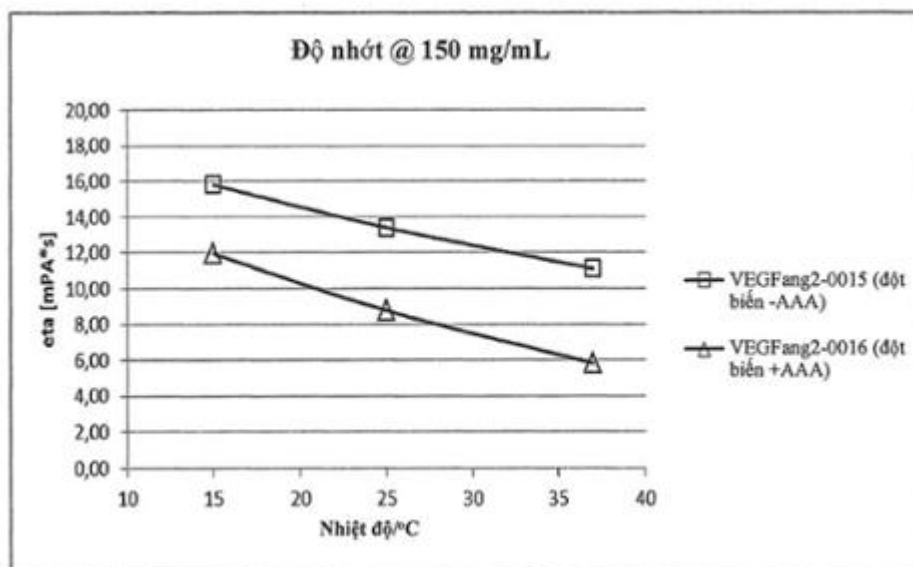
Wagistrasse 18, CH-8952, Schlieren, Switzerland

(72) DUERR, Harald (DE); HERTING, Frank (DE); KLEIN, Christian (DE); REGULA, Joerg Thomas (DE); RUETH, Matthias (DE); STUBENRAUCH, Kay-Gunnar (DE).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM ĐỘ NHỚT CỦA KHÁNG THỂ, KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG NỘI MẠC MẠCH (VEGF)/KHÁNG ANGIOPOIETIN-2 (ANG-2) ĐẶC HIỆU KÉP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm độ nhớt của kháng thể, kháng thể đặc hiệu kép kháng yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF/VEGF-A) và kháng angiotensin-2 (ANG-2) người thuộc phân nhóm IgG1 hoặc phân nhóm IgG4 người có đột biến I253A, H310A, và H435A, phương pháp sản xuất chúng và dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm độ nhớt của kháng thể (bao gồm kháng thể đặc hiệu kép) của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người, kháng thể đặc hiệu kép kháng yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF/VEGF-A) và kháng angiopoietin-2 (ANG-2) người, phương pháp sản xuất chúng và dược phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự tạo mạch được dùng để chỉ sự phát sinh bệnh của nhiều chứng rối loạn gồm khối u rắn, rối loạn tân mạch trong mắt như bệnh võng mạc tăng sinh hoặc sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi (AMD), viêm khớp dạng thấp, và bệnh vẩy nến (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; and Garner, A., Vascular diseases, in: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710).

Ranibizumab (tên thương mại Lucentis®) là mảnh kháng thể đơn dòng thu được từ kháng thể chuột ban đầu như bevacizumab (Avastin). Tuy nhiên, nó được trưởng thành về mặt ái lực để tạo ra liên kết mạnh hơn với VEGF-A (WO 98/45331). Được biết rằng việc phong bế VEGF-A có thể được liên quan đến một số độc tố toàn thân, vì thể ranibizumab thiếu phần Fc làm giảm thời gian bán thải huyết thanh và do vậy có độc tố toàn thân. Nó là chất kháng sự hình thành mạch mà được phê chuẩn để điều trị loại “ướt” của sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi (ARMD), dạng thông thường của mất thị lực do độ tuổi.

Thử nghiệm sự tạo mạch giác mạc được thể hiện là cả ANG-1 và ANG-2 có hiệu quả tương tự, hoạt động theo cách hiệp đồng với VEGF để thúc đẩy sự sinh trưởng của mạch máu mới. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Có thể là đây là đáp ứng nội mạch phụ thuộc liều gây ra bằng sự quan sát trong ống nghiệm ở nồng độ cao,

ANG-2 cũng có thể là chất tiền tạo mạch (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52). Ở nồng độ cao, ANG-2 hoạt động như hệ số sống sót khỏi sự chết theo chương trình với tế bào nội mô trong khi chết theo chương trình thiếu huyết thanh thông qua sự kích hoạt Tie2 qua con đường PI-3 Kinaza và Akt (Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52).

WO 2010/040508 A9 và WO 2011/117329 liên quan đến kháng thể kháng-VEGF/kháng-ANG-2 đặc hiệu kép. WO 2008/132568 đề cập đến protein dung hợp liên kết với yếu tố tăng trưởng. WO 2009/136352 đề cập đến hợp chất kháng sự hình thành mạch. WO 2009/080253 và WO 2011/117330 đề cập đến dạng kháng thể hóa trị hai đặc hiệu kép. WO 2010/069532 đề cập đến kháng thể Ang2.

Bệnh mạch máu mắt như sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi (ARMD) và bệnh võng mạc tiểu đường (DR) tương ứng là do sự tạo mạch mới thành mạch hoặc võng mạc bất thường. Chúng là nguyên nhân chính của việc mất thị lực ở các quốc gia công nghiệp hóa. Võng mạc bao gồm các lớp được xác định rõ gồm noron, thần kinh đệm, và yếu tố mạch máu, sự nhiễu loạn tương đối nhỏ như các hiện tượng được quan sát trong sự tăng sinh mạch hoặc bệnh phù có thể dẫn đến sự mất mát đáng kể chức năng thị giác. Sự thoái hóa võng mạc do di truyền, như viêm võng mạc sắc tố (Retinitis Pigmentosa RP), được liên quan đến sự bất thường mạch, như hẹp động mạch nhỏ và sự teo mạch. Chúng ảnh hưởng lớn đến 1 trong 3500 cá thể và được đặc trưng bởi bệnh quáng gà tiến triển, mất trường thị giác, teo dây thần kinh thị giác, sự suy yếu động mạch nhỏ, và việc mất thị trường trung tâm thường dẫn đến mù mắt hoàn toàn.

Bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ được đặc trưng bởi sự mất hoặc rối loạn chức năng của hệ mạch võng mạc mà dẫn đến sự giảm bớt dòng máu và sự giảm oxy huyết. Võng mạc đáp ứng với sự giảm oxy huyết bằng cách tạo ra tín hiệu để phát triển mạch máu mới, nhưng các mạch mới này thường dễ vỡ và bị đứt mạch. Đây là do sự sinh trưởng của các mạch mới bất thường này mà hầu hết gây ra sự ảnh hưởng đến thị lực vì chúng có thể rò rỉ, sự xuất huyết hoặc dẫn đến tạo sẹo mà có thể kết thúc là sự bong võng mạc. Các điều trị hiện nay đối với bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ hướng tới sự tạm ngừng sinh trưởng của mạch gây bệnh nhưng không khắc phục được bệnh thiếu máu cục bộ căn nguyên mà dẫn đến sự tăng trưởng của chúng. Ngoài ra, việc điều trị tiêu chuẩn đối với bệnh võng mạc tiểu đường, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ mà ảnh hưởng đến hàng triệu người, bao gồm sự phá hủy một phần võng mạc bằng tia laze với

nỗ lực làm ngừng sự sinh trưởng mạch máu mới và giữ gìn thị giác trung tâm. Phác đồ được dùng để phong bế chức năng của yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch (VEGF), gen khởi đầu chủ yếu của sự sinh trưởng mạch máu. Trong thời gian ngắn, trị liệu kháng VEGF có thể cải thiện thị lực, nhưng không khắc phục được bệnh thiếu máu cục bộ căn nguyên và trên thực tế có thể làm trầm trọng tình trạng bệnh này khi nó ức chế toàn bộ sự sinh trưởng mạch máu, bao gồm các nhánh có lợi. Đây cũng là khía cạnh nghiêm trọng do sự tiếp xúc toàn thân của các thuốc này ở bệnh nhân cao tuổi và/hoặc đái tháo đường trong đó sự sinh trưởng mạch máu mới có thể được yêu cầu trong não, tim hoặc các chi thiếu máu cục bộ.

Thông thường đối với các bệnh nhãn khoa thông qua việc dùng trong mắt mảnh kháng thể nhỏ hơn như Fab hoặc Fab(2) thường được sử dụng do chúng có thời gian bán thải huyết thanh thấp và nguy cơ độc tố toàn thân thấp hơn. Tuy nhiên, các mảnh nhỏ hơn này thường có thời gian bán thải trong mắt thấp hơn (ví dụ do sự khuếch tán vào trong huyết thanh nhanh hơn) và được dùng thường xuyên hơn.

Kim et al, *Molecular Vision*, 15 (2009) 2803-2812 đề cập đến kháng thể có chiều dài đầy đủ được dùng trong mắt vào trong mắt, trong đó sự gắn kết IgG với FcRn được loại trừ vào trong máu ở chuột kiểu đại, trong đó IgY với không có sự gắn kết FcRn không được loại trừ vào trong hệ thống máu. Hơn nữa IgG với sự gắn kết FcRn không được loại trừ vào trong hệ thống máu trong chuột giảm cRn.

Vẫn cần có trong lĩnh vực phương pháp tốt hơn để điều trị và ngăn ngừa các bệnh mạch máu mắt khác nhau như bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp làm giảm độ nhớt của kháng thể trong đó kháng thể bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người và) trong đó phương pháp bao gồm sự cải biến của vùng chuỗi nặng không đổi kháng thể của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người với các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án của sáng chế phương pháp này đặc trưng ở chỗ kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của, SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14, và trong đó

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án của sáng chế phương pháp này đặc trưng ở chỗ kháng thể đặc hiệu kép được nêu trên đây bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) và còn bao gồm các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Một phương án của sáng chế là kháng thể thu được bằng phương pháp này.

Một phương án của sáng chế mô tả việc sử dụng các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) để giảm bớt độ nhớt của kháng thể trong đó kháng thể bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người).

Theo một phương án của sáng chế đặc trưng ở chỗ kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người,

trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ

vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của, SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14, và trong đó

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án của sáng chế, việc sử dụng đặc hiệu này đặc trưng ở chỗ kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) và còn bao gồm các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người,

và trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của, SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14,

và trong đó

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này đặc trưng ở chỗ

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm là miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm là miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này đặc trưng ở chỗ vùng chuỗi nặng không đổi dưới iii) của phân nhóm IgG1 người. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này của phân nhóm IgG1 đặc trưng ở chỗ vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 còn bao gồm các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép này đặc trưng ở chỗ vùng chuỗi nặng không đổi dưới iii) của phân nhóm IgG4 người. Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép này của phân nhóm IgG4 đặc trưng ở chỗ vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG4 còn bao gồm các đột biến S228P và L235E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép của phân nhóm IgG4 đặc trưng ở chỗ vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG4 còn bao gồm các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Các khía cạnh khác của sáng chế là dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, dược phẩm dùng trong điều trị bệnh mạch máu mắt, việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép này để sản xuất thuốc điều trị bệnh mạch máu mắt, phương pháp điều trị bệnh nhân bị đau đớn bởi bệnh mạch máu mắt bằng cách cấp kháng thể đặc hiệu kép này cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị. Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép này được dùng thông qua việc dùng trong mắt.

Khía cạnh khác của sáng chế là phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic theo sáng chế có thể biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, và tế bào chủ chứa các vector này để sản xuất kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu kép theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn chứa vector theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ việc biểu hiện axit nucleic theo sáng chế trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn và thu hồi kháng thể đặc hiệu kép này từ tế bào này hoặc dịch nổi nuôi cấy tế bào. Một phương án là phương pháp điều chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các bước

- a) biến nạp tế bào chủ với vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể này;
- b) nuôi cấy tế bào chủ dưới điều kiện mà cho phép tổng hợp phân tử kháng thể này; và
- c) thu hồi phân tử kháng thể này từ môi trường nuôi cấy này

Sáng chế còn bao gồm kháng thể thu được bằng phương pháp này để sản xuất kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, của SEQ ID NO: 22, của SEQ ID NO: 23, và của SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, của SEQ ID NO: 26, của SEQ ID NO: 27, và của SEQ ID NO: 28.

Kháng thể theo sáng chế có các đặc tính biến đổi cao do sự cải biến đặc hiệu của chúng trong phần / vùng không đổi Fc cung cấp lợi ích cho bệnh nhân bị đau đốn bởi bệnh mạch máu mắt. Chúng thể hiện độ ổn định cao trong môi trường trong mắt và sự khuếch tán chậm từ mắt (so với mảnh kháng thể nhỏ hơn không có vùng chuỗi nặng

không đổi), trong đó bệnh thực tế được định vị hoặc được điều trị (vì thể phác đồ điều trị này có thể được cải thiện so với kháng thể khác IgG như mảnh Fab và (Fab)₂). Bất ngờ là so với kháng thể IgG không được cải biến, thời gian bán thải trong mắt sau khi dùng trong mắt của kháng thể có các đột biến I253A, H310A, và H435A trong vùng không đổi (với không có nhiều sự gắn kết FcRn) là tương tự (chỉ giảm nhẹ) (các bảng 17a và 18a và các Fig. 7D và 7E), trong đó sự khuếch tán từ mắt vào trong huyết thanh máu là tương tự (bảng 15 và Fig. 7B). Sự biến đổi cao này là mong muốn trong việc điều trị bệnh mạch máu mắt liên quan đến ANG2 và/hoặc VEGF để loại bỏ VEGF và Ang2 ra khỏi mắt (ví dụ qua sự vận chuyển vào trong huyết thanh máu như phức hợp kháng thể kháng ANG2/ANG2 hoặc phức hợp kháng thể kháng VEGF/VEGF). Kháng thể theo sáng chế mắt khác được thanh thải khá nhanh ra khỏi huyết thanh khi so với kháng thể IgG không được cải biến (là rất mong muốn để giảm tác dụng phụ có thể gây ra do sự tiếp xúc toàn thân).

Bất ngờ là chúng cũng thể hiện độ nhớt thấp hơn (xem Fig. 2) (so với các phiên bản không có các đột biến I253A, H310A, và H435A trong vùng không đổi) và vì thế đặc biệt đặc biệt hữu dụng để việc dùng trong mắt thông qua kim tiêm mảnh trong khi điều trị các bệnh về mắt (với việc ứng dụng kim tiêm mảnh thường được dùng và độ nhớt cao khiến cho việc ứng dụng thích hợp khá khó khăn). Độ nhớt thấp hơn cũng cho phép chế phẩm có nồng độ cao hơn.

Cũng bất ngờ là kháng thể theo sáng chế thể hiện xu hướng ngưng tụ thấp (Fig 4) trong khi lưu giữ (so với các phiên bản không có các đột biến I253A, H310A, và H435A trong phần Fc) mà quyết định để dùng trong mắt trong mắt (do việc ngưng tụ trong mắt có thể dẫn đến các biến chứng trong việc điều trị này). Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế thể hiện hiệu quả tốt về tác dụng ức chế của bệnh về mắt.

Trong các phương án này, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế do sự cải biến đặc hiệu của chúng trong vùng không đổi (ví dụ P329G LALA) thể hiện đặc tính biến đổi như thụ thể không gắn kết Fcγ₁ mà giảm nguy cơ tác dụng phụ như chứng huyết khối và/hoặc sự chết tế bào không mong muốn (do ví dụ ADCC).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Sơ đồ ý tưởng và ưu điểm của kháng thể <VEGF-ANG-2> IgG1 hoặc IgG4 có đột biến AAA (đột biến I253A, H310A, và H435A đánh số theo chỉ số EU của

Kabat)

Fig. 2: Đo độ nhớt quy mô nhỏ trên cơ sở DLS. Độ nhớt được ngoại suy ở nồng độ 150 mg/ml trong Arginin 200 mM/Suxinat, pH 5,5 (so sánh <VEGF-ANG-2> kháng thể theo sáng chế VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) với tài liệu tham khảo VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA này)

Fig. 3: Sự kết tụ DLS phụ thuộc vào nhiệt độ (bao gồm DLS nhiệt độ bắt đầu ngưng tụ) trong His 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 5 (so sánh kháng thể <VEGF-ANG-2> theo sáng chế VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) với VEGFang2-0015 tham chiếu (không có đột biến AAA này)

Fig. 4: 7 ngày được lưu giữ ở 40°C ở 100 mg/ml (Giảm chính và Khối lượng phân tử cao /HMW) tăng) (so sánh kháng thể <VEGF-ANG-2> theo sáng chế VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) mà thể hiện ngưng tụ thấp hơn với VEGFang2-0015 tham chiếu (không có đột biến AAA))

Fig. 5A: Ái lực trạng thái tĩnh FcRn của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA): chồng lấp của sensogram Biacore ở nồng độ khác nhau thể hiện sự gắn kết phụ thuộc nồng độ của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) với FcRn

Fig. 5B: Ái lực trạng thái tĩnh FcRn của A: VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA): đường cong đáp ứng gắn kết phụ thuộc nồng độ VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) thể hiện liên kết với FcRn

Fig. 5C: Ái lực trạng thái tĩnh FcRn của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA): chồng lấp của các sensogram Biacore ở nồng độ khác nhau thể hiện không liên kết với FcRn ở tất cả các nồng độ

Fig. 5D: Ái lực trạng thái tĩnh FcRn của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA): đường cong đáp ứng gắn kết phụ thuộc nồng độ của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) thể hiện không liên kết với FcRn

Fig. 5E: Ái lực trạng thái tĩnh FcRn của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA): đường cong đáp ứng gắn kết phụ thuộc nồng độ của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) thể hiện không liên kết với FcRn (phạm vi đáp ứng từ -0,6 đến 0,2 RU/ nồng độ quy mô nằm trong khoảng từ 0 đến 0,35 M)

Fig. 6: Đo sự tương tác FcγRIIIa của VEGFang2-0015 không có đột biến

AAA và VEGFang2-0016 có đột biến AAA (tất cả đều là phân nhóm IgG1 với đột biến P329G LALA; làm đối chứng kháng Dig của phân nhóm IgG1 và kháng thể trên cơ sở IgG4 được dùng)

Fig. 7A: Nguyên tắc thử nghiệm Pk-ELISA dưới dạng giản đồ để đo nồng độ của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/Ang2> trong huyết thanh và dịch thủy phân mắt toàn phần

Fig. 7B: Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt: So sánh các hợp chất - VEGFang2-0015 không có đột biến AAA và VEGFang2-0016 có đột biến AAA

Fig. 7C: Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt: So sánh hợp chất - VEGFang2-0015 không có đột biến AAA và VEGFang2-0016 có đột biến AAA

Fig. 7D: Nồng độ trong dịch thủy phân mắt của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) trong mắt phải và mắt trái (sau khi chỉ dùng trong mắt phải so với dùng trong mắt): Lượng đáng kể có thể chỉ được phát hiện trong mắt phải sau khi dùng trong mắt. Sau khi dùng trong mắt không có nồng độ trong dịch thủy phân mắt có thể được phát hiện do thời gian bán thải huyết thanh thấp của VEGFang2-0016 (có đột biến AAA)

Fig. 7E: Nồng độ dịch thủy phân mắt của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) trong mắt phải và mắt trái (sau khi chỉ dùng trong mắt vào trong mắt phải so với dùng trong mắt): trong mắt phải (và mức độ nào đó trong mắt trái) sau khi dùng trong mắt lượng VEGFang2-0015 có thể được phát hiện. Kết quả này cho thấy sự khuếch tán từ mắt phải vào trong huyết thanh và từ đây vào trong mắt trái, mà có thể được giải thích bằng thời gian bán thải dài của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA). Sau khi dùng trong mắt cả lượng đáng kể trong dịch thủy phân mắt cả hai mắt có thể được phát hiện do sự dung hợp vào trong mắt của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) ổn định trong huyết thanh

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là hóa trị hai.

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép theo sáng chế đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất mà liên

kết đặc hiệu với VEGF;

b) chuỗi nặng được cải biến và chuỗi nhẹ được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2, trong đó miền không đổi CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Dạng kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép này cho kháng thể đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 (ANG-2) người được bộc lộ trong WO 2009/080253 (bao gồm các miền CH3 được cải biến núp trong lỗ). Kháng thể dựa trên dạng kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép được đặt tên CrossMabs.

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27, và

b) chuỗi nặng được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, và chuỗi nhẹ được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28.

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23, và

b) chuỗi nặng được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22, và chuỗi nhẹ được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép như vậy đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29, và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, và

b) chuỗi nặng được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự

axit amin của SEQ ID NO: 30, và chuỗi nhẹ được cải biến của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, của SEQ ID NO: 26, của SEQ ID NO: 27, và của SEQ ID NO: 28.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, của SEQ ID NO: 22, của SEQ ID NO: 23, và của SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29, của SEQ ID NO: 30, của SEQ ID NO: 31, và của SEQ ID NO: 32.

Theo khía cạnh khác của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF;

b) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2, trong đó đầu tận N của chuỗi nặng được nối với đầu tận C của chuỗi nhẹ qua phần tử liên kết peptit.

Dạng kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép cho kháng thể đặc hiệu kép này liên kết đặc hiệu với yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 (ANG-2) người được bộc lộ trong WO 2011/117330 bao gồm các miền CH3 được cải biến núp trong lỗ. Kháng thể dựa trên dạng kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép này được đặt tên OAscFabs.

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33, và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35, và

b) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai được nối với chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai thông qua phân tử liên kết peptit trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34.

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm

a) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36, và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ nhất trình tự axit amin của SEQ ID NO: 38, và

b) chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai được nối với chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai thông qua phân tử liên kết peptit trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37.

Theo một phương án miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai được làm ổn định bởi disulfua bằng cách đưa vào liên kết disulfua giữa các vị trí sau: miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 44 với miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100 (luôn đánh số theo chỉ số EU của Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequence of Protein of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Sự ổn định disulfua này đạt được bằng cách đưa vào liên kết disulfua giữa các miền biến đổi VH và VL của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các kỹ thuật để đưa cầu nối disulfua phi tự nhiên để làm ổn định được mô tả, ví dụ, trong WO 94/029350, Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. 10 (1997) 1453-59; Kobayashi et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393; or Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33, của SEQ ID NO: 34, và của SEQ ID NO: 35.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36, của SEQ ID NO: 37, và của SEQ ID NO: 38.

Trong phương án miền CH3 của kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép theo sáng chế được biến đổi bởi kỹ thuật “nắm trong lỗ” mà được bộc lộ chi tiết với một vài ví dụ trong các ví dụ của WO 96/027011, Ridgway J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617–621; và Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681. Trong phương pháp này bề mặt tương tác của hai miền CH3 được biến đổi để làm tăng việc đime hóa khác loại của các chuỗi nặng chứa hai miền CH3 này. Mỗi miền của hai miền CH3 (của hai chuỗi nặng) có thể là “nắm”, trong khi miền còn lại là “lỗ”. Việc đưa vào cầu nối disulfua làm ổn định các đime khác loại (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al. J. Mol. Biol. 270 (1997) 26–35) và gia tăng hiệu suất.

Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế tất cả kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế đặc trưng ở chỗ

miền CH3 của một chuỗi nặng và miền CH3 của mỗi chuỗi nặng khác gặp nhau ở mặt phân cách mà bao gồm mặt phân cách ban đầu giữa miền CH3 kháng thể;

trong đó mặt phân cách này được biến đổi để thúc đẩy sự hình thành của kháng thể đặc hiệu kép, trong đó sự biến đổi đặc trưng ở chỗ:

a) miền CH3 của một chuỗi nặng được biến đổi,

sao cho trong mặt phân cách ban đầu miền CH3 của một chuỗi nặng mà gặp mặt phân cách ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng khác trong kháng thể đặc hiệu kép,

gốc axit amin được thế với gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, bằng cách đó tạo ra sự phòng lên trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng mà có thể định vị trong khoang trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng khác

và

b) miền CH3 của chuỗi nặng khác được biến đổi,

sao cho trong mặt phân cách ban đầu của miền CH3 thứ hai mà gặp mặt phân cách ban đầu của miền CH3 thứ hai trong kháng thể đặc hiệu kép

gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, bằng cách đó tạo ra khoang trong bề mặt chung của miền CH3 thứ hai trong mà sự phòng lên trong bề mặt chung của miền CH3 thứ hai là có thể định vị.

Vì thế kháng thể theo sáng chế tốt hơn là đặc trưng ở chỗ

miền CH3 của chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ của a) và miền CH3 của chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ của b) mỗi miền gặp ở mặt phân cách mà bao gồm sự biến đổi trong mặt phân cách ban đầu giữa các miền CH3 kháng thể;

trong đó i) trong miền CH3 của một chuỗi nặng

gốc axit amin được thế với gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, bằng cách đó tạo ra sự phòng lên trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng mà có thể định vị trong khoang trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng khác

và trong đó

ii) trong miền CH3 của chuỗi nặng khác

gốc axit amin được thế với gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, bằng cách đó tạo ra khoang trong bề mặt chung của miền CH3 thứ hai trong mà sự phòng lên trong bề mặt chung của miền CH3 thứ hai là có thể định vị.

Tốt hơn là gốc axit amin này có thể tích chuỗi bên lớn hơn được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y), tryptophan (W).

Tốt hơn là gốc axit amin này có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T), valin (V).

Theo một khía cạnh của sáng chế các miền CH3 được biến đổi thêm bằng cách đưa vào xystein (C) thành axit amin trong các vị trí tương ứng của mỗi miền CH3 sao cho cầu nối disulfua giữa các miền CH3 có thể được tạo ra.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi bóng” và các đột biến T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của “chuỗi lỗ”. Cầu nối disulfua liên chuỗi bổ sung giữa miền CH3 cũng có thể được dùng (Merchant, A.M, et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681) ví dụ bằng cách đưa đột biến Y349C vào trong miền CH3 của “chuỗi bóng” và đột biến E356C hoặc đột biến 354C vào trong miền CH3 của “chuỗi lỗ”.

Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm đột biến Y349C, T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến E356C, T366S, L368A, Y407V trong các đột biến khác của hai miền CH3. Theo một phương án được ưu tiên kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến Y349C, T366W trong một trong số hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A, Y407V trong các đột biến khác của hai miền CH3 (đột biến Y349C bổ sung trong một miền CH3 và đột biến E356C hoặc S354C bổ sung trong miền CH3 còn lại tạo ra cầu nối disulfua liên chuỗi) (luôn đánh số theo chỉ số EU của Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))). Nhưng các kỹ thuật núng trong lỗ khác như được nêu trong EP 1 870 459 A1, có thể được dùng theo cách khác hoặc bổ sung. Vì thế ví dụ khác về kháng thể đặc hiệu kép là R409D; đột biến K370E trong miền CH3 của “chuỗi bóng” và D399K; đột biến E357K trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” (luôn đánh số theo chỉ số EU của Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))).

Theo phương án khác kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi núng” và đột biến T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” và đột biến R409D; K370E bổ sung trong miền CH3 của “chuỗi núng” và đột biến D399K; E357K trong miền CH3 của “chuỗi lỗ”.

Theo phương án khác kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến Y349C, T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến S354C, T366S, L368A, Y407V trong các đột biến khác của hai miền CH3 hoặc kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị ba này bao gồm các đột biến Y349C, T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến S354C, T366S, L368A, Y407V trong đột biến khác của hai miền CH3 và R409D bổ sung; các đột biến K370E trong miền CH3 của “chuỗi núng” và các đột biến D399K; E357K trong miền CH3 của “chuỗi lỗ”.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế đặc trưng ở chỗ có một hoặc nhiều đặc tính sau (được xác định trong thử nghiệm như được nêu trong ví dụ 6

- thể hiện nồng độ huyết thanh thấp hơn so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép

không có các đột biến được mô tả dưới iii) (96 giờ sau khi dùng trong mắt ở chuột, mà là chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen đối với FcRn người);

- thể hiện nồng độ tương tự (hệ số 0,8 đến 1,2) trong mắt phải dịch thủy phân toàn phần so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép không có các đột biến được mô tả dưới iii) (ở chuột, mà là chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen đối với FcRn người, 96 giờ sau khi dùng trong mắt trong mắt phải).

Theo một phương án kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này bao gồm là miền biến đổi chuỗi nặng (VH) SEQ ID NO: 7, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) SEQ ID NO: 8; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) SEQ ID NO: 15, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) SEQ ID NO: 16; và

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của IgG1 hoặc phân nhóm IgG4 (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

và có một hoặc nhiều đặc tính sau (được xác định trong thử nghiệm như được nêu trong ví dụ 6

- thể hiện nồng độ huyết thanh thấp hơn so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép không có các đột biến được mô tả dưới iii) (96 giờ sau khi dùng trong mắt ở chuột, là chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen đối với FcRn người);

- thể hiện lượng tương tự (hệ số 0,8 đến 1,2) trong mắt phải dịch thủy phân toàn phần so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép không có các đột biến được mô tả dưới iii) (ở chuột, mà chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen đối với FcRn người, 96 giờ sau khi dùng trong mắt trong mắt phải).

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép đặc trưng ở chỗ bao gồm

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) SEQ ID NO: 7 với sự thay thế 1, 2, 3 gốc axit amin, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) SEQ ID NO: 8 với sự thay thế 1, 2 hoặc 3 gốc axit amin; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) SEQ ID NO: 15 với sự thay thế 1, 2 hoặc 3 gốc axit amin, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) SEQ ID NO: với sự thay thế 1, 2 hoặc 3 gốc axit amin; và

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 hoặc IgG4 (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

và có một hoặc nhiều đặc tính sau (được xác định trong thử nghiệm như được nêu trong ví dụ 6

- thể hiện nồng độ huyết thanh thấp hơn so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép không có các đột biến được mô tả dưới iii) (96 giờ sau khi dùng trong mắt ở chuột, là chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen cho FcRn người);

- thể hiện lượng tương tự (hệ số 0,8 đến 1,2) trong mắt phải dịch thủy phân toàn phần so với tương ứng kháng thể đặc hiệu kép không có các đột biến được mô tả dưới iii) (ở chuột, là chuột thiếu hụt FcRn, nhưng bán hợp tử chuyển gen đối với FcRn người, 96 giờ sau khi dùng trong mắt trong mắt phải).

Khi được dùng ở đây, “kháng thể” để chỉ protein liên kết mà bao gồm các vị trí gắn kết kháng nguyên. Thuật ngữ “vị trí gắn kết” hoặc “vị trí gắn kết kháng nguyên” khi được dùng ở đây biểu thị (các) vùng của phân tử kháng thể mà phối tử thực sự gắn kết. Thuật ngữ “vị trí gắn kết kháng nguyên” bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL) (cặp VH/VL.)

Sự đặc hiệu kháng thể để chỉ sự nhận diện chọn lọc của kháng thể đối với epitop cụ thể của kháng nguyên. Kháng thể tự nhiên, ví dụ, đặc hiệu đơn.

“Kháng thể đặc hiệu kép” theo sáng chế là kháng thể mà có hai tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên khác nhau. Kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu đối với hai kháng nguyên khác nhau, VEGF là kháng nguyên thứ nhất và ANG-2 là kháng nguyên thứ hai.

Thuật ngữ kháng thể “đặc hiệu đơn” khi được dùng ở đây biểu thị kháng thể mà

có một hoặc nhiều vị trí gắn kết mỗi vị trí gắn kết với epitop giống nhau của kháng nguyên giống nhau.

Thuật ngữ “hóa trị” được dùng trong sáng chế biểu thị sự có mặt của số lượng xác định của vị trí gắn kết trong phân tử kháng thể. Do đó, thuật ngữ “hóa trị hai”, “hóa trị bốn”, và “hóa trị sáu” để chỉ sự có mặt của hai vị trí gắn kết, bốn vị trí gắn kết, và sáu vị trí gắn kết, lần lượt, trong phân tử kháng thể. Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế tốt hơn là “hóa trị hai”.

Thuật ngữ “VEGF” khi được dùng ở đây để chỉ yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF/VEGF-A,) 165-axit amin yếu tố tăng trưởng tế bào nội mạc mạch người (axit amin 27-191 của trình tự tiền chất của VEGF165 người: SEQ ID NO: 17; axit amin 1-26 là peptit tín hiệu), và 121, 189, và 206 chất đồng phân yếu tố tăng trưởng tế bào nội mạc mạch liên quan, như được nêu bởi Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Houck et al., Mol. Endocrin. 5 (1991) 1806-1814; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 và Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24; cùng với alen có trong tự nhiên và dạng được tác động của các yếu tố tăng trưởng này. VEGF được tham gia vào việc điều tiết sự tạo mạch bình thường và bất thường và sự tạo mạch mới có liên quan đến khối u và các chứng rối loạn trong mắt (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Người Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Ung thư Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; và Dvorak, H.F., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF là glycoprotein dimer giống nhau mà được phân lập từ vài nguồn và bao gồm một vài chất đồng phân. VEGF thể hiện hoạt tính gây phân bào đặc hiệu cao đối với tế bào nội mô.

Thuật ngữ “ANG-2” khi được dùng ở đây để chỉ angiotensin-2 (ANG-2) người (theo cách khác được viết tắt bằng ANGPT2 hoặc ANG2) (SEQ ID NO: 18) mà được mô tả ví dụ trong Maisonpierre, P.C., et al, Science 277 (1997) 55-60 và Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Các angiotensin-1 (SEQ ID NO: 19) và -2 được bộc lộ là phối tử của Tie, họ tyrosin kinaza mà được biểu hiện chọn lọc trong nội mạc mạch (Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48). Hiện nay có bốn thành viên thành viên xác định của họ angiotensin. Angiotensin-3 và -4 (Ang-3 và Ang-4) có thể là các bản sao khác nhau rộng rãi của locut gen giống nhau ở chuột và người (Kim, I.,

et al., FEBS Let, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28). ANG-1 và ANG-2 ban đầu được nhận biết trong các thí nghiệm nuôi cấy mô là chất chủ vận và chất đối kháng, lần lượt (xem ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; và đối với ANG-2: Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60). Tất cả các angiopoietin đã biết chủ yếu gắn kết với Tie2 (SEQ ID NO: 20), và cả Ang-1 và -2 gắn kết với Tie2 với ái lực bằng 3 nM (Kd) (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60).

Vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế chứa sáu vùng quyết định bổ trợ (CDR) mà góp phần vào các mức độ ái lực khác nhau của vị trí gắn kết với kháng nguyên. Có ba CDR miền biến đổi chuỗi nặng (CDRH1, CDRH2 và CDRH3) và ba CDR miền biến đổi chuỗi nhẹ (CDRL1, CDRL2 và CDRL3). Mức độ của vùng CDR và khung (FR) được xác định bằng việc so sánh cơ sở dữ liệu của trình tự axit amin trong đó các vùng này được xác định theo tính khả biến giữa các trình tự.

Kháng thể của sáng chế bao gồm vùng không đổi globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người của một hoặc nhiều nhóm globulin miễn dịch, trong đó nhóm globulin miễn dịch này bao gồm IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE nhóm và, trong trường hợp IgG và IgA, phân nhóm của chúng, đặc biệt là IgG1 và IgG4.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “chế phẩm kháng thể đơn dòng” khi được dùng ở đây để chỉ chế phẩm của phân tử kháng thể của một chế phẩm axit amin.

Thuật ngữ “kháng thể khảm” để chỉ kháng thể gồm vùng thay đổi, tức là, vùng gắn kết, từ một nguồn hoặc loài và ít nhất một phần của vùng không đổi thu được từ nguồn hoặc loài khác, thường được điều chế bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Kháng thể khảm gồm vùng thay đổi chuột và vùng không đổi người được ưu tiên. Dạng được ưu tiên khác của “kháng thể khảm” được bao gồm trong sáng chế là các kháng thể trong đó vùng không đổi được cải biến hoặc được thay đổi từ vùng của kháng thể ban đầu để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt là liên quan đến sự gắn kết C1q và/hoặc sự gắn kết thụ thể Fc (FcR). Kháng thể khảm này cũng để chỉ “kháng thể được chuyển lớp”. Kháng thể khảm là sản phẩm của gen globulin miễn dịch được biểu hiện gồm DNA các đoạn mã hóa globulin miễn dịch vùng thay đổi và các đoạn ADN mã hóa vùng không đổi globulin miễn dịch. Các phương pháp để sản xuất kháng thể khảm bao gồm kỹ thuật chuyển nhiễm ADN và gen tái tổ hợp thông thường là đã biết rõ trong lĩnh vực. Xem, ví

dụ, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244.

Thuật ngữ “kháng thể được làm giống như của người” để chỉ kháng thể trong đó khung hoặc “vùng quyết định hỗ trợ” (CDR) được cải biến để bao gồm CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau khi so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc. Trong phương án được ưu tiên, CDR chuột được ghép vào trong vùng khung của kháng thể người để tạo ra “kháng thể được làm giống như của người”. Xem, ví dụ, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Các CDR đặc biệt được ưu tiên tương ứng với các CDR thể hiện trình tự nhận diện kháng nguyên được lưu ý ở trên với kháng thể khảm. Các dạng khác của “kháng thể được làm giống như của người” được bao gồm trong chế là các kháng thể trong đó vùng không đổi còn được biết đổi hoặc thay đổi từ vùng đó của kháng thể ban đầu để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt là liên quan đến sự gắn kết C1q và/hoặc sự gắn kết thụ thể Fc (FcR).

Thuật ngữ “kháng thể người”, khi được dùng ở đây, được dự định để bao gồm kháng thể có vùng thay đổi và vùng không đổi thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng giao tử người. Kháng thể người được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật (van Dijk, M.A., và van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Kháng thể người cũng có thể được tạo ra ở động vật chuyển gen (ví dụ, chuột) mà có thể, khi chủng ngừa, sản xuất kho đầy đủ hoặc sự chọn lọc kháng thể người khi vắng mặt sự sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Việc chuyển dãy gen dòng giao tử người globulin miễn dịch trong chuột thể đột biến dòng giao tử sẽ dẫn đến sự sản xuất kháng thể người khi có thử thách kháng nguyên (xem, ví dụ, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Kháng thể người cũng có thể được tạo ra ở thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (Hoogenboom, H.R., và Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Các kỹ thuật của Cole, A., et al. và Boerner, P., et al. là sẵn có để sản xuất kháng thể người đơn dòng (Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Liss, A.L., p. 77 (1985); và Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Như đã được đề cập với kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế thuật ngữ “kháng thể người” khi được dùng ở đây cũng bao gồm các kháng thể mà được

cải biến trong vùng không đổi để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt là liên quan đến sự gắn kết C1q và/hoặc gắn kết FcR, ví dụ bằng “việc chuyển lớp” tức là thay đổi hoặc đột biến của các phần Fc (ví dụ đột biến từ IgG1 thành IgG4 và/hoặc IgG1/IgG4).

Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp”, khi được dùng ở đây, được dự định để bao gồm tất cả kháng thể người mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách tái tổ hợp, như kháng thể được phân lập từ tế bào chủ như tế bào NS0 hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ chuột) mà chuyển gen đối với gen globulin miễn dịch hoặc kháng thể người được biểu hiện sử dụng tái tổ hợp vectơ biểu hiện được chuyển nhiễm vào trong tế bào chủ. Kháng thể tái tổ hợp này có vùng thay đổi và vùng không đổi ở dạng được sắp xếp lại. Kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được tiến hành siêu đột biến sinh dưỡng *in vivo*. Vì thế, trình tự axit amin của vùng VH và VL của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, khi thu được từ và được liên quan đến trình tự VH và VL dòng giao tử người, mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong kho kháng thể người dòng giao tử *in vivo*.

“Miền biến đổi” (miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) khi được dùng ở đây biểu thị mỗi miền của cặp các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà trực tiếp được tham gia vào việc gắn kết kháng thể đến kháng nguyên. Các miền của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thay đổi của người có cấu trúc chung giống nhau và mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) các trình tự của chúng được bảo tồn rộng rãi, được nối bằng ba “vùng siêu biến” (hoặc vùng quyết định bổ trợ, CDR). Các vùng khung có cấu hình tám β và CDR có thể tạo ra vòng thắt nối cấu trúc tám β . CDR trong mỗi chuỗi được giữ trong cấu trúc ba chiều của chúng bằng vùng khung và tạo ra cùng với CDR từ vị trí gắn kết chuỗi kháng nguyên khác. Vùng CDR3 chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong sự đặc hiệu/ái lực gắn kết của kháng thể theo sáng chế và vì thế tạo ra mục đích khác của sáng chế.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “gắn kết kháng nguyên một phần của kháng thể” khi được dùng trong bản mô tả để chỉ gốc axit amin của kháng thể mà chịu trách nhiệm gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm gốc axit amin từ “vùng quyết định bổ trợ” hoặc “CDR”. Vùng “khung” hoặc “FR” là các vùng trong miền biến đổi khác với các gốc vùng siêu biến như được xác định ở bản mô tả. Vì thế, các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3,

và FR4 từ đầu tận N đến C. Các CDR trên mỗi chuỗi được tách bằng axit amin khung. Đặc biệt, CDR3 của chuỗi nặng là vùng mà góp phần hầu hết sự gắn kết kháng nguyên. Vùng CDR và FR được xác định theo định nghĩa chuẩn của Kabat, E.A., et al., *Sequence of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Khi được dùng ở đây, thuật ngữ “sự gắn kết” hoặc “sự gắn kết đặc hiệu” để chỉ sự gắn kết của kháng thể với epitop của kháng nguyên (VEGF người hoặc ANG-2 người) trong thử nghiệm trong ống nghiệm, tốt hơn là trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden với kháng nguyên kiểu đại được tinh chế. Ái lực gắn kết được xác định bằng ký tự k_a (hằng số tốc độ của sự liên kết của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên), k_D (hằng số phân ly), và K_D (k_D/k_a). Theo một phương án sự gắn kết hoặc sự gắn kết đặc hiệu có nghĩa là sự gắn kết ái lực (K_D) bằng 10^{-8} mol/l hoặc nhỏ hơn, theo một phương án 10^{-9} M đến 10^{-13} mol/l.

Thuật ngữ “epitop” bao gồm yếu tố quyết định polypeptit bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Trong các phương án khác, yếu tố quyết định epitop bao gồm nhóm phân tử bề mặt hoạt động hóa học như axit amin, chuỗi bên đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, trong các phương án khác, có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể, và/hoặc đặc điểm điện tích cụ thể. Epitop là một vùng của kháng nguyên mà được liên kết bởi kháng thể.

Theo các phương án khác, kháng thể được gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khi nó nhận diện ưu tiên kháng nguyên mục tiêu của nó trong hỗn hợp phức hợp của protein và/hoặc phân tử lớn.

Thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ” biểu thị kháng thể bao gồm hai “chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ” và hai “kháng thể có chiều dài đầy đủ chuỗi nhẹ”. “Chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ” là polypeptit bao gồm hướng đầu tận N đến đầu tận C của miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH), miền chuỗi nặng không đổi kháng thể 1 (CH1), vùng khớp nối kháng thể (HR), miền không đổi chuỗi nặng kháng thể 2 (CH2), và miền không đổi chuỗi nặng kháng thể 3 (CH3), được viết tắt là VH-CH1-HR-CH2-CH3; và tùy chọn miền không đổi chuỗi nặng kháng thể 4 (CH4) trong trường hợp kháng thể thuộc phân nhóm IgE. Tốt hơn là “chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ” là polypeptit bao gồm hướng đầu tận N đến đầu tận C của VH, CH1, HR,

CH₂ và CH₃. “Kháng thể có chiều dài đầy đủ chuỗi nhẹ” là polypeptit bao gồm hướng từ đầu tận N đến đầu tận C của miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL), và miền không đổi chuỗi nhẹ kháng thể (CL), được viết tắt là VL-CL. Miền không đổi chuỗi nhẹ kháng thể (CL) có thể là κ (kappa) hoặc λ (lambda). Hai chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ được liên kết với nhau qua liên kết polypeptit disulfua bên trong giữa miền CL và miền CH₁ và giữa vùng khớp nối của chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về kháng thể có chiều dài đầy đủ điển hình là kháng thể tự nhiên như IgG (ví dụ IgG 1 và IgG2), IgM, IgA, IgD, và IgE. Kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế có thể từ một loài ví dụ người, hoặc chúng có thể được khám hoặc kháng thể được làm giống như của người. Kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên mỗi vị trí được tạo thành bởi một cặp VH và VL, mà hai vị trí gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên giống nhau. Đầu tận C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ này biểu thị axit amin cuối cùng ở đầu tận C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đã nêu. Đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ này biểu thị axit amin cuối cùng ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đã nêu.

Thuật ngữ “phần tử liên kết peptit” được dùng trong sáng chế biểu thị peptit với trình tự axit amin, tốt hơn là có nguồn gốc tổng hợp. Các peptit theo sáng chế được dùng để nối đầu tận C của chuỗi nhẹ với đầu tận N của chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai (mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai) qua phần tử liên kết peptit. Phần tử liên kết peptit trong kháng thể có chiều dài đầy đủ thứ hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là peptit với trình tự axit amin với chiều dài ít nhất 30 axit amin, tốt hơn là với chiều dài từ 32 đến 50 axit amin. Trong một phần tử liên kết peptit là peptit với trình tự axit amin có chiều dài từ 32 đến 40 axit amin. Theo một phương án trình tự liên kết này là (GxS)_n với G = glyxin, S = serin, (x = 3, n = 8, 9 hoặc 10 và m = 0, 1, 2 hoặc 3) hoặc (x = 4 và n = 6, 7 hoặc 8 và m = 0, 1, 2 hoặc 3), tốt hơn là với x = 4, n = 6 hoặc 7 và m = 0, 1, 2 hoặc 3, tốt hơn nữa nếu với x = 4, n = 7 và m = 2. Theo một phương án trình tự liên kết này là (G₄S)₆G₂.

Thuật ngữ “vùng không đổi” được dùng trong sáng chế biểu thị tổng cộng các miền của kháng thể khác vùng thay đổi. Vùng không đổi không tham gia trực tiếp vào sự gắn kết của kháng nguyên, nhưng biểu hiện các chức năng phản ứng kích thích khác nhau. Phụ thuộc vào trình tự axit amin của vùng không đổi của chuỗi nặng của chúng,

kháng thể được chia thành các nhóm: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài trong số đó có thể là còn được chia thành các phân nhóm, như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA1 và IgA2. Vùng không đổi chuỗi nặng mà tương ứng với nhóm khác nhau của kháng thể được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , lần lượt. Vùng không đổi chuỗi nhẹ mà được phát hiện trong cả năm nhóm kháng thể được gọi là κ (kappa) và λ (lambda).

Thuật ngữ “vùng không đổi có nguồn gốc từ người” hoặc “vùng không đổi người” như được dùng trong sáng chế biểu thị vùng chuỗi nặng không đổi của kháng thể người của phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 và/hoặc vùng kappa hoặc lambda chuỗi nhẹ không đổi. Các vùng không đổi đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và ví dụ được mô tả bởi Kabat, E.A., et al., *Sequence of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) (xem also ví dụ Johnson, G., và Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788). Khi ứng dụng đánh số vị trí và đột biến hệ thống đánh số châu Âu (chỉ số EU) theo Kabat, E.A., et al., *Sequence of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) được dùng và để chỉ “đánh số theo chỉ số EU của Kabat”.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có vùng không đổi của phân nhóm IgG1 người (thu được từ phân nhóm IgG1 người).

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có vùng không đổi của phân nhóm IgG4 người (thu được từ phân nhóm IgG1 người).

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là phân nhóm IgG1 người có đột biến L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) và P329G (Pro329Gly). Kháng thể bị suy giảm gắn kết FcR (đặc biệt là chúng thể hiện không liên kết thêm với FcRgammaI, FcRgammaII và FcRgammaIII). Điều này đặc biệt hữu dụng để giảm tác dụng phụ có thể như ví dụ chứng huyết khối (Meyer, T., et al., *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 171-81). Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là thuộc phân nhóm IgG4 người có đột biến S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) và P329G (Pro329Gly). Kháng thể thể hiện sự gắn kết FcR giảm như được thể hiện ở trên. Trong khi đột biến Pro329Ala mà đã được mô tả đã loại bỏ chỉ hai phần ba sự tương tác bánh kẹp FcgammaRIIIa, Pro329Gly trong kháng thể theo sáng chế hoàn toàn tạo ra sự gắn kết của phần Fc với FcgammaRIII. Đây đặc biệt hữu dụng do việc liên kết với

Fcγ₃ được tham gia trong ADCC (độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể) mà dẫn đến sự chết tế bào, mà có thể là hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, nhưng mà có thể gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng trong việc điều trị các bệnh mạch máu hoặc miễn dịch khác dựa vào kháng thể. Vì thế kháng thể theo sáng chế của phân nhóm IgG1 có đột biến L234A, L235A và P329G và Phân nhóm IgG4 có đột biến S228P, L235E và P329G đặc biệt hữu dụng, khi chúng cùng thể hiện không liên kết thêm với Fcγ₁, Fcγ₂ và Fcγ₃.

Thuật ngữ “với đột biến AAA” khi được dùng ở đây để chỉ các đột biến I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala), và H435A (His435Ala) trong vùng chuỗi nặng không đổi của IgG1 hoặc IgG4, trong đó việc đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Thuật ngữ “với đột biến P329G LALA” khi được dùng ở đây chỉ các đột biến L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) và P329G (Pro329Gly) trong vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1, trong đó việc đánh số là theo chỉ số EU của Kabat. Thuật ngữ “với đột biến SPLE” khi được dùng ở đây để chỉ vùng chuỗi nặng không đổi S228P (Ser228Pro) và L235E (Leu235Glu) của phân nhóm IgG4, trong đó việc đánh số là theo chỉ số EU của Kabat. Thuật ngữ “với đột biến SPLE và P329G” khi được dùng ở đây chỉ vùng chuỗi nặng không đổi S228P (Ser228Pro), L235E (Leu235Glu) và P329G (Pro329Gly) của phân nhóm IgG4, trong đó việc đánh số là theo chỉ số EU của Kabat.

Kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Vì thế, một khía cạnh của sáng chế là axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế và khía cạnh khác là tế bào chứa axit nucleic này mã hóa kháng thể theo sáng chế. Các phương pháp sản xuất tái tổ hợp được biết rộng rãi trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm protein biểu hiện trong tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn với sự cô lập sau đó của kháng thể và thường tinh chế đến độ tinh khiết được dụng. Để biểu hiện kháng thể như được đề cập ở trên trong tế bào chủ, axit nucleic mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được cải biến tương ứng được cài xen vào trong vector biểu hiện bằng các phương pháp chuẩn. Việc biểu hiện được tiến hành trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn thích hợp như tế bào CHO, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào HEK293, tế bào COS, tế bào PER.C6, nấm men, hoặc tế bào E.coli, và kháng thể được thu hồi từ tế bào (dịch nổi hoặc tế bào sau khi phân giải). Các phương pháp thông thường để sản xuất tái tổ hợp kháng thể được biết rõ trong tình trạng

kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong bài báo của Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Theo một phương án theo sáng chế là phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, bao gồm các bước

- a) biến nạp tế bào chủ với vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể này;
- b) nuôi cấy tế bào chủ dưới điều kiện mà cho phép tổng hợp của phân tử kháng thể này; và
- c) thu hồi phân tử kháng thể này từ môi trường nuôi cấy này.

Theo một phương án bước thu hồi theo bước c) bao gồm việc sử dụng chất phản ứng bất giữ đặc hiệu miễn không đổi chuỗi nhẹ (mà ví dụ đặc hiệu đối với chuỗi nhẹ không đổi kappa hoặc lambda, phụ thuộc vào chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda trong kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế được dùng hay không). Theo một phương án chất phản ứng bất giữ đặc hiệu chuỗi nhẹ này được dùng theo cách cách gắn kết và tách rửa). Ví dụ về chất phản ứng bất giữ đặc hiệu miễn không đổi chuỗi nhẹ này là ví dụ KappaSelect™ và LambdaFabSelect™ từ GE Healthcare/BAC, được dựa trên chất nền cơ bản agarosa độ cứng cao mà cho phép tốc độ chảy cao và nghịch áp thấp ở quy mô lớn. Chúng là đặc điểm của phối tử mà liên kết với vùng không đổi của chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda tương ứng (tức là các mảnh thiếu vùng không đổi của chuỗi nhẹ sẽ không gắn kết; Fig. 1). Tất cả vì thế có khả năng sự gắn kết phân tử mục tiêu chứa vùng không đổi của chuỗi nhẹ, ví dụ, IgG, IgA và IgM. Phối tử được gắn với chất nền qua tay đệm ưa nước khiến cho nó dễ dàng để liên kết với phân tử mục tiêu. Chúng dựa trên mảnh kháng thể chuỗi đơn mà được sàng lọc cho Ig kappa hoặc lambda người.

Kháng thể đặc hiệu kép được phân tách một cách thích hợp ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharosa, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực. ADN và ARN mã hóa kháng thể đơn dòng dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Tế bào lai có thể dùng làm nguồn ADN và ARN này. Khi được phân lập, ADN có thể là được cài xen vào trong vectơ biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào trong tế bào chủ như tế bào HEK 293, tế bào CHO, hoặc tế

bào u tủy mà không sản xuất protein globulin miễn dịch, để thu được sự tổng hợp của kháng thể tái tổ hợp đơn dòng trong tế bào chủ.

Trình tự axit amin các biến thể (hoặc thể đột biến) của kháng thể đặc hiệu kép được điều chế bằng cách đưa sự thay đổi nucleotit thích hợp vào trong ADN kháng thể, hoặc bằng sự tổng hợp nucleotit. Sự cải biến như vậy có thể được tiến hành, tuy nhiên, chỉ trong khoảng rất hạn chế. Ví dụ, sự cải biến không làm biến đổi các đặc điểm kháng thể được đề cập ở trên như phân nhóm IgG và sự gắn kết kháng nguyên, nhưng có thể cải thiện hiệu suất của việc sản xuất tái tổ hợp, độ ổn định protein hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế.

Thuật ngữ “tế bào chủ” như được dùng trong sáng chế biểu thị loại hệ thống tế bào bất kỳ mà có thể được thiết kế để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án tế bào HEK293 và tế bào CHO được dùng làm tế bào chủ. Khi được dùng ở đây, thuật ngữ “tế bào”, “dòng tế bào,” và “dịch nuôi cấy tế bào” được dùng thay đổi cho nhau và tất cả đều bao gồm con cháu. Vì thế, thuật ngữ “thể biến nạp” và “tế bào được biến nạp” bao gồm tế bào sơ cấp và chất cấy thu được từ chúng không bao gồm số lần chuyển. Cũng được hiểu rằng tất cả con cháu không thể chỉ ra chính xác Nồng độ ADN, do đột biến chủ ý hoặc vô ý. Biến thể con cháu mà có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự khi được sàng lọc để trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm.

Biểu hiện trong tế bào NS0 được mô tả bởi, ví dụ, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Biểu hiện tạm thời được mô tả bằng, ví dụ, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Việc tách dòng các miên biến đổi được mô tả bởi Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; và Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. A hệ thống biểu hiện tạm thời được ưu tiên (HEK 293) được mô tả bởi Schlaeger, E.-J., và Christensen, K., trong *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 và Schlaeger, E.-J., trong *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Trình tự đối chứng mà thích hợp cho sinh vật nhân sơ, ví dụ, bao gồm gen khởi đầu, trình tự điều hành tùy chọn, và vị trí gắn kết ribosom. Tế bào nhân chuẩn được đã biết là có thể sử dụng gen khởi đầu, gen tăng cường và tín hiệu polyadenyl hóa.

Axit nucleic “được liên kết hoạt động” khi nó được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN với tiền trình tự hoặc trình tự dẫn kích thích tiết được liên kết hoạt động với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện như tiền protein mà tham gia vào việc tiết polypeptit; gen khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự; hoặc vị trí gắn kết ribosom được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó được định vị để tạo điều kiện thuận lợi cho việc dịch mã. Thông thường, “được liên kết hoạt động” có nghĩa là trình tự ADN bổ trợ được liên kết kề nhau, và, trong trường hợp trình tự dẫn kích thích tiết, kề nhau và trong khung đọc. Tuy nhiên, gen tăng cường không phải kề nhau. Việc liên kết được hoàn thành bằng cách nối các vị trí giới hạn thuận tiện. Nếu các vị trí này không tồn tại, thể thích nghi oligonucleotit hoặc trình tự liên kết tổng hợp được dùng theo cách thực hiện thông thường.

Việc tinh chế kháng thể được tiến hành để loại bỏ thành phần tế bào hoặc các chất gây ô nhiễm khác, ví dụ axit nucleic hoặc protein khác, bằng kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý kiềm/SDS, tạo dải CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel agarosa, và các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực. Xem Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing và Wiley Interscience, New York (1987). Các phương pháp khác đã được công bố và được dùng rộng rãi để tinh chế protein, như các phương pháp sắc ký ái lực với protein vi khuẩn (ví dụ sắc ký ái lực protein A hoặc protein G), sắc ký trao đổi ion (ví dụ trao đổi cation (nhựa carboxymetyl), trao đổi anion (nhựa amino etyl) và trao đổi kiểu hỗn hợp), hấp thu ưa lưu huỳnh (ví dụ với beta-mercaptoetanol và phối tử SH khác), sự tương tác kỵ nước hoặc sắc ký hấp thụ thơm (ví dụ với phenyl-sepharosa, nhựa aza-ura khí, hoặc axit m-aminophenylboronic), sắc ký ái lực chelat kim loại (ví dụ với nguyên liệu ái lực Ni(II)- và Cu(II)-), sắc ký loại trừ kích thước, và điện di (như điện di trên gel, điện di mao quản) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép theo sáng chế thể hiện là có lợi cho bệnh nhân là người có nhu cầu trị liệu hướng đích VEGF và ANG-2.

Kháng thể hóa trị hai đặc hiệu kép kháng VEGF người và ANG-2 người theo sáng chế có thể có profin hiệu quả/an toàn có giá trị và có thể cung cấp lợi ích cho bệnh nhân có nhu cầu trị liệu kháng VEGF và kháng ANG-2.

Một khía cạnh của sáng chế là được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế. Khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất được phẩm. Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp sản xuất được phẩm gồm kháng thể theo sáng chế. Theo khía cạnh khác, sáng chế tạo ra chế phẩm, ví dụ được phẩm, chứa kháng thể theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang được dụng.

Khi được dùng ở đây, “chất mang được dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bọc, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương và làm trễ sự hấp thu, và tương tự mà thích hợp về mặt sinh lý. Tốt hơn là chất mang thích hợp để cấp được dùng cho đối tượng thông qua đường khu trú. Ví dụ, kháng thể hoặc chế phẩm của nó có thể được dùng cho đối tượng bằng việc dùng trong mắt ví dụ tiêm trong mắt như tiêm trong mắt. Việc này có thể được tiến hành theo các quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; và Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Do sẽ được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, đường và/hoặc cách cấp sẽ khác nhau phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Để cấp hợp chất theo sáng chế bằng cách đường cấp này, có thể cần bọc hợp chất với, hoặc cấp đồng thời hợp chất với, nguyên liệu để ngăn ngừa sự bất hoạt của nó. Ví dụ, hợp chất có thể được dùng cho đối tượng trong chất mang thích hợp, ví dụ, liposom, hoặc chất làm loãng. Chất pha loãng được dụng bao gồm nước muối và dung dịch đệm chứa nước. Chất mang được dụng bao gồm dung dịch chứa nước hoặc thể phân tán tiệt trùng và bột vô trùng đối với chế phẩm dùng ngay của dung dịch tiệt trùng hoặc thể phân tán. Việc sử dụng môi trường và chất này đối với các chất có được tính đã biết trong lĩnh vực.

Nhiều cách đưa vào cơ thể có thể được dùng, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở việc dùng trong mắt hoặc khu trú. Theo một phương án ứng dụng là trong mắt và bao gồm, nhưng không bị giới hạn, tiêm dưới kết mạc, tiêm trong buồng mắt, tiêm vào trong tiền phòng qua vùng rìa, tiêm trong mô đệm, tiêm trong giác mạc, tiêm dưới võng mạc, tiêm thủy dịch, tiêm quanh mắt hoặc thiết bị đưa vào cơ thể kéo dài, tiêm trong mắt (ví

dụ, tiêm trước, giữa hoặc sau). Theo một phương án bồi là khu trú và bao gồm, nhưng không bị giới hạn thuộc nhỏ mắt vào giác mạc.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng thông qua việc dùng trong mắt, ví dụ thông qua tiêm trong mắt. Việc này có thể được tiến hành theo các quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; và Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5.

Theo một số phương án, bộ kit trị liệu của sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều liều kháng thể đặc hiệu kép có mặt trong dược phẩm được mô tả ở đây, thiết bị thích hợp để tiêm trong mắt của dược phẩm, và hướng dẫn chi tiết cho đối tượng thích hợp và tiến trình để tiêm. Theo các phương án này, chế phẩm thường được dùng cho đối tượng có nhu cầu điều trị thông qua việc tiêm trong mắt. Việc này được tiến hành theo các quy trình chuẩn đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-76; Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206; và Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-5.

Chế phẩm cũng có thể chứa tá dược như chất bảo quản, chất làm ướt, chất nhũ hóa và chất phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi cả quy trình khử trùng, supra, và bằng cách kết hợp các chất kháng khuẩn và chất kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và tương tự. Cũng mong muốn bao gồm chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và chất tương tự vào trong chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thụ kéo dài của dạng dược phẩm tiêm được có thể được đưa vào bằng cách kết hợp các chất mà làm trễ sự hấp thu như alumin monostearat và gelatin.

Không liên quan đến đường dùng được chọn, hợp chất theo sáng chế, mà có thể được dùng ở dạng dược hydrat hóa thích hợp, và/hoặc dược phẩm theo sáng chế, được bào chế thành dạng liều được dụng bằng các phương pháp thông thường đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mức liều lượng thực tế của thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể được biến đổi sao cho thu được lượng thành phần hoạt tính mà hữu hiệu để đạt được đáp ứng trị liệu mong muốn với bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và cách cấp, không có độc tính với bệnh nhân. Mức liều lượng được chọn sẽ phụ thuộc vào các loại hệ số dược động học bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể theo sáng chế được dùng, đường

dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được dùng, khoảng thời gian điều trị, các thuốc khác, hợp chất và/hoặc nguyên liệu được dùng kết hợp với chế phẩm cụ thể được dùng, tuổi, giới tính, khối lượng, điều kiện, sức khỏe chung và bệnh sử trước đó của bệnh nhân được điều trị, và các hệ số tương tự được biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Chế phẩm phải vô trùng và lỏng đến mức mà chế phẩm có thể được phân phối bằng ống tiêm. Ngoài nước, chất mang tốt hơn là dung dịch nước muối được đệm đẳng trương.

Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng lớp bọc như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt yêu cầu trong trường hợp thể phân tán và bằng cách dùng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol hoặc sorbitol, và natri clorua trong chế phẩm.

Chế phẩm có thể bao gồm dạng bào chế phóng thích chậm trong mắt gồm hoạt chất để dùng dưới kết mạc. Dạng bào chế phóng thích chậm trong mắt bao gồm các vi hạt của hoạt chất hầu như tinh khiết, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế. Các vi hạt gồm kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được nhúng trong tương thích sinh học polyme được dùng hoặc lỏng chất bao. Dạng bào chế phóng thích chậm có thể được làm phù hợp để giải phóng hầu như toàn bộ các nguyên liệu hoạt tính trong khoảng thời gian kéo dài. Nền polyme hoặc lỏng, nếu có mặt, có thể được làm phù hợp để phân giải đủ để được vận chuyển từ vị trí cấp sau khi giải phóng toàn bộ hoặc hầu như toàn bộ hoạt chất. Dạng bào chế phóng thích chậm có thể là dạng bào chế lỏng, gồm polyme được dùng và hoạt chất được hòa tan hoặc được phân tán. Khi tiêm, polyme tạo ra kho dự trữ tại vị trí tiêm, ví dụ bằng gel hóa hoặc tạo kết tủa.

Khía cạnh khác của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh mạch máu mắt.

Một phương án của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh mạch máu mắt.

Khía cạnh khác của sáng chế trong dược phẩm để dùng trong điều trị bệnh mạch máu mắt.

Khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng kháng thể theo sáng chế dùng trong

sản xuất thuốc để điều trị bệnh mạch máu mắt.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều trị bệnh nhân bị đau đớn bởi bệnh mạch máu mắt bằng cách cấp kháng thể theo sáng chế cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị.

Thuật ngữ “bệnh mạch máu mắt” và “bệnh mắt mạch máu” được dùng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở trong mắt rối loạn tân mạch như bệnh võng mạc tiểu đường, bệnh phù điểm vàng đái tháo đường, bệnh võng mạc do sinh non, tăng nhãn áp cho sự phát triển mạch máu mới, tắc tĩnh mạch võng mạc, tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm, sự thoái hóa điểm vàng, sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi, viêm võng mạc sắc tố, sự tăng sinh u mạch võng mạc, giãn mao mạch điểm vàng, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, sự tạo mạch mới trong mống mắt, sự tạo mạch mới trong mắt, sự tạo mạch mới giác mạc, sự tạo mạch mới võng mạc, sự tạo mạch mới thành mạch, và thoái hóa võng mạc. (Garner, A., Vascular disease, In: Pathobiology of eye disease, A dynamic approach, Garner, A., và Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710). Khi được dùng ở đây, rối loạn mạch máu mắt chỉ tình trạng bệnh học bất kỳ đặc trưng ở chỗ sự tăng sinh được biến đổi hoặc không được điều hòa và sự xâm lấn mạch máu mới vào trong cấu trúc của mô mắt như võng mạc hoặc giác mạc. Theo một phương án bệnh mạch máu mắt được chọn từ nhóm bao gồm: sự thoái hóa điểm vàng ướt liên quan đến độ tuổi (AMD ướt), sự thoái hóa điểm vàng khô liên quan đến độ tuổi (AMD khô), bệnh phù điểm vàng đái tháo đường (DME), bệnh phù thũng điểm vàng (CME), tiểu đường không do bệnh võng mạc tăng sinh (NPDR), bệnh võng mạc tăng sinh tiểu đường (PDR), bệnh phù thũng điểm vàng, viêm mạch (ví dụ tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm), phù gai thị, viêm võng mạc, viêm kết mạc, viêm màng mạch nhỏ, viêm màng mạch, viêm màng mạch nhiều ổ, bệnh nấm mắt Histoplasma, bệnh viêm mí mắt, bệnh khô mắt (bệnh Sjögren) và bệnh mắt khác trong đó mắt bệnh và chứng rối loạn có liên quan đến mắt sự tạo mạch mới, rỉ mạch, và/hoặc bệnh phù thận. Vì thế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể sử dụng trong việc ngăn ngừa và điều trị AMD ướt, AMD khô, CME, DME, NPDR, PDR, bệnh viêm mí mắt, bệnh khô mắt và viêm màng mạch nhỏ, còn tốt hơn là AMD ướt, AMD khô, bệnh viêm mí mắt, và bệnh khô mắt, còn tốt hơn là CME, DME, NPDR và PDR, còn tốt hơn là bệnh viêm mí mắt, và bệnh khô mắt, cụ thể AMD ướt và AMD khô, và cả AMD ướt cụ thể. Theo một số phương án, bệnh mắt được chọn từ

nhóm bao gồm sự thoái hóa điểm vàng ướt liên quan đến độ tuổi (AMD ướt), bệnh phù điểm vàng, tắc tĩnh mạch võng mạc, bệnh võng mạc do đẻ non, và bệnh võng mạc tiểu đường.

Các bệnh khác liên quan đến giác mạc sự tạo mạch mới bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viêm kết giác mạc bộc phát, thiếu vitamin A, rách thấu kính tiếp xúc, viêm giác mạc dị ứng, superior viêm giác mạc rìa, viêm giác mạc khô mỏng thịt, hội chứng sjogrens, mụn đỏ, viêm kết mạc mụn nước nhỏ, giang mai, nhiễm khuẩn Mycobacteria, sự thoái hóa lipit, bỏng hóa chất, bệnh loét do vi khuẩn, bệnh loét do nấm, nhiễm khuẩn virut ecpet đơn giản, nhiễm virut bệnh zona, nhiễm động vật nguyên sinh, sacôm Kaposi (Kaposi sarcoma), loét Mooren, thoái hóa võng mạc Terrien, bệnh ly sừng rìa, viêm khớp dạng thấp, lu pút ban đỏ hệ thống, viêm đa khớp, chấn thương, bệnh saccoit Wegeners, viêm củng mạc, bệnh Steven Johnson, giác mạc hình nan hoa dạng periphigus, và từ chối ghép giác mạc.

Bệnh liên quan đến sự tạo mạch mới võng mạc/thành mạch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh võng mạc tiểu đường, sự thoái hóa điểm vàng, thiếu máu hồng cầu hình liềm, sarcoit, giang mai, u màng giả sợi chun, bệnh Pagets, tắc tĩnh mạch, tắc động mạch, bệnh tắc nghẽn động mạch cảnh, viêm màng mạch nho/vitritis mạn tính, nhiễm trùng lao trên chó mèo, bệnh Lyme, lu pút ban đỏ hệ thống bệnh luput ban đỏ, bệnh võng mạc do đẻ non, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc bệnh phù (bao gồm bệnh phù điểm vàng), bệnh Eales, bệnh Bechets, nhiễm khuẩn gây viêm võng mạc hoặc viêm màng mạch, bệnh nấm mắt Histoplasma phỏng đoán, bệnh Bests, bệnh cận thị, hóc mắt, bệnh Stargarts, viêm màng bồ đào trung gian, mạn tính sự bong võng mạc, hội chứng tăng độ nhót, nhiễm ký sinh trùng toxoplasma, chấn thương và sau khi -laze các biến chứng. các bệnh khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh có liên quan đến bệnh đỏ da (sự tạo mạch mới của góc nhỏ) và bệnh gây ra bởi sự tăng sinh bất thường của mô mạch sợi hoặc xơ bao gồm tất cả các dạng của tăng sinh dịch kính võng mạc.

Bệnh võng mạc do đẻ non (ROP) là bệnh về mắt mà ảnh hưởng đến trẻ đẻ non. Nó được cho là gây ra bởi bị đứt mạch sự sinh trưởng của võng mạc mạch máu mà có thể dẫn đến tạo sẹo và sự bong võng mạc. ROP có thể nhẹ và có thể tự giải quyết, nhưng có thể dẫn đến mù trong các trường hợp nghiêm trọng. Do đó, tất cả trẻ sinh non có nguy

cơ ROP, và trọng lượng khi sinh rất thấp là các yếu tố nguy cơ bổ sung. Cả độc tính oxy và sự giảm oxy huyết tương đối có thể góp phần vào sự phát triển của ROP.

Sự thoái hóa điểm vàng là tình trạng y tế phần lớn được phát hiện ở người già trong đó trung tâm của lớp lót trong của mắt, được biết là diện tích điểm vàng của võng mạc, dẫn đến việc mỏng, teo, và trong một số trường hợp, chảy máu. Hiện tượng này có thể dẫn đến việc mất thị giác trung tâm, mà dẫn đến mất khả năng nhìn rõ chi tiết, đọc, hoặc nhận diện khuôn mặt. Theo Học viện Nhãn khoa Hoa Kỳ, nguyên nhân chính của việc mất thị trường trung tâm (mù) ở Hoa Kỳ hiện nay đối với các bệnh nhân trên 50 tuổi. Mặc dù đôi khi sự loạn dưỡng điểm vàng ảnh hưởng đến đối tượng trẻ hơn đôi khi để chỉ sự thoái hóa điểm vàng, thuật ngữ này thường để chỉ sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi (AMD hoặc ARMD).

Sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi bắt đầu với các chất đọng bám màu vàng đặc trưng trong điểm vàng (diện tích trung tâm của võng mạc mà tạo ra thị giác trung tâm chi tiết, được gọi là hố thị giác) được gọi là kết tụ màu vàng giữa lớp biểu mô sắc tố võng mạc và màng mạch cơ bản. Hầu hết mọi người với sự thay đổi sớm này (để chỉ bệnh lý điểm vàng liên quan đến độ tuổi) có thị giác tốt. Người có kết tụ màu vàng có thể tiến triển đến AMD giai đoạn nặng. Nguy cơ này khá cao khi kết tụ màu vàng lớn và nhiều và liên quan đến sự xáo trộn trong lớp tế bào sắc tố dưới điểm vàng. Kết tụ màu vàng to và mềm được liên quan đến các chất đọng bám cholesteol tăng cao và có thể đáp ứng với các chất làm hạ cholesteol hoặc phương pháp Rheo.

AMD giai đoạn nặng, mà chịu trách nhiệm với việc mất phần lớn thị giác, có hai dạng: khô và ướt. Chứng teo thị phần trung tâm, AMD khô giai đoạn nặng, do sự teo lớp biểu bì sắc tố võng mạc dưới võng mạc, mà gây ra mất thị lực thông qua việc mất tế bào nhận kích thích ánh sáng (hình que và hình nón) trong vùng trung tâm của mắt. Trong khi hiện nay không có phương pháp điều trị đối với tình trạng này, việc bổ sung vitamin với liều cao chất chống oxy hóa, lutein và zeaxanthin, được chứng tỏ bởi viện mắt quốc gia và các chất khác làm chậm sự tiến triển của sự thoái hóa điểm vàng khô và ở một số bệnh nhân, cải thiện thị lực.

Viêm võng mạc sắc tố (RP) là nhóm gồm tình trạng bệnh mắt di truyền. Trong sự tiến triển của các triệu chứng RP, bệnh quáng gà thường diễn ra trước thị trường hình ống hàng nhiều năm hoặc thậm chí hàng thập kỷ. Nhiều người bị RP không trở nên mù

hoàn toàn cho đến khi họ 40 hoặc 50 tuổi và giữ được một chút thị lực trong cả cuộc đời. Một số người khác bị mù hoàn toàn sau khi RP, trong một số trường hợp bị sớm hơn từ khi còn nhỏ. Sự tiến triển RP là khác nhau trong mỗi trường hợp. RP là loại thoái hóa võng mạc di truyền, nhóm gồm các chứng rối loạn được di truyền trong đó sự bất thường của tế bào nhận kích thích ánh sáng (hình que và hình nón) hoặc lớp biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) của võng mạc dẫn đến việc mất thị lực tiến triển. Cá thể thứ nhất bị ảnh hưởng lần đầu tiên trải qua sự thích nghi bóng tối khiếm khuyết hoặc chứng sáng đêm (bệnh quáng gà), sau đó là sự giảm bớt vùng thị giác ngoại biên (được biết là thị trường hình ống) và, đôi khi, việc mất thị giác trung tâm muộn trong quá trình bệnh.

Bệnh phù điểm vàng diễn ra khi khi chất lỏng và chất động bám protein tập trung trên hoặc dưới điểm vàng của mắt, diện tích trung tâm màu vàng của võng mạc, khiến nó dày lên và trương phồng. Việc trương phồng này có thể làm méo thị giác trung tâm của người đó, do điểm vàng gần với tâm võng mạc ở phía sau của nhãn cầu. Diện tích này giữ các tế bào hình nón được gói chặt mà tạo ra thị giác trung tâm sắc, trong đó khiến cho người ta có thể nhìn được hình dạng, màu sắc, và các tiểu tiết trực tiếp trong đường ngắm. Bệnh phù thũng điểm vàng là loại bệnh phù điểm vàng mà bao gồm sự hình thành nang.

Trị liệu kết hợp: trong các phương án kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng một mình (không có chất trị liệu bổ sung) để điều trị một hoặc nhiều bệnh mạch máu mắt được mô tả ở đây.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng kết hợp với một hoặc nhiều các chất trị liệu bổ sung hoặc các phương pháp điều trị một hoặc nhiều bệnh mạch máu mắt được mô tả ở đây.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được bào chế kết hợp với một hoặc nhiều các chất trị liệu bổ sung và được dùng để điều trị một hoặc nhiều bệnh mạch máu mắt được mô tả ở đây.

Trong các phương án khác, sự điều trị kết hợp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm cấp kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng liên tiếp với một hoặc nhiều các chất trị liệu bổ sung để điều trị một hoặc nhiều bệnh mạch máu mắt được mô tả ở đây.

Các chất trị liệu bổ sung bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tryptophanyl- tARN

synthetaza (TrpRS), EyeOOI (aptamer được pegylat hóa kháng VEGF), squalamin, RETAANE(TM) (anecortav axetat đối với hỗn dịch phóng thích chậm; Alcon, Inc.), Combretastatin A4 Prodrug (CA4P), MACUGEN(TM), MIFEPREX(TM) (mifepriston-ru486), subtenon triamxinolon axetonit, triamcinolon axetonit kết tinh trong mắt, Prinomastat (AG3340- chất ức chế metalloproteinaza nền tổng hợp, Pfizer), fluoxinolon axetonit (bao gồm chất cấy trong mắt fluoxinolo, Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), chất ức chế VEGFR (Sugen), VEGF-Trap (Regeneron/Aventis), chất ức chế tyrosin kinaza thụ thể VEGF như 4-(4-bromo- 2-floanilino)-6- metoxy-7-(1-metylpiperidin-4-ylmetoxy)quinazolin (ZD6474), 4-(4-flo-2-metylindol-5- yloxy)-6-metox-7-(3- pyrolidin- 1 -ylpropoxy)quinazolin (AZD2171), vatalanib (PTK787) và SU1 1248 (sunitinib), linomit, và chất ức chế chức năng integrin v.beta.3 và angiostatin.

Cách trị liệu bằng được phẩm khác mà có thể được dùng trong tổ hợp kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, VISUDYNE(TM) với việc sử dụng laze phi nhiệt, PKC 412, Endovion (NeuroSearch A/S), yếu tố dinh dưỡng tế bào thần kinh, bao gồm để làm ví dụ yếu tố dinh dưỡng hướng thần kinh có nguồn gốc thần kinh đệm, và yếu tố dinh dưỡng tế bào thần kinh thể mi, diatazem, dorzolamit, Phototrop, 9-cis-võng mạc, thuốc dành cho mắt (bao gồm Echo trị liệu) bao gồm phospholin iodua hoặc echothiophat hoặc carbonic anhydraza chất ức chế, AE-941 (AEteARN Laboratories, Inc.), SiARN-027 (Sima Therapeutics, Inc.), pegaptanib (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), neurotrophin (bao gồm, theo cách chỉ lấy làm ví dụ, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), chất đối kháng integrin (bao gồm các thuốc từ Jerini AG và Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), thalidomit (được dùng, ví dụ, của EntreMed, Inc.), cardiotrophin-1 (Genentech), 2-metoxiestradiol (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), tetrathiomolybđat (University of Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), hợp chất vi tảo (Aquasearch/ Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group pic), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), chất ức chế tyrosin kinaza (Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), chất bảo vệ thần kinh hạch tế bào võng mạc (Cogent Neurosciences), dẫn xuất N- nitropyrazol (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), xyclosporin A,

chuyển vị vớng mạc giới hạn”, trị liệu quang động, (bao gồm, theo cách chỉ lấy làm ví dụ, thụ thể-targeted PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfimer natri để tiêm với PDT; verteporfin, QLT Inc.; rostoporfin với PDT, Miravent Medical Technologies; talaporfin natri với PDT, Nippon Petroleum; motexafin lutetium, Pharmacyclics, Inc.), oligonucleotit đối nghĩa (bao gồm, để làm ví dụ, sản phẩm được thử nghiệm bởi Novagali Pharma SA và ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals), quang đông laze, laze kết tụ màu vàng, phẫu thuật lỗ điểm vàng, phẫu thuật chuyển vị điểm vàng, kính viễn vọng thu nhỏ có thể cấy ghép, chụp tia X mạch chuyển động Phi (cũng được biết là trị liệu vi-laze và Feeder Vessel Treatment), trị liệu chùm proton, trị liệu mô phỏng vi phân, phẫu thuật bong vớng mạc và thủy dịch, thất màng cứng, phẫu thuật dưới điểm vàng, nhiệt trị liệu chuyển đồng tử, trị liệu hệ thống quang hóa I, việc sử dụng nhiều ARN (ARNi), thay đổi độ nhót máu ngoài cơ thể (còn được biết là lọc khác biệt màng và phép trị liệu thay đổi độ nhót), cấy ghép vi chip, trị liệu tế bào gốc, trị liệu thay thế gen, trị liệu gen ribozim (bao gồm trị liệu gen đối với yếu tố đáp ứng sự giảm oxy huyết, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; PDEF trị liệu gen, GenVec), ghép tế bào nhận kích thích ánh sáng/tế bào vớng mạc (bao gồm biểu mô tế bào vớng mạc có thể ghép, Diacrin, Inc.; ghép tế bào vớng mạc, Cell Genesys, Inc.), và châm cứu.

Chất kháng sự hình thành mạch có thể được dùng kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dược phẩm được liệt kê bởi Carmeliet và Jain, 2000, Nature 407:249-257. Trong các phương án khác, chất kháng sự hình thành mạch là chất đối kháng VEGF khác hoặc thụ thể chất đối kháng VEGF như các biến thể VEGF, mảnh thụ thể VEGF hòa tan, aptame có khả năng phong bế VEGF hoặc VEGFR, kháng thể trung hoà kháng VEGFR, chất ức chế trọng lượng phân tử thấp của VEGFR tyrosin kinaza và tổ hợp bất kỳ của chúng của chúng và các chất này bao gồm aptame kháng VEGF (ví dụ Pegaptanib), thụ thể bắt tái tổ hợp hòa tan (ví dụ VEGF Trap). Trong các phương án khác, chất kháng sự hình thành mạch bao gồm corticosteroid, steroid ức chế sự hình thành mạch mới, anecortav axetat, angiostatin, endostatin, ARN can thiệp nhỏ làm giảm sự biểu hiện của phối tử VEGFR hoặc VEGF, sau VEGFR phong bế với chất ức chế tyrosin kinaza, chất ức chế MMP, IGFBP3, chất phong bế SDF-1, PEDF, gamma-secretaza, phối tử 4 giống Delta, chất đối kháng integrin, phong bế HIF-1 alpha, phong bế protein kinaza CK2, và tác dụng ức chế của tế bào gốc (tức là tế bào tiền thân nội mô) hướng tới vị trí tạo mạch mới bằng

cách sử dụng nội mạc mạch cadherin (CD-144) và kháng thể (SDF)-I yếu tố có nguồn gốc từ mô đệm. Thụ thể VEGF hướng chất ức chế RTK phân tử nhỏ bao gồm PTK787 cũng có thể được dùng. Các chất mà có hoạt tính kháng sự tạo mạch mới không nhất thiết là hợp chất kháng VEGF cũng có thể được dùng và bao gồm thuốc kháng viêm, chất ức chế m-Tor, rapamycin, everolimus, temsirolimus, cyclosporin, chất kháng TNF, chất kháng bổ thể, và chất kháng viêm phi steroid. Chất bảo vệ thần kinh và có khả năng giảm sự tiến triển sự thoái hóa điểm vàng khô cũng có thể được dùng, như nhóm thuốc được gọi là “neurosteroid”. Các chất bao gồm thuốc như dehydroepiandrosteron (DHEA) (Tên thương mại: Prastera(R) và Fidelin(R)), dehydroepiandrosteron sulfat, và pregnenolon sulfat. Chất trị liệu AMD (sự thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi) bất kỳ có thể được dùng kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép hoặc được phẩm theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở verteporfin kết hợp với PDT, pegaptanib natri, kẽm, hoặc chất chống oxy hóa, một mình hoặc trong tổ hợp bất kỳ.

Thuật ngữ “đối tượng” và “bệnh nhân” được dùng thay đổi cho nhau và để chỉ động vật có vú như người bệnh nhân và động vật linh trưởng khác người, cũng như động vật thử nghiệm như thỏ, chuột, và chuột, và động vật khác. Các động vật bao gồm tất cả động vật có xương, ví dụ, động vật có vú và động vật không có vú, như chó, mèo, cừu, bò, lợn, thỏ, gà, và v.v.. Đối tượng được ưu tiên để thực hiện các phương pháp trị liệu theo sáng chế là người. Đối tượng có nhu cầu điều trị bao gồm bệnh nhân đã bị đau đớn bởi bệnh và rối loạn mạch máu mắt cũng như các đối tượng đang phát triển các rối loạn.

Khi được dùng ở đây, các thuật ngữ “tế bào”, “dòng tế bào” và “dịch nuôi cấy tế bào” được dùng thay đổi cho nhau và tất cả các định nghĩa như vậy bao gồm con cháu. Vì thế, thuật ngữ “thể biến nạp” và “tế bào được biến nạp” bao gồm tế bào sơ cấp và giống cấy thu được từ chúng không liên quan đến số lần chuyển. Cũng được hiểu rằng tất cả con cháu có thể không hoàn toàn giống về nồng độ ADN, do đột biến tính toán hoặc ngẫu nhiên. Biến thể con cháu mà có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự khi được sàng lọc để trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm. Trong đó sự định nghĩa khác được dự định, sẽ rõ ràng trong ngữ cảnh.

Thuật ngữ “sự biến nạp” khi được dùng ở đây chỉ quy trình vận chuyển vectơ/axit nucleic vào trong tế bào chủ. Nếu tế bào không có lớp chắn thành tế bào vững chắc được dùng làm tế bào chủ, chuyển nạp được thực hiện ví dụ bằng phương pháp kết tủa canxi

phosphat như được nêu trong Graham, F.L., van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 546-467. Tuy nhiên, các phương pháp khác để đưa ADN vào trong tế bào như bằng cách tiêm vào nhân hoặc dung hợp tế bào trần cũng có thể được dùng. Nếu tế bào nhân sơ hoặc tế bào mà hầu như bao gồm cấu trúc thành tế bào được dùng, ví dụ một phương pháp chuyển nạp là xử lý canxi bằng cách sử dụng canxi clorua như được nêu bởi Cohen, S.N., et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

Khi được dùng ở đây, “biểu hiện” để chỉ quy trình mà axit nucleic được sao mã thành ARN thông tin và/hoặc quy trình mà ARN thông tin được sao mã (cũng để chỉ bản sao) sau đó được dịch mã thành peptit, các polypeptit, hoặc protein. Các bản sao và các polypeptit được mã hóa nói chung để chỉ sản phẩm gen. Nếu polynucleotit thu được từ ADN bộ gen, biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn có thể bao gồm việc ghép nối của ARN thông tin.

“Vector” là phân tử axit nucleic, cụ thể tự tái bản, mà vận chuyển phân tử axit nucleic được cài xen vào trong và/hoặc giữa tế bào chủ. Thuật ngữ bao gồm vector mà có chức năng chủ yếu trong việc gắn chèn ADN hoặc ARN vào trong tế bào (ví dụ, tích hợp vào nhiễm sắc thể), tái bản vector mà có chức năng chủ yếu đối với sự tái bản của ADN hoặc ARN, và vector biểu hiện mà có chức năng sao mã và/hoặc sự dịch mã của ADN hoặc ARN. Cũng bao gồm vector mà cung cấp nhiều hơn một chức năng như được nêu.

“Vector biểu hiện” là polynucleotit mà, khi được đưa vào tế bào chủ thích hợp, có thể được sao chép được dịch mã thành polypeptit. “Hệ thống biểu hiện” thường để chỉ tế bào chủ thích hợp bao gồm vector biểu hiện mà có thể có chức năng tạo ra sản phẩm biểu hiện mong muốn.

Các ví dụ sau, danh mục trình tự và các hình vẽ được cung cấp nhằm hiểu rõ sáng chế, phạm vi thực của mà được nêu trong phần yêu cầu bảo hộ. Nên hiểu rằng sự cải biến có thể được thực hiện theo các quy trình được nêu dưới đây mà không vượt quá ý tưởng của sáng chế.

Mô tả danh mục trình tự (trình tự axit amin)

SEQ ID NO:	1	chuỗi nặng CDR3H, <VEGF>ranibizumab
------------	---	-------------------------------------

SEQ ID NO:	2	chuỗi nặng CDR2H, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	3	chuỗi nặng CDR1H, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	4	chuỗi nhẹ CDR3L, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	5	chuỗi nhẹ CDR2L, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	6	chuỗi nhẹ CDR1L, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	7	miền biến đổi chuỗi nặng VH, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	8	miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	9	chuỗi nặng CDR3H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	10	chuỗi nặng CDR2H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	11	chuỗi nặng CDR1H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	12	chuỗi nhẹ CDR3L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	13	chuỗi nhẹ CDR2L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	14	chuỗi nhẹ CDR1L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	15	miền biến đổi chuỗi nặng VH, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	16	miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	17	Yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch người (VEGF); trình tự tiền chất của VEGF 165 người
SEQ ID NO:	18	Angiopoietin-2 (ANG-2) người
SEQ ID NO:	19	Người angiopoietin-1 (ANG-1)
SEQ ID NO:	20	Thụ thể Tie-2 người
SEQ ID NO	21	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO	22	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA (VEGFang2-0012)
SEQ ID NO	23	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA (VEGFang2-0012)

SEQ ID NO	24	Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA (VEGF-Ang2-0012)
SEQ ID NO:	25	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA và P329G LALA đột biến (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	26	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA và P329G LALA đột biến (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	27	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA và đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	28	Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA và đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)
SEQ ID NO:	29	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	30	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	31	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	32	Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	33	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 có đột biến AAA
SEQ ID NO:	34	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 có đột biến AAA
SEQ ID NO:	35	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 có đột biến AAA
SEQ ID NO:	36	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	37	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	38	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 có đột biến AAA và đột biến SPLE
SEQ ID NO:	39	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 kiểu đại (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	40	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 kiểu đại (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	41	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 kiểu đại (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	42	Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 kiểu đại (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0201)
SEQ ID NO:	43	Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ có đột biến P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	44	Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ có đột biến P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)

SEQ ID NO:	45	Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ có đột biến P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	46	Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ có đột biến P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)
SEQ ID NO:	47	vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa
SEQ ID NO:	48	vùng không đổi chuỗi nhẹ lambda
SEQ ID NO:	49	vùng không đổi chuỗi nặng thu được từ IgG1 người
SEQ ID NO:	50	vùng không đổi chuỗi nặng thu được từ IgG4 người

Dưới đây là các phương án của sáng chế được liệt kê như sau:

1. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người,

trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong vùng biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của, SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14, và trong đó

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người hoặc IgG4 người (có nguồn gốc từ người và) gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

2. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 1, trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 2, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi dưới iii) là của phân nhóm IgG1

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 3, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 còn bao gồm các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

5. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 2, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi dưới iii) là của phân nhóm IgG4

6. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG4 còn bao gồm các đột biến S228P và L235E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

7. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG4 còn bao gồm các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat)

8. Dược phẩm chứa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 7.

9. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 7 để dùng trong việc điều trị bệnh mạch máu mắt.

10. Việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 7 để sản xuất thuốc để điều trị bệnh mạch máu mắt.

11. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 9 hoặc 10, trong đó kháng thể được dùng thông qua việc dùng trong mắt.

12. Phương pháp điều trị bệnh nhân bị đau đớn bởi bệnh mạch máu mắt bằng cách cấp kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 7 cho bệnh

nhân có nhu cầu điều trị.

13. Axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu kép theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 7.

14. Vector biểu hiện chứa axit nucleic này theo phương án 13 có thể biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn.

15. Tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn bao gồm vector theo phương án 14.

16. Phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 1 đến 7 bao gồm các bước

- a) biến nạp tế bào chủ với vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể này;
- b) nuôi cấy tế bào chủ dưới điều kiện mà cho phép tổng hợp phân tử kháng thể này; và
- c) thu hồi phân tử kháng thể này từ môi trường nuôi cấy này.

17. Kháng thể đặc hiệu kép thu được bằng phương pháp theo phương án 16.

18. Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, của SEQ ID NO: 26, của SEQ ID NO: 27, và của SEQ ID NO: 28.

19. Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, của SEQ ID NO: 22., của SEQ ID NO: 23., và của SEQ ID NO: 24.

20. Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29, của SEQ ID NO: 30, của SEQ ID NO: 31, và của SEQ ID NO: 32.

Quy trình thử nghiệm

Bảng 1: Kháng thể đặc hiệu kép và các trình tự tương ứng của chúng

Mô tả	Tên ngắn gọn	Trình tự
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA	VEGFang2-0012	SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 kiểu đại (không có đột biến AAA)	VEGFang2-0201-	SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 có đột biến AAA và đột biến P329G LALA	VEGFang2-0016	SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ với đột biến P329G LALA (không có đột biến AAA)	VEGFang2-0015	SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46
<VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 có đột biến AAA và với đột biến SPLE	--	SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 có đột biến AAA	-	SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35
<VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 có đột biến AAA và với SPLE đột biến	-	SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38

Lưu ý là thuật ngữ “có đột biến AAA” khi được dùng ở đây để chỉ các đột biến I253A (Ile253Ala), H310A (His310Ala), và H435A (His435Ala) trong vùng chuỗi nặng không đổi của IgG1 hoặc IgG4 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat), thuật ngữ “với đột biến P329G LALA” khi được dùng ở đây để chỉ các đột biến L234A (Leu235Ala), L235A (Leu234Ala) và P329G (Pro329Gly) trong vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat), và thuật ngữ “có đột biến SPLE” khi được dùng ở đây để chỉ S228P (Ser228Pro) và L235E (Leu235Glu) vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG4 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và các phương pháp thông thường

Thông tin tổng quát liên quan đến trình tự nucleotit của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch người được nêu trong: Kabat, E.A., et al., Sequence of Protein of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Axit amin của chuỗi kháng thể được đánh số và đánh số theo

cách đánh số EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequence of Protein of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được dùng để thao tác ADN như được nêu trong Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Các chất phản ứng sinh học phân tử được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen được mô tả được xếp thứ tự theo phần mô tả cho trước ở Genart (Regensburg, Germany).

Xác định trình tự ADN

Trình tự ADN được xác định bằng giải trình tự mạch kép được tiến hành ở MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) hoặc Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany).

Phân tích trình tự ADN và protein và quản lý dữ liệu trình tự

Gói phần mềm GCGs (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite phiên bản 8.0 được dùng để tạo ra, vẽ bản đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vector biểu hiện

Để biểu hiện kháng thể được mô tả, các biến thể của plasmid biểu hiện để biểu hiện tạm thời (ví dụ trong tế bào HEK293-F) được dựa trên sự tổ chức ADN bổ sung có hoặc không có gen khởi đầu CMV-Intron A hoặc sự tổ chức bộ gen với gen khởi đầu CMV được áp dụng.

Ngoài cat-xet biểu hiện kháng thể vector chứa:

- điểm khởi đầu sao chép mà cho phép plasmid sao chép trong *E. coli*,
- gen β -lactamaza mà tạo ra tính kháng ampicillin ở *E. coli*, và
- gen dihydrofolat reductaza từ *Mus musculus* làm thành phần đánh dấu

chọn lọc trong tế bào nhân chuẩn

- Đơn vị phiên mã của gen kháng thể bao gồm các yếu tố sau:
- (các) vị trí giới hạn duy nhất ở đầu 5'
- gen tăng cường sớm qua trung gian và gen khởi đầu từ cytomegalovirus người,
- sau đó là trình tự Intron A trong trường hợp ADN bổ sung organization,
- vùng không dịch mã 5' của gen kháng thể người,
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,
- chuỗi kháng thể người (kiểu đại hoặc với sự trao đổi miễn) là sự tổ chức ADN bổ sung hoặc là bộ gen với sự tổ chức exon-intron globulin miễn dịch
- vùng không dịch mã 3' với trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, và
- (các) vị trí giới hạn duy nhất ở đầu 3'.

Các gen dung hợp bao gồm chuỗi kháng thể như được nêu dưới đây được tạo ra bằng sự PCR và/hoặc tổng hợp gen và được lắp bằng các phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết và bằng cách nối các đoạn axit nucleic ví dụ bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn duy nhất trong vector tương ứng. Trình tự axit nucleic được tách dòng được xác nhận bằng Giải trình tự ADN. Để chuyển nạp tạo thời lượng lớn plasmit được tạo ra bằng chế phẩm plasmit từ chất cấy *E. coli* được biến nạp (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào được dùng như được nêu trong các Tiến trình hiện nay trong Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. và Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Kháng thể đặc hiệu kép được biểu hiện bằng đồng chuyển nạp tạm thời plasmit tương ứng biểu hiện trong tế bào HEK29-F được nuôi trong hỗn dịch như được nêu dưới đây.

Ví dụ 1

Biểu hiện và tinh chế

Chuyển nạp tạm thời trong hệ HEK293-F

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng chuyển nạp tạm thời với plasmit tương ứng (ví dụ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nặng được cải biến, cũng như chuỗi nhẹ và chuỗi

nhẹ được cải biến tương ứng) bằng cách sử dụng hệ HEK293-F (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vắn tắt, tế bào HEK293-F (Invitrogen) được nuôi trong hỗn dịch trong bình lắc hoặc thiết bị lên men được khuấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 không chứa huyết thanh (Invitrogen) được chuyển nhiễm với hỗn hợp của bốn plasmit biểu hiện và 293 fectin™ hoặc fectin (Invitrogen). Với bình lắc 2l (Corning) tế bào HEK293-F được gieo ở mật độ $1,0 \times 10^6$ tế bào/ml trong 600 ml và được ủ ở 120 vòng/phút, 8% CO₂. Ngày sau khi tế bào được chuyển nhiễm ở mật độ tế bào bằng khoảng $1,5 \times 10^6$ tế bào/ml với khoảng 42 ml hỗn hợp gồm A) 20ml Opti-MEM (Invitrogen) với 600µg tổng plasmit ADN (1 µg/ml) mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng được cải biến, lần lượt và chuỗi nhẹ tương ứng trong tỷ lệ đương lượng mol và B) 20 ml Opti-MEM + 1,2 ml 293 fectin hoặc fectin (2 µl/ml). Theo sự tiêu thụ glucoza, dung dịch glucoza được thêm vào trong khi quá trình lên men. Dịch nổi chứa kháng thể được tiết được thu hoạch sau từ 5 đến 10 ngày và kháng thể được tinh chế trực tiếp từ dịch nổi hoặc dịch nổi được đông lạnh và được lưu giữ.

Tinh chế

Kháng thể đặc hiệu kép được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng MabSelectSure-Sepharosa™ (cho thể đột biến khác_AAA) (GE Healthcare, Sweden) hoặc kappaSelect-Agarosa (cho thể đột biến AAA) (GE Healthcare, Sweden), sắc ký tương tác kỵ nước bằng cách sử dụng butyl-Sepharosa (GE Healthcare, Sweden) và sắc ký loại trừ kích thước Superdex 200 (GE Healthcare, Sweden).

Vắn tắt, dịch nổi nuôi cấy tế bào được lọc vô trùng được bắt giữ trên nhựa MabSelect SuRe được bổ sung chất đệm PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl và 2,7mM KCl, pH 7,4), được rửa bằng chất đệm làm cân bằng và được tách rửa với natri xitrat 25mM ở độ pH 3,0. Thể đột biến AAA được bắt giữ trên nhựa kappaSelect được làm cân bằng với Tris 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, được rửa với chất đệm làm cân bằng và được tách rửa với natri xitrat 25 mM pH 2,9. Các phần protein được tách rửa được gộp chung và được trung hòa với Tris 2M, pH 9,0. Thể gộp chung kháng thể được chuẩn bị cho sắc ký tương tác kỵ nước bằng cách bổ sung dung dịch amoni sulfat 1,6 M đến nồng độ cuối cùng của amoni sulfat 0,8 M và độ pH được điều chỉnh đến độ pH 5,0 bằng cách sử dụng axit axetic. Sau khi làm cân bằng nhựa butyl-

Sepharoza với natri axetat 35 mM, amoni sulfat 0,8 M, pH 5,0, kháng thể được áp dụng lên nhựa, được rửa với chất đệm làm cân bằng và được tách rửa với gradient tuyến tính đến natri axetat 35 mM độ pH 5,0. Kháng thể đặc hiệu kép chứa các phần được gộp chung và được tinh chế thêm bằng sắc ký loại trừ kích thước bằng cách sử dụng cột Superdex 200 26/60 GL (GE Healthcare, Sweden) được làm cân bằng với His 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Kháng thể đặc hiệu kép chứa các phần được cộng gộp, được cô đến lượng yêu cầu bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc Vivaspın (Sartorius Stedim Biotech S.A., France) và được lưu giữ ở nhiệt độ -80°C.

Bảng 2: Hiệu suất của kháng thể<VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép

	VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA)	VEGFang2-0016 (có đột biến AAA)
Dịch nổi độ chuẩn	64 µg/ml, (2 L = 128 mg)	không xác định (quy mô 2L)
Protein A (MabSelectSure)	118 mg (~ 70% monome)	không xác định
Kappa chọn lọc	không xác định	117 mg (~ 83% monome)
Butyl Sepharosa	60 mg	57 mg
SEC	35 mg (>95% monome)	38 mg (>95% monome)

Độ tinh khiết và tính toàn vẹn kháng thể được phân tích sau mỗi bước tinh chế bằng CE-SDS sử dụng kỹ thuật Labchip kênh dẫn vi lưu (Caliper Life Science, USA). 5µl dung dịch protein được điều chế cho phân tích CE-SDS bằng cách sử dụng Kit chất phản ứng biểu hiện Protein HT theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được phân tích trên hệ thống LabChip GXII sử dụng Chip biểu hiện Protein HT. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Phần mềm LabChip GX.

Bảng 3: Loại bỏ sản phẩm phụ điển hình bằng các bước tinh chế lần lượt khác nhau được xác định bằng CE-SDS.

Bước tinh chế	VEGFang2-0015						VEGFang2-0016					
	% diện tích đỉnh* * phân tích: CE-SDS (Caliper Labchip GXII)											
	mab	¾ ab	(HC) 2	½ ab	(LC)2	LC	mab	¾ ab	(H C) 2	½ ab	(L C) 2	LC
Chắc chắn chọn lọc Mab	55,7	19	10,6	9,8	3,5	0,9	-					

Chọn lọc Kappa	-						63	13,4	3,5	6,1	5,8	7,4
Butyl-Sepharoza	81,4	1,9	2,3	8,2	3,6	1,8	76,2	1,3	0,7	8,3	7,7	5,8
Superdex 200 SEC	92,4	1,8	2,6	1,4	0,5	0,5	99	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Lượng kết tụ của mẫu kháng thể được phân tích bằng SEC hiệu năng cao bằng cách sử dụng cột loại trừ kích thước phân tích Superdex 200 (GE Healthcare, Sweden) trong 2xPBS (Na₂HPO₄ 20mM, KH₂PO₄ 2mM, NaCl 274 mM và KCl 5,4 mM, pH 7,4) chất đệm chạy mẫu ở 25°C. 25µg protein được bơm lên cột ở tốc độ chảy bằng 0,75 ml/phút và được tách rửa đẳng điện ly trong 50 phút.

Theo cách tương tự kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> VEGFang2-0012 và VEGFang2-0201 được điều chế và được tinh chế với hiệu suất sau:

	VEGFang2-0012 (có đột biến AAA)	VEGFang2-0201 (không có đột biến AAA)
Độ chuẩn //lượng	-	36 µg/ml // 72 mg
Quy mô	2,1 L	2L
Protein A (MabSelectSure)	-	66 mg (~95 % monome)
kappaSelect	43 mg(~ 65 % monome)	-
Butyl Sepharoza	-	45 mg
SEC	14 mg	21 mg (> 98 % monome)
Hiệu suất hydroxylapatit	8,5 mg (> 98% monome)	
Tổng hiệu suất (thu hồi)	8,5 mg (20%)	21 mg (30%)

Tương tự, kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG4 có đột biến AAA và với đột biến SPLE (SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32), <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 có đột biến AAA(SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35) và <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 có đột biến AAA và với SPLE đột biến (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38) có thể được tổng hợp và được tinh chế theo cách tương tự.

Ví dụ 2

Phân tích và khả năng phát triển

Đo độ nhớt dựa trên DLS duy mô nhỏ.

Đo độ nhớt chủ yếu được tiến hành như được nêu trong (He, F. et al., Analytical Biochemical 399 (2009) 141-3). Vắn tắt, các mẫu được cô đến lượng protein khác nhau trong Arginin Suxinat 200 mM, pH 5,5, trước khi các hạt polystyren latex (đường kính 300 nm và polysorbat 20 (0,02% theo thể tích) được thêm vào. Mẫu được chuyển vào đĩa 384 lỗ quang học bằng cách ly tâm thông qua đĩa lọc và 0,4 μ m được thu hồi với dầu parafin. Đường kính biểu kiến của hạt latex được xác định bằng tán xạ ánh sáng động 25 °C. Độ nhớt của dung dịch có thể được tính là $\eta = \eta_0(rh/rh,0)$ (η : độ nhớt; η_0 : độ nhớt của nước; rh : bán kính thủy động học biểu kiến của hạt latex; $rh,0$: bán kính thủy động học của hạt latex trong nước).

Để so sánh các mẫu khác nhau ở cùng lượng, dữ liệu độ nhớt-nồng độ được khớp với với phương trình Mooney (phương trình 1) (Mooney, Colloid Sci, 1951; Monkos, Biochem. Biophys. Acta 1997) và số liệu được nội suy theo.

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{S\Phi}{1-K\Phi}\right) \text{ Phương trình 1}$$

(S: thông số tương tác thủy động học của protein; K: hệ số chèn lẫn; Φ : phần thể tích của protein được hòa tan)

Kết quả được thể hiện trong Fig. 2: VEGFang2-0016 có đột biến AAA trong phần Fc thể hiện độ nhớt thấp hơn ở tất cả các nhiệt độ được đo so với VEGFang2-0015 không có đột biến AAA trong phần Fc.

Nhiệt độ gây ngưng tụ DLS

Các mẫu được điều chế ở nồng độ 1 mg/ml trong Histidin/Histidin clorua 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, được chuyển vào trong đĩa 384 lỗ quang học bằng cách ly tâm thông qua đĩa lọc 0,4 μ m và được thu hồi bằng dầu parafin. Bán kính thủy động học được đo lặp lại bằng tán xạ ánh sáng động trong khi mẫu được làm nóng với tốc độ 0,05°C/phút từ 25°C đến 80°C. Nhiệt độ bắt đầu ngưng tụ được xác định là nhiệt độ tại đó bán kính thủy động học bắt đầu tăng. Kết quả được thể hiện trong Fig. 3. Trong Fig. 3 việc ngưng tụ của VEGFang2-0015 không có đột biến AAA đối với VEGFang2-0016

có đột biến AAA trong phần Fc được thể hiện. VEGFang2-0016 đã thể hiện nhiệt độ bắt đầu ngưng tụ là 61°C trong đó VEGFang2-0015 không có đột biến AAA đã thể hiện nhiệt độ bắt đầu là 60°C.

Khoảng thời gian DLS

Mẫu được điều chế ở nồng độ 1mg/ml trong His 20 mMtidin/Histidin clorua, NaCl 140 mM, pH 6,0, được chuyển vào trong đĩa 384 lỗ quang học bằng cách ly tâm thông qua đĩa lọc 0,4 μ m và được thu hồi với dầu parafin. Bán kính thủy động học được đo lặp lại bằng cách tán xạ ánh sáng động trong khi mẫu được giữ ở nhiệt độ không đổi bằng 50°C lên đến 145 giờ. Trong thử nghiệm này, xu hướng ngưng tụ của protein tự nhiên, không gấp cuộn ở nhiệt độ cao sẽ dẫn đến việc gia tăng đường kính hạt trung bình qua thời gian. Phương pháp trên cơ sở DLS rất nhạy với khối kết tụ do chúng góp phần theo tỷ lệ vào cường độ ánh sáng tán xạ. Ngay cả sau 145 giờ ở 50°C (nhiệt độ gần với nhiệt độ bắt đầu ngưng tụ, xem ở trên), việc gia tăng đường kính hạt trung bình chỉ ít hơn 0,5 nm được phát hiện cho cả VEGFang2-0015 và VEGFang2-0016

7 ngày được lưu giữ ở nhiệt độ 40°C ở nồng độ 100 mg/ml (gia tăng HMW)

Các mẫu được cô đến nồng độ cuối cùng bằng 100 mg/ml trong Arginin Suxinat 200 mM, pH 5,5, được lọc tiệt trùng và được lưu giữ tĩnh ở nhiệt độ 40°C trong 7 ngày. Trước khi và sau khi lưu giữ, nồng độ của loại khối lượng phân tử cao và thấp (HMW và LMW, lần lượt) được xác định bằng sắc ký loại trừ kích thước. Sự khác biệt về lượng HMW và LMW giữa mẫu lưu giữ và mẫu được đo ngay sau khi điều chế được báo cáo là “tăng HMW” và “tăng LMW, lần lượt. Kết quả được thể hiện trong bảng 4 và Fig. 4, mà thể hiện là VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) thể hiện sự giảm mạnh hơn của đỉnh chính và tăng HMW cao hơn so với VEGF Ang2-0016 (có đột biến AAA). Bất ngờ là VEGF Ang2-0016 (có đột biến AAA) đã thể hiện xu hướng ngưng tụ thấp so với VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA).

Bảng 4: Delta chính, đỉnh HMW và LMW sau 7 ngày ở 40°C

	Delta diện tích %(40°C-(-80°C))		
	Đỉnh chính	HMW	LMW
VEGFang2-0015 (-Đột biến AAA)	-3,56	2,89	0,67
VEGFang2-0016 (+Đột biến AAA)	-1,74	1,49	0,25

Phân tích chức năng kháng thể đặc hiệu kép kháng VEGF và kháng Ang2 được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử dụng thiết bị BIAcore® T100 hoặc T200 (GE Healthcare) ở 25°C. Hệ thống BIAcore® được thiết lập để nghiên cứu sự tương tác phân tử. Kỹ thuật SPR được dựa trên việc xác định chỉ số khúc xạ gần với bề mặt của chip cảm biến sinh học được phủ vàng. Sự thay đổi về chỉ số khúc xạ cho thấy sự thay đổi khối lượng trên bề mặt gây ra bởi sự tương tác của phối tử cố định với chất phân tích được bơm trong dung dịch. Việc gia tăng khối lượng nếu phân tử gắn kết phối tử cố định trên bề mặt, và ngược lại, việc làm giảm khối lượng trong trường hợp sự phân ly của chất phân tích từ phối tử cố định (phản ánh sự phân ly phức hợp). SPR cho phép kiểm soát thời gian thực liên tục của sự gắn kết phối tử/chất phân tích và vì thế việc xác định hằng số tốc độ liên kết (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và của hằng số cân bằng (KD).

Ví dụ 3

Liên kết với VEGF, Ang2, FcγR và FcRn

Ái lực động học chất đồng phân VEGF bao gồm việc đánh giá phản ứng chéo loài

Khoảng 12000 đơn vị cộng hưởng (RU) của hệ bắt giữ (10 µg/ml đề kháng F(ab')₂ người; Mã thứ tự: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) được ghép đôi trên chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin do GE Healthcare cung cấp. Mẫu và chất đệm hệ thống là PBS-T (10 mM nước muối được đệm phosphat bao gồm 0,05% Tween20) pH 7,4. Thet tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C - và phòng bể mẫu được thiết lập đến 12°C - và được môi bằng chất đệm chạy mẫu hai lần. Kháng thể đặc hiệu kép được bắt giữ bằng cách tiêm 50 nM dung dịch trong 30 giây ở tốc độ dòng chảy 5 µl/phút. Sự liên kết được đo bằng cách tiêm hVEGF121 người, mVEGF120 chuột hoặc rVEGF164 chuột rattus với các nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 300 giây ở tốc độ dòng chảy 30 µl/phút bắt đầu với với 300 nM trong tỷ lệ pha loãng 1:3. Pha phân ly được theo dõi lên đến 1200 giây và được khởi động bằng cách chuyển từ dung dịch mẫu sang chất đệm chạy mẫu. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa 60 giây với dung dịch Glyxin độ pH 2,1 ở tốc độ chảy bằng 30 µl/phút. Sự khác biệt chỉ số khúc xạ khối được điều chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt bề mặt F(ab')₂ người kháng đề. Dung dịch tiêm trống cũng được

trừ đi (= tham chiếu kép). Từ việc trừ K_D biểu kiến và các thông số động học khác mô hình Langmuir 1:1 được dùng. Kết quả được thể hiện trong bảng 5.

Dung dịch ái lực Ang2 bao gồm việc đánh giá phản ứng chéo loài

Dung dịch ái lực đo ái lực của sự tương tác bằng cách xác định hàm nồng độ thành phần tương tác tự do trong hỗn hợp cân bằng. Thử nghiệm dung dịch ái lực bao gồm hỗn hợp của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>, được giữ ở nồng độ không đổi, với phối tử (= Ang2) ở nồng độ khác nhau. Đơn vị cộng hưởng tối thiểu có thể (ví dụ 17000 đơn vị cộng hưởng (RU)) của kháng thể được cố định trên bề mặt chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin do GE Healthcare cung cấp. Mẫu và chất đệm hệ thống là HBS-P độ pH 7,4. Tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C và khối mẫu đến 12°C và được môi với chất đệm chạy mẫu hai lần. Để tạo ra sự gia tăng đường cong hiệu chuẩn nồng độ của Ang2 được bơm vào trong tế bào đo dòng BIAcore chứa kháng thể đặc hiệu kép VEGF-ANG-2> cố định. Lượng Ang2 gắn kết được xác định là đơn vị cộng hưởng (RU) và được vẽ đồ thị đối với các nồng độ. Dung dịch của mỗi phối tử (11 nồng độ từ 0 đến 200 nM đối với VEGF-ANG-2> kháng thể đặc hiệu kép) được ủ với 10 nM Ang2 và được phép đạt đến sự cân bằng ở nhiệt độ trong phòng. Nồng độ Ang2 tự do được xác định từ đường cong hiệu chuẩn được tạo ra trước khi và sau khi đo đáp ứng của dung dịch với lượng Ang2 đã biết. Sự phù hợp 4 thông số được thiết lập với XLFit4 (Phần mềm IDBS) bằng cách sử dụng Model 201 sử dụng nồng độ Ang2 tự do làm trục y và nồng độ kháng thể được dùng để ức chế làm trục x. Ái lực được tính toán bằng cách xác định điểm uốn của đường cong này. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa đúng 30 phút với dung dịch H_3PO_4 0,85% ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút. Sự sai khác chỉ số khúc xạ khối được điều chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt được ghép cặp trống. Kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Ái lực trạng thái tĩnh FcRn

Để đo FcRn, ái lực trạng thái tĩnh được dùng để so sánh kháng thể đặc hiệu kép kháng lẫn nhau. FcRn người được phả loãng trong chất đệm bắt cặp (10 μ g/ml, Na-Axetat độ pH 5,0) và cố định trên Chip C1 (GE Healthcare BR-1005-35) bằng quy trình cố định được hướng đích bằng cách sử dụng phần mềm BIAcore đến đáp ứng cuối bằng 200 RU. Tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C và khối mẫu đến 12°C và được môi với chất đệm chạy mẫu hai lần. Mẫu và chất đệm hệ thống là PBS-T (10 mM nước muối

được đệm phosphat bao gồm 0,05% Tween20) độ pH 6,0. Để đánh giá nồng độ IgG khác nhau với mỗi kháng thể, nồng độ bằng 62,5 nM, 125 nM và 250 nM, 500 nM được điều chế. Lưu lượng được thiết lập đến 30 μ l/phút và các mẫu khác nhau được bơm liên tiếp lên trên bề mặt chip lựa chọn 180 giây thời gian liên kết. Bề mặt được tái tạo bằng PBS-T được bơm tại pH 8 trong 60 giây ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút. Sự sai khác chỉ số khúc xạ khối được điều chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt trống. Chất đệm tiêm cũng được trừ đi (= tham chiếu kép). Từ việc trừ ái lực trạng thái tĩnh phương pháp từ phần mềm đánh giá Bia được dùng. Vấn tất, các giá trị RU (RU tối đa) được vẽ đồ thị đối với nồng độ được phân tích, thu được đường cong đáp ứng liều. Dựa trên sự phù hợp 2 thông số, đường tiệm cận trên được tính, cho phép xác định giá trị RU bán tối đa và ái lực. Kết quả được thể hiện trong Fig. 5 và bảng 7. Theo cách tương tự ái lực với FcRn xyno, chuột và thỏ có thể được xác định.

Đo FcgammaRIIIa

Để đo FcgammaRIIIa thử nghiệm gắn kết trực tiếp được dùng. Khoảng 3000 đơn vị cộng hưởng (RU) của hệ bắt giữ (1 μ g/ml Penta-His; Quiagen) được tiếp hợp trên chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin do GE Healthcare cung cấp. Mẫu và chất đệm hệ thống là HBS-P+ pH 7,4. Tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C - và khối mẫu đến 12°C - và được mỗi bằng chất đệm chạy mẫu hai lần. FcgammaRIIIa -His-thụ thể được bắt giữ bằng cách bơm 100 nM dung dịch trong 60 giây ở tốc độ dòng chảy 5 μ l/phút. Sự gắn kết được đo bằng cách tiêm 100 nM kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đối chứng đặc hiệu đơn (kháng Dig đối với phân nhóm IgG1 và kháng thể phân nhóm IgG4) trong 180 giây ở tốc độ dòng chảy 30 μ l/. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 120 giây bằng dung dịch glyxin có độ pH 2,5 ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút. Do sự gắn kết FcgammaRIIIa khác với mô hình Langmuir 1:1, chỉ có sự gắn kết/không gắn kết được xác định trong thử nghiệm này. Trong cách tương tự sự gắn kết FcgammaRIa, và FcgammaRIIa có thể được xác định. Kết quả được thể hiện trong Fig. 6, trong đó nó dựa theo rằng bằng cách đưa vào các đột biến P329G LALA không liên kết thêm với FcgammaRIIIa có thể được phát hiện.

Đánh giá liên kết VEGF- và Ang2- độc lập với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>

Khoảng 3500 đơn vị cộng hưởng (RU) của hệ bắt giữ (10 µg/ml IgG người kháng dê; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) được tiếp hợp trên chip CM4 (GE Healthcare BR-1005-34) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin do GE Healthcare cung cấp. Mẫu và chất đệm hệ thống là PBS-T (10 mM nước muối được đệm phosphat bao gồm 0,05% Tween20) độ pH 7,4. Nhiệt độ của tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C và của khối mẫu đến 12°C. Trước khi bắt giữ, tế bào đo dòng được mỗi bằng chất đệm chạy mẫu hai lần.

Kháng thể đặc hiệu kép được bắt giữ bằng cách bơm 10 nM dung dịch trong 60 giây ở tốc độ dòng chảy 5 µl/phút. Sự gắn kết độc lập của mỗi phối tử với kháng thể đặc hiệu kép được phân tích bằng cách xác định khả năng gắn kết tích cực với mỗi phối tử, được bổ sung liên tiếp hoặc đồng thời (lưu lượng 30 µl/phút):

1. Tiêm VEGF người với nồng độ 200 nM trong 180 giây (cho biết sự gắn kết đơn của kháng nguyên).
2. Tiêm Ang2 người với nồng độ 100 nM trong 180 giây (cho biết sự gắn kết đơn của kháng nguyên).
3. Tiêm VEGF người với nồng độ 200 nM trong 180 giây sau đó tiêm thêm Ang2 người với nồng độ 100 nM trong 180 giây (cho biết sự gắn kết Ang2 trong điều kiện có mặt VEGF).
4. Tiêm Ang2 người với nồng độ 100 nM trong 180 giây sau đó là tiêm thêm VEGF người với nồng độ 200 nM (cho biết sự gắn kết của VEGF trong điều kiện có mặt Ang2).
5. Tiêm đồng thời VEGF người với nồng độ 200 nM và của Ang2 người với nồng độ 100 nM trong 180 giây (cho biết sự gắn kết của VEGF và của Ang2 ở cùng thời gian).

Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 60 giây với dung dịch MgCl₂ 3m ở tốc độ chảy bằng 30µl/phút. Sự sai khác chỉ số khúc xạ khối được điều chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt IgG người kháng dê.

Kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết cả kháng nguyên độc lập lẫn nhau nếu tín hiệu cuối cùng tạo thành của các phương pháp 3, 4 và 5 bằng hoặc tương tự với tổng các tín hiệu cuối cùng riêng rẽ của các phương pháp 1 và 2. Kết quả được thể hiện

trong bảng 9, trong đó cả kháng thể VEGFang2-0016, VEGFang2-0012 được thể hiện là có khả năng gắn kết độc lập với nhau với VEGF và ANG2

Đánh giá gắn kết VEGF- và Ang2-đồng thời với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>

Thứ nhất, khoảng 1600 đơn vị cộng hưởng (RU) của VEGF (20µg/ml) được tiếp hợp trên chip CM4 (GE Healthcare BR-1005-34) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin do GE Healthcare cung cấp. Mẫu và chất đệm hệ thống là PBS-T (10 mM nước muối được đệm phosphat bao gồm 0,05% Tween 20) pH 7,4. Tế bào đo dòng được thiết lập đến 25°C và khối mẫu đến 12°C và được môi với chất đệm chạy mẫu hai lần. Thứ hai, 50nM dung dịch kháng thể đặc hiệu kép được bơm trong 180 giây ở tốc độ dòng chảy 30µl/phút. Thứ hai, hAng-2 được bơm trong 180 giây ở tốc độ dòng chảy 30µl/phút. Đáp ứng gắn kết của hAng-2 phụ thuộc vào lượng kháng thể đặc hiệu kép được gắn kết với VEGF và thể hiện sự gắn kết đồng thời. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 60 giây với dung dịch H3PO4 0,85% ở tốc độ chảy bằng 30µl/phút. Sự gắn kết đồng thời được thể hiện bằng tín hiệu gắn kết đặc hiệu bổ sung của hAng2 với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> được gắn kết VEGF trước đó. Với cả hai kháng thể đặc hiệu kép VEGFang2-0015 và liên kết VEGFang2-0016 đồng thời VEGF- và Ang2- với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> có thể được phát hiện (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 5: Kết quả: Ái lực động học với chất đồng phân VEGF từ các loài khác nhau

	VEGFang2-0015 -ái lực biểu kiến	VEGFang2-0016 -ái lực biểu kiến	VEGFang2-0012 -ái lực biểu kiến	VEGFang2-0201 -ái lực biểu kiến
VEGF người 121	≤1 pM (ngoài phần mô tả của Biacore)	≤1 pM (ngoài phần mô tả của Biacore)	≤1 pM (ngoài phần mô tả của Biacore)	≤1 pM (ngoài phần mô tả của Biacore)
VEGF 120 chuột	không gắn kết	không gắn kết	không gắn kết	không gắn kết
VEGF 164 chuột	13 nM	14 nM	24 nM	35 nM

Bảng 6: Kết quả: Ái lực dung dịch với Ang2

	VEGFang2-0015 KD [nM]	VEGFang2-0016 KD [nM]	VEGFang2-0012 KD [nM]	VEGFang2-0201 KD [nM]
Ang2 người	8	20	20	tbd
Ang2 chó	5	13	10	tbd
Ang2 chuột	8	13	8	tbd
Ang2 thỏ	4	11	8	tbd

Bảng 7: Kết quả: Ái lực với FcRn của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>

	VEGFang2-0015 [ái lực]	VEGFang2-0016 [ái lực]	VEGFang2-0012 [ái lực]	VEGFang2-0201 [ái lực]
FcRn người	0,8 μ M	không gắn kết	không gắn kết	0,8 μ M
FcRn chó	0,9 μ M	không gắn kết	không gắn kết	1,0 μ M
FcRn chuột	0,2 μ M	không gắn kết	không gắn kết	0,2 μ M

Bảng 8: Kết quả liên kết với FcgammaRI – IIIa

	VEGFang2-0015	VEGFang2-0016	VEGFang2-0012	VEGFang2-0201
Fc γ RIa	Không gắn kết	Không gắn kết	Gắn kết	Gắn kết
Fc γ RIIa	Không gắn kết	Không gắn kết	Gắn kết	Gắn kết
Fc γ RIIIa	Không gắn kết	Không gắn kết	Gắn kết	Gắn kết

Bảng 9: Kết quả: sự gắn kết độc lập của VEGF- và Ang2 với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>

	1) Ang2 [RUmax]	2) VEGF [RUmax]	3) đầu tiên VEGF sau đó Ang2 [RUmax]	4) đầu tiên Ang2 sau đó VEGF [RUmax]	5) Tiêm đồng thời Ang2+VEGF [RUmax]
VEGFang2-0016	174	50	211	211	211
VEGFang2-0012	143	43	178	177	178

Ví dụ 4

Phổ khối

Phần này mô tả sự mô tả đặc điểm của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> với sự gia cường trên kết cấu chuẩn. Cấu trúc chủ yếu được mong đợi được khẳng định bằng phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> được deglycosyl hóa, và nguyên vẹn hoặc được phân cắt IdeS (enzym phân hủy IgG-

của *S. pyogenes*). Việc phân cắt IdeS được tiến hành với 100µg kháng thể được tinh chế được ủ với 2 µg IdeS proteaza (Roche) trong 100 mmol/L NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH 7,1 ở 37°C trong 5 giờ. Sau đó, kháng thể được deglycosyl hóa với N-Glycosidaza F, Neuraminidaza và O-glycosidaza (Roche) trong 100 mmol/L NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄, pH 7,1 ở 37°C lên đến 16 giờ ở nồng độ protein bằng 1 mg/ml và sau đó được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Khối lượng tổng được xác định qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được lắp nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Khối lượng thu được đối với phân tử được phân hủy IdeS, deglycosyl hóa (Bảng 10), hoặc nguyên vẹn, deglycosyl hóa (bảng 11) tương ứng với khối lượng được dự đoán được suy ra từ trình tự axit amin đối với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> gồm hai chuỗi nhẹ khác nhau LC_{Ang2} và LC_{Lucentis}, và hai chuỗi nặng khác nhau HC_{Ang2} và HC_{Lucentis}.

Bảng 10: Khối lượng của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> VEGFang2-0201 (không có đột biến AAA) và VEGFang2-0012 (có đột biến AAA) được deglycosyl hóa và được phân hủy IdeS

Mẫu	F(ab') ₂ của kháng thể đặc hiệu kép VEGF-ANG-2>		Fc được deglycosyl hóa của kháng thể đặc hiệu kép VEGF-ANG-2>	
	Khối lượng trung bình dự đoán [Da]	Khối lượng trung bình quan sát [Da]	Khối lượng trung bình dự đoán [Da]	Khối lượng trung bình quan sát [Da]
VEGFang2-0201	99360,8	99360,7	47439,2	47430,1
VEGFang2-0012	99360,8	99361,1	47087,7	47082,0

Bảng 11: Khối lượng của kháng thể <VEGF/ANG2> VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) và VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) được deglycosyl hóa

	Kháng thể đặc hiệu kép VEGF-ANG-2> deglycosyl hóa	
	Khối lượng trung bình dự đoán [Da]	Khối lượng trung bình quan sát [Da]
VEGFang2-0016	146156,9	146161,2
VEGFang2-0015	146505,3	146509,4

Ví dụ 5

Sắc ký Fc-Rn

Ghép cặp với streptavidin sepharosa:

Một gam streptavidin sepharosa (GE Healthcare) được thêm vào thụ thể được biotinyl hóa và được thẩm tách và được ủ trong hai giờ trong khi lắc. Thụ thể được bắt nguồn từ sepharosa được nạp lên cột 1 ml XK (GE Healthcare).

Sắc ký sử dụng ái lực cột FcRn:

Điều kiện:

Đường kính cột: 50 mm x 5 mm

chiều cao hạt: 5 cm

tải trọng: 50 µg mẫu

chất đệm làm cân bằng: MES 20 mM, với 1NaCl 50 mM, được điều chỉnh đến pH 5,5

chất đệm tách rửa: Tris/HCl 20 mM, với NaCl 150 mM, được điều chỉnh đến pH 8,8

tách rửa: 7,5 CV chất đệm làm cân bằng, trong 30 CV đến 100 % chất đệm tách rửa, 10 CV chất đệm tách rửa

Sắc ký ái lực cột Hu FcRn

Trong thời gian lưu trong bảng sau đây của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> trên cột ái lực bao gồm FcRn người được nêu. Dữ liệu thu được dùng các điều kiện ở trên. Trong thời gian lưu trong bảng dưới đây của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> trên FcRn người được nêu.

Bảng 12: Kết quả: thời gian lưu của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>

Kháng thể	Thời gian lưu [thời gian]
VEGF _{Ang2} -0015 (không có đột biến AAA)	78,5
VEGF _{Ang2} -0201 (không có đột biến AAA)	78,9
VEGF _{Ang2} -0012 (có đột biến AAA)	2,7 (khuyết-đỉnh)
VEGF _{Ang2} -0016 (có đột biến AAA)	2,7 (khuyết-đỉnh)

Ví dụ 6

Đặc tính dược động học (PK)

Dữ liệu PK với Fc-Rn chuột chuyển gen đối với FcRn người

Trong pha sống

Nghiên cứu bao gồm chuột C57BL/6J cái (nền); thiếu FcRn chuột, nhưng bán hợp tử chuyển gen của người FcRn (huFcRn, dòng 276 -/tg)

Phần 1

Tất cả chuột được tiêm một lần vào mắt phải với lượng 2 μ L/con dung dịch thích hợp (tức là 21 μ g hợp chất/con (VEGF_{Ang2}-0015 (không có đột biến AAA) hoặc 23,6 μ g hợp chất/con (VEGF_{Ang2}-0016 (có đột biến AAA)).

Chuột được chia thành 2 nhóm với 6 con mỗi nhóm. Mẫu máu được lấy từ nhóm 1 tại thời điểm 2, 24 và 96 giờ và từ nhóm 2 tại thời điểm 7, 48 và 168 giờ sau khi tiêm.

Việc tiêm vào trong thủy dịch của mắt phải chuột được tiến hành bằng cách sử dụng hệ NanoFil Microsyringe để tiêm nanolit do World Precision Instruments, Inc., Berlin, Germany cung cấp. Chuột được giết bằng 2,5% Isofluran và để quan sát mắt chuột kính hiển vi Leica MZFL 3 với độ phóng đại 40 lần và ánh sáng vòng với bóng đèn Leica KL 2500 LCD được dùng. Sau đó, 2 μ L hợp chất được tiêm bằng cách sử dụng kim tiêm cỡ 35.

Máu được thu gom qua đám rối tĩnh mạch sau cầu mắt của mắt đối diện từ mỗi con để xác định nồng độ hợp chất trong huyết thanh.

Ít nhất 50 μ L mẫu huyết thanh thu được từ máu sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách ly tâm (9300xg) ở 4°C trong 3 phút. Mẫu huyết thanh được làm đông lạnh trực tiếp sau khi ly tâm và được lưu giữ đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích. Mẫu được xử lý của động vật trong nhóm 1 được phân lập 96 giờ sau khi xử lý và của động vật thuộc nhóm 2 168 giờ sau khi xử lý. Các mẫu được lưu giữ đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích.

Phần 2

Tất cả các con chuột được tiêm một lần qua đường tĩnh mạch qua tĩnh mạch đuôi với 200 μ L/con bằng dung dịch thích hợp (tức là 21 μ g hợp chất/con (VEGF_{Ang2}-0015

(không có đột biến AAA) hoặc 23,6 µg hợp chất/con (VEGF_{Ang2}-0016 (có đột biến AAA)).

Chuột được chia thành 2 nhóm với 5 con mỗi nhóm. Mẫu máu được lấy từ nhóm 1 tại thời điểm 1, 24 và 96 giờ và từ nhóm 2 tại thời điểm 7, 48 và 168 giờ sau khi tiêm. Máu được thu gom qua đám rối tĩnh mạch sau cầu mắt từ mỗi con để xác định nồng độ hợp chất trong huyết thanh.

Ít nhất 50 µl mẫu huyết thanh thu được từ máu sau khi 1 giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách ly tâm (9300xg) ở 4°C trong 3 phút. Mẫu huyết thanh được làm đông lạnh ngay sau khi ly tâm và được lưu giữ đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích.

Chế phẩm của dịch thủy phân mắt toàn phần (chuột)

Dịch thủy phân mắt được thu được bằng cách sự phân hủy lý hóa mắt toàn phần từ động vật phòng thí nghiệm. Để phá vỡ cơ học, mỗi mắt được chuyển vào trong lọ nhỏ loại 1,5ml có đáy hình nón. Sau khi làm đông lạnh và rã đông, mắt được rửa một lần bằng 1ml chất đệm rửa tế bào (Bio-Rad, Bio-Plex Cell Lysis Kit, Cat. No. 171-304011). Trong bước sau đây, 500µL chất đệm tiêu tế bào mới được điều chế được bổ sung và mắt được nghiền bằng cách sử dụng 1,5ml chày nghiền mô (Kimble Chase, chày 1,5ml, Art. No. 749521-1500). Hỗn hợp sau đó được làm đông lạnh và rã đông năm lần và được nghiền lại. Để tách sản phẩm phân giải ra khỏi mẫu mô còn lại được ly tâm trong 4 phút ở tốc độ 4500 g. Sau khi ly tâm dịch nổi được thu gom và được lưu giữ ở -20°C cho đến khi phân tích thêm trong ELISA định lượng.

Phân tích

Nồng độ kháng thể <VEGF/ANG2> ở huyết thanh và dịch thủy phân mắt chuột được xác định bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn kết enzym (ELISA)

Để định lượng kháng thể <VEGF/ANG2> trong mẫu huyết thanh và dịch thủy phân mắt của chuột, thử nghiệm miễn dịch bán kẹp theo chuỗi pha rắn chuẩn kháng thể đơn dòng với biotiny hóa và được digoxigen hóa được dùng làm kháng thể bắt giữ và phát hiện được tiến hành. Để khẳng định tính toàn vẹn của sự đặc hiệu kép của chất phân tích kháng thể bắt giữ được biotiny hóa nhận diện vị trí gắn kết kháng VEGF- trong đó kháng thể phát hiện được digoxigen hóa sẽ gắn kết với vị trí gắn kết kháng Ang2 của chất phân tích. Phức hợp miễn dịch gắn kết của kháng thể bắt giữ, chất phân

tích và kháng thể phát hiện trên pha rắn của đĩa vi chuẩn được phủ streptavidin (SA-MTP) sau đó được phát hiện với peroxidaza cây cải ngựa được ghép cặp với kháng thể kháng digoxigenin. Sau khi rửa nguyên liệu không gắn kết ra khỏi SA-MTP và bổ sung chất ABTS, tín hiệu thu được tỷ lệ với lượng chất phân tích được gắn kết trên pha rắn của SA-MTP. Việc định lượng sau đó được thực hiện bằng cách chuyển hóa tín hiệu đo được của mẫu thành nồng độ để chỉ bộ định chuẩn được phân tích song song.

Trong bước thứ nhất SA-MTP được phủ với 100µL/lỗ của kháng thể bất giữ được biotinyl hóa dung dịch (mAb<Id<VEGF>>M-2,45,51-IgG-Bi(DDS)) với nồng độ 1µg/ml trong một giờ ở tốc độ 500 vòng/phút trên thiết bị lắc MTP. Đồng thời bộ định chuẩn, mẫu QC và mẫu được điều chế. Bộ định chuẩn và mẫu QC được pha loãng đến 2% nền huyết thanh; mẫu được pha loãng cho đến khi tín hiệu theo chuỗi tuyến tính của bộ định chuẩn.

Sau khi bọc SA-MTP bằng kháng thể bất giữ, đĩa được rửa ba lần bằng chất đệm rửa và 300µL/lỗ. Sau đó 100µL/lỗ của bộ định chuẩn, Mẫu QC và mẫu được hút bằng pipet trên SA-MTP và được ủ lần nữa trong giờ ở 500 vòng/phút. Chất phân tích hiện được gắn kết với vị trí gắn kết kháng VEGF của nó qua kháng thể bất giữ với pha rắn của SA-MTP. Sau khi ủ và việc loại bỏ chất phân tích không gắn kết bằng cách rửa đĩa 100µL/lỗ của kháng thể phát hiện thứ nhất (mAb<Id-<Ang2>>M-2,6,81-IgG-Dig(XOSu)) với nồng độ 250ng/ml được thêm vào SA-MTP. Một lần nữa, đĩa được ủ trong một giờ ở tốc độ 500 vòng/phút trên máy lắc. Sau khi rửa, kháng thể phát hiện thứ hai (pAb<Digoxigenin>S-Fab-POD (poly)) ở nồng độ 50 mU/ml với lượng 100µL/lỗ được thêm vào các lỗ của SA-MTP và đĩa được ủ lần nữa trong một giờ ở 500 vòng/phút. Sau bước rửa cuối cùng để loại bỏ lượng dư kháng thể phát hiện, 100 µL/lỗ chất (ABTS) được thêm vào. Thử tiếp hợp kháng thể-enzym xúc tác cho phản ứng tạo màu của chất ABTS®. Tín hiệu sau đó được đo bằng thiết bị đọc ELISA ở chiều dài bước sóng 405 nm (chiều dài bước sóng tham chiếu: 490 nm ([405/490] nm)).

Đánh giá được động học

Các thông số được động học được tính bằng phân tích không phân cấp, sử dụng chương trình đánh giá được động học WinNonlin™ (Pharsight), phiên bản 5,2,1.

Kết quả: A) Nồng độ huyết thanh

Kết quả các nồng độ huyết thanh được thể hiện trong Các bảng 13 đến 16 và Fig. 7B đến 7C

Bảng 13: VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA): So sánh nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt và trong tĩnh mạch

	Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt	Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong tĩnh mạch
ID	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]
1h		17,7
2h	9,8	
7h	10,4	12,1
24h	6,4	8,3
48h	6,5	6,9
96h	3,4	4,1
168h	2,9	2,7

Bảng 14: VEGFang2-0016 (có đột biến AAA): So sánh nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt và trong tĩnh mạch

	Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt	Nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong tĩnh mạch
ID	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]
1h		18,4
2h	7,0	
7h	8,7	10,0
24h	2,2	3,3
48h	1,0	1,0
96h	0,1	0,1
168h	0,0	0,0

Bảng 15: VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) và VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) : So sánh nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt

	VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA)	VEGFang2-0016 (có đột biến AAA)
ID	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]
2h	9,8	7,0
7h	10,4	8,7
24h	6,4	2,2
48h	6,5	1,0
96h	3,4	0,1
168h	2,9	0,0

Bảng 16: VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) và VEGFang2-0016 (có đột biến AAA): So sánh nồng độ huyết thanh sau khi dùng trong mắt

	VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA)	VEGFang2-0016 (có đột biến AAA)
ID	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]	Nồng độ trung bình [$\mu\text{g/ml}$]
1h	17,7	18,4
7h	12,1	10,0
24h	8,3	3,3
48h	6,9	1,0
96h	4,1	0,1
168h	2,7	0,0

Kết quả: B) Nồng độ trong dịch thủy phân mắt của mắt trái và phải

Kết quả về các nồng độ trong dịch thủy phân mắt được thể hiện trong các bảng 17 đến 18 và các Fig. 7D đến 7E

Bảng 17a: Nồng độ của VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) trong dịch thủy phân mắt sau khi nhỏ vào trong mắt ở mắt phải

Giá trị nồng độ trung bình từ n=6 chuột		
ID		nồng độ trung bình [ng/ml]
96 giờ	Mắt trái	8,7
	Mắt phải	46,1
168 giờ	Mắt trái	4,3
	Mắt phải	12,9

Bảng 17b: Nồng độ VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) trong dịch thủy phân mắt sau khi dùng trong tĩnh mạch

Giá trị nồng độ trung bình từ n=5 chuột		
ID	nồng độ trung bình [ng/ml]	
96 giờ	Mắt trái	4,2
	Mắt phải	7,5
168 giờ	Mắt trái	3,4
	Mắt phải	6,1

Bảng 18a: Nồng độ VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) trong dịch thủy phân mắt sau khi nhỏ và mắt trong mắt phải

Giá trị nồng độ trung bình từ n=5 chuột		
ID	nồng độ trung bình [ng/ml]	
96 giờ	Mắt trái	0,3
	Mắt phải	34,5
168 giờ	Mắt trái	0,1
	Mắt phải	9,0

Bảng 18b: Nồng độ VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) trong dịch thủy phân mắt sau khi dùng trong tĩnh mạch

Giá trị nồng độ trung bình từ n=5 chuột		
ID	nồng độ trung bình [ng/ml]	
96 giờ	Mắt trái	0,0
	Mắt phải	0,1
168 giờ	Mắt trái	0,0
	Mắt phải	0,1

Tóm tắt kết quả

Sau khi dùng trong mắt, kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> theo sáng chế VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) thể hiện nồng độ tương tự (sau khi 96 và 168 giờ) trong dịch thủy phân mắt khi so với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> không có đột biến AAA VEGFang2-0015.

Cũng sau khi dùng trong mắt kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> theo sáng chế VEGFang2-0016 (có đột biến AAA) còn thể hiện thời gian thanh thải nhanh hơn và thời gian bán thải trong huyết thanh ngắn hơn khi so với kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> không có đột biến AAA VEGFang2-0015.

Ví dụ 7

Thử nghiệm tạo mạch gói nhỏ ở giác mạc chuột

Để thử nghiệm kháng thể đặc hiệu kép <VEGF/ANG2> có tác dụng kháng sự hình thành mạch với kháng thể kháng VEGF VH và VL của SEQ ID NO: 7 và 8 tương ứng và kháng thể kháng ANG2 VH và VL của SEQ ID NO: 15 và 16 trên sự tạo mạch bị kích ứng bởi VEGF in vivo, các tác giả sáng chế tiến hành thử nghiệm tạo mạch giác mạc chuột. Trong thử nghiệm này đĩa Nylaflo được nhúng VEGF được cấy ghép vào trong ổ giác mạc thiếu mạch ở khoảng cách cố định với mạch máu rìa. Các mạch ngay lập tức phát triển vào trong giác mạc hướng đến gradient VEGF phát triển. Chuột Balb/c cái 8 đến 10 tuần tuổi được mua từ Charles River, Sulzfeld, Germany. Tiến trình được cải biến theo phương pháp được mô tả bởi Rogers, M.S., et al., Nat. Protoc. 2 (2007) 2545-2550. Vắn tắt, các gói nhỏ với chiều rộng bằng khoảng 500µm chuẩn bị dưới kính hiển vi ở khoảng 1 mm từ rìa đến đỉnh của giác mạc bằng cách sử dụng dao mổ và nhíp nhọn trong chuột bị gây mê. Đĩa (Nylaflo®, Pall Corporation, Michigan) có đường kính bằng 0,6mm được cấy và bề mặt của diện tích cấy được làm trơn. Đĩa này được ủ trong yếu tố tăng trưởng tương ứng hoặc chất dẫn thuốc trong ít nhất 30 phút. Sau 3, 5 và 7 ngày (hoặc theo cách khác chỉ sau 3, 5 hoặc 7 ngày), mắt được chụp ảnh và đáp ứng mạch được đo. Thử nghiệm được định lượng bằng cách trừ tỷ lệ % diện tích của các mạch mới trong mỗi tổng diện tích giác mạc.

Đĩa được nạp 300ng VEGF hoặc với PBS làm đối chứng và cấy ghép trong 7 ngày. Sự sinh trưởng nhanh hơn của mạch từ rìa đến đĩa được theo dõi qua thời gian vào ngày 3, 5 và/hoặc 7. Một ngày trước khi cấy ghép đĩa kháng thể được dùng qua đường tĩnh mạch với liều lượng bằng 10 mg/kg (do việc dùng trong mắt VEGFang2-0015 (không có đột biến AAA) ổn định huyết thanh mà chỉ khác với VEGFang2-0016 bởi đột biến AAA và có các VH và VL kháng VEGF và kháng ANG2 giống nhau để tạo ra hiệu quả, được dùng làm chất thay thế) để thử nghiệm hiệu quả kháng sự hình thành mạch lên sự tạo mạch in vivo được cảm ứng bởi VEGF. Các chuột trong nhóm đối chứng tiếp nhận chất dẫn thuốc. Thể tích dùng là 10 ml/kg.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm giảm độ nhớt của kháng thể trong đó kháng thể này bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người

trong đó phương pháp này bao gồm

việc cải biến vùng chuỗi nặng không đổi kháng thể của phân nhóm IgG1 người với các đột biến I253A, H310A, và H435A, đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

và trong đó kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người,

trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong miền biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong miền biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong miền biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong miền biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép cũng được cải biến bằng các đột biến L234A , L235A và P329G, đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

3. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người,

trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm trong miền biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1H của SEQ ID NO:3, và trong miền biến đổi chuỗi nhẹ

vùng CDR3L của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2L của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1L của SEQ ID NO:6; và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm trong miền biến đổi chuỗi nặng vùng CDR3H của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2H của SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1H của SEQ ID NO: 11, và trong miền biến đổi chuỗi nhẹ vùng CDR3L của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2L của SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1L của SEQ ID NO: 14, và trong đó

iii) kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 người gồm các đột biến I253A, H310A, và H435A, đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 3, trong đó

i) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất này liên kết đặc hiệu với VEGF bao gồm là miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, và

ii) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai này liên kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm là miền biến đổi chuỗi nặng VH trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, và là miền biến đổi chuỗi nhẹ VL trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16.

5. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 3, trong đó vùng chuỗi nặng không đổi của phân nhóm IgG1 còn bao gồm các đột biến L234A, L235A và P329G, đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

6. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 3 đến 5.

7. Axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm 3 đến 5.

8. Vector biểu hiện chứa axit nucleic này theo điểm 7 có thể biểu hiện axit nucleic này trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn.

9. Tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn chứa vector theo điểm 8.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5 bao gồm các bước:

a) biến nạp tế bào chủ với vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể

này;

b) nuôi cấy tế bào chủ dưới điều kiện mà cho phép tổng hợp phân tử kháng thể này; và

c) thu hồi phân tử kháng thể này từ môi trường nuôi cấy.

11. Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, của SEQ ID NO: 26, của SEQ ID NO: 27, và của SEQ ID NO: 28.

12. Kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà liên kết đặc hiệu với VEGF người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà liên kết đặc hiệu với ANG-2 người, đặc trưng ở chỗ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, của SEQ ID NO: 22, của SEQ ID NO: 23, và của SEQ ID NO: 24.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM ĐỘ NHÓT CỦA KHÁNG THỂ, KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG NỘI MẠC MẠCH (VEGF)/KHÁNG ANGIOPOETIN-2 (ANG-2) ĐẶC HIỆU KÉP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 31094 WO

<150> EP12176299.1

<151> 2012-07-13

<160> 50

<170> Patent In phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR3H, <VEGF>ranibizumab

<400> 1

Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10				

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR2H, <VEGF>ranibizumab

<400> 2

Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe	Lys
1				5					10					15	

Arg

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CDR1H, <VEGF>ranibizumab

<400> 3

His Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR3L, <VEGF>ranibizumab

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR2L, <VEGF>ranibizumab

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CDR1L, <VEGF>ranibizumab

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 123
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi chuỗi nặng VH, <VEGF>ranibizumab

<400> 7

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

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

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, <VEGF>ranibizumab

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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
 100 105

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR3H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 9

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR2H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 10

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng CDR1H, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR3L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 12

Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Trp	Val
1				5					10	

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR2L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 13

Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ CDR1L, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 14

Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His
1				5					10	

<210> 15
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Miền biến đổi chuỗi nặng VH, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 16
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, biến thể <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 16

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 17
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

<210> 18
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
 20 25 30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
 35 40 45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala
 50 55 60

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

Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys
 85 90 95

Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile
 100 105 110

Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly
 115 120 125

Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp
 130 135 140

Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu
 145 150 155 160

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
 165 170 175

Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
 195 200 205
 Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
 210 215 220
 Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
 245 250 255
 Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
 260 265 270
 Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
 275 280 285
 Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
 290 295 300
 Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
 325 330 335
 Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
 340 345 350
 Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
 355 360 365
 Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
 370 375 380
 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile
 405 410 415
 Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys
 420 425 430

Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp
 435 440 445

Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln
 450 455 460

Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
 485 490 495

<210> 19
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
 50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
 85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
 100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
 115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
 130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
 145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
 165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
 180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
 195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
 210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
 225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp
 245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
 260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
 275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
 290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
385 390 395 400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
405 410 415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn
420 425 430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp
435 440 445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala
450 455 460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
485 490 495

Asp Phe

<210> 20
<211> 1124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
65 70 75 80

Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
 85 90 95

Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
 100 105 110

Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
 115 120 125

Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
 130 135 140

Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
 145 150 155 160

Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val
 165 170 175

His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
 180 185 190

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

Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
 210 215 220

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 225 230 235 240

Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
 245 250 255

Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
 260 265 270

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

Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
 290 295 300

Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 305 310 315 320

31810

Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
 325 330 335

Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
 340 345 350

Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
 355 360 365

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
 370 375 380

Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
 385 390 395 400

Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro
 405 410 415

Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met
 420 425 430

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu
 435 440 445

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn
 450 455 460

Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys
 465 470 475 480

Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln
 485 490 495

Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu
 500 505 510

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
 515 520 525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
 530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
 545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
 565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
 580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
 595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
 610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro
 625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val
 645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
 660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
 675 680 685

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Thr Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
 690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
 705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
 725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
 740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
 755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
 770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
 785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
 805 810 815

Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
 820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
 835 840 845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
 850 855 860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly
 865 870 875 880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly
 885 890 895

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp
 900 905 910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile
 915 920 925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe
 930 935 940

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe
 945 950 955 960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr
 965 970 975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr
 980 985 990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
 995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
 1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
 1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
 1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
 1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
 1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
 1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala
 1115 1120

<210> 21
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 (VEGFang2-0012)

<400> 21

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 22
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 (VEGFang2-0012)

<400> 22

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

31810

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 23

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
(VEGFang2-0012)

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 24
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 (VEGF-Ang2-0012)

<400> 24

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 25
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 và Đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)

<400> 25

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 225 230 235 240

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

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420

425

430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 26
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 và Đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)

<400> 26

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
và Đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 28
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với đột biến AAA
 và Đột biến P329G LALA (VEGFang2-0016)

<400> 28

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
100 105 110

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 29

<211> 450

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 với đột biến AAA
và với Đột biến SPLE

<400> 29

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

31810

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 30

<211> 460

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 với đột biến AAA
và với Đột biến SPLE

<400> 30

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 245 250 255

31810

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln
355 360 365

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala
435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 với đột biến AAA
và với Đột biến SPLE

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG4 với đột biến AAA
và với Đột biến SPLE

<400> 32

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
100 105 110

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

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 195 200 205

Glu Ser Lys Tyr Gly
 210

<210> 33

<211> 453

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 với đột biến AAA

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 34

<211> 705

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 với đột biến AAA

<400> 34

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

31810

		115					120						125						
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly				
	130					135					140								
Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly				
145					150					155					160				
Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala				
				165					170					175					
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser				
			180					185					190						
Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val				
		195					200					205							
Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
	210					215					220								
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
225					230					235					240				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu				
			245					250						255					
Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly				
			260					265					270						
Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly				
		275					280					285							
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr				
	290					295					300								
Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr				
305					310					315					320				
Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp				
				325					330					335					
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp				
			340					345					350						

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 355 360 365
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 370 375 380
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 385 390 395 400
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 405 410 415
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 420 425 430
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 450 455 460
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 465 470 475 480
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 485 490 495
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser
 500 505 510
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 515 520 525
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 530 535 540
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 545 550 555 560
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 565 570 575
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 580 585 590

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
675 680 685

Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
690 695 700

Lys
705

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG1 với đột biến AAA

<400> 35

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 36
<211> 450
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 với đột biến AAA
và với Đột biến SPLE

<400> 36

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 Asp Phe Thr His Tyr
20 25 30

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

[illegible]

31810

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 37

<211> 702

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 với đột biến AAA và
với đột biến SPLE

31810

<400> 37

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 245 250 255

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

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 275 280 285

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

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 305 310 315 320

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 340 345 350

Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 355 360 365

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 370 375 380

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 385 390 395 400

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 405 410 415

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 420 425 430

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 435 440 445

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 465 470 475 480

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 485 490 495

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

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

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

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

Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 565 570 575

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

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

Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 610 615 620

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

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

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

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

Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 690 695 700

<210> 38
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> OAscFab IgG4 với đột biến AAA
 và với Đột biến SPLE

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 39

<211> 453

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without
 AAA đột biến) (VEGFang2-0201)

<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 Tyr Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 40

<211> 463

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without
 AAA đột biến) (VEGFang2-0201)

<400> 40

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 41
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without
 AAA đột biến) (VEGFang2-0201)
 <400> 41
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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

31810

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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 42

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 wild type (without
AAA đột biến) (VEGFang2-0201)

<400> 42

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 115 120 125
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys
 210
 <210> 43
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with P329G LALA
đột biến only (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 225 230 235 240

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

 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
 325 330 335

 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 44
<211> 463
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 với duy nhất đột biến
P329G LALA
(không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)

<400> 44

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

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

<210> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 1 của <VEGF-ANG-2> CrossMAB IgG1 chỉ duy nhất đột biến
 P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser 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 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 46

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 2 của <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 chỉ duy nhất đột biến
 P329G LALA (không có đột biến AAA) (VEGFang2-0015)

<400> 46

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110

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

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 48
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 48

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 49
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 50

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

Fig. 1

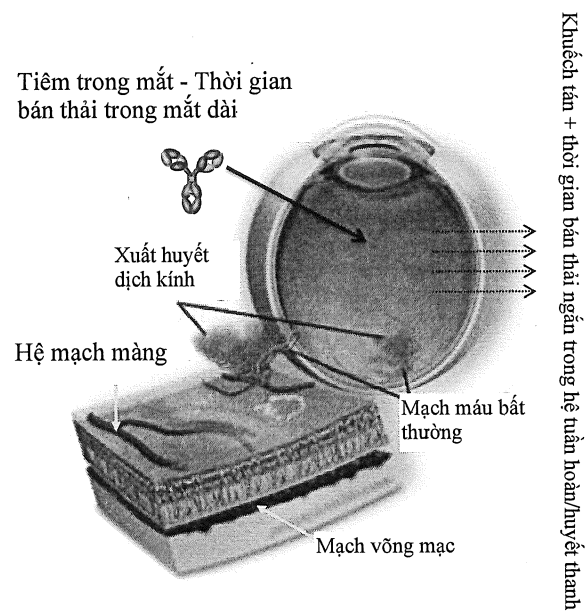


Fig. 2

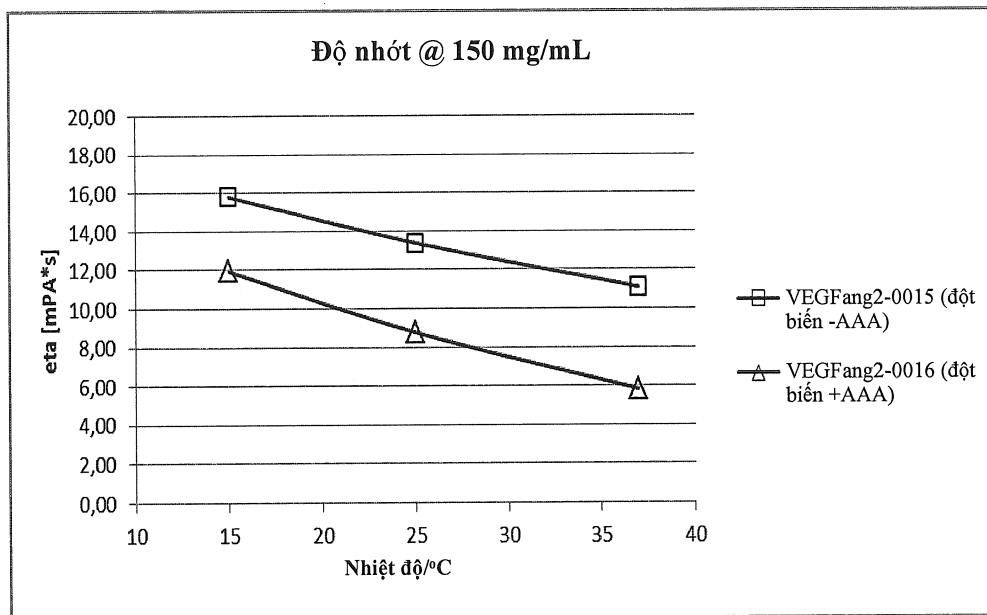


Fig. 3

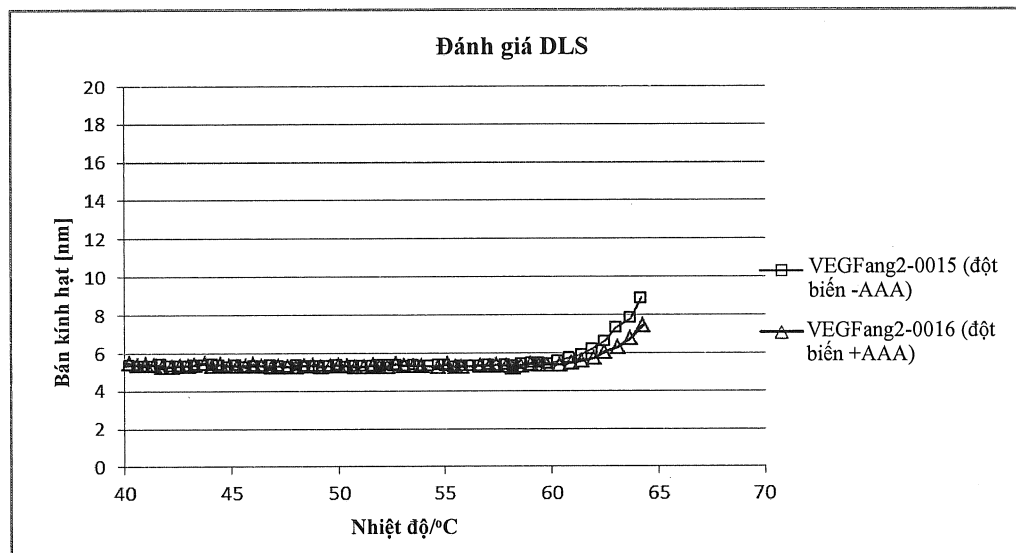


Fig. 4

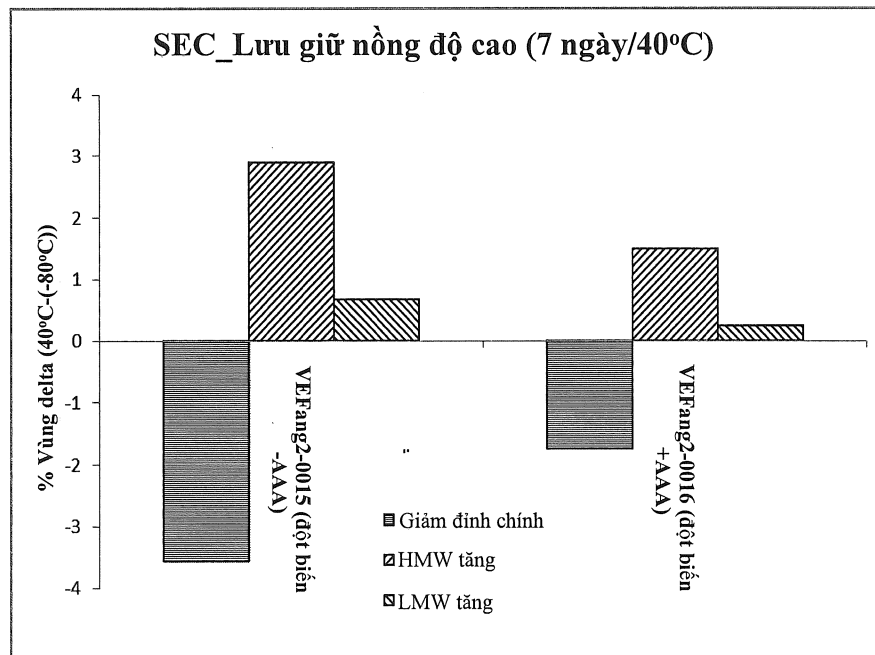


Fig. 5A

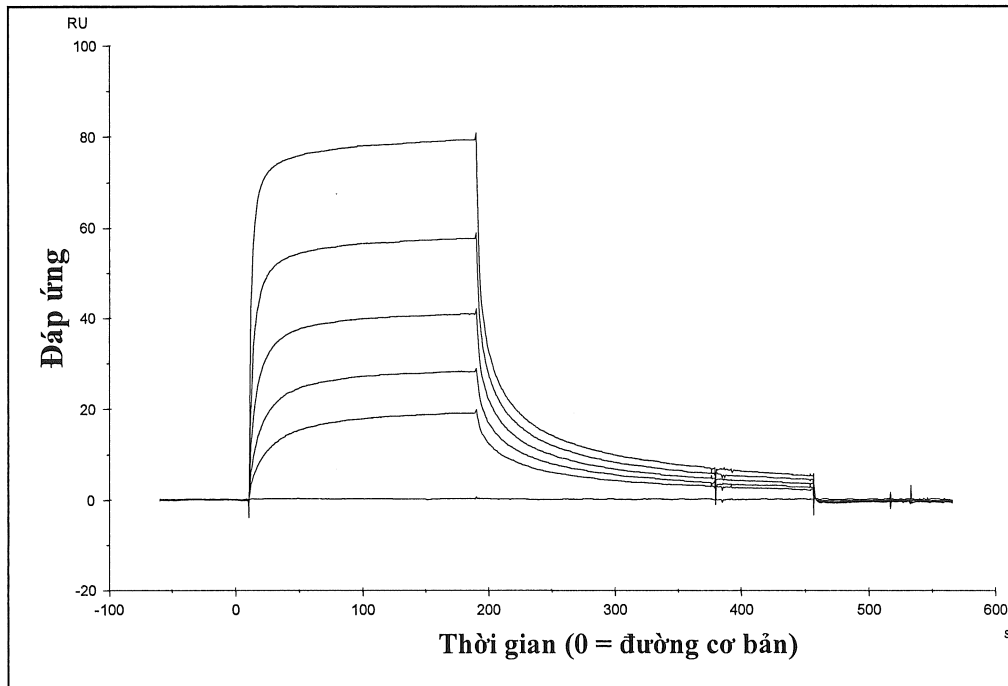


Fig. 5B

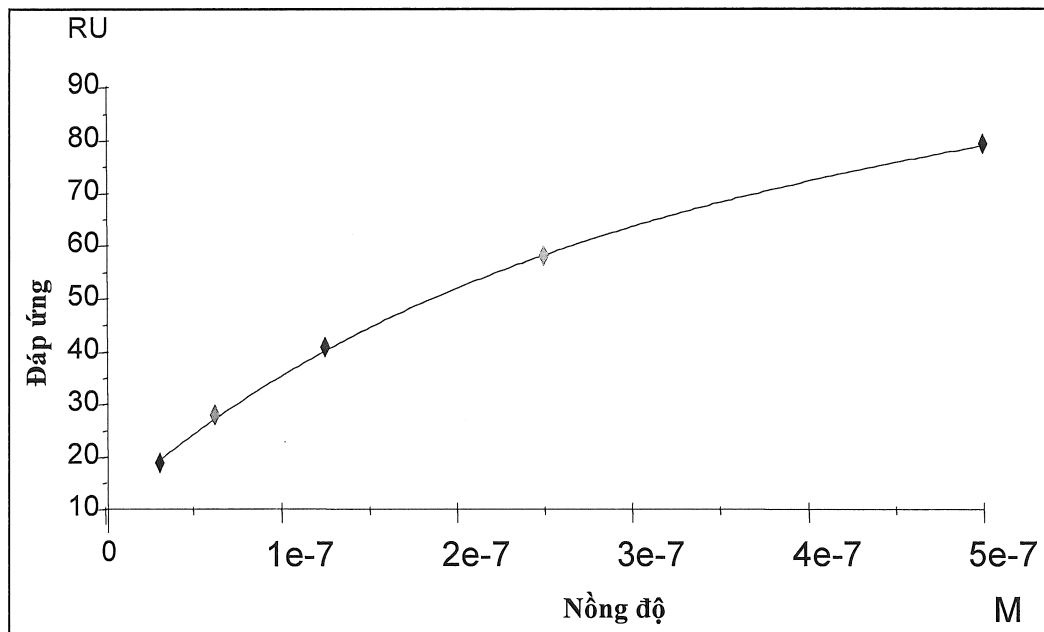


Fig. 5C

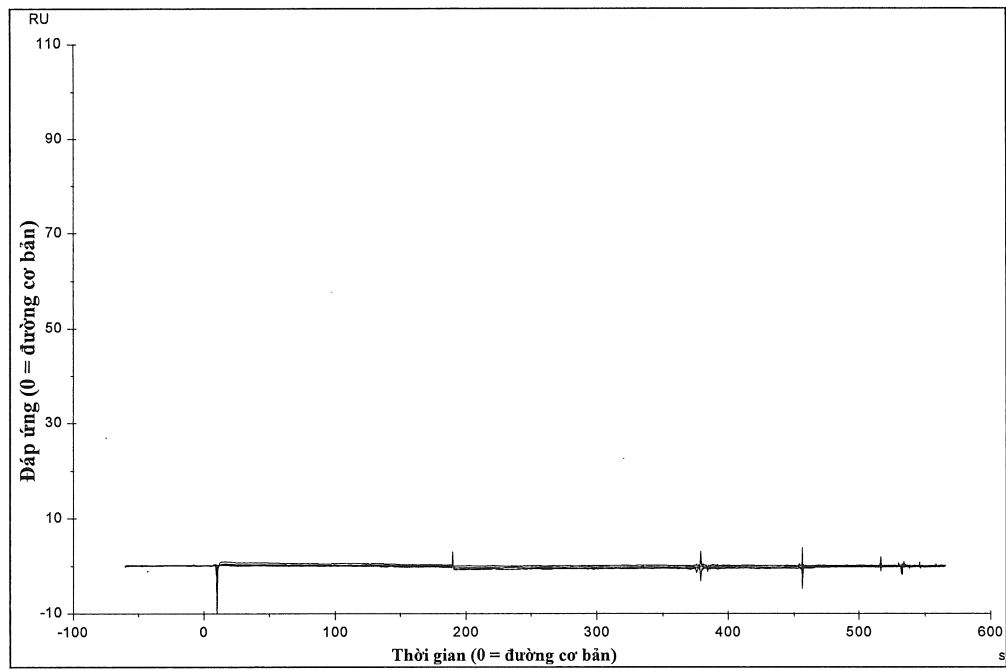


Fig. 5D

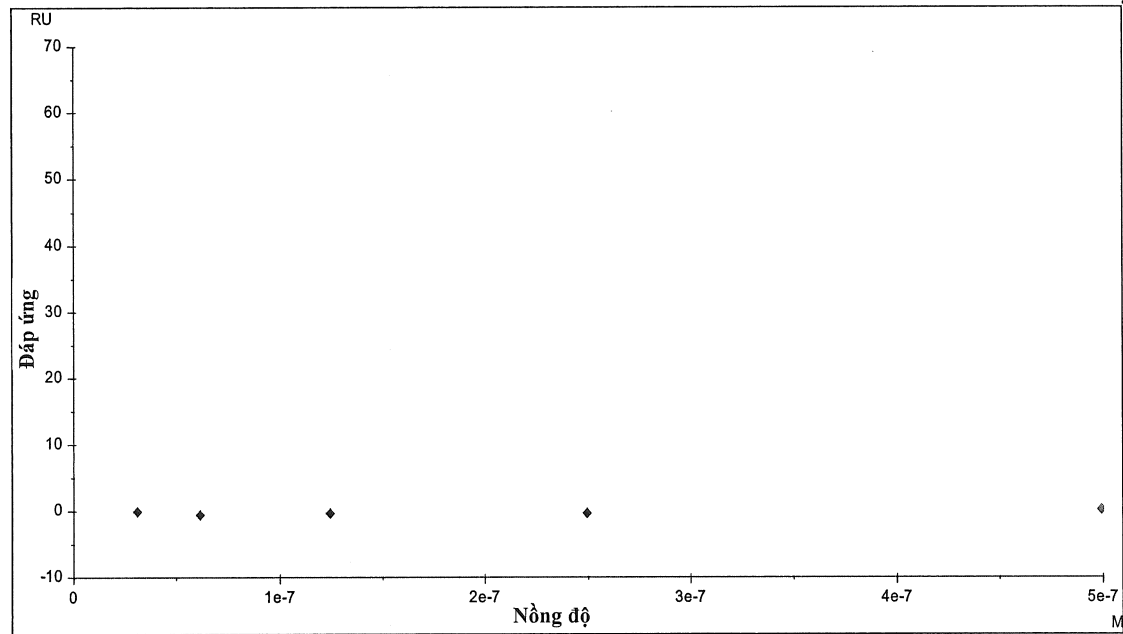


Fig. 5E

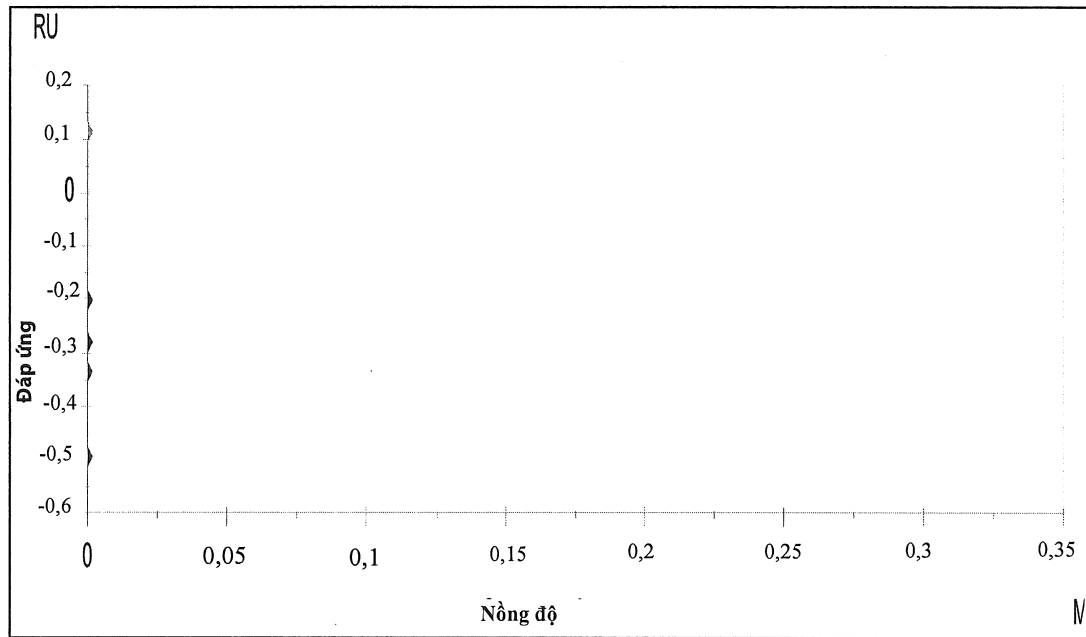


Fig. 6

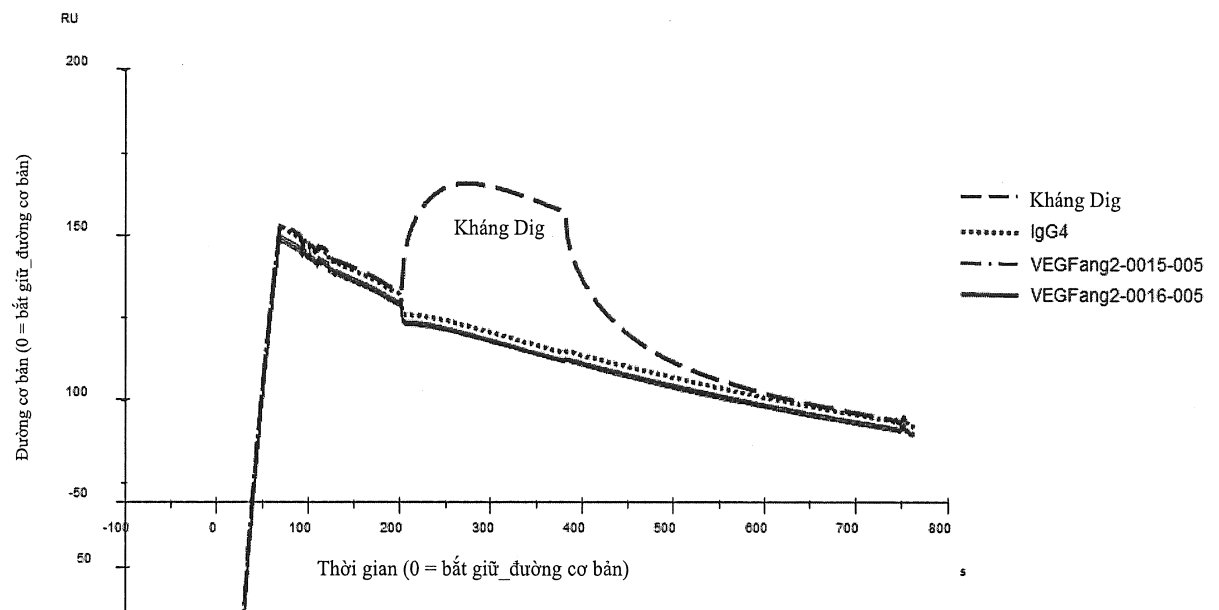


Fig. 7A

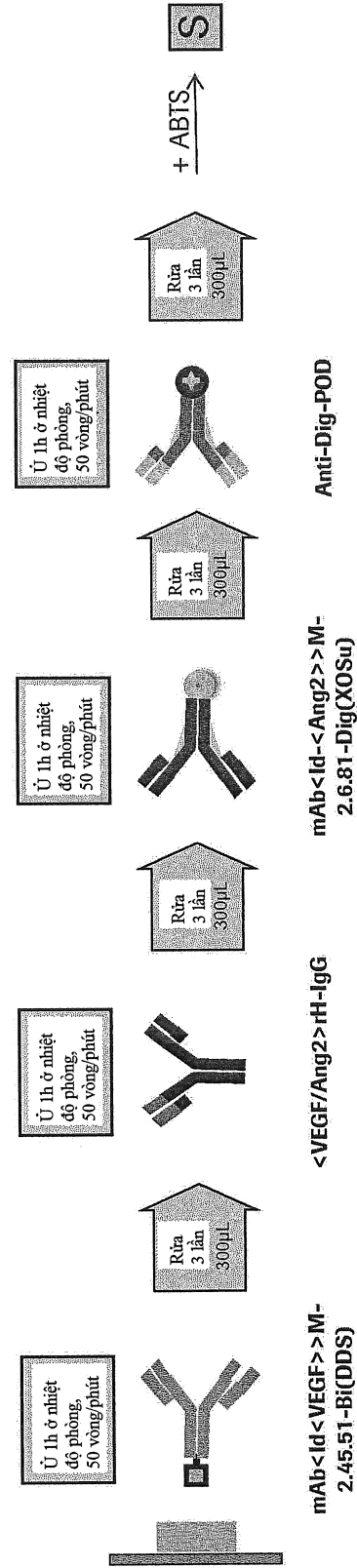


Fig. 7B

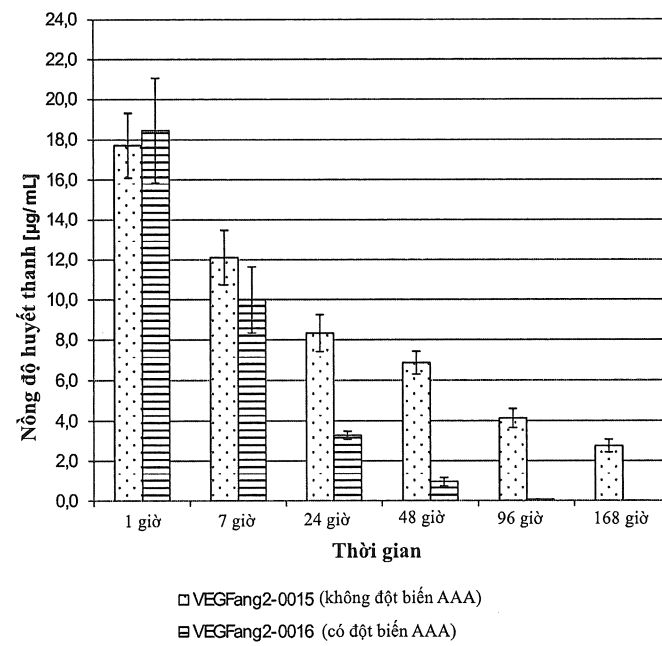


Fig. 7C

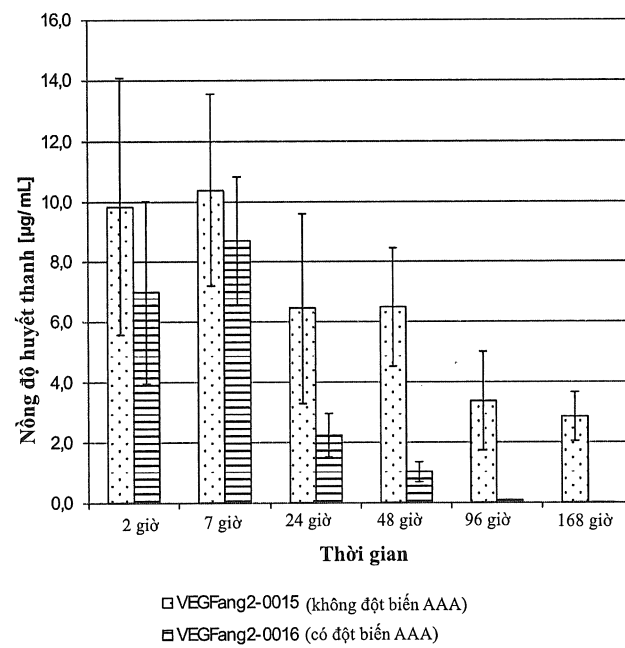


Fig. 7D

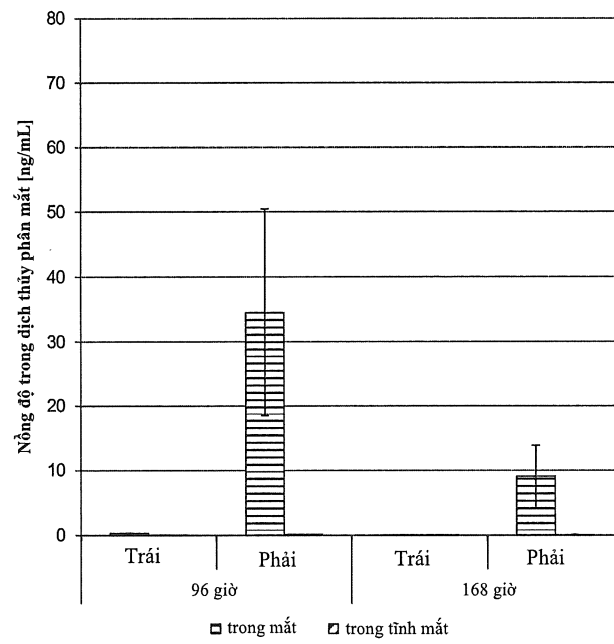


Fig. 7E

