



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

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



1-0034049

(51)⁷ C07K 16/28; C07K 16/22; C07K 16/24 (13) B

(21) 1-2016-03698

(22) 01/04/2015

(86) PCT/EP2015/057165 01/04/2015

(87) WO 2015/150447 08/10/2015

(30) 14163165.5 02/04/2014 EP; 14179034.5 30/07/2014 EP

(45) 25/11/2022 416

(43) 26/12/2016 345A

(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland

(72) SCHAEFER, Wolfgang (DE); KLEIN, Christian (DE); IMHOF-JUNG, Sabine (DE); KLOSTERMANN, Stefan (DE); MOLHOJ, Michael (DK); REGULA, Joerg Thomas (DE).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐA ĐẶC HIỆU, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu và dược phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các protein được thiết kế, như kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các protein gắn kết đa đặc hiệu này có thể được tạo ra nhờ sử dụng kỹ thuật dung hợp tế bào, liên hợp hóa học, hoặc ADN tái tổ hợp.

Gần đây, có rất nhiều kiểu kháng thể đa đặc hiệu tái tổ hợp khác nhau đã được phát triển, ví dụ kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn, bằng cách dung hợp, ví dụ, kiểu kháng thể IgG và miền chuỗi đơn (xem, ví dụ, Coloma, M.J., et. al., Nature Biotech. 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; và Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234).

Tương tự, một vài kiểu mới khác trong đó cấu trúc nhân kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM) không còn giữ lại như kháng thể thể đôi, kháng thể thể ba hoặc kháng thể thể bốn, kháng thể nhỏ, một vài kiểu chuỗi đơn (scFv, Bis-scFv), có khả năng gắn kết hai hoặc nhiều kháng nguyên, đã được phát triển (Holliger, P., et. al, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., and Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et. al., J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297).

Tất cả các kiểu nêu trên đều sử dụng tác nhân liên kết để dung hợp nhân kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM) với protein gắn kết khác (ví dụ, scFv) hoặc dung hợp, ví dụ, hai mảnh Fab hoặc scFv (Fischer, N., and Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Trong khi thấy rằng tác nhân liên kết có nhiều ưu điểm trong việc xử lý kỹ thuật các kháng thể đặc hiệu kép, nhưng chúng cũng có thể gây ra một số vấn đề trong các trường hợp điều trị. Trên thực tế, các peptit ngoại lai này có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch dựa trên chính tác nhân liên kết hoặc điểm nối giữa protein và tác nhân liên kết. Hơn nữa, bản chất linh động của các peptit này khiến chúng có xu

hướng bị phân cắt phân giải protein nhiều hơn, có thể dẫn đến kháng thể kém ổn định hơn, kết tụ và tính sinh miễn dịch tăng. Ngoài ra, có thể mong muốn giữ lại các chức năng tác động, ví như, tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), được điều tiết thông qua phần Fc bằng cách duy trì mức độ tương đồng cao với kháng thể có trong tự nhiên.

Do đó, lý tưởng là, người có hiểu biết trung bình nên tập trung vào việc phát triển kháng thể đặc hiệu kép có cấu trúc tổng quát rất giống với cấu trúc tổng quát của kháng thể có trong tự nhiên (như IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM) với sai lệch nhỏ so với trình tự ở người.

Trong một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép rất giống với kháng thể tự nhiên được sản xuất bằng cách sử dụng công nghệ dung hợp kháng thể quadroma (xem Milstein, C., and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540) dựa trên quá trình dung hợp phần sinh dưỡng của hai dòng tế bào lai biểu hiện kháng thể đơn dòng chuột khác nhau có tính đặc hiệu mong muốn của kháng thể đặc hiệu kép. Do việc ghép cặp ngẫu nhiên của hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau của kháng thể trong dòng tế bào lai (hoặc dung hợp kháng thể quadroma) thu được, nên có đến mười loại kháng thể khác nhau được tạo ra, trong đó chỉ có duy nhất một kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép có chức năng mong muốn. Do sự có mặt của các sản phẩm phụ ghép cặp sai, và hiệu suất bị giảm đáng kể, nên cần có các quy trình tinh chế tinh vi (xem, ví dụ, Morrison, S.L., *Nature Biotech.* 25 (2007) 1233-1234). Nhìn chung, nếu sử dụng các kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp thì vẫn tồn tại vấn đề các sản phẩm phụ ghép cặp sai.

Một phương pháp để giải quyết vấn đề sản phẩm phụ ghép cặp sai, đã được biết đến là phương pháp “tra khóa vào ổ”, phương pháp này tập trung vào việc bắt buộc ghép cặp hai chuỗi nặng của kháng thể khác nhau bằng cách đưa các đột biến vào miền CH3 để thay đổi bề mặt tiếp xúc giữa hai kháng thể này. Ở một chuỗi, các axit amin lớn được thay thế bằng các axit amin có mạch bên ngắn để tạo ra phần “ổ”. Ngược lại, các axit amin có mạch bên lớn được đưa vào miền CH3 còn lại, để tạo ra phần “khóa”. Bằng cách cùng biểu hiện, hai chuỗi nặng này (và hai chuỗi nhẹ giống nhau, cần phải tương thích với cả hai chuỗi nặng), quan sát thấy hiệu suất tạo ra dị dime cao (‘phần “khóa”-phần “ổ”’) so với hiệu suất tạo ra đồng dime (‘phần

“ổ”-phần “ổ”” hoặc ‘phần “khóa”-phần “khóa”’) (Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; và WO 96/027011). Số lượng dị dime có thể tăng thêm nữa bằng cách sửa đổi bề mặt tiếp xúc của hai miền CH3 bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể và đưa vào liên kết cầu disulfua để làm ổn định các dị dime (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26–35). Các phương pháp sử dụng công nghệ “tra khóa vào ổ” được mô tả trong, ví dụ, EP 1 870 459 A1. Mặc dù các phương pháp này có vẻ rất thu hút, nhưng hiện lại không chứa dữ liệu mô tả việc thực hiện trên lâm sàng. Một điều kiện quan trọng của phương pháp là chuỗi nhẹ của hai kháng thể gốc phải giống nhau để tránh được việc ghép cặp sai và tạo ra các phân tử không có hoạt tính. Do đó, kỹ thuật này không thích hợp làm nền tảng để dễ dàng phát triển kháng thể tái tổ hợp, đặc hiệu ba hoặc đặc hiệu bốn với ba hoặc bốn kháng nguyên sử dụng hai kháng thể kháng kháng nguyên thứ nhất và thứ hai vì chuỗi nặng của các kháng thể này và/hoặc các chuỗi nhẹ giống nhau trước tiên cần được tối ưu hóa và sau đó bổ sung các peptit liên kết kháng nguyên khác liên kết kháng nguyên thứ ba và thứ tư.

WO 2006/093794 đề cập đến chế phẩm liên kết với protein dạng dị dime. WO 99/37791 mô tả các dẫn xuất kháng thể đa chức năng. Morrison, S.L., et al., J. Immunol. 160 (1998) 2802-2808 đề cập đến ảnh hưởng khi trao đổi miền của vùng biến đổi đến các đặc tính chức năng của IgG.

WO 2013/02362 đề cập đến polypeptit được dị dime hóa. WO 2013/12733 đề cập đến polypeptit bao gồm vùng Fc ở dạng dị dime. WO 2012/131555 đề cập đến globulin miễn dịch dị dime được xử lý kỹ thuật. EP 2647707 đề cập đến globulin miễn dịch dị dime được xử lý kỹ thuật.

WO 2013/026835 đề cập đến kháng thể Fc đặc hiệu kép tự do có đường chuyển miền. WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 và Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191 đề cập đến kháng thể IgG đặc hiệu kép hóa trị hai có sự chuyển miền.

Kháng thể đa đặc hiệu có sự thay thế/trao đổi VH/VL ở cùng liên kết để tránh việc ghép cặp sai chuỗi nhẹ (CrossMab^{VH-VL}) được mô tả trong WO2009/080252, (cũng xem trong tài liệu Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191) là giảm

rõ rệt các sản phẩm phụ do việc ghép cặp sai chuỗi nhẹ kháng kháng nguyên thứ nhất với chuỗi nặng kháng kháng nguyên thứ hai không chính xác gây ra (so với các phương pháp không có sự trao đổi miền như vậy). Tuy nhiên chế phẩm chứa chúng không hoàn toàn không có các sản phẩm phụ. Sản phẩm phụ chủ yếu dựa trên tương tác kiểu Bence–Jones - cũng xem trong tài liệu Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191; trên Fig.S1I của phụ lục).

Do đó, vẫn có nhu cầu về việc làm giảm hơn nữa các sản phẩm phụ này làm cải thiện, ví dụ, hiệu suất của kháng thể đặc hiệu kép.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, trong đó kháng thể này chứa:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào vật chủ bằng các vector chứa các phân tử axit nucleic mã hóa:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc
- ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên từ môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa axit nucleic theo sáng chế có khả năng biểu hiện axit nucleic nêu trên trong tế bào vật chủ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ chứa vector theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, dược phẩm hoặc chế phẩm chẩn đoán bệnh, chứa kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế và ít nhất một tá dược được dụng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, đặc trưng bởi việc cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của kháng thể theo sáng chế.

Theo sáng chế, tỷ lệ giữa kháng thể đa đặc hiệu mong muốn với sản phẩm phụ kiểu Bence Jones chủ yếu không mong muốn có thể được cải thiện bằng việc đưa vào các thay thế axit amin tích điện có điện tích trái dấu ở vị trí axit amin đặc hiệu trong miền CH1 và CL.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Một số ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế có sự thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu trong một bề mặt chung của miền CH1/CL:

ít nhất là axit amin ở vị trí 124 của miền CL được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

ít nhất là axit amin ở vị trí 147 của miền CH1 hoặc axit amin ở vị trí 213 của miền CH1 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Fig.1A: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và đột biến đặc hiệu trong bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.1B: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể.

Fig.1C: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại, và các cải biến của bề mặt chung miền CH3/CH3 để gia tăng quá trình dị dime hóa chuỗi nặng (ví như công nghệ phương pháp “tra khóa vào ổ” hoặc công nghệ dị dime hóa khác ví như thay thế các axit amin tích điện bằng điện tích trái dấu tương ứng của chúng).

Fig.2A. Ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu có sự thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và không có đột biến ở một bề mặt chung của miền CH1/CL (phía bên trái) và sản phẩm phụ chủ yếu của kháng thể đa đặc hiệu này (do tương tác miền kiểu Bence jones của VL-VL)- các biến thể có thể có khác dưới dạng sản phẩm phụ tiềm ẩn không phát hiện ra được bằng phép đo phổ khối trực tiếp; hoặc bằng phép đo phổ khối sau khi phân hủy plasmin hoặc LysC bằng cách phân tích các mảnh Fab của nó.

Fig.2B. Nguồn gốc sản phẩm phụ chủ yếu của kháng thể đa đặc hiệu có sự thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và không có đột biến ở một bề mặt chung của miền CH1/CL (do tương tác miền kiểu Bence jones của VL-VL).

Fig.3. Fig.3A: trình tự axit amin kiểu đại (wt) trong miền CH1 (hai isotyp IgG được thể hiện) có các axit amin được gạch chân và bôi đậm ở vị trí 147 và 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Fig.3B: trình tự axit amin kiểu đại (wt) trong miền CL của isotyp kappa có các axit amin được gạch chân và bôi đậm ở vị trí 124 và 123 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat).

Fig.3C: trình tự axit amin kiểu đại (wt) trong miền CL của isotyp lambda có các axit amin được gạch chân và bôi đậm ở vị trí 124 và 123 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat).

Fig.4. Fig.4A: giảm lượng sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu bằng các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ theo sáng chế trong bề mặt chung CH1/CL.

Các ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* theo sáng chế có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMAb^{Vh-VL}*).

So sánh thay thế axit amin kiểu dại (wt) và tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện riêng lẻ

1) kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF CrossMab^{Vh-VL}* kiểu dại (wt) không có sự thay thế axit amin cụ thể trong bề mặt chung CH1/CL,

2) kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* theo sáng chế i) có các thay thế ở vị trí 124 của miền CL, và ở vị trí 147 của miền CH1 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) hoặc ii) có các thay thế ở vị trí 124 của miền CL, và ở vị trí 213 của miền CH1 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU),

3) các kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF CrossMab^{Vh-VL}* khác có sự thay thế ở các vị trí khác nhau

Fig.4B: Trình tự (SEQ ID NO) của kháng thể đa đặc hiệu trong đó các kết quả được thể hiện trên Fig.4A.

Fig.5. Fig.5A: giảm lượng sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu bằng các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL.

Các ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* theo sáng chế có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*).

So sánh thay thế axit amin kiểu dại (wt) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện

Fig.5B: trình tự (SEQ ID NO) của kháng thể đa đặc hiệu trong đó các kết quả được thể hiện trên Fig.5A.

Fig.6. Fig.6A: giảm lượng sản phẩm phụ kiểu Bence-Johns chủ yếu bằng các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL.

Các ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu kháng *IL-17/TWEAK* theo sáng chế có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*).

So sánh các thay thế axit amin kiểu dại (wt) và các tổ hợp khác nhau của thay thế axit amin tích điện

Fig.6B: trình tự (SEQ ID NO) của kháng thể đa đặc hiệu trong đó các kết quả được thể hiện trên Fig.6A.

Fig.7: Một số ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu hóa trị hai theo sáng chế có sự thay thế miền VH/VL trong một nhánh liên kết kháng thể và đột biến đặc hiệu ở một bề mặt chung của miền CH1/CL, trong đó các kháng thể đa đặc hiệu này không có mảnh Fc (kiểu Fab-CrossFab^{VH-VL} và CrossFab^{VH-VL}-Fab):

ít nhất là axit amin ở vị trí 124 của miền CL được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và ít nhất là axit amin ở vị trí 147 của miền CH1 hoặc axit amin ở vị trí 213 của miền CH1 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Fig.7A: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.7B: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể.

Fig.7C: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể có các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể; và các đột biến đặc hiệu khác ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.7D: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.8: Một số ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu hóa trị ba theo sáng chế có sự thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và đột biến đặc hiệu ở một bề mặt chung của miền CH1/CL, trong đó kháng thể đa đặc hiệu không có mảnh Fc (kiểu Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

ít nhất là axit amin ở vị trí 124 của miền CL được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và ít nhất là axit amin ở vị trí 147 của miền CH1 hoặc axit amin ở vị trí 213 của miền CH1 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Fig.8A, Fig.8B, Fig.8C: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.8D: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể.

Fig.8E: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể có các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể; và các đột biến đặc hiệu khác ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.9 Một số ví dụ về kháng thể đa đặc hiệu hóa trị bốn theo sáng chế có sự thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và đột biến đặc hiệu ở một bề mặt chung của miền CH1/CL, trong đó kháng thể đa đặc hiệu này không có mảnh Fc (kiểu Fab-Fab-CrossFab^{VH-VL}):

ít nhất là axit amin ở vị trí 124 của miền CL được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và ít nhất là axit amin ở vị trí 147 của miền CH1 hoặc axit amin ở vị trí 213 của miền CH1 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Fig.9A: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của nhánh liên kết kháng thể còn lại.

Fig.9B: thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết kháng thể và các đột biến đặc hiệu ở bề mặt chung của miền CH1/CL của cùng một nhánh liên kết kháng thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Kháng thể đa đặc hiệu có sự thay thế/trao đổi miền ở một nhánh liên kết (CrossMab^{VH-VL}) được mô tả chi tiết trong WO2009/080252 và Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191 (được kết hợp ở đây để tham khảo). Các kháng thể này làm giảm rõ rệt các sản phẩm phụ do việc ghép đôi không phù hợp chuỗi nhẹ kháng kháng nguyên thứ nhất với chuỗi nặng không thích hợp kháng kháng nguyên thứ hai gây ra (so với các phương pháp không có sự trao đổi miền này). Tuy nhiên, chế phẩm của chúng không hoàn toàn không có sản phẩm phụ. Sản phẩm phụ

chủ yếu dựa trên tương tác kiểu Bence–Jones -cũng xem trong tài liệu Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191; trên Fig. S1I của phụ lục).

Do đó, các tác giả sáng chế đã tìm ra một phương pháp để làm giảm hơn nữa các sản phẩm phụ như vậy nhằm cải thiện hiệu suất của các kháng thể đa đặc hiệu này (tức là kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm thay thế/trao đổi miền VH/VL chỉ ở (các) nhánh liên kết có một tính đặc hiệu kháng nguyên, trong khi đó (các) nhánh liên kết có tính đặc hiệu kháng nguyên còn lại không bao gồm thay thế/trao đổi miền VH/VL thay vào đó là bố trí miền kháng thể kiểu đại như được thể hiện trên Fig. 1) bằng cách đưa vào các thay thế axit amin tích điện có điện tích trái dấu ở các vị trí axit amin đặc hiệu trong miền CH1 và CL.

Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) được thay thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) được thay thế bằng axit amin tích điện âm; hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) được thay thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) được thay thế bằng axit amin tích điện âm.

Theo khái niệm nêu trong sáng chế, kháng thể theo sáng chế chỉ bao gồm một trong các cải biến như được chỉ ra trong i) và ii) nêu trên và dưới đây. Do đó, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế bao gồm:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) bằng axit amin tích điện dương, và trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) bằng axit amin tích điện âm;

hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) thay thế axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) bằng axit amin tích điện dương, và trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) thay thế axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) bằng axit amin tích điện âm,

với điều kiện kháng thể đa đặc hiệu không bao gồm cả hai cải biến nêu trong i) và ii).

Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213

được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

- ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) được thay thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) được thay thế bằng axit amin tích điện âm.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Do đó, để kháng thể thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai có trong kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, các bước sau được thực hiện:

- trong chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể nêu trên; và
- trong chuỗi nặng, miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể nêu trên; và
- miền cố định CL và CH1 trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai không được đổi chỗ cho nhau (vẫn không được trao đổi).

Do đó, để kháng thể nêu trên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất có trong kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, các bước sau được áp dụng:

- trong chuỗi nhẹ thứ nhất nêu trên có nguồn gốc từ kháng thể thứ nhất nêu trên, việc bố trí tuần tự các miền của chuỗi nhẹ (CL-VL) vẫn không được thay đổi; và
- trong chuỗi nặng thứ nhất nêu trên có nguồn gốc từ kháng thể thứ nhất nêu trên, việc bố trí tuần tự các miền của chuỗi nặng (ví dụ, CH1-VH hoặc CH3-CH2-CH1-VH) vẫn không được thay đổi (do đó kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng thể thứ nhất nêu trên không bao gồm trao đổi miền này, đặc biệt là không trao đổi VH/VL).

Theo cách khác, kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất có trong kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế nêu trên bao gồm:

- chuỗi nhẹ thứ nhất có nguồn gốc từ kháng thể thứ nhất nêu trên bao gồm việc bố trí tuần tự các miền của chuỗi nhẹ của VL-CL (theo chiều từ đầu N đến đầu C); và
- chuỗi nặng thứ nhất có nguồn gốc từ kháng thể thứ nhất nêu trên bao gồm việc bố trí tuần tự các miền của chuỗi nặng của CH1-VH (theo chiều từ đầu N đến đầu C) (theo một phương án, chuỗi nặng thứ nhất bao gồm việc bố trí tuần tự các miền của chuỗi nặng của CH3-CH2-CH1-VH theo chiều từ đầu N đến đầu C).

“Chuỗi nhẹ của kháng thể” theo sáng chế là polypeptit chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), và miền cố định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL) theo chiều từ đầu N đến đầu C, được ký hiệu là VL-CL.

“Chuỗi nặng của kháng thể” theo sáng chế là polypeptit chứa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền cố định chuỗi nặng của kháng thể 1 (CH1) theo chiều từ đầu N đến đầu C.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chuỗi nặng của kháng thể đa đặc hiệu bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền cố định chuỗi nặng của kháng thể 1 (CH1) theo chiều từ đầu N đến đầu C và không bao gồm miền cố định chuỗi nặng CH2 và CH3, do đó được ký hiệu là VH-CH1. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế bao gồm ít nhất hai mảnh Fab, trong đó mảnh Fab thứ nhất bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và mảnh Fab thứ hai bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó trong mảnh Fab thứ hai, miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và trong đó kháng thể đa đặc hiệu không bao gồm miền Fc; và trong đó

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ của mảnh Fab thứ nhất, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng của mảnh Fab thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213

được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

- ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ của mảnh Fab thứ hai, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng của mảnh Fab thứ hai, axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế bao gồm ít nhất là hai mảnh Fab, trong đó mảnh Fab thứ nhất bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và mảnh Fab thứ hai bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó trong mảnh Fab thứ hai, miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và trong đó kháng thể đa đặc hiệu không bao gồm miền Fc; và trong đó

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ của mảnh Fab thứ nhất, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng của mảnh Fab thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo sáng chế, “mảnh Fab” chỉ mảnh kháng thể bao gồm mảnh chuỗi nhẹ bao gồm miền VL biến đổi và miền cố định của chuỗi nhẹ (CL), và miền VH biến đổi và miền cố định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án này bao gồm ít nhất là hai mảnh Fab, trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mảnh Fab thứ hai được trao đổi. Do sự trao đổi giữa các vùng biến đổi, mảnh Fab thứ hai nêu trên còn được gọi là “mảnh cross-Fab” hoặc “mảnh xFab” hoặc “mảnh Fab giao cắt”. Trong mảnh Fab thứ hai nêu trên, trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi, phân tử Fab giao cắt

bao gồm chuỗi nặng cải biến gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH1), và chuỗi nhẹ cải biến gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL). Phân tử Fab giao cắt còn được gọi là CrossFab^{VH/VL}.

Thuật ngữ “miền Fc” được sử dụng trong bản mô tả để xác định vùng có đầu C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Ví dụ, trong các kháng thể tự nhiên, miền Fc gồm có hai mảnh protein giống hệt, có nguồn gốc từ miền cố định thứ hai và thứ ba của hai chuỗi nặng của kháng thể có isotyp IgG, IgA và IgD; miền Fc của IgM và IgE chứa ba miền cố định chuỗi nặng (miền CH 2–4) trong mỗi chuỗi polypeptit. “Không có miền Fc” theo sáng chế có nghĩa là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế không bao gồm miền CH2, CH3 và CH4; tức là chuỗi nặng hằng định chỉ bao gồm một hoặc nhiều miền CH1.

Theo một phương án, mảnh Fab thứ nhất và thứ hai được nối thông qua tác nhân liên kết peptit. Thuật ngữ “tác nhân liên kết peptit” theo sáng chế chỉ peptit có trình tự axit amin, ưu tiên có nguồn gốc tổng hợp. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit được sử dụng để nối một trong các mảnh Fab với đầu C hoặc đầu N của mảnh Fab còn lại để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên, tác nhân liên kết peptit là peptit có trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 5 axit amin, theo một phương án có độ dài từ 5 đến 100, theo một phương án khác từ 10 đến 50 axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit là $(GxS)_n$ hoặc $(GxS)_nG_m$ với G = glyxin, S = serin, và $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ hoặc } 6, \text{ và } m = 0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$ hoặc $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ hoặc } 5 \text{ và } m=0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$, theo một phương án $x=4$ và $n=2$ hoặc 3, theo một phương án khác $x=4$ và $n=2$. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit này là $(G_4S)_2$. Tác nhân liên kết peptit được sử dụng để nối mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai. Theo một phương án, mảnh Fab thứ nhất được nối với đầu C hoặc đầu N của mảnh Fab thứ hai.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến chuỗi nặng của kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), miền cố định chuỗi nặng của kháng thể 1 (CH1), miền cố định chuỗi nặng của kháng thể 2 (CH2), và miền cố định chuỗi nặng của kháng thể 3 (CH3) theo chiều từ đầu N đến đầu C, được ký hiệu là VH-CH1-CH2-CH3.

Trong trường hợp kháng thể đa đặc hiệu bao gồm các miền VH-CH1-CH2-CH3 trong mỗi chuỗi nặng, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc cải thiện tỷ lệ của kháng thể đa đặc hiệu mong muốn so với các sản phẩm phụ không mong muốn có thể bằng các cải biến của miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên để làm tăng mức độ dị dime hóa của cả hai chuỗi nặng chứa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai này.

Hiện có một vài phương pháp cho các cải biến CH3 nhằm gia tăng mức độ dị dime hóa, được mô tả rõ trong, ví dụ, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Thông thường, trong tất cả các phương pháp như vậy, miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai đều được xử lý kỹ thuật theo cách bổ sung sao cho mỗi miền CH3 (hoặc chuỗi nặng chứa nó) có thể không bao giờ đồng dime hóa với chính bản thân nó nữa nhưng bị ép dị dime hóa với miền CH3 được xử lý kỹ thuật bổ sung khác (sao cho miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai dị dime hóa và không tạo ra homdime giữa hai miền CH3 thứ nhất hoặc hai miền CH3 thứ hai). Các phương pháp khác nhau nhằm cải thiện quá trình dị dime hóa chuỗi nặng này được dự định là các phương án thay thế khác nhau kết hợp với cải biến chuỗi nặng-chuỗi nhẹ (trao đổi/thay thế VH và VL ở một nhánh liên kết và đưa vào đó các thay thế axit amin tích điện có điện tích trái dấu trong bề mặt chung CH1/CL) trong kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế mà làm giảm các sản phẩm ghép cặp không phù hợp của chuỗi nhẹ và sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến (trong trường hợp kháng thể đa đặc hiệu bao gồm miền CH3 trong chuỗi nặng) miền CH3 của kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế nêu trên được thay đổi để hỗ trợ quá trình dị dime hóa bằng cách

- thay thế ít nhất một axit amin của miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất, và
- thay thế ít nhất một axit amin của miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai, trong đó axit amin này đối diện với ít nhất một axit amin của miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất trong cấu trúc bậc ba của kháng thể đa đặc hiệu,

trong đó các axit amin tương ứng trong miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai, một cách lần lượt,

- được thay thế sao cho các axit amin có điện tích mạch bên trái đầu được đưa vào chuỗi nặng đối diện, hoặc
- được thay thế sao cho các axit amin có khối lượng mạch bên lớn và nhỏ được đưa vào chuỗi nặng đối diện, từ đó tạo ra được “khóa” bằng axit amin có khối lượng mạch bên lớn ở một miền CH₃, có thể đút vừa lỗ được đặt trong miền CH₃ còn lại, trong đó lỗ này được tạo ra bằng axit amin có khối lượng mạch bên nhỏ.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế (trong trường hợp kháng thể đa đặc hiệu bao gồm miền CH₃ trong chuỗi nặng) đề cập đến miền CH₃ của kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế được thay đổi bằng công nghệ “phương pháp “tra khóa vào ổ”” được mô tả chi tiết trong một vài ví dụ trong, ví dụ, 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; và WO 98/ 050431. Trong phương pháp này, các bề mặt tiếp xúc của hai miền CH₃ được thay đổi để tăng cường dị dime hóa cả hai chuỗi nặng chứa hai miền CH₃ này. Mỗi một trong hai miền CH₃ (của hai chuỗi nặng) có thể là “phần “khóa””, trong khi miền còn lại là “phần “ổ””. Việc đưa vào liên kết cầu disulfua còn làm ổn định các dị dime (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) và làm tăng hiệu suất.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu (bao gồm miền CH₃ trong từng chuỗi nặng và) còn khác biệt ở chỗ,

miền CH₃ thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể trong a) và miền CH₃ thứ hai của chuỗi nặng thứ hai của kháng thể trong b) mỗi miền cắt nhau ở bề mặt chung bao gồm bề mặt chung ban đầu giữa các miền CH₃ của kháng thể,

trong đó bề mặt chung nêu trên được thay đổi để thúc đẩy quá trình tạo kháng thể đa đặc hiệu, trong đó quá trình thay đổi này khác biệt ở chỗ:

i) miền CH₃ của một chuỗi nặng được thay đổi,

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của một chuỗi nặng cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại bên trong kháng thể đa đặc hiệu,

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có khối lượng mạch bên lớn hơn, từ đó tạo ra “chốt” trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng có thể đứt vừa lỗ trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại

và

ii) miền CH3 của chuỗi nặng còn lại được thay đổi,

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại mà cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của một chuỗi nặng trong kháng thể đa đặc hiệu

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có khối lượng mạch bên nhỏ hơn, từ đó tạo ra lỗ trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, trong đó “khóa” trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng có thể định vị được.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến gốc axit amin nêu trên có khối lượng mạch bên lớn hơn được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y) và tryptophan (W).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến gốc axit amin có khối lượng mạch bên nhỏ hơn được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T) và valin (V).

Theo một khía cạnh của sáng chế, cả hai miền CH3 còn được thay đổi bằng việc đưa xystein (C) vào dưới dạng axit amin ở các vị trí tương ứng của từng miền CH3 sao cho có thể tạo ra liên kết cầu disulfua giữa hai miền CH3. Do đó, theo khía cạnh này của sáng chế, miền CH3 của một chuỗi nặng còn được thay đổi sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của một chuỗi nặng cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bên trong kháng thể đa đặc hiệu, gốc axit amin được thay thế bằng gốc xystein (C), và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại còn được thay đổi sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của một chuỗi nặng trong kháng thể đa đặc hiệu, gốc axit amin được thay thế bằng gốc xystein (C), sao cho

cầu disulfua giữa hai miền CH3 có thể được tạo ra qua các gốc xystein được đưa vào.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm đột biến axit amin T366W ở một miền CH3 của “chuỗi phình” và đột biến axit amin T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 còn lại của “chuỗi lõm”. Cầu disulfua liên chuỗi bổ sung giữa các miền CH3 cũng có thể được sử dụng (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), ví dụ, bằng cách đưa đột biến axit amin Y349C vào miền CH3 của “chuỗi lõm”; và đột biến axit amin E356C hoặc đột biến axit amin S354C vào miền CH3 của “chuỗi phình”.

Theo một phương án ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu (bao gồm miền CH3 trong từng chuỗi nặng) bao gồm đột biến axit amin S354C và T366W ở một miền CH3 và đột biến axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V ở miền còn lại trong số hai miền CH3 (có đột biến axit amin S354C bổ sung ở một miền CH3 và đột biến axit amin Y349C bổ sung ở miền CH3 còn lại tạo ra liên kết cầu disulfua liên chuỗi) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Các kỹ thuật khác cho cải biến CH3 để gia tăng mức độ dị dime hóa được dự định làm các phương án thay thế của sáng chế và được mô tả trong, ví dụ, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 và WO 2013/096291.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong EP 1 870 459A1 được sử dụng thay thế. Phương pháp này dựa trên việc đưa vào thay thế/đột biến axit amin tích điện có điện tích trái dấu ở các vị trí axit amin đặc hiệu trong bề mặt chung của miền CH3/CH3 giữa cả hai chuỗi nặng. Một phương án được ưu tiên của kháng thể đa đặc hiệu là đột biến axit amin R409D và K370E trong miền CH3 của một chuỗi nặng và đột biến axit amin D399K và E357K trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại của kháng thể đa đặc hiệu (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu nêu trên bao gồm đột biến axit amin T366W trong miền CH3 của “chuỗi phình” và đột biến axit amin T366S, L368A và Y407V trong miền CH3 của “chuỗi lõm”; và còn bao gồm đột biến axit

amin R409D và K370E trong miền CH₃ của “chuỗi phình” và đột biến axit amin D399K và E357K trong miền CH₃ của “chuỗi lõm”.

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm đột biến axit amin S354C và T366W trong miền CH₃ của một chuỗi nặng và đột biến axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại; hoặc kháng thể đa đặc hiệu nêu trên bao gồm đột biến axit amin Y349C và T366W trong miền CH₃ của một chuỗi nặng và đột biến axit amin S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại và còn bao gồm đột biến axit amin R409D và K370E trong miền CH₃ của “chuỗi phình” và đột biến axit amin D399K và E357K trong miền CH₃ của “chuỗi lõm”.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2013/157953 được sử dụng thay thế. Theo một phương án, miền CH₃ của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin T366K và miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin L351D. Theo một phương án khác, miền CH₃ của một chuỗi nặng còn bao gồm đột biến axit amin L351K. Theo một phương án khác, miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại còn bao gồm đột biến axit amin được chọn từ Y349E, Y349D và L368E (theo một phương án L368E).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2012/058768 được sử dụng thay thế. Theo một phương án, miền CH₃ của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin L351Y và Y407A và miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin T366A và K409F. Theo một phương án khác, miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại còn bao gồm đột biến axit amin ở vị trí T411, D399, S400, F405, N390 hoặc K392. Theo một phương án, đột biến axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E và T411W,
- b) D399R, D399W, D399Y và D399K,
- c) S400E, S400D, S400R và S400K,
- d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V và F405W,
- e) N390R, N390K và N390D,
- f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F và K392E.

Theo một phương án khác, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin L351Y và Y407A và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin T366V và K409F. Theo một phương án khác, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin Y407A và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin T366A và K409F. Theo một phương án khác, miền CH3 của chuỗi nặng còn lại còn bao gồm đột biến axit amin K392E, T411E, D399R và S400R.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2011/143545 được sử dụng thay thế. Theo một phương án, cải biến axit amin theo WO2011/143545 được đưa vào trong miền CH3 của chuỗi nặng ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 368 và 409.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2011/090762 cũng sử dụng công nghệ phương pháp “tra khóa vào ổ” nêu trên được sử dụng thay thế. Theo một phương án, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin T366W và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin Y407A. Theo một phương án, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin T366Y và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin Y407T.

Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu là isotyp IgG2 và phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2010/129304 được sử dụng thay thế.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2009/089004 được sử dụng thay thế. Theo một phương án, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm thay thế axit amin của K392 hoặc N392 bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án, axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D); theo một phương án khác, đột biến K392D hoặc N392D) và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm thay thế axit amin của D399, E356, D356, hoặc E357 có axit amin tích điện dương (theo một phương án, Lysin (K) hoặc arginin (R), theo một phương án khác, thay thế D399K, E356K, D356K hoặc E357K; và theo một phương án khác nữa, đột biến D399K hoặc E356K). Theo một phương án khác, miền CH3 của một chuỗi nặng còn bao gồm thay thế axit amin của K409 hoặc R409 bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án, axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D); theo một

phương án khác, đột biến K409D hoặc R409D). Theo một phương án khác, miền CH3 của một chuỗi nặng còn hoặc theo một cách khác bao gồm thay thế axit amin của K439 và/hoặc K370 bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D)).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2007/147901 được sử dụng thay thế. Theo một phương án, miền CH3 của một chuỗi nặng bao gồm đột biến axit amin K253E, D282K và K322D và miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bao gồm đột biến axit amin D239K, E240K và K292D.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO2007/110205 được sử dụng thay thế.

Thuật ngữ “vị trí liên kết” hoặc “vị trí liên kết kháng nguyên” theo sáng chế chỉ (các) vùng chứa phân tử kháng thể mà phối tử (ví dụ, kháng nguyên hoặc mảnh kháng nguyên của nó) thực sự liên kết với và có nguồn gốc từ kháng thể. Vị trí liên kết kháng nguyên bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), hoặc cặp VH/VL.

Vị trí liên kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên mong muốn có thể có nguồn gốc a) từ các kháng thể đã biết với kháng nguyên hoặc b) từ các kháng thể mới hoặc mảnh kháng thể thu được bằng phương pháp miễn dịch hóa *de novo* bằng cách sử dụng protein của kháng nguyên hoặc axit nucleic nêu trên hoặc các mảnh của nó, hoặc bằng cách biểu hiện thực khuẩn thể.

Vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa sáu vùng xác định bổ thể (CDR) góp phần làm thay đổi độ ái lực của vị trí liên kết đối với kháng nguyên. Có ba miền biến đổi chuỗi nặng CDR (CDRH1, CDRH2 và CDRH3) và ba miền biến đổi chuỗi nhẹ CDR (CDRL1, CDRL2 và CDRL3). Phạm vi CDR và vùng khung làm việc (FR) được xác định bằng cách so sánh với dữ liệu được biên soạn về các trình tự axit amin, trong đó các vùng này được xác định theo độ biến đổi giữa các trình tự. Sáng chế còn đề cập đến vị trí liên kết kháng nguyên chức năng gồm một số CDR (tức là, khi độ đặc hiệu liên kết được xác định là ba, bốn hoặc năm CDR). Ví dụ, ít hơn bộ hoàn chỉnh bao gồm 6 CDR có thể đủ để liên kết. Trong một số trường hợp, miền VH hoặc VL là đủ.

Tính đặc hiệu kháng thể chỉ khả năng nhận diện có chọn lọc của kháng thể đối với epitop cụ thể của kháng nguyên. Kháng thể tự nhiên chẳng hạn là kháng thể đơn đặc hiệu. Thuật ngữ kháng thể “đơn đặc hiệu” theo sáng chế chỉ kháng thể có một hoặc nhiều vị trí liên kết, mỗi vị trí này liên kết với cùng một epitop của cùng một kháng nguyên.

Kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, là kháng thể đặc hiệu kép, đặc hiệu ba hoặc đặc hiệu bốn. Kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể có hai tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên khác nhau. Do đó, kháng thể đặc hiệu ba là kháng thể có ba tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên khác nhau. Kháng thể đặc hiệu bốn là kháng thể có bốn tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép.

Nếu kháng thể có nhiều hơn một tính đặc hiệu, các epitop được nhận diện có thể được kết hợp với một kháng nguyên duy nhất hoặc nhiều hơn một kháng nguyên.

Thuật ngữ “hóa trị” theo sáng chế chỉ số vị trí liên kết cụ thể có trong phân tử kháng thể. Kháng thể tự nhiên chẳng hạn có hai vị trí liên kết và có hóa trị hai. Tương tự, thuật ngữ “hóa trị ba” chỉ việc có ba vị trí liên kết trong phân tử kháng thể.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch của một hoặc nhiều lớp globulin miễn dịch. Các lớp globulin miễn dịch bao gồm isotyp IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE và, trong trường hợp IgG và IgA, các phân lớp của chúng. Theo một phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế có cấu trúc miền cố định của kháng thể typ IgG.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" theo sáng chế chỉ chế phẩm chứa các phân tử kháng thể của hợp phần axit amin đơn.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" chỉ kháng thể bao gồm vùng biến đổi, tức là, vùng liên kết, từ một nguồn hoặc loài và ít nhất một phần vùng hằng định có nguồn gốc từ nguồn hoặc loài khác nhau, thường được xây dựng bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Kháng thể khảm bao gồm vùng biến đổi ở chuột và vùng hằng định ở người được ưu tiên. Các dạng "kháng thể khảm" được ưu tiên khác nằm trong phạm vi của sáng chế là các dạng trong đó vùng hằng định được cải biến hoặc thay đổi từ kháng

thể gốc để có được các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là đối với việc liên kết C1q và/hoặc liên kết thụ thể Fc (FcR). Các kháng thể khảm này còn được gọi là "kháng thể chuyển đổi lớp". Kháng thể khảm là sản phẩm của gen globulin miễn dịch được biểu hiện bao gồm các đoạn ADN mã hóa vùng biến đổi globulin miễn dịch và đoạn ADN mã hóa vùng hằng định globulin miễn dịch. Phương pháp sản xuất kháng thể khảm bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp và chuyển nhiễm gen thông thường là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. 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 tương thích với người" chỉ kháng thể trong đó khung làm việc hoặc "vùng xác định bổ thể" (CDR) được cải biến để bao gồm CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch ban đầu. Theo một phương án được ưu tiên, CDR chuột được ghép vào vùng khung làm việc của kháng thể người để tạo ra "kháng thể được làm tương thích với 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 dạng "kháng thể được làm tương thích với người" khác được sáng chế đề cập đến là các dạng trong đó vùng hằng định được cải biến thêm hoặc thay đổi từ vùng hằng định của kháng thể gốc để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là đối với việc liên kết C1q và/hoặc liên kết thụ thể Fc (FcR).

Thuật ngữ "kháng thể người", theo sáng chế, được dự định bao gồm kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của dòng mầm người. Các kháng thể người đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Các kháng thể người cũng có thể được sản sinh ở các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt), khi miễn dịch hóa, có khả năng tạo ra danh mục đầy đủ hoặc khả năng chọn lọc các kháng thể người khi không có sự sản sinh globulin miễn dịch nội sinh. Việc truyền chuỗi gen globulin miễn dịch của dòng mầm người trong chuột nhắt đột biến dòng mầm này sẽ dẫn đến việc tạo ra các kháng thể người khi thách thức 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; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Các kháng thể người cũng có thể được tạo ra trong các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể (Hoogenboom, H.R.,

and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Các công nghệ trong Cole et al. và Boerner et al. cũng sẵn có để xây dựng các kháng thể đơn dòng người (Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); và Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Cũng đã được đề cập đối với kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể người" theo sáng chế còn bao gồm các kháng thể được cải biến trong vùng hằng định để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là đối với việc liên kết C1q và/hoặc liên kết FcR, ví dụ, bằng cách "chuyển đổi lớp" tức là thay đổi hoặc đột biến các phần Fc (ví dụ, từ IgG1 thành IgG4 và/hoặc đột biến IgG1/IgG4).

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", theo sáng chế, được dự định bao gồm tất cả các kháng thể người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng công cụ tái tổ hợp, như kháng thể được phân lập từ tế bào vật chủ như tế bào NS0 hoặc tế bào CHO hoặc từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) chuyển gen cho gen globulin miễn dịch người hoặc kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ. Các kháng thể người tái tổ hợp này có vùng biến đổi và vùng hằng định dưới dạng được bố trí lại. Các kháng thể người tái tổ hợp theo sáng chế được đưa vào quá trình siêu biến soma in vivo. Do đó, trình tự axit amin của vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi có nguồn gốc và liên quan đến trình tự VH và VL dòng mầm người, có thể là, về mặt tự nhiên không tồn tại danh mục dòng mầm kháng thể người in vivo.

"Miền biến đổi" (miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), miền biến đổi của chuỗi nặng (VH)) theo sáng chế chỉ từng cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan trực tiếp đến việc liên kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi ở người có cùng cấu trúc chung và mỗi miền bao gồm bốn vùng khung làm việc (FR) có trình tự được bảo toàn rộng rãi, được nối bằng ba "vùng siêu biến" (hoặc vùng xác định bổ thể, CDR). Vùng khung làm việc nhận cấu dạng tấm β và các CDR có thể tạo ra các vòng nối cấu trúc tấm β . Các CDR trong mỗi chuỗi được giữ trong cấu trúc ba chiều của nó bằng vùng khung làm việc và cùng với các CDR từ chuỗi còn lại tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên. Vùng CDR3 chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có vai trò đặc biệt quan trọng về tính đặc hiệu/ái lực liên kết của kháng thể theo sáng chế và do đó đề xuất một mục đích khác của sáng chế.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "phần liên kết kháng nguyên của kháng thể" khi được sử dụng trong bản mô tả chỉ gốc axit amin của kháng thể chịu trách nhiệm liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm gốc axit amin từ "vùng xác định bổ thể" hoặc "CDR". "Khung làm việc" hoặc vùng "FR" là các vùng của miền biến đổi khác với các gốc của vùng siêu biến như được định nghĩa trong bản mô tả. Do đó, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm, từ đầu N đến đầu C, các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các CDR trong mỗi chuỗi được tách ra bằng các axit amin của khung làm việc. Đặc biệt là, CDR3 của chuỗi nặng là vùng đóng góp nhiều nhất vào việc liên kết kháng nguyên. Vùng CDR và FR được xác định theo định nghĩa chuẩn trong Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Theo sáng chế, thuật ngữ “liên kết”, “mà gắn kết đặc hiệu”, và “gắn kết đặc hiệu” chỉ việc kháng thể liên kết với epitop của kháng nguyên trong thử nghiệm in vitro, tốt hơn là trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) bằng kháng nguyên kiểu đại tinh khiết. Ái lực liên kết được định nghĩa bằng thuật ngữ k_a (hằng số tốc độ để kết hợp 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, “liên kết” hoặc “mà gắn kết đặc hiệu với” có nghĩa là ái lực liên kết (K_D) bằng 10^{-8} mol/l hoặc thấp hơn, theo một phương án, 10^{-8} M đến 10^{-13} mol/l. Do đó, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với mỗi kháng nguyên mà nó đặc hiệu với có ái lực liên kết (K_D) bằng 10^{-8} mol/l hoặc thấp hơn, theo một phương án, có ái lực liên kết (K_D) bằng 10^{-8} đến 10^{-13} mol/l. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên của nó có ái lực liên kết (K_D) bằng 10^{-9} đến 10^{-13} mol/l.

Khả năng kháng thể liên kết với FcγRIII có thể được nghiên cứu bằng thử nghiệm BIAcore® (GE-Healthcare Uppsala, Sweden). Ái lực liên kết được định nghĩa bằng thuật ngữ k_a (hằng số tốc độ để kết hợp kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên), k_D (hằng số phân ly), và K_D (k_D/k_a).

Thuật ngữ "epitop" bao gồm thành phần quyết định polypeptit bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Theo một số phương án, thành phần quyết

định epitop bao gồm các nhóm phân tử bề mặt có hoạt tính hóa học như axit amin, mạch bên đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, theo một số phương án, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều cụ thể, và hoặc các đặc tính tích điện cụ thể. Epitop là vùng chứa kháng nguyên liên kết với kháng thể.

Theo một số phương án, kháng thể được nêu là gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khi tốt hơn nếu nó nhận diện kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức của các protein và/hoặc đại phân tử.

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, kháng thể nêu trên thuộc phân lớp IgG1 người, hoặc phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A và L235A (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, kháng thể nêu trên thuộc phân lớp IgG2 người.

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, kháng thể nêu trên thuộc phân lớp IgG3 người.

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, kháng thể nêu trên thuộc phân lớp IgG4 người hoặc, phân lớp IgG4 người có đột biến bổ sung S228P (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, nó thuộc phân lớp IgG1 người hoặc phân lớp IgG4 người.

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế đặc trưng là thuộc phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A và L235A (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế đặc trưng là thuộc phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế đặc trưng là thuộc phân lớp IgG4 người có các đột biến S228P và L235E (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế đặc trưng là thuộc phân lớp IgG4 người có các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Đã phát hiện ra rằng, kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế có các đặc tính cải thiện, như hoạt tính sinh học hoặc hoạt tính dược học, các tính chất dược động học hoặc độc tính. Các đặc tính này có thể được sử dụng, ví dụ, để điều trị các bệnh, như bệnh ung thư.

Thuật ngữ “vùng hằng định” theo sáng chế chỉ tổng số các miền của kháng thể khác với vùng biến đổi. Vùng hằng định không liên quan trực tiếp đến việc liên kết của kháng nguyên, nhưng có nhiều chức năng tác động khác nhau. Phụ thuộc vào trình tự axit amin của vùng hằng định của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể được chia thành các lớp: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài lớp còn có thể được chia tiếp thành phân lớp, như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA1 và IgA2. Các vùng hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp kháng thể khác nhau lần lượt được gọi là α , δ , γ , và μ . Các vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL) có thể được tìm thấy trong cả năm lớp kháng thể được gọi là κ (kappa) và λ (lambda). “Miền cố định” theo sáng chế có nguồn gốc từ người, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể người thuộc phân lớp IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Các miền và vùng hằng định này đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Theo sáng chế, vị trí axit amin của tất cả các vùng và miền cố định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ đánh số Kabat được mô tả trong Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) và trong bản mô tả được gọi là “đánh số theo hệ thống đánh số Kabat”. Cụ thể là, hệ đánh số Kabat (xem trang 647-660) nêu trong Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) được sử dụng cho miền cố định chuỗi nhẹ CL của isotyp kappa và lambda, và hệ đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU (xem trang 661-723) được sử dụng cho

miền chuỗi nặng hằng định (CH1, bản lề, CH2 và CH3, còn được nêu rõ hơn trong bản mô tả là “đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU” trong trường hợp này).

Trong khi các kháng thể thuộc phân lớp IgG4 cho thấy khả năng gắn kết thụ thể Fc (FcγRIIIa) giảm, các kháng thể thuộc phân lớp IgG khác cho thấy khả năng gắn kết mạnh. Tuy nhiên, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (mất hydrat cacbon của Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, và His435 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) là các gốc, nếu được thay đổi, cũng khiến cho khả năng gắn kết của thụ thể Fc giảm (Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có khả năng gắn kết FcR giảm so với kháng thể IgG1. Do đó, kháng thể gốc liên quan đến khả năng gắn kết FcR của phân lớp IgG4 hoặc phân lớp IgG1 hoặc IgG2 có đột biến ở S228, L234, L235 và/hoặc D265, và/ hoặc chứa đột biến PVA236 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU). Theo một phương án, các đột biến ở kháng thể gốc là S228P, L234A, L235A, L235E và/hoặc PVA236 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU). Theo một phương án khác, các đột biến ở kháng thể gốc là ở S228P của IgG4 và ở L234A và L235A của IgG1 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Vùng hằng định của kháng thể liên quan trực tiếp đến ADCC (tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) và CDC (tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể). Quá trình hoạt hóa bổ sung (CDC) bắt đầu bằng cách liên kết yếu tố bổ thể C1q với vùng hằng định của hầu hết các phân lớp kháng thể IgG. Liên kết của C1q với kháng thể là do các tương tác protein-protein đã định nghĩa ở vị trí gọi là vị trí liên kết. Các vị trí liên kết vùng hằng định như vậy là đã biết trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Bunkhouse, R. and Cobra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thomason, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idiocias, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hearer, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434. Các vị trí liên kết vùng hằng

định, ví dụ, đặc trưng bởi các axit amin L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, và P329 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)” chỉ quá trình phân hủy các tế bào đích ở người nhờ kháng thể theo sáng chế khi có mặt các tế bào tác động. ADCC tốt hơn là được xác định bằng cách xử lý chế phẩm chứa tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng kháng thể theo sáng chế khi có mặt các tế bào tác động như PBMC mới được phân lập hoặc tế bào tác động tinh khiết từ lớp đệm, như bạch cầu đơn nhân hoặc tế bào diệt tự nhiên (NK) hoặc dòng tế bào NK phát triển lâu năm.

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)” chỉ quy trình bắt đầu bằng cách liên kết bổ thể C1q với phần Fc của hầu hết các phân lớp kháng thể IgG. Liên kết của C1q với kháng thể là do tương tác protein-protein được xác định ở vị trí gọi là vị trí liên kết. Các vị trí liên kết phần Fc như vậy là đã biết trong tình trạng kỹ thuật (xem trên đây). Các vị trí liên kết phần Fc, ví dụ, đặc trưng bởi các axit amin L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, và P329 (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU). Các kháng thể thuộc phân lớp IgG1, IgG2, và IgG3 thường cho thấy sự hoạt hóa bổ sung bao gồm liên kết C1q và C3, trong khi đó IgG4 không hoạt hóa hệ bổ sung và không liên kết C1q và/hoặc C3.

Chức năng tác động qua trung gian tế bào của kháng thể đơn dòng có thể được tăng cường bằng cách xử lý kỹ thuật thành phần oligosacarit của nó như được mô tả trong Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180, và US 6,602,684. Các kháng thể loại IgG1, các kháng thể điều trị bệnh được sử dụng phổ biến nhất, là glycoprotein có vị trí glycosyl hóa được bảo toàn liên kết với N ở Asn297 trong miền CH2. Hai oligosacarit hai nhánh phức hợp được gắn vào Asn297 được vùi giữa các miền CH2, tạo ra các tiếp xúc mở rộng với mạch chính polypeptit, và việc các tiếp xúc này có mặt là thiết yếu để kháng thể điều tiết các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M., R., et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32). Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 và WO 99/54342 cho thấy sự biểu hiện quá mức ở tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO) của $\beta(1,4)$ -N-

axetylglucosaminyltransferaza III (“GnTIII”), là glycosyltransferaza xúc tác sự tạo ra oligosacarit cắt đôi, làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC in vitro của kháng thể. Các thay đổi trong chế phẩm chứa Asn297 hydrat cacbon hoặc tác động bài tiết của nó cũng liên kết với FcγR và C1q (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; Davies, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., et al., *J. Immunol. Methods* 263 (2002) 133-147).

Phương pháp tăng cường chức năng tác động qua trung gian tế bào của kháng thể đơn dòng được báo cáo trong, ví dụ, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể đa đặc hiệu được glycosyl hóa (nếu kháng thể này bao gồm phần Fc của phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, tốt hơn là phân lớp IgG1 hoặc IgG3) bằng chuỗi đường ở Asn297, từ đó lượng fucoza trong chuỗi đường bằng 65% hoặc thấp hơn (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU). Theo một phương án khác là lượng fucoza trong chuỗi đường nằm trong khoảng từ 5% đến 65%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 20% đến 40%. “Asn297” theo sáng chế có nghĩa là axit amin asparagin được đặt ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc. Dựa trên các biến thể trình tự nhỏ của kháng thể, Asn297 cũng có thể đặt một số axit amin (thường không quá ± 3 axit amin) ở trước hoặc sau vị trí 297, tức là trong khoảng từ vị trí 294 đến vị trí 300. Theo một phương án, kháng thể được glycosyl hóa theo sáng chế, phân lớp IgG là phân lớp IgG1 người, phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A và L235A hoặc phân lớp IgG3. Theo một phương án khác, lượng axit N-glycolylneuraminic (NGNA) bằng 1% hoặc thấp hơn và/hoặc lượng alpha-1,3-galactoza đầu N bằng 1% hoặc thấp hơn trong chuỗi đường. Chuỗi đường tốt hơn nếu có đặc tính là glycan liên kết với N được gắn vào Asn297 của kháng thể được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào CHO.

Thuật ngữ “chuỗi đường cho thấy đặc tính của các glycan liên kết với N được gắn vào Asn297 của kháng thể được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào CHO” chỉ ra rằng chuỗi đường ở Asn297 của kháng thể gốc theo sáng chế có cùng cấu trúc và trình tự gốc đường ngoại trừ gốc fucosa giống như cấu trúc và trình tự gốc đường của kháng thể được biểu hiện trong các tế bào CHO không được cải biến giống nhau, ví dụ, như cấu trúc và trình tự gốc đường được báo cáo trong WO 2006/103100.

Thuật ngữ “NGNA” theo sáng chế chỉ axit N-glycolylneuraminic gốc đường.

Quá trình glycosyl hóa IgG1 hoặc IgG3 người xảy ra ở Asn297 do quá trình glycosyl hóa oligosacarit phức hợp hai nhánh được fucosyl hóa nhân được kết thúc bằng tối đa hai gốc Gal. Vùng hằng định chuỗi nặng người của phân lớp IgG1 hoặc phân lớp IgG3 được báo cáo chi tiết trong Kabat, E., A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), và trong Brüggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361; Love, T., W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527. Các cấu trúc này được ký hiệu là gốc G0, G1 (α -1,6- hoặc α -1,3-), hoặc G2 glycan, phụ thuộc vào lượng gốc Gal tận cùng (Raju, T., S., *Bioprocess Int.* 1 (2003) 44-53). Việc glycosyl hóa dạng CHO của phần Fc kháng thể được mô tả trong, ví dụ, Routier, F., H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207. Các kháng thể được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào vật chủ CHO không được cải biến glycosyl thường được fucosyl hóa ở Asn297 với lượng ít nhất là 85%. Oligosacarit được cải biến của kháng thể có thể là thể lai hoặc phức hợp. Tốt hơn là oligosacarit cắt đôi, được khử/không được fucosyl hóa là thể lai. Theo một phương án khác, oligosacarit cắt đôi, được khử/không được fucosyl hóa là phức hợp.

Theo sáng chế, “lượng fucosa” có nghĩa là lượng đường trong chuỗi đường ở Asn297, liên quan đến tổng tất cả các cấu trúc glycosyl được gắn vào Asn297 (ví dụ, phức hợp, thể lai và cấu trúc có hàm lượng manosa cao) được xác định bằng phép đo phổ khối MALDI-TOF và được tính dưới dạng giá trị trung bình. Lượng fucosa tương đối là phần trăm cấu trúc chứa fucosa liên quan đến tất cả các cấu trúc glycosyl được nhận biết trong mẫu được xử lý N-Glycosidaza F (ví dụ phức hợp,

thể lai và cấu trúc oligomanoza và cấu trúc hàm lượng manosa cao, một cách lần lượt) bằng MALDI-TOF.

Kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với nhiều kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến, không phải kháng nguyên thứ nhất cũng không phải kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào T hoạt hóa. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến, không phải kháng nguyên thứ nhất cũng không phải kháng nguyên thứ hai là CD3. Theo một phương án, kháng thể không gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào T hoạt hóa. Theo một phương án, kháng thể không gắn kết đặc hiệu với CD3.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là TWEAK người. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là IL17 người. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng nguyên thứ nhất là TWEAK người và kháng nguyên thứ hai là IL17 người. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng nguyên thứ nhất là IL17 người và kháng nguyên thứ hai là TWEAK người.

TWEAK người (UniProtKB O43508, chất cảm ứng yếu liên quan đến TNF của quá trình chết tế bào theo chương trình) là protein xuyên màng typ II kết hợp với bề mặt tế bào. TWEAK được mô tả trong Chicheportiche, Y., et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 32401-32410; Marsters, S.A., et al., Curr. Biol. 8 (1998) 525-528; Lynch, C.N., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 8455-8459. Dạng hoạt hóa của TWEAK là homotrimer tan được. TWEAK người và chuột cho thấy 93% đồng nhất trình tự trong miền liên kết thụ thể. Thụ thể TWEAK Fn14 (protein 14 kDa cảm ứng bởi yếu tố phát triển nguyên bào sợi) là protein xuyên màng typ I 129 aa gồm có một miền giàu xystein đơn trong miền liên kết phối tử. Quá trình truyền tín hiệu TWEAK xảy ra thông qua việc hoạt hóa con đường NF-KB. TWEAK mARN được biểu hiện trong nhiều mô khác nhau và được tìm thấy trong hầu hết các cơ quan chính như tim, não, cơ vân, và tuyến tụy, các mô liên quan đến hệ miễn dịch như lá lách, hạch bạch huyết, và tuyến ức. Fn14 mARN được tìm thấy trong các tế bào tim, não, phổi, nhau thai, EC mạch máu và cơ trơn. Chuột nhất bất hoạt TWEAK-null và Fn14-null có thể sống được, khỏe mạnh và có khả năng sinh sản và có nhiều tế bào diệt tự nhiên hơn và biểu hiện đáp ứng viêm bẩm sinh tăng cường. TWEAK liên

quan đến sự chết tế bào theo chương trình, sự tăng sinh, sự hình thành mạch, sự bán ảnh thiếu máu, sự phù não, sự đa xơ cứng.

IL-17 người (còn gọi là IL17-A; CTLA-8, Swiss Prot Q16552, IL17) là xytokin tiền viêm được sản sinh bởi tập hợp con của tế bào T trợ giúp (gọi là Th17) do sự phát sinh bệnh MS. IL-17A có vai trò trong quá trình cảm ứng các xytokin viêm khác, các chemokin và các phân tử bám dính. Việc điều trị cho động vật bằng các kháng thể trung hòa IL-17A làm giảm tỷ lệ mắc bệnh và độ nghiêm trọng của bệnh ở bệnh viêm não tủy tự miễn (Komiyama, Y. et al., J. Immunol. 177 (2006) 566-573). IL-17A được biểu hiện quá mức trong dịch não tủy của bệnh nhân mắc MS (Hellings, P.W. et al., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50; Matusiewicz, D. et al., Multiple Sclerosis 5 (1999) 101-104; WO 2005/051422). Ngoài ra, kháng thể trung hòa IL-17A làm giảm độ nghiêm trọng và tỷ lệ mắc bệnh viêm khớp gây ra bởi collagen ở mô hình chuột nhắt RA, và IL-17A với nồng độ cao có thể được phát hiện trong hoạt dịch của các khớp bị viêm từ bệnh nhân mắc RA (Ziolkowska, M. et al., J. Immunol. 164 (2000) 2832-2838; Kotake, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 1345-1352; Hellings, P.W. et al., Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28 (2003) 42-50).

Kháng thể theo sáng chế được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế và theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế này. Phương pháp sản xuất tái tổ hợp được biết rộng rãi trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm việc biểu hiện protein ở các tế bào nhân rải rác và nhân chuẩn với sự phân lập kháng thể sau đó và thường tinh chế đến độ tinh khiết được dụng. Để biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ như nêu trên, các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được cải biến tương ứng được xen vào các vector biểu hiện bằng phương pháp chuẩn. Quá trình biểu hiện được tiến hành trong các tế bào vật chủ nhân rải rác 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, tế bào nấm men, hoặc tế bào E.coli, và kháng thể được thu hồi từ các tế bào này (phần dịch nổi trên bề mặt hoặc tế bào sau khi phân giải). Các phương pháp chung để sản xuất tái tổ hợp kháng thể là đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong các bài nhận xét trong 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) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

Các kháng thể sản sinh do tế bào vật chủ có thể trải qua quá trình phân tách sau dịch mã của một hoặc nhiều, đặc biệt là một hoặc hai, axit amin từ đầu C của chuỗi nặng. Do đó, kháng thể sản sinh do tế bào vật chủ bằng cách biểu hiện phân tử axit nucleic đặc hiệu mã hóa chuỗi nặng độ dài đầy đủ có thể bao gồm chuỗi nặng độ dài đầy đủ, hoặc có thể bao gồm biến thể được phân tách của chuỗi nặng độ dài đầy đủ (trong bản mô tả còn gọi là chuỗi nặng biến thể được phân tách). Đây có thể là trường hợp trong đó hai axit amin đầu C cuối cùng của chuỗi nặng là glyxin (G446) và lysin (K447, đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

Do đó, trình tự axit amin của chuỗi nặng chứa miền CH3 được nêu trong bản mô tả mà không có glyxin-lysin dipeptit đầu C nếu không được chỉ khác đi.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, bao gồm glyxin-lysin dipeptit đầu C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án, kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, bao gồm gốc glyxin đầu C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Chế phẩm theo sáng chế, như được phẩm được nêu trong bản mô tả, chứa tập hợp các kháng thể theo sáng chế. Tập hợp các kháng thể này có thể bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng độ dài đầy đủ và các kháng thể có chuỗi nặng biến thể được phân tách. Tập hợp các kháng thể có thể gồm có hỗn hợp các kháng thể có chuỗi nặng độ dài đầy đủ và các kháng thể có chuỗi nặng biến thể được phân tách, trong đó ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% kháng thể có chuỗi nặng biến thể được phân tách.

Theo một phương án, chế phẩm chứa tập hợp các kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, có glyxin-lysin dipeptit đầu C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án, chế phẩm chứa tập hợp các kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, có gốc glyxin đầu C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án, chế phẩm này chứa tập hợp các kháng thể bao gồm các kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả; các kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, có gốc glyxin đầu C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat); và các kháng thể bao gồm chuỗi nặng chứa miền CH3, như được xác định trong bản mô tả, có glyxin-lysine dipeptit đầu C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế được tách khỏi môi trường nuôi cấy một cách thích hợp bằng quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharose, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực. ADN và ARN mã hóa các kháng thể đơn dòng dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Các tế bào lai có thể đóng vai trò làm nguồn ADN và ARN này. Ngay khi được phân lập, ADN có thể được xen vào vectơ biểu hiện, sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ như tế bào HEK 293, tế bào CHO, hoặc tế bào u tủy mà về mặt khác, không sản sinh protein globulin miễn dịch, để có được sự tổng hợp các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp trong các tế bào vật chủ.

Biến thể trình tự axit amin (hoặc đột biến) của kháng thể đa đặc hiệu được điều chế bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào ADN của kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp nucleotit. Tuy nhiên, các cải biến như vậy chỉ có thể được thực hiện trong phạm vi rất hạn chế, ví dụ như nêu trên. Ví dụ, các cải biến này không làm thay đổi các đặc tính của kháng thể nêu trên như isotyp IgG và khả năng gắn kết kháng nguyên, mà còn có thể làm cải thiện hiệu suất của việc sản xuất tái tổ hợp, độ ổn định protein hoặc tạo điều kiện cho việc tinh chế. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều thay thế axit amin bảo toàn.

Các axit amin có thể được chia nhóm theo các tính chất mạch bên chung:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) axit: Asp, Glu;

(4) bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến việc định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) gốc thơm: Trp, Tyr, Phe.

Bảng 1 – Axit amin có tính chất cụ thể

Axit amin	3 ký tự	1 ký tự	Độ phân cực mạch bên	Điện tích mạch bên (pH 7,4)
Alanin	Ala	A	không phân cực	trung tính
Arginin	Arg	R	phân cực bazơ	dương tính
Asparagin	Asn	N	phân cực	trung tính
Axit aspartic	Asp	D	phân cực axit	Âm tính
Xystein	Cys	C	không phân cực	trung tính
Axit glutamic	Glu	E	phân cực axit	Âm tính
Glutamin	Gln	Q	phân cực	trung tính
Glyxin	Gly	G	không phân cực	trung tính
Histidin	His	H	phân cực bazơ	Dương tính (10%) trung tính (90%)
Isoleucine	Ile	I	không phân cực	trung tính
Leucine	Leu	L	không phân cực	trung tính
Lysin	Lys	K	phân cực bazơ	Dương tính
Metionin	Met	M	không phân cực	trung tính
Phenylalanin	Phe	F	không phân cực	trung tính
Prolin	Pro	P	không phân cực	trung tính
Serin	Ser	S	phân cực	trung tính
Threonin	Thr	T	phân cực	trung tính
Tryptophan	Trp	W	không phân cực	trung tính
Tyrosin	Tyr	Y	phân cực	trung tính
Valin	Val	V	không phân cực	trung tính

Thuật ngữ “tế bào vật chủ” theo sáng chế chỉ loại hệ tế bào bất kỳ có thể được xử lý kỹ thuật để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào HEK293 và tế bào CHO được sử dụng làm tế bào vật chủ. Theo sáng chế, các cụm từ “tế bào,” “dòng tế bào,” và “nuôi cấy tế bào” được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các tên gọi như vậy bao gồm cả thể hệ con. Do đó, cụm từ “thể biến nạp” và

“tế bào được biến nạp” bao gồm tế bào của đối tượng sơ cấp và các môi trường nuôi cấy thu được từ đó mà không quan tâm đến số lần cấy chuyển. Cũng nên hiểu rằng, tất cả các thế hệ con có thể không giống hết nhau về nồng độ ADN, do các đột biến cố ý hoặc vô ý. Thế hệ con biến thể có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc trong tế bào được biến nạp gốc được bao gồm. Khi các tên gọi khác nhau được dự định, sẽ là rõ ràng từ ngữ cảnh.

Việc biểu hiện trong các tế bào NS0 được mô tả trong, ví dụ, Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Việc biểu hiện nhất thời được mô tả trong, ví dụ, Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Việc tách dòng của miền biến đổi được mô tả trong 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. Hệ biểu hiện nhất thời được ưu tiên (HEK 293) được mô tả trong Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., in *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 và trong Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Các trình tự đối chứng thích hợp cho tế bào nhân nguyên thủy, ví dụ, bao gồm gen khởi động, tùy ý trình tự điều khiển, và vị trí liên kết ribosom. Các tế bào nhân chuẩn đã được biết là sử dụng gen khởi động, gen tăng cường và tín hiệu polyadenyl hóa.

Axit nucleic “được liên kết có điều khiển” khi nó được đặt trong môi liên hệ chức năng với một trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN đối với trình tự hoặc gen dẫn đầu kích thích tiết ra được liên kết có điều khiển với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện dưới dạng tiền-protein tham gia vào quá trình tiết polypeptit; gen khởi động hoặc gen tăng cường được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của trình tự này; hoặc vị trí liên kết ribosom được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó được định vị để tạo điều kiện cho quá trình dịch mã. Nhìn chung, “được liên kết có điều khiển” có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết là liền kề, và, trong trường hợp gen dẫn đầu tiết ra, liền kề và trong khung đọc. Tuy nhiên, gen tăng cường không cần phải liền kề. Việc liên kết kết thúc bằng cách nối ở vị trí giới hạn thuận lợi. Nếu các vị trí này

không tồn tại, các chất thích nghi oligonucleotit tổng hợp hoặc tác nhân liên kết được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

Việc tinh chế kháng thể được thực hiện để loại bỏ các thành phần tế bào hoặc các tạp chất khác, ví dụ, các axit nucleic hoặc protein trong tế bào khác, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm phương pháp xử lý kiềm/SDS, phân vạch CsCl, sắc ký cột, điện di gel agarosa, và các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Xem Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Các phương pháp khác nhau được thiết lập tốt và được sử dụng rộng rãi để tinh chế protein, như sắc ký ái lực bằng protein vi sinh (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 dạng hỗn hợp), hấp thụ ưa lưu huỳnh (ví dụ, với beta-mercaptoetanol và các phối tử SH khác), tương tác kỵ nước hoặc sắc ký hấp thụ thơm (ví dụ, với nhựa phenyl-sepharosa, aza-arenophilic, hoặc axit m-aminophenylboric), sắc ký ái lực chelat kim loại (ví dụ, với vật liệu ái lực với Ni(II) và Cu(II)), sắc ký loại trừ theo kích cỡ, và phương pháp điện di (như điện di gel, điện di mao dẫn) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất dược phẩm. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, dược phẩm, chứa kháng thể theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang thuốc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm nêu trên dùng để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị dùng kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế dùng để điều trị các bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh ở cơ, ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ, bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm nêu trên dùng để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, các bệnh ở cơ, ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ, bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, các bệnh ở cơ, ví dụ bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, các bệnh ở cơ, ví dụ, bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ, bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu, bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị dùng kháng thể theo sáng chế.

Theo sáng chế, “chất mang dược” bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, chất kháng khuẩn và chất chống nấm, chất đẳng trương và chất trì hoãn hấp thụ, và chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Tốt hơn là, chất mang thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, tùy sống hoặc biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Như sẽ được hiểu bởi người có kiến

thức trung bình, đường dùng và/hoặc cách dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong đợi. Để dùng hợp chất theo sáng chế bằng các đường dùng nhất định, có thể là cần phải bọc hợp chất này bằng, hoặc cùng sử dụng hợp chất này với, vật liệu để ngăn chặn 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 pha loãng. Các chất pha loãng được dùng bao gồm nước muối và dung dịch đệm trong nước. Các chất mang được bao gồm dung dịch vô trùng trong nước hoặc dạng phân tán và bột vô trùng dùng cho được phẩm bào chế ngay lúc dùng chứa dung dịch tiêm vô trùng hoặc dạng phân tán vô trùng. Việc sử dụng môi trường và các chất như vậy cho các chất hoạt được là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Cụm từ “dùng ngoài đường tiêu hóa” và “được dùng ngoài đường tiêu hóa” theo sáng chế có nghĩa là cách dùng khác với dùng trong ruột và khu trú, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong não tủy, trong nang, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới nang, dưới màng nhện, trong tủy sống, gây tê ngoài màng cứng và trong xương ức.

Thuật ngữ bệnh ung thư theo sáng chế chỉ các bệnh tăng sinh, như u lympho, bệnh bạch cầu thể lympho, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào tiểu phế quản phế nang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u melanin da hoặc u melanin hốc mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bao tử, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom ống dẫn trứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ tử cung, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacom mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, caxinoma tế bào thận, caxinom bề thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư đường mật, u hệ thần kinh trung ương (CNS), u tủy sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào đệm đa hình, u tế bào hình sao, u Schwann, u màng não thất, u nguyên bào tủy, u màng não, caxinoma tế bào vảy, u tuyến tuyến yên và

sacom Ewings, bao gồm dạng kháng bất kỳ của các bệnh ung thư nêu trên, hoặc tổ hợp của một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Các dược phẩm này cũng có thể chứa chất bảo trợ như chất bảo quản, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa và chất phân tán. Việc ngăn chặn các vi sinh vật có mặt có thể được đảm bảo bằng cả các quy trình vô trùng, nêu trên, và bằng cách bao gồm cả các chất kháng khuẩn và chất chống nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và chất tương tự. Cũng có thể mong muốn bao gồm chất độn, như đường, natri clorua, và chất tương tự trong dược phẩm. Ngoài ra, có thể mang lại sự hấp thụ kéo dài dạng dược phẩm tiêm được bằng cách bao gồm cả các chất trì hoãn hấp thụ như nhôm monostearat và gelatin.

Bất kể đường dùng được chọn, hợp chất theo sáng chế, có thể được sử dụng ở dạng dược hydrat hóa thích hợp, và/hoặc dược phẩm theo sáng chế, được phối trộn thành dạng liều lượng được dùng bằng các phương pháp thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Lượng liều lượng thực tế của thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi để thu được lượng thành phần hoạt tính hữu hiệu để đạt được đáp ứng điều trị bệnh mong muốn cho bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và cách dùng, mà không gây độc cho bệnh nhân. Lượng liều lượng được chọn phụ thuộc vào các yếu tố dược động học khác nhau bao gồm hoạt tính của dược phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết hợp chất cụ thể được sử dụng, thời gian điều trị, các thuốc, hợp chất và/hoặc vật liệu khác được sử dụng kết hợp với dược phẩm cụ thể được sử dụng, độ tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng bệnh, sức khỏe tổng quát và tiền sử bệnh của bệnh nhân được điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết rõ trong lĩnh vực y học.

Dược phẩm này cần phải vô trùng và lỏng đến mức phân bố được dược phẩm này bằng xi lanh. Ngoài nước, chất mang tốt hơn là dung dịch nước muối đậm đặc trung.

Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt được yêu cầu trong trường hợp dạng phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là được

phẩm này chứa chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như mannitol hoặc sorbitol, và natri clorua.

Thuật ngữ “biến nạp” theo sáng chế chỉ quy trình chuyển các vectơ/axit nucleic vào tế bào vật chủ. Nếu các tế bào không có vách ngăn thành tế bào mạnh được sử dụng làm tế bào vật chủ, việc chuyển nhiễm được tiến hành, ví dụ, bằng phương pháp kết tủa canxi phosphat như được mô tả trong Graham and Van der Eh, *Virology* 52 (1978) 546ff. Tuy nhiên, các phương pháp khác để đưa ADN vào tế bào như bằng cách tiêm hạt nhân hoặc bằng cách dung hợp tế bào trần cũng có thể được sử dụng. Nếu các tế bào nhân rải rác hoặc các tế bào chứa các cấu trúc vách tế bào cơ bản được sử dụng, ví dụ, một phương pháp chuyển nhiễm là xử lý canxi bằng cách sử dụng canxi clorua như được mô tả trong Cohen, F.N, et al., *PNAS* 69 (1972) 7110 et seq.

Theo sáng chế, “biểu hiện” chỉ quy trình axit nucleic được phiên mã thành ARN thông tin và/hoặc quy trình mà ARN thông tin được phiên mã (còn gọi là thể phiên mã) sau đó được dịch mã thành peptit, polypeptit, hoặc protein. Các thể phiên mã và polypeptit được mã hóa được gọi chung là sản phẩm di truyền. Nếu polynucleotit có nguồn gốc từ ADN hệ gen, việc biểu hiện trong tế bào nhân chuẩn có thể bao gồm việc ghép ARN thông tin.

“Vectơ” là phân tử axit nucleic, đặc biệt là tự sao chép, truyền phân tử axit nucleic đã được xen vào và/hoặc giữa các tế bào vật chủ. Thuật ngữ này bao gồm các vectơ chủ yếu đóng vai trò trong quá trình xen ADN hoặc ARN vào tế bào (ví dụ, kết hợp nhiễm sắc thể), việc sao chép các vectơ chủ yếu đóng vai trò trong quá trình sao chép ADN hoặc ARN, và vectơ biểu hiện đóng vai trò trong quá trình phiên mã và/hoặc dịch mã ADN hoặc ARN. Sáng chế cũng đề cập đến các vectơ tạo ra nhiều hơn một chức năng như được mô tả.

“Vectơ biểu hiện” là polynucleotit, khi được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp, có thể được phiên mã và dịch mã thành polypeptit. “Hệ biểu hiện” thường chỉ tế bào vật chủ thích hợp gồm có vectơ biểu hiện có thể đóng vai trò trong việc thu được sản phẩm biểu hiện mong muốn.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế được liệt kê như sau:

1. Kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

- i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc
- ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

2. Kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

3. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

4. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

5. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 4, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat); và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

6. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

7. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)); và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

8. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

9. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 8, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

10. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 1 hoặc 2, trong đó trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

11. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 5, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

12. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 9, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit

amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

13. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) và chuỗi nhẹ thứ hai trong b) là isotyp kappa.

14. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12, trong đó miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) là isotyp lambda và miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) là isotyp kappa.

15. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12, trong đó miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) và chuỗi nhẹ thứ hai trong b) là isotyp lambda.

16. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) hoặc chuỗi nhẹ thứ hai trong b), trong đó axit amin ở vị trí 124 không được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) và là isotyp kappa, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (theo một phương án ưu tiên bởi axit glutamic (E)) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat).

17. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, khác biệt ở chỗ:

miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể trong a) và miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai của kháng thể trong b) mỗi miền cắt nhau ở bề mặt chung bao gồm bề mặt chung ban đầu giữa miền CH3 của các kháng thể,

trong đó bề mặt chung nêu trên được thay đổi để thúc đẩy việc tạo ra kháng thể đa đặc hiệu, trong đó quá trình thay đổi này khác biệt ở chỗ:

i) miền CH3 của một chuỗi nặng được thay đổi,

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của một chuỗi nặng cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại bên trong kháng thể đa đặc hiệu,

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có khối lượng mạch bên lớn hơn, từ đó tạo ra “chốt” trong bề mặt chung của miền CH₃ của một chuỗi nặng mà có thể đút vừa lỗ trong bề mặt chung của miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại,

và

ii) miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại được thay đổi,

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại cắt bề mặt chung ban đầu của miền CH₃ của một chuỗi nặng trong kháng thể đa đặc hiệu

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có khối lượng mạch bên nhỏ hơn, từ đó tạo ra lỗ trong bề mặt chung của miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, trong đó “khóa” trong bề mặt chung của miền CH₃ của một chuỗi nặng có thể định vị được.

18. Kháng thể theo phương án 17, khác biệt ở chỗ, gốc axit amin nêu trên có khối lượng mạch bên lớn hơn được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y) và tryptophan (W), và gốc axit amin nêu trên có khối lượng mạch bên nhỏ hơn được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T) và valin (V).

19. Kháng thể theo phương án 17 hoặc 18, khác biệt ở chỗ, cả hai miền CH₃ đều còn được thay thế bằng cách đưa xystein (C) dưới dạng axit amin vào ở các vị trí tương ứng của từng miền CH₃ sao cho cầu disulfua giữa hai miền CH₃ có thể được tạo ra.

20. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên trong đó kháng thể này kháng thể đặc hiệu kép.

21. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết đặc hiệu với TWEAK người và gắn kết đặc hiệu với IL17 người, trong đó:

A) kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

miền chuỗi nặng biến đổi (VH) có trình tự SEQ ID NO:24, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) có trình tự SEQ ID NO:25; và

B) kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

miền chuỗi nặng biến đổi (VH) có trình tự SEQ ID NO:26, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) có trình tự SEQ ID NO:27.

22. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với TWEAK người, bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) có trình tự SEQ ID NO:24, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) có trình tự SEQ ID NO:25; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với IL-17 người, bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) có trình tự SEQ ID NO:26, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) có trình tự SEQ ID NO:27; trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau, và

trong đó:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

23. Kháng thể đặc hiệu kép theo phương án 21, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat); và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế

độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

24. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 21 đến 23 dùng để điều trị bệnh ung thư, hoặc bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, các bệnh ở cơ, ví dụ bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ, bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu.

25. Sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 21 đến 23 để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh ung thư, hoặc bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh thấp khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, các bệnh ở cơ, ví dụ bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh đa xơ cứng, bệnh thận mạn tính, bệnh xương, ví dụ bệnh thoái hóa xương trong đa u tủy, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm thận luput, và tổn thương mạch máu.

26. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23, khác biệt ở chỗ, nó là IgG1 người hoặc phân lớp IgG4 người.

27. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26, đặc trưng là thuộc phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A và L235A (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

28. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 27, đặc trưng là thuộc phân lớp IgG1 người có các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

29. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26, đặc trưng là thuộc phân lớp IgG4 người có các đột biến S228P và L235E (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

30. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23, và 26 đến 29, đặc trưng là thuộc phân lớp IgG4 người có các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

31. Phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 30, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào vật chủ bằng các vectơ chứa các phân tử axit nucleic mã hóa

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU);

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên từ môi trường nuôi cấy.

32. Axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 30.

33. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo phương án 32 có khả năng biểu hiện axit nucleic nêu trên trong tế bào vật chủ.

34. Tế bào vật chủ bao gồm vector theo phương án 33.

35. Dược phẩm chứa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 30.

36. Dược phẩm chứa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 30 và ít nhất một tá dược được dụng.

37. Phương pháp điều trị bệnh nhân cần điều trị bệnh, đặc trưng bởi việc cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 23 và 26 đến 30.

38. Phương pháp làm giảm các sản phẩm phụ của kháng thể đa đặc hiệu,

bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào vật chủ với các vector chứa các phân tử axit nucleic mã hóa

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó các thay thế sau được bao gồm để làm giảm sản phẩm phụ của kháng thể đa đặc hiệu:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được

thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU);

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên từ môi trường nuôi cấy.

39. Phương pháp làm giảm sản phẩm phụ của kháng thể đa đặc hiệu

bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào vật chủ với các vector chứa các phân tử axit nucleic mã hóa

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó các thay thế sau được bao gồm,

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K), arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K), arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU),

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên có profin sản phẩm phụ giảm từ môi trường nuôi cấy.

40. Phương pháp làm giảm sản phẩm phụ của kháng thể đa đặc hiệu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào vật chủ với các vectơ chứa các phân tử axit nucleic mã hóa

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó các thay thế sau được bao gồm,

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K), arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU),

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên có profin sản phẩm phụ giảm đi từ môi trường nuôi cấy.

41. Sử dụng các đột biến thay thế sau để làm giảm việc tạo ra các sản phẩm phụ (hoặc giảm profin sản phẩm phụ) của kháng thể đa đặc hiệu:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 124 độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo

hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU); hoặc

ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) thay thế axit amin ở vị trí 124 độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) thay thế axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU);

trong đó kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau.

42. Sử dụng các thay thế sau để làm giảm việc tạo ra các sản phẩm phụ (hoặc làm giảm profin sản phẩm phụ) của kháng thể đa đặc hiệu:

i) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 124 độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) thay thế axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU);

trong đó kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau.

43. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 16, và 20 đến 23, trong đó kháng thể bao gồm ít nhất hai mảnh Fab, trong đó mảnh Fab thứ nhất bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và mảnh Fab thứ hai bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó trong mảnh Fab thứ hai, miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và trong đó kháng thể đa đặc hiệu không bao gồm miền Fc.

44. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 43, trong đó kháng thể bao gồm hai đến bốn mảnh Fab.

45. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án 43 hoặc 44, trong đó kháng thể gắn kết đặc hiệu với Ang-2 người và VEGF.

46. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo phương án 34 sao cho kháng thể được tạo ra.

47. Phương pháp theo phương án 46, còn bao gồm bước thu hồi kháng thể từ tế bào vật chủ.

Các ví dụ, danh mục trình tự và hình vẽ sau đây được nêu nhằm mục đích hỗ trợ việc hiểu sáng chế, phạm vi chính xác của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm. Nên hiểu rằng các cải biến có thể được tạo ra trong các quy trình được nêu mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Mô tả các trình tự axit amin

SEQ ID NO:1 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:2 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:3 chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:4 chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:5 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có sự thay thế Q124K

SEQ ID NO:6 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E

SEQ ID NO:7 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K213E

SEQ ID NO:8 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có sự thay thế E123K

SEQ ID NO:9 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có sự thay thế Q124K và thay thế E123K

SEQ ID NO:10 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213E

SEQ ID NO:11 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có sự thay thế Q124R và thay thế E123K

SEQ ID NO:12 chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có sự thay thế Q124E

SEQ ID NO:13 chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có sự thay thế E124K và thay thế E123K

SEQ ID NO:14 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213D

SEQ ID NO:15 chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:16 chuỗi nặng (HC) <IL-17> kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:17 chuỗi nặng (HC) <TWEAK> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:18 chuỗi nhẹ (LC) <TWEAK> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt)

SEQ ID NO:19 chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> có sự thay thế Q124K và thay thế E123R

SEQ ID NO:20 chuỗi nặng (HC) <IL-17> có sự thay thế K147E và thay thế K213E

SEQ ID NO:21 chuỗi nhẹ (LC) <TWEAK> có sự thay thế Q124E

SEQ ID NO:22 chuỗi nặng (HC) <IL-17> có sự thay thế K147E và thay thế K213D

SEQ ID NO:23 chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> có sự thay thế Q124K và thay thế E123K

SEQ ID NO:24 miền chuỗi nặng biến đổi VH <TWEAK > 305-HC4

SEQ ID NO:25 miền chuỗi nhẹ biến đổi VL <TWEAK>305-LC2

SEQ ID NO:26 miền chuỗi nặng biến đổi VH <IL-17> HC136

SEQ ID NO:27 miền chuỗi nhẹ biến đổi VL <IL-17> LC136

SEQ ID NO: 28 chuỗi nặng (HC) <TWEAK> có sự trao đổi VH-VL kiểu đại (wt) (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 29 chuỗi nặng (HC) <IL-17> có sự thay thế K147E và thay thế K213E (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 30 chuỗi nặng (HC) <IL-17> có sự thay thế K147E và thay thế K213D (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 31 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu đại (wt) (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 32 chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu đại (wt) (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 33 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 34 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K213E (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 35 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213E (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 36 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213D (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 37 chuỗi nặng (HC) <IL-17> kiểu đại (wt) (chứa dipeptit GK tận cùng)

SEQ ID NO: 38 chuỗi nặng (HC) Fab₂-CrossFab bao gồm hai chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu dại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 39 chuỗi nặng (HC) Fab₂-CrossFab bao gồm hai chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213E kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 40 chuỗi nặng (HC) CrossFab-Fab bao gồm một chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213E thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 41 chuỗi nặng (HC) CrossFab-Fab bao gồm một chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và thay thế K213E thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 42 chuỗi nặng (HC) CrossFab₂-Fab bao gồm hai chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu dại (wt) thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 43 chuỗi nặng (HC) CrossFab₂-Fab bao gồm hai chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL kiểu dại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có sự thay thế K147E và K231E thông qua tác nhân liên kết glyxin-serin

SEQ ID NO: 44 chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL có sự thay thế K147E

SEQ ID NO: 45 chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL có sự thay thế Q124K

SEQ ID NO: 46 chuỗi nặng (HC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL có sự thay thế K147E, và thay thế K213E

SEQ ID NO: 47 chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có sự trao đổi VH-VL có sự thay thế E123K, và Q124K

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu & phương pháp tổng quát

Thông tin tổng quát về trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của người được nêu trong: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Các axit amin của chuỗi kháng thể được đánh số và gọi tên theo hệ thống đánh số theo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) như được định nghĩa trên đây.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để thao tác bằng tay ADN như được mô tả 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 sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra từ oligonucleotit được thực hiện bằng kỹ thuật tổng hợp hóa học. Đoạn gen dài 600 - 1800 cặp bazơ (bp), được đặt bản lề bằng các vị trí phân tách nucleaza nội sinh giới hạn đơn lẻ, được lắp ráp bằng cách gắn và nối các oligonucleotit bao gồm khuếch đại PCR và sau đó tách dòng thông qua các vị trí giới hạn được chỉ định, ví dụ, KpnI/ SacI hoặc AscI/PacI thành vectơ tách dòng pGA4 dựa trên pPCRScrip (Stratagene). Các trình tự ADN của các đoạn gen được tách dòng được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Các đoạn tổng hợp gen được sắp xếp theo các đặc tính cho trước trong Geneart (Regensburg, Germany).

Xác định trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự mạch kép được thực hiện tại 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 của GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite phiên bản 8.0 được sử dụng để tạo ra, vẽ sơ đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vector biểu hiện

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

Ngoài cắt-xét biểu hiện kháng thể, các vector này chứa:

- gốc sao chép cho phép sao chép plasmid này trong *E. coli*, và
- gen β -lactamaza mang lại tính kháng ampicillin trong *E. coli*.

Đơn vị phiên mã của gen kháng thể gồm có các thành phần sau:

- (các) vị trí giới hạn đơn nhất ở đầu 5'
- gen tăng cường và gen khởi động rất sớm từ cytomegalovirus người,
- sau đó là trình tự Intron A trong trường hợp tổ chức ADN bổ sung,
- vùng không được dịch mã ở đầu 5' của gen kháng thể người,
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,
- chuỗi kháng thể người (kiểu đại hoặc có sự trao đổi miễn) dưới dạng ADN bổ sung hoặc dưới dạng tổ chức hệ gen với tổ chức exon-intron của globulin miễn dịch
- vùng không được dịch mã ở đầu 3' có trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, và
- (các) vị trí giới hạn đơn nhất ở đầu 3'.

Các gen dung hợp chứa các chuỗi kháng thể như được mô tả dưới đây được tạo ra bằng kỹ thuật PCR và/hoặc tổng hợp gen và được lắp ráp bằng các phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết bằng cách nối các đoạn axit nucleic tương ứng, ví dụ, sử dụng vị trí giới hạn đơn nhất trong các vector tương ứng. Các trình tự axit nucleic đã tách dòng được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Để chuyển nhiễm

tạm thời, plasmit với lượng lớn hơn được tạo ra bằng cách điều chế plasmit từ môi trường nuôi cấy *E. coli* được biến nạp (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn được sử dụng như được mô tả trong *Current Protocols in Cell Biology* (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời các plasmit biểu hiện tương ứng trong các tế bào HEK293-EBNA sinh trưởng bám dính hoặc trong các tế bào HEK29-F sinh trưởng trong huyền phù như được mô tả dưới đây.

Chuyển nhiễm tạm thời trong hệ HEK293-EBNA

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời các plasmit biểu hiện tương ứng (ví dụ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nặng cải biến, cũng như chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ cải biến tương ứng) trong các tế bào HEK293-EBNA sinh trưởng bám dính (đòng tế bào thận phôi người 293 biểu hiện kháng nguyên có nhân Epstein-Barr-Virut; Bộ sưu tập giống chuẩn Hoa Kỳ số lưu trữ ATCC # CRL-10852, Lot. 959 218) được nuôi cấy trong DMEM (môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco, Gibco®) được bổ sung IgG FCS siêu thấp 10% (huyết thanh bào thai bê, Gibco®), L-Glutamin 2mM (Gibco®), và Geneticin 250µg/ml (Gibco®). Để chuyển nhiễm, chất phản ứng chuyển nhiễm FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) được sử dụng với tỷ lệ giữa chất phản ứng FuGENE™ (µl) và ADN (µg) là 4:1 (nằm trong khoảng từ 3:1 đến 6:1). Protein được biểu hiện từ plasmit tương ứng sử dụng tỷ lệ mol giữa plasmit mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (được cải biến và kiểu đại) lần lượt là 1:1 (đẳng mol), nằm trong khoảng từ 1:2 đến 2:1. Các tế bào được nạp L-Glutamin ad 4mM, Glucoza [Sigma] và NAA [Gibco®] vào ngày 3. Kháng thể đa đặc hiệu chứa phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được thu hoạch từ ngày 5 đến 11 sau khi chuyển nhiễm bằng cách ly tâm và bảo quản ở -20°C. Thông tin tổng quát về quá trình biểu hiện tái tổ hợp của globulin miễn dịch người trong, ví dụ, tế bào HEK293 có trong: Meissner, P. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Chuyển nhiễm tạm thời trong hệ HEK293-F

Kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời với các plasmit tương ứng (ví dụ, mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nặng cải biến, cũng như chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ cải biến tương ứng) sử dụng hệ HEK293-F (Invitrogen) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Nói ngắn gọn là, các tế bào HEK293-F (Invitrogen) sinh trưởng trong huyền phù trong bình lắc hoặc trong thùng gây men được khuấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 không huyết thanh (Invitrogen) được chuyển nhiễm bằng hỗn hợp của bốn plasmit biểu hiện và 293fectin™ hoặc fectin (Invitrogen). Đối với bình lắc 2L (Corning), các tế bào HEK293-F được nuôi cấy ở mật độ bằng $1,0 \times 10^6$ tế bào/mL trong 600 mL và được ủ ở 120 vòng/phút, CO₂ 8%. Ngày sau khi các tế bào được chuyển nhiễm ở mật độ tế bào bằng khoảng $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL với hỗn hợp khoảng 42 mL của A) 20mL Opti-MEM (Invitrogen) với 600µg tổng plasmit ADN (1 µg/mL) mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng cải biến, một cách lần lượt và chuỗi nhẹ tương ứng với tỷ lệ đẳng mol và B) 20ml Opti-MEM + 1,2mL 293 fectin hoặc fectin (2 µl/mL). Theo mức độ tiêu thụ glucoza, dung dịch glucoza được bổ sung trong suốt quá trình gây men. Phần dịch nổi trên bề mặt chứa kháng thể tiết ra được thu hoạch sau 5-10 ngày và kháng thể được tinh chế trực tiếp từ phần dịch nổi trên bề mặt hoặc phần dịch nổi trên bề mặt được làm đông lạnh và được bảo quản.

Xác định protein

Nồng độ protein của kháng thể được tinh chế và các dẫn xuất được xác định bằng cách xác định mật độ quang (OD) ở 280 nm, sử dụng hệ số tắt phân tử được tính dựa trên trình tự axit amin theo Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Xác định nồng độ kháng thể trong phần dịch nổi trên bề mặt

Nồng độ kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được ước tính bằng cách kết tủa miễn dịch với các hạt Protein A Agarose (Roche). 60µL hạt Protein A Agarose được rửa ba lần trong TBS-NP40 (Tris 50mM, pH 7,5, NaCl 150mM, Nonidet-P40 1%). Tiếp đó, 1 -15mL phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được áp dụng vào các hạt Protein A Agarose được làm cân bằng trước trong TBS-NP40. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các

hạt này được rửa trên cột lọc Ultrafree-MC (Amicon) một lần bằng 0,5mL TBS-NP40, hai lần bằng 0,5mL 2x nước muối đệm phosphat (2xPBS, Roche) và rửa nhanh bốn lần bằng 0,5mL Na-xitrat 100mM độ pH = 5,0. Kháng thể được liên kết được rửa giải bằng cách bổ sung 35µl chất đệm mẫu NuPAGE® LDS (Invitrogen). Một nửa mẫu được kết hợp với chất khử mẫu NuPAGE® hoặc còn lại không khử, một cách lần lượt, và được gia nhiệt trong 10 phút ở 70°C. Do đó, 5-30µl được áp dụng vào NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) (với chất đệm MOPS dùng cho SDS-PAGE không được khử và chất đệm MES với chất phụ gia đệm chạy chất chống oxy hóa NuPAGE® (Invitrogen) dùng cho SDS-PAGE được khử) và nhuộm màu bằng Coomassie Blue.

Nồng độ của kháng thể và các dẫn xuất trong phân dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được xác định về mặt lượng bằng sắc ký HPLC ái lực. Nói ngắn gọn là, phân dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa kháng thể và các dẫn xuất liên kết với Protein A được áp dụng vào cột Applied Biosystems Poros A/20 trong KH₂PO₄ 200mM, natri xitrat 100mM, pH = 7,4 và được rửa giải từ cơ chất bằng NaCl 200mM, axit xitric 100mM, pH = 2,5 trên hệ Agilent HPLC 1100. Protein đã rửa giải được định lượng bằng mức độ hấp thụ UV và kết hợp các vùng đỉnh. Kháng thể IgG1 chuẩn được tinh chế được sử dụng làm tiêu chuẩn.

Theo một cách khác, nồng độ của kháng thể và các dẫn xuất trong phân dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được xác định bằng Sandwich-IgG-ELISA. Nói ngắn gọn là, các đĩa vi chuẩn độ có 96 giếng StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) được phủ bằng phân tử bắt giữ kháng IgG người được biotinyl hóa F(ab')₂-h-Fcγ BI (Dianova) với nồng độ 100µL/giếng ở 0,1µg/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc theo một cách khác, qua đêm ở 4°C và tiếp đó rửa ba lần bằng PBS 200 µL/giếng, Tween 0,05% (PBST, Sigma). Các phân pha loãng theo dãy với nồng độ 100 µL/giếng trong PBS (Sigma) của kháng thể tương ứng chứa phân dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được bổ sung vào các giếng và được ủ trong 1-2 giờ trên bình lắc có đĩa vi chuẩn ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng PBST 200 µL/giếng và kháng thể được liên kết được phát hiện bằng 100µl F(ab')₂-h-Fcγ-POD (Dianova) ở 0,1 µg/mL dưới dạng kháng thể phát hiện trong 1-2 giờ trên bình lắc có đĩa vi chuẩn ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không liên kết được rửa sạch ba lần bằng PBST 200 µL/giếng và kháng thể

phát hiện liên kết được phát hiện ra bằng cách bổ sung 100 μ L ABTS/giếng. Việc xác định mức độ hấp thụ được thực hiện trên máy đo phổ Tecan Fluor ở bước sóng đo bằng 405 nm (bước sóng tham chiếu 492 nm).

Tinh chế protein

Protein được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được lọc theo phương pháp chuẩn. Nói ngắn gọn là, kháng thể được áp dụng vào cột Protein A Sepharose (GE healthcare) và được rửa bằng PBS. Tiến hành việc rửa giải các kháng thể ở độ pH = 2,8, sau đó trung hòa ngay mẫu này. Protein được kết tập được tách khỏi kháng thể monome bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong Histidin 20mM, NaCl 150mM độ pH = 6,0. Các loại mảnh kháng thể monome được gom, được cô (nếu cần) bằng cách sử dụng, ví dụ, máy cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), được làm đông lạnh và được bảo quản ở -20°C hoặc -80°C. Một phần các mẫu được cấp để sau đó phân tích protein và đặc trưng hóa phân tích bằng, ví dụ, SDS-PAGE, sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) hoặc phép đo phổ khối.

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể là, 10% hoặc 4-12% gel NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH = 6,4) và NuPAGE® MES (gel được khử, với chất phụ gia đệm chạy chất chống oxy hóa NuPAGE®) hoặc chất đệm chạy MOPS (gel không được khử) được sử dụng.

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ phân tích

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) để xác định sự kết tụ và trạng thái oligome của các kháng thể được tiến hành bằng sắc ký HPLC. Nói ngắn gọn là, các kháng thể được tinh chế protein A được áp dụng vào cột Tosoh TSKgel G3000SW trong NaCl 300mM, KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50mM, độ pH = 7,5 trên hệ Agilent HPLC 1100 hoặc áp dụng vào cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2 x PBS trên hệ Dionex HPLC. Protein đã được rửa giải được định lượng bằng mức độ hấp thụ UV và kết hợp các vùng đỉnh. Tiêu chuẩn BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 được sử dụng làm tiêu chuẩn.

Phép đo phổ khối

Đoạn này mô tả đặc trưng của kháng thể đa đặc hiệu có sự trao đổi VH/VL (VH/VL CrossMabs) nhấn mạnh vào việc lắp ráp chúng một cách chính xác. Các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của CrossMabs trở được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác, CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC hạn chế.

CrossMab của VH/VL được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC giới hạn (Roche) được thực hiện với 100 µg VH/VL CrossMab được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Xác định khả năng gắn kết và ái lực liên kết của kháng thể đa đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (BIAcore)

Khả năng gắn kết của kháng thể được tạo ra với kháng nguyên tương ứng (ví dụ ANG2 và VEGF) được nghiên cứu nhờ cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng công cụ BIAcore (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Nói ngắn gọn là, để đo ái lực, các kháng thể IgG ở dê kháng người, JIR 109-005-098 được cố định trên chip CM5 thông qua phản ứng ghép cặp amin để biểu hiện các kháng thể kháng kháng nguyên tương ứng. Khả năng gắn kết được xác định trong chất đệm HBS (HBS-P (HEPES 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%, pH = 7,4), 25°C (hoặc theo một cách khác ở 37°C) kháng nguyên (R&D Systems hoặc được tinh chế trong nhà) được bổ sung với các nồng độ khác nhau trong dung dịch. Việc kết hợp được xác định bằng cách tiêm kháng nguyên trong thời gian từ 80 giây đến 3 phút; việc phân ly được xác định bằng cách rửa bề mặt chip bằng chất đệm HBS trong 3 - 10 phút và giá trị KD được ước tính bằng cách sử dụng mô hình liên

kết 1:1 Langmuir. Dữ liệu đối chứng âm (ví dụ, đường cong đệm) được trừ từ đường cong mẫu để chính xác hóa độ lệch đường cơ sở thực tế của hệ và làm giảm tín hiệu tiếng ồn. Phần mềm Biacore Evaluation tương ứng được sử dụng để phân tích biểu đồ cảm biến và để tính dữ liệu ái lực.

Ví dụ 1A

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có sự thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Trong ví dụ thứ nhất, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 người (ANG2) và VEGF người được tạo ra như được mô tả trong đoạn mô tả các phương pháp tổng quát bằng kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 như nêu trên. Sơ đồ tổng quát của các kháng thể đa đặc hiệu tương ứng được nêu trong các hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C. Để so sánh, kháng thể kiểu dại (wt) trao đổi/thay thế miền VH/VL không có sự thay thế trong bề mặt chung CH1/CL cũng được xây dựng. Tương tự, các thay thế khác trong phạm vi lân cận trong bề mặt chung CH1CL (được nêu, ví dụ, trong EP 2647707) được sử dụng để so sánh. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmid biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được nêu trong Bảng 2a.

Bảng 2a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0396, Ang2VEGF-0397, Ang2VEGF-0394, Ang2VEGF-0395 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*): kiểu đại (wt) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ

Kháng thể	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ dị dime hóa phần “khóa” vào “ổ” được sử dụng với thay thế phần “khóa” (T366W) điển hình trong miền CH3 thứ nhất và thay thế phần “ổ” tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein bổ sung được đưa vào S354C/Y349’C) (có trong các trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng nêu trên)

Ví dụ 1B

Tinh chế và đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện ở trên được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Tất cả các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sản xuất với hiệu suất tốt và ổn định.

Các sản phẩm thu được được đặc trưng về độ đồng nhất bằng phép đo phổ khối và các tính chất phân tích như độ tinh khiết bằng SDS-PAGE, hàm lượng monome và độ ổn định

Phép đo phổ khối

Các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa phun điện (ESI-MS) của CrossMab trợ được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác, CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC hạn chế.

Các CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC được giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100 µg CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2b và Fig.4a.

Bảng 2b: Giảm sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu bằng cách thay thế axit amin tích điện đơn lẻ theo sáng chế trong bề mặt chung CH1/CL

	CL ANG-2 (vị trí 124)	CL ANG-2 (vị trí 123)	CH1 ANG-2 (vị trí 147)	CH1 ANG-2 (vị trí 213)	CH1 VEGF	CL VEGF	sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) % theo MS
Ang2VEG F-0273	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt	<u>~20</u>
Ang2VEG F-0396	Q124K	wt	K147E	wt	wt	wt	<u>~3</u>
Ang2VEG F-0397	Q124K	wt	wt	K213E	wt	wt	<u>~3</u>
Ang2VEG F-0394	wt	E123K	K147E	wt	wt	wt	~15
Ang2VEG F-0395	wt	E123K	wt	K213E	wt	wt	~15

Các kết quả trong bảng 2b và Fig.4a cho thấy rằng, với các thay thế của các axit amin tích điện đơn lẻ có điện tích trái dấu trong miền CH1 và CL theo sáng chế/như được mô tả trong sáng chế (cặp CL:Q124K và CH1:K147E; hoặc cặp CL:Q124K và CH1:K213E) sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) giảm mạnh khi so với kháng thể đa đặc hiệu kiểu đại không có các thay thế này (giảm ~ 17%). Với các thay thế khác ở phạm vi gần (Cặp CL:Q123K và CH1:K147E; hoặc cặp CL:Q123K và CH1:K213E) chỉ có sự giảm nhẹ sản phẩm phụ chủ yếu so với kháng thể đa đặc hiệu kiểu đại không có các thay thế này (giảm ~ 5%).

Ví dụ 1C

Các đặc tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có sự thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Khả năng gắn kết của kháng thể đa đặc hiệu trong ví dụ 1A và 1B trên đây với các kháng nguyên đích tương ứng của chúng, tức là ANG2 và VEGF, được đánh giá bằng Biacore®.

Khả năng gắn kết VEGF được đánh giá theo quy trình sau:

Khả năng gắn kết của các kháng thể được nêu với VEGFA-121 người được nghiên cứu bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng công cụ BIACORE® T200 (GE Healthcare). Khoảng 10000 (RU) kháng thể kháng His (1µg/ml kháng thể kháng His; Mã thứ tự: 28995056; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) được kết hợp trên chip Series S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH =5,0 bằng cách sử dụng bộ kit kết hợp amin được phân phối bởi GE Healthcare. HBS-N (HEPES 10mM, NaCl 150mM độ pH= 7,4, GE Healthcare) được sử dụng làm chất đệm chạy trong cả quy trình làm cố định. Đối với đặc trưng động học sau, mẫu và chất đệm chạy là PBS-T (nước muối đệm phosphat 10mM bao gồm Tween20 0,05%) ở độ pH =7,4. Cu-vét dòng chảy được thiết lập đến 25°C - và khối mẫu được thiết lập đến 12°C - và được môi bằng chất đệm chạy hai lần trước khi đặc trưng hóa động học.

VEFGA-121-His được bắt giữ bằng cách tiêm dung dịch 0,5 µg/ml trong 30 giây ở tốc độ chảy bằng 5 µl/phút. Sự kết hợp được xác định bằng cách tiêm các kháng thể được nêu ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 180 giây ở tốc độ chảy bằng 30 µl/phút bắt đầu bằng 1000nM trong các phân pha loãng theo dãy theo tỷ lệ 1:3. Pha phân ly được theo dõi lên đến 600 giây và được hoạt hóa bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang chất đệm chạy. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 60 giây bằng dung dịch glyxin có độ pH = 1,5 ở tốc độ chảy bằng 30 µl/phút. Chênh lệch chỉ số khúc xạ lớn được chính xác hóa bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt kháng thể kháng His. Các lần tiêm trống cũng được trừ (= là hai). Để tính K_D và các thông số động học khác, mô hình Langmuir 1:1 được sử dụng.

Khả năng gắn kết Ang-2 được đánh giá theo quy trình sau:

Khả năng gắn kết của các kháng thể được nêu với Ang-2-RBD-Fc người được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng công cụ BIACORE® T200 (GE Healthcare). Khoảng 8000 (RU) F(ab')₂ ở dê kháng người

(10 μ g/ml F(ab')₂ ở dê kháng người; Mã thứ tự: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) được kết hợp trên chip Series S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit kết hợp amin được phân phối bởi GE Healthcare. HBS-N (HEPES 10mM, NaCl 150mM độ pH = 7,4, GE Healthcare) được sử dụng làm chất đệm chạy trong cả quy trình làm cố định. Đối với đặc trưng động học sau, mẫu và chất đệm chạy là PBS-T (nước muối đệm phosphat 10mM bao gồm Tween20 0,05%) ở độ pH = 7,4. Cu-vét dòng chảy được thiết lập đến 25°C - và khối mẫu được thiết lập đến 12°C - và được mỗi bằng chất đệm chạy hai lần trước khi đặc trưng hóa động học.

Kháng thể đặc hiệu kép được bắt giữ bằng cách tiêm dung dịch 5nM trong 25 giây ở tốc độ chảy bằng 5 μ l/phút. Việc kết hợp được xác định bằng cách tiêm Ang2-RBD-Fc người ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 120 giây ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút bắt đầu bằng 100nM trong các phân pha loãng theo dãy theo tỷ lệ 1:3. Pha phân ly được theo dõi trong tối đa 180 giây và được hoạt hóa bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang chất đệm chạy. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 60 giây bằng dung dịch Glyxin độ pH = 2,1 ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút. Các chênh lệch chỉ số khúc xạ lớn được chính xác hóa bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt F(ab')₂ ở dê kháng người. Các lần tiêm mẫu trống cũng được trừ (= là hai). Để tính K_D biểu kiến, mô hình Langmuir 1:1 được sử dụng.

Để làm ví dụ so sánh, kháng thể tham chiếu gắn kết đặc hiệu với Ang2 và VEGF bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL nhưng thiếu thay thế axit amin tích điện (kháng thể Ang2VEGF-0273 của Bảng 2b) được đánh giá song song.

Các kết quả được nêu trong Bảng 2c và 2d.

Bảng 2c: Ái lực đối với VEGF của các kháng thể được nêu

Mẫu	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0396	3
Ang2VEGF-0397	4
Ang2VEGF-0394	3

Ang2VEGF-0395	4
---------------	---

Bảng 2d: Ái lực đối với Ang2 của các kháng thể được nêu

Mẫu	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0396	17
Ang2VEGF-0397	14
Ang2VEGF-0394	12
Ang2VEGF-0395	15

Tất cả các kháng thể thử nghiệm gắn kết đặc hiệu với cả hai đích, Ang2 và VEGF, và biểu hiện ái lực kháng nguyên trong phạm vi nanomol.

Ví dụ 1D

Độ ổn định của kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMAb^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có sự thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Để đánh giá độ ổn định của cấu trúc kháng thể, độ ổn định nhiệt cũng như nhiệt độ bắt đầu kết tụ được đánh giá theo quy trình sau.

Mẫu của các kháng thể được nêu được tạo ra ở nồng độ bằng 1mg/mL trong Histidin/Histidin clorua 20mM, NaCl 140mM, pH 6,0, được truyền vào dây cu-vét nhỏ 10μL và dữ liệu tán xạ ánh sáng tĩnh cũng như dữ liệu huỳnh quang khi kích thích bằng laze 266nm được ghi lại bằng công cụ Optim1000 (Avacta Inc.), trong khi các mẫu được gia nhiệt ở tốc độ bằng 0,1°C/phút từ 25°C đến 90°C.

Nhiệt độ bắt đầu kết tụ (T_{agg}) được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó mật độ ánh sáng được tán xạ bắt đầu tăng lên. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) được định nghĩa là điểm uốn trong mật độ quang so với biểu đồ bước sóng.

Kết quả được thể hiện trong Bảng 2e.

Bảng 2e: Nhiệt độ bắt đầu kết tụ (T_{agg}) và nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các kháng thể được nêu

Mẫu	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0396	56,9	62,0
Ang2VEGF-0397	56,0	61,7
Ang2VEGF-0394	56,9	62,2
Ang2VEGF-0395	56,8	62,1

Ví dụ 1E

Hiệu suất của kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL ($CrossMab^{Vh-VL}$) ở một nhánh liên kết và có sự thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Hiệu suất của kháng thể đa đặc hiệu được chỉ định được đánh giá sau khi tinh chế Protein A (ProtA). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2f.

Bảng 2e: Hiệu suất [mg/L phần dịch nổi trên bề mặt] của các kháng thể được nêu

Mẫu	ProtA
Ang2VEGF-0273	65
Ang2VEGF-0396	80,8
Ang2VEGF-0397	68,4
Ang2VEGF-0394	79,2
Ang2VEGF-0395	93,6

Ví dụ 2A

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMAb^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Trong ví dụ thứ nhất, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 người (ANG2) và VEGF người được tạo ra như được mô tả trong phần mô tả các phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 như nêu trên. Sơ đồ tổng quát của các kháng thể đa đặc hiệu tương ứng này được nêu trong cách hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C. Để so sánh, kháng thể kiểu đại (wt) trao đổi/thay thế miền VH/VL không có sự thay thế trong bề mặt chung CH1/CL cũng được tạo ra. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmit biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được nêu trong Bảng 3a.

Bảng 3a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0274, Ang2VEGF-0282, Ang2VEGF-0283, Ang2VEGF-0284, Ang2VEGF-0285, Ang2VEGF-0286 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMAb^{Vh-VL}*): kiểu đại (wt) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện

Kháng thể	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ dị dime hóa phần “khóa” vào “ổ” được sử dụng với thay thế phần “khóa” (T366W) điển hình trong miền CH3 thứ nhất và thay thế phần “ổ” tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein bổ sung được đưa vào S354C/Y349’C) (có trong các trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng nêu trên).

Ví dụ 2B

Tinh chế và đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện ở trên được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Tất cả các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sản xuất với hiệu suất tốt và ổn định.

Các sản phẩm thu được được đặc trưng về độ đồng nhất bằng phép đo phổ khối và các tính chất phân tích như độ tinh khiết bằng SDS-PAGE, hàm lượng monome và độ ổn định

Phép đo phổ khối

Các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của CrossMab trợ được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC hạn chế.

Các CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1 mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC được giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS

trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3b và Fig.5a.

Bảng 3b: Giảm sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu bằng các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ theo sáng chế trong bề mặt chung CH1/CL

	CL ANG-2	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) % theo MS
Ang2VEGF-0273	wt: Q124 (kappa)	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	<u>~20%</u>
Ang2VEGF-0274	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	0
Ang2VEGF-0282	Q124R	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0283	E124K (lambda)	E123K	K147E	K213E	wt	wt:	0
Ang2VEGF-0284	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	wt	0
Ang2VEGF-0285	Q124R	E123K	K147E	K213D	wt	Q124E	0
Ang2VEGF-0286	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0

Các kết quả trong bảng 3b và Fig.5a cho thấy rằng, có các thay thế kép của các axit amin tích điện có điện tích trái dấu trong miền CH1 và CL theo sáng chế/như được mô tả trong sáng chế (CL:Q124K/E123K và CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K và CH1:K147E/K213E; CL:Q124R/E123K và CH1:K147E/K213D) sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) được loại bỏ hoàn toàn khi so với kháng thể đa đặc hiệu kiểu đại không có các thay thế này. Việc này không phụ thuộc vào thay thế đơn lẻ khác Q124E trong miền CL của

nhánh liên kết còn lại, không ảnh hưởng đến việc biểu hiện hay profin sản phẩm phụ.

Ví dụ 2C

Các đặc tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Khả năng gắn kết của kháng thể đa đặc hiệu của ví dụ 2A và 2B nêu trên với các kháng nguyên đích tương ứng, tức là ANG2 và VEGF, được đánh giá bằng Biacore® như được nêu sơ lược trong ví dụ 1C.

Để làm ví dụ so sánh, kháng thể đối chiếu gắn kết đặc hiệu với Ang2 và VEGF bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL nhưng thiếu các thay thế axit amin tích điện (kháng thể Ang2VEGF-0273 của Bảng 2b) được đánh giá song song.

Các kết quả được nêu trong Bảng 3c và 3d.

Bảng 3c: Ái lực đối với VEGF của các kháng thể được nêu

Mẫu	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	6
Ang2VEGF-0274	3
Ang2VEGF-0282	4
Ang2VEGF-0283	4
Ang2VEGF-0284	4
Ang2VEGF-0285	4
Ang2VEGF-0286	4

Bảng 3d: Ái lực đối với Ang2 của các kháng thể được nêu

Mẫu	KD (nM)
Ang2VEGF-0273	15
Ang2VEGF-0274	17

Mẫu	KD (nM)
Ang2VEGF-0282	14
Ang2VEGF-0283	15
Ang2VEGF-0284	13
Ang2VEGF-0285	14
Ang2VEGF-0286	12

Tất cả các kháng thể thử nghiệm gắn kết đặc hiệu với cả hai đích, Ang2 và VEGF, và biểu hiện ái lực kháng nguyên trong phạm vi nanomol.

Ví dụ 2D

Độ ổn định của kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL

Để đánh giá độ ổn định của cấu trúc kháng thể, độ ổn định nhiệt cũng như nhiệt độ bắt đầu kết tụ được đánh giá như được nêu sơ lược trong ví dụ 1D.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3e.

Bảng 3e: Nhiệt độ bắt đầu kết tụ (T_{agg}) và nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các kháng thể được nêu

Mẫu	T_{agg} (°C)	T_m (°C)
Ang2VEGF-0273	56,0	61,3
Ang2VEGF-0274	53,5	58,9
Ang2VEGF-0282	56,9	61,4
Ang2VEGF-0283	56,3	61,0
Ang2VEGF-0284	56,3	61,1
Ang2VEGF-0285	56,3	61,1
Ang2VEGF-0286	56,3	61,6

Ví dụ 3A

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu liên kết với IL-17 và TWEAK có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{VH-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Trong ví dụ thứ nhất, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với IL-17 người và TWEAK người được tạo ra như được mô tả trong phần mô tả các phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 như nêu trên. Sơ đồ tổng quát của các kháng thể đa đặc hiệu tương ứng này được nêu trong cách hình vẽ từ Fig.1A đến Fig.1C. Để so sánh, kháng thể kiểu đại (wt) trao đổi/thay thế miền VH/VL không có sự thay thế trong bề mặt chung CH1/CL cũng được tạo ra. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmit biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được nêu trong Bảng 4a.

Bảng 4a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể đa đặc hiệu kháng *TWEAK-IL17* TweakIL17-0096, TweakIL17-0097, TweakIL17-0098, TweakIL17-0099, TweakIL17-0100, TweakIL17-0101 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{VH-VL}*): kiểu đại (wt) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện

Kháng thể	LC IL17	HC IL17	HC TWEAK	LC TWEAK
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ dị dime hóa phần “khóa” vào “ổ” được sử dụng với sự thay thế phần “khóa” (T366W) điển hình trong miền CH3 thứ nhất và các thay thế phần “ổ” tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein bổ sung được đưa vào S354C/Y349’C) (có trong các trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng nêu trên).

Ví dụ 3B

Tinh chế và đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu liên kết với IL-17 và TWEAK có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện ở trên được tinh chế từ phân dịch nổi trên bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Tất cả các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sản xuất với hiệu suất tốt và ổn định.

Các sản phẩm thu được được đặc trưng về độ đồng nhất bằng phép đo phổ khối và các tính chất phân tích như độ tinh khiết bằng SDS-PAGE, hàm lượng monome và độ ổn định

Phép đo phổ khối

Các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của CrossMab trước được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC hạn chế.

Các CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC được giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4b và Fig.6a.

Bảng 4b: Giảm sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu bằng các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ theo sáng chế trong bề mặt chung CH1/CL

	CL IL17 (vị trí 124)	CL IL17 (vị trí 123)	CH1 IL17 (vị trí 147)	CH1 IL17 (vị trí 213)	CH1 TWEAK	CL TWEAK (vị trí 124)	Sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) % theo MS
TweakIL17 -0096	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124	~20%
TweakIL17 -0097	Q124K	E123R	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17 -0098	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	wt	0
TweakIL17 -0099	Q124K	E123R	K147E	K213D	wt	Q124E	0
TweakIL17 -0100	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	Q124E	0
TweakIL17 -0101	Q124K	E123K	K147E	K213E	wt	wt	không xác định

Các kết quả trong bảng 2b và Fig.6a cho thấy rằng, có các thay thế kép của các axit amin tích điện có điện tích trái dấu trong miền CH1 và CL theo sáng chế/như được mô tả trong sáng chế (CL:Q124K/E123R và CH1:K147E/K213E; CL:Q124K/E123R và CH1:K147E/K213D; CL:Q124K/E123K và CH1:K147E/K213E) sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) được loại bỏ hoàn toàn khi so với kháng thể đa đặc hiệu kiểu đại không có các thay thế này. Việc này không phụ thuộc vào thay thế đơn lẻ khác Q124E trong miền CL của nhánh liên kết còn lại, không ảnh hưởng đến việc biểu hiện cũng như profin sản phẩm phụ.

Ví dụ 4A

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu hóa trị hai và kháng thể đa đặc hiệu hóa trị ba liên kết với Ang2 và VEGF, trong đó các kháng thể này không có mảnh Fc và bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết và một hoặc nhiều thay thế axit amin tích điện trong bề mặt chung CH1/CL

Trong một ví dụ khác, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Ang2 người và VEGF người được tạo ra như được mô tả trong phần mô tả các phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 như nêu trên. Các kháng thể được tạo ra có trong nhánh liên kết gắn kết đặc hiệu với VEGF là mảnh Fab có thay đổi miền VH/VL và ở nhánh liên kết khác gắn kết đặc hiệu với Ang2 là mảnh Fab không có sự trao đổi miền này, trong khi kháng thể đa đặc hiệu không bao gồm mảnh Fc. Do đó, chuỗi nhẹ thứ nhất có nguồn gốc từ kháng thể gắn kết đặc hiệu với Ang2 người và bao gồm, theo chiều từ đầu N đến đầu C, các miền VL-CL. Chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất (kháng Ang2) và kháng thể thứ hai (kháng VEGF) được nối thông qua tác nhân liên kết peptit glyxin-serin. Trong chuỗi nặng của kháng thể gắn kết đặc hiệu với VEGF, miền biến đổi gốc VH được thay thế bằng miền biến đổi VL có nguồn gốc từ kháng thể kháng VEGF. Do đó, polypeptit bao gồm chuỗi nặng của kháng thể kháng Ang2 và kháng thể kháng VEGF bao gồm, theo chiều từ đầu N đến đầu C, các miền VH(Ang2)-CH1(Ang2)-tác nhân liên kết-VL(VEGF)-CH1(VEGF). Trong chuỗi nhẹ gắn kết đặc hiệu với VEGF người, miền biến đổi gốc VL được thay thế bằng miền biến đổi VH có nguồn gốc từ kháng thể kháng VEGF. Do đó, chuỗi nhẹ cái biến của kháng thể kháng VEGF bao gồm, theo chiều từ đầu N đến đầu C, các miền VH-CL. Các thay thế của các axit amin khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL được nêu trong Bảng 5b.

Trong ví dụ này, kháng thể đa đặc hiệu có ba cấu trúc tổng quát được tạo ra:

- i) kháng thể đặc hiệu kép Ang2-VEGF đa đặc hiệu hóa trị hai có dạng CrossFab_{VH-VL}-(Fab) (cấu trúc tổng quát được nêu trên Fig. 7D);
- ii) kháng thể đặc hiệu kép Ang2-VEGF đa đặc hiệu hóa trị ba có dạng (CrossFab_{VH-VL})₂-Fab (cấu trúc tổng quát được nêu trên Fig. 8C (neu));

iii) kháng thể đặc hiệu kép Ang2-VEGF đa đặc hiệu hóa trị ba có dạng (Fab)₂-CrossFab_{VH-VL} (cấu trúc tổng quát được nêu trên trên Fig. 8D);

Để so sánh, kháng thể kiểu đại (wt) trao đổi/thay thế miền VH/VL không có sự thay thế trong bề mặt chung CH1/CL cũng được tạo ra. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmit biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được nêu trong Bảng 5a.

Bảng 5a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể đa đặc hiệu kháng Ang2-VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL: kiểu đại (“không tích điện”) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện (“tích điện”)

Kháng thể	LC Ang2	HC	LC VEGF
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-không tích điện (Ang2VEGF-0452)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 4
xFab-Fab<ANG2-VEGF>-tích điện (Ang2VEGF-0447)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-không tích điện (Ang2VEGF-0453)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 4
xFab ₂ -Fab<ANG2-VEGF>-tích điện (Ang2VEGF-0448)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 4
Fab ₂ -xFab<ANG2-VEGF>-không tích điện	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 4
Fab ₂ -xFab<ANG2-VEGF>-tích điện	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 4

Bảng 5b: Thay thế axit amin trong bề mặt chung CH1/CL trong kháng thể theo sáng chế được nêu trong Bảng 5a

	Ang2				VEGF	
	CL (vị trí 124)	CL (vị trí 123)	CH1 (vị trí 147)	CH1 (vị trí 213)	CH1	CL (vị trí 124)
xFab-Fab<ANG2- VEGF>-không tích điện (Ang2VEGF-0452)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab-Fab<ANG2- VEGF>-tích điện (Ang2VEGF-0447)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
xFab ₂ -Fab<ANG2- VEGF>-không tích điện (Ang2VEGF-0453)	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
xFab ₂ -Fab<ANG2- VEGF>-tích điện (Ang2VEGF-0448)	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt
Fab2-xFab<ANG2- VEGF>-không tích điện	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	wt	wt: Q124
Fab2-xFab<ANG2- VEGF>-tích điện	Q124R	E123K	K147E	K123E	wt	wt

Ví dụ 4B:

Sản xuất và biểu hiện của kháng thể đa đặc hiệu hóa trị hai và kháng thể đa đặc hiệu hóa trị ba liên kết với ANG2 và VEGF, trong đó các kháng thể này không có mảnh Fc và bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết và các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Các protein được tiết ra được tinh chế bằng các quy trình chuẩn sử dụng kỹ thuật tinh chế ái lực.

Hiệu suất sau khi tinh chế ái lực và đoạn phân tử kháng thể như được xác định bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ phân tích được nêu trong Bảng 5c.

Bảng 5c: Hiệu suất và đoạn kháng thể mong muốn sau khi tinh chế ái lực

Kháng thể	Hiệu suất [mg/L]	Đoạn [%] kháng thể bằng SEC phân tích
Ang2VEGF-0452	37,8	64,1
Ang2VEGF-0447	26,7	88,5
Ang2VEGF-0453	4,2	88,5
Ang2VEGF-0448	9,7	92,4

Phép đo phổ khối: các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể trước được khử glycosyl hóa và kháng thể được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác, kháng thể được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC được hạn chế.

Cấu trúc VH/VL Fab-CrossFab được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC được giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg VH/VL Fab-CrossFab được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Do khoảng khối lượng chồng nhau giữa vật liệu được cung cấp và phương pháp MS của các tác giả sáng chế, các mẫu thu được theo hai phương pháp khác nhau để quan sát các sản phẩm phụ có thể có trong khoảng khối lượng lớn hơn. Trong khi vận hành trong khoảng khối lượng lớn hơn (1000-4000 m/z), phương pháp này bao gồm điện áp CID (trong trường hợp này, cCID bằng 90), phép đo trong khoảng khối lượng thấp hơn (600-2000) không sử dụng CID. Bằng việc áp dụng CID, có cơ hội cao hơn để thu được các mảnh xuất hiện trong quá trình tạo ra mảnh nguồn trong máy đo phổ khối.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 5d.

Bảng 5d: Sản phẩm phụ của các kháng thể được nêu như được phân tích bằng MS được định lượng một cách tương đối dựa vào phân tử chính được mong muốn

Kháng thể	Đoạn sản phẩm phụ [%] theo MS	Sản phẩm phụ
Ang2VEGF-0452	6%	sản phẩm phụ ghép cặp sai có hai chuỗi nhẹ Ang2 VL-CL
Ang2VEGF-0447	0	không xác định
Ang2VEGF-0453	4,4%; 35,7%	sản phẩm phụ ghép cặp sai có ba chuỗi nhẹ Ang VL-CL; sản phẩm phụ ghép cặp sai có hai chuỗi nhẹ Ang VL-CL và một chuỗi VEGF VH-CL
Ang2VEGF-0448	0	không xác định

Ví dụ 4C:

Các đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể đa đặc hiệu hóa trị hai và kháng thể đa đặc hiệu hóa trị ba liên kết với ANG2 và VEGF, trong đó các kháng thể này không có mảnh Fc và bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL ở một nhánh liên kết và các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Khả năng gắn kết của kháng thể đa đặc hiệu trong ví dụ 4A và 4B nêu trên với các kháng nguyên đích tương ứng, tức là ANG2 và VEGF, được đánh giá bằng Biacore®.

Khả năng gắn kết VEGF được đánh giá theo quy trình sau:

Khả năng gắn kết của các kháng thể được nêu với VEGFA-121 người được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng công cụ BIACORE® T200 (GE Healthcare). Để có 50 RU của VEGFA-121-His được kết hợp trên chip Series S C1 (GE Healthcare BR-1005-35) ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit kết hợp amin được phân phối bởi GE Healthcare. HBS-N (HEPES 10mM, NaCl 150mM độ pH = 7,4, GE Healthcare) được sử dụng làm chất đệm chạy trong cả quy trình làm cố định. Đối với đặc trưng động học sau, mẫu và chất đệm chạy là PBS-T (nước muối đệm phosphat 10mM bao gồm Tween20 0,05%) ở độ pH = 7,4. Cu-vét dòng chảy được thiết lập đến 25°C - và khối mẫu được thiết lập

đến 12°C - và được mỗi bằng chất đệm chạy hai lần trước khi đặc trưng hóa động học.

Việc kết hợp được xác định bằng cách tiêm kháng thể được nêu ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 180 giây ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút bắt đầu bằng 100nM trong các dung dịch pha loãng theo dãy theo tỷ lệ 1:3. Pha phân ly được theo dõi trong thời gian lên đến 300 giây và được hoạt hóa bằng cách chuyển từ dung dịch mẫu sang chất đệm chạy. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 30 giây bằng dung dịch H_3PO_4 0,85% (axit phosphoric) ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút. Mức khác biệt là chỉ số khúc xạ lớn được chính xác hóa bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt kháng thể kháng His. Các lần tiêm trống cũng được trừ (= là hai). Để tính K_D và các thông số động học khác, mô hình Langmuir 1:1 được sử dụng.

Ang-2 liên kết được đánh giá theo quy trình sau:

Khả năng gắn kết của các kháng thể được nêu với Ang-2-RBD-Fc người được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng công cụ BIACORE® T200 (GE Healthcare). Khoảng 8000 (RU) F(ab')_2 ở dê kháng người (10 μ g/ml F(ab')_2 kháng người; Mã thứ tự: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) được kết hợp trên chip Series S CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit kết hợp amin được phân phối bởi GE Healthcare. HBS-N (HEPES 10mM, NaCl 150mM độ pH = 7,4, GE Healthcare) được sử dụng làm chất đệm chạy trong cả quy trình làm cố định. Đối với đặc trưng động học sau, mẫu và chất đệm chạy là PBS-T (nước muối đệm phosphat 10mM bao gồm Tween20 0,05%) ở độ pH = 7,4. Cu-vét dòng chảy được thiết lập đến 25°C - và khối mẫu được thiết lập đến 12°C - và được mỗi bằng chất đệm chạy hai lần trước khi đặc trưng hóa động học.

Kháng thể đặc hiệu kép được bắt giữ bằng cách tiêm dung dịch 5nM trong 25 giây ở tốc độ chảy bằng 5 μ l/phút. Việc kết hợp được xác định bằng cách tiêm Ang2 -RBD-Fc người ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 120 giây ở tốc độ chảy bằng 30 μ l/phút bắt đầu bằng 100nM trong các pha loãng theo dãy theo tỷ lệ 1:3. Pha phân ly được theo dõi trong tối đa 180 giây và được hoạt hóa bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang chất đệm chạy. Bề mặt được tái tạo bằng cách rửa trong 60 giây bằng dung dịch Glyxin có độ pH = 2,1 ở tốc độ chảy

bằng 30 $\mu\text{l/phút}$. Các chênh lệch chỉ số khúc xạ lớn được chính xác hóa bằng cách trừ đáp ứng thu được từ bề mặt F(ab')₂ ở dê kháng người. Các lần tiêm trông cũng được trừ (= là hai). Để tính K_D rõ ràng và các thông số động học khác, mô hình Langmuir 1:1 được sử dụng.

Các kết quả được nêu trong Bảng 5e và 5f.

Bảng 5e: Ái lực đối với VEGF của các kháng thể được nêu

Kháng thể	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	0,35
Ang2VEGF-0447	0,36
Ang2VEGF-0453	0,22
Ang2VEGF-0448	0,18

Bảng 5f: Ái lực đối với Ang2 của các kháng thể được nêu

Kháng thể	KD (nM)
Ang2VEGF-0452	3
Ang2VEGF-0447	3
Ang2VEGF-0453	5
Ang2VEGF-0448	4

Khả năng gắn kết kháng nguyên không bị suy giảm do các đột biến được đưa vào bề mặt chung CH1/CL của kháng thể tự do Fc.

Ví dụ 5A:

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở nhánh liên kết VEGF và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL của nhánh liên kết VEGF

Trong một ví dụ khác, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 người (ANG2) và VEGF người được tạo ra như được mô tả trong phần mô tả các phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử cổ điển và được biểu

hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 như nêu trên. Sơ đồ tổng quát của các kháng thể đa đặc hiệu tương ứng này được nêu trên Fig.1B, chỉ ra rằng, có các thay thế bằng các axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL của nhánh liên kết bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL. Để so sánh, kháng thể kiểu đại (wt) trao đổi/thay thế miền VH/VL không có sự thay thế trong bề mặt chung CH1/CL cũng được tạo ra. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmid biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được nêu trong Bảng 6a.

Bảng 6a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC) của kháng thể đa đặc hiệu kháng *Ang2-VEGF* Ang2VEGF-0273, Ang2VEGF-0425, và Ang2VEGF-0424 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*): kiểu đại (wt) và các tổ hợp khác nhau của các thay thế axit amin tích điện

Kháng thể	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0425	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
Ang2VEGF-0424	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ dị dime hóa phần “khóa” vào “ổ” được sử dụng với thay thế phần “khóa” (T366W) điển hình trong miền CH3 thứ nhất và thay thế phần “ổ” tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein bổ sung được đưa vào S354C/Y349C) (có trong các trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng nêu trên).

Ví dụ 5B

Tinh chế và đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu liên kết với Angiopoietin-2 (ANG2) và VEGF có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMab^{Vh-VL}*) ở một nhánh liên kết và có các thay thế axit amin tích điện khác nhau trong bề mặt chung CH1/CL

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện ở trên được tinh chế từ phân dịch nổi trên bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Tất cả các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sản xuất với hiệu suất tốt và ổn định.

Các sản phẩm thu được được đặc trưng về độ đồng nhất bằng phép đo phổ khối và các tính chất phân tích như độ tinh khiết bằng SDS-PAGE, hàm lượng monome và độ ổn định

Phép đo phổ khối

Các cấu trúc sơ cấp mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của CrossMab trở được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải plasmin hoặc theo một cách khác CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân giải LysC hạn chế.

Các CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidase F trong đệm phosphat hoặc Tris ở 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân giải plasmin hoặc LysC được giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg CrossMab VH/VL được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở 37°C trong 40 phút, một cách lần lượt. Trước khi đo phổ khối các mẫu được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6b.

Bảng 6b: profin sản phẩm phụ (sản phẩm phụ kiểu Bence-Jones chủ yếu) bằng các thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong bề mặt chung CH1/CL trong nhánh liên kết bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL

	CL ANG-2	CH1 ANG-2	CH1 VEGF	CL VEGF	Phân tử mong muốn	Sản phẩm phụ chủ yếu (ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) % theo MS
Ang2VEGF-0273	wt (kappa)	wt	wt K147 K213	wt E123 Q124	<i>n.d.</i>	~20%
Ang2VEGF-0425	wt	wt	K147E	Q124K	72%	22%
Ang2VEGF-0424	wt	wt	K147E K213E	E123K Q124K	64%	26%

Các kết quả trong bảng 6b cho thấy rằng profin sản phẩm phụ (bao gồm việc ghép cặp sai kiểu Bence-Jones) có thể không được cải thiện trong kháng thể đặc

hiệu kép Ang2VEGF có các thay thế axit amin trong bề mặt chung CH1/CL được đặt trong nhánh liên kết bao gồm trao đổi/thay thế miền VH/VL.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đa đặc hiệu của phân lớp IgG1 của người, IgG2 của người, IgG3 của người hoặc IgG4 của người, trong đó kháng thể này bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó miền biến đổi VL và VH trong chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể thứ hai được đổi chỗ cho nhau; và

trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat EU).

2. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU).

3. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU).

4. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được

thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU).

5. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó:

trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và

trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU).

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ:

miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể trong a) và miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai của kháng thể trong b) mỗi miền giao nhau tại bề mặt chung bao gồm bề mặt chung ban đầu giữa miền CH3 của kháng thể,

trong đó bề mặt chung nêu trên được thay đổi để thúc đẩy việc tạo ra kháng thể đa đặc hiệu, trong đó quá trình thay đổi này khác biệt ở chỗ:

i) miền CH3 của một chuỗi nặng được thay đổi:

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của một chuỗi nặng đáp ứng bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại bên trong kháng thể đa đặc hiệu,

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y) và tryptophan (W), từ đó tạo ra chốt bên trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng mà có thể định vị được trong lỗ trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại;

và

ii) miền CH3 của chuỗi nặng còn lại được thay đổi:

sao cho trong bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại đáp ứng bề mặt chung ban đầu của miền CH3 của một chuỗi nặng trong kháng thể đa đặc hiệu,

gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T) và valin (V), từ đó tạo ra lỗ trong bề mặt chung của miền CH3 của chuỗi nặng còn lại trong đó chốt trong bề mặt chung của miền CH3 của một chuỗi nặng có thể định vị được.

7. Kháng thể theo điểm 6, khác biệt ở chỗ, cả hai miền CH3 còn được thay đổi bằng cách đưa xystein (C) dưới dạng axit amin ở các vị trí tương ứng của mỗi miền CH3 sao cho có thể tạo ra cầu disulfua giữa cả hai miền CH3.

8. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên gắn kết đặc hiệu với TWEAK của người và gắn kết đặc hiệu với IL17 của người, trong đó:

A) kháng thể đa đặc hiệu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO:24, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của SEQ ID NO:25; và

B) kháng thể đa đặc hiệu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO:26, và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của SEQ ID NO:27.

9. Phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

A) biến nạp tế bào chủ với các vector chứa phân tử axit nucleic mã hóa:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9;

B) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp phân tử kháng thể nêu trên; và

C) thu hồi phân tử kháng thể nêu trên từ môi trường nuôi cấy.

10. Axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

11. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 10 có khả năng biểu hiện axit nucleic nêu trên trong tế bào vật chủ.
12. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và ít nhất một tá dược được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Kháng thể đa đặc hiệu, phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này
 <130> P32061-WO
 <150> EP 14163165.5
 <151> 2014-04-02
 <150> EP 14179034.5
 <151> 2014-07-30
 <160> 47
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> kiểu đại (wt)
 <400> 1

Gln	Pro	Gly	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	
Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	100	105	110	
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	115	120	125	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	130	135	140	
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	145	150	155	160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu				

165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 2
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu đại (wt)
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455
 <210> 3
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <VEGF> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro
 435
 <210> 4
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

145					150					155					160
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
				165					170					175	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
			180					185					190		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
		195					200					205			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
	210					215					220				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
225					230										
<210>	5														
<211>	215														
<212>	PRT														
<213>	Nhân tạo														
<220>															
<223>	chuỗi nhẹ (LC)														
<400>	5														
Gln	Pro	Gly	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	
Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala
			100					105					110		
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Lys	Leu	Lys	Ser
		115					120					125			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	130					135					140				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145					150					155					160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165					170					175	

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 6
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455
 <210> 7
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K213E
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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						
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	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser					
130							135							140						
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp					
145							150							155						
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr					
165							170							175						
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr					
180							185							190						
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln					
195							200							205						
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp					
210							215							220						
Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro					
225							230							235						
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro					
245							250							255						
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr					
260							265							270						
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn					
275							280							285						
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg					
290							295							300						
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val					
305							310							315						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser					
325							330							335						
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys					

340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455
 <210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có thay thế E123K
 <400> 8
 Gln Pro Gly 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
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có thay thế Q124K và thay thế E123K

<400> 9

Gln Pro Gly 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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser
115 120 125

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

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

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

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 10
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và thay thế K213E
 <400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455
 <210> 11
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có thay thế Q124R và thay thế E123K
 <400> 11
 Gln Pro Gly 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
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Arg Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 12

<211> 230

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có thay thế Q124E

<400> 12

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

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <Ang-2> có thay thế E124K và thay thế E123K

<400> 13

Gln Pro Gly 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

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Lys Lys 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
210

<210> 14

<211> 457

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và thay thế K213D

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Glu 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	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
130					135					140					
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp
145					150					155					160
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
165					170					175					
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
180					185					190					
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
195					200					205					
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
210					215					220					
Asp	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
225					230					235					240
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
245					250					255					
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
260					265					270					
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
275					280					285					
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
290					295					300					
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
325					330					335					
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
340					345					350					
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp
355					360					365					
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
370					375					380					
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
385					390					395					400
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
405					410					415					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
420					425					430					
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr

435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455

<210> 15
<211> 219
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> kiểu đại (wt)

<400> 15

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 16
<211> 446
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> kiểu dài (wt)

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 <210> 17
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <TWEAK> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
 85 90 95
 Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser

100							105					110					
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser		
115							120					125					
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp		
130							135					140					
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr		
145							150					155					
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr		
165							170					175					
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys		
180							185					190					
Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp		
195							200					205					
Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala		
210							215					220					
Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro		
225							230					235					
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val		
245							250					255					
Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
260							265					270					
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
275							280					285					
Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		
290							295					300					
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly		
305							310					315					
Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro		
325							330					335					
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Gln	Glu	Glu	Met	Thr		
340							345					350					
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
355							360					365					
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
370							375					380					
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr		
385							390					395					
Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe		
405							410					415					
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys		

420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435
 <210> 18
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <TWEAK> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60
 Asn Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys
 225

<210> 19
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> có thay thế Q124K và thay thế E123R

<400> 19

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 20
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> có thay thế K147E và thay thế K213E

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 227

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ (LC) <TWEAK> có thay thế Q124E

<400> 21

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

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

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

Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val

115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Glu Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 Gly Glu Cys
 225
 <210> 22
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> có thay thế K147E và thay thế K213D
 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 <210> 23
 <211> 219

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ (LC) <IL-17> có thay thế Q124K và thay thế E123K

<400> 23

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys
 115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miễn chuỗi nặng biến đổi VH <TWEAK > 305-HC4

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Val Tyr Val Arg Gln Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Leu
 50 55 60
 Asn Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Ala Phe Val Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền chuỗi nhẹ biến đổi VL <TWEAK>305-LC2

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
 85 90 95
 Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> miền chuỗi nặng biến đổi VH <IL-17> HC136

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền chuỗi nhẹ biến đổi VL <IL-17> LC136

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95
 Thr His Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 28
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <TWEAK> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 (chứa GK dipeptit tận cùng)

<400> 28

```

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Ala Tyr Tyr Asn Ser Arg
          85           90           95

Pro Asp Thr Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
          100          105          110

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
          130          135          140

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

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
          180          185          190

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

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
          210          215          220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
          225          230          235          240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
          245          250          255

```

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 29
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> có thay thế K147E và thay thế K213E
 (chứa GK dipeptit tận cùng)
 <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 Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65		70		75		80
Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Gly Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala				
	85	90	95			
Arg Asp Thr His	Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly					
	100	105	110			
Gln Gly Thr Thr	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser					
	115	120	125			
Val Phe Pro Leu	Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala					
	130	135	140			
Ala Leu Gly Cys	Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val					
	145	150	155			160
Ser Trp Asn Ser	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala					
	165	170	175			
Val Leu Gln Ser	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val					
	180	185	190			
Pro Ser Ser Ser	Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His					
	195	200	205			
Lys Pro Ser Asn	Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly					
	210	215	220			
Pro Pro Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser					
	225	230	235			240
Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg					
	245	250	255			
Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro					
	260	265	270			
Glu Val Gln Phe	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					
	275	280	285			
Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val					
	290	295	300			
Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr					
	305	310	315			320
Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr					
	325	330	335			
Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu					
	340	345	350			
Pro Pro Ser Gln	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys					
	355	360	365			
Ala Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
	370	375	380			
Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					

385 390 395 400

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 30
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> có thay thế K147E và thay thế K213D
(chứa GK dipeptit tận cùng)

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Asp Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 31
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu đại (wt) (chứa GK
 dipeptit tận cùng)
 <400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 32
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <VEGF> có trao đổi VH-VL kiểu đại (wt)
 (chứa GK dipeptit tận cùng)
 <400> 32
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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 Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

130	135	140
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
145	150	155 160
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170 175
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
	180	185 190
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		
	195	200 205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
	210	215 220
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	225	230 235 240
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
	245	250 255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
	260	265 270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
	275	280 285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	290	295 300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
	305	310 315 320
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	325	330 335
Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
	340	345 350
Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	355	360 365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	370	375 380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser		
	385	390 395 400
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
	405	410 415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
	420	425 430
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	

<210> 33

```
<211> 459
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E (chứa GK dipeptit tận cùng)

<400> 33

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	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	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	
	130					135					140					
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	
145					150					155					160	
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
				165					170					175		
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
			180					185					190			
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	
		195					200					205				
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
	210					215					220					
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
225					230					235					240	
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
				245					250					255		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
			260					265					270			

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 34
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K213E (chứa
 GK dipeptit tận cùng)
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 35

<211> 459

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và thay thế K213E
(chứa GK dipeptit tận cùng)

<400> 35

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

```
<210> 36
<211> 459
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi năng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và thay thế K213D
```

(chứa GK dipeptit tận cùng)

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 37
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <IL-17> kiểu đại (wt) (chứa GK
 dipeptit tận cùng)
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Trp Ser Asp Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Thr His Tyr Arg Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365
 Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 38

<211> 688

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng Fab2-CrossFab (HC) bao gồm hai chuỗi nặng (HC)
<Ang-2> kiểu đại (wt) kết hợp với một chuỗi nặng (HC) <VEGF>
có trao đổi miền VL-VH kiểu đại (wt) thông qua
chất liên kết glyxin-serin

<400> 38

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
 260 265 270
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 275 280 285
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 290 295 300
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335
 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 340 345 350
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 370 375 380
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 405 410 415
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 420 425 430
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 435 440 445
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 450 455 460
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 465 470 475 480
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
 500 505 510
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
 515 520 525
 Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 530 535 540

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
595 600 605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
625 630 635 640

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
645 650 655

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
660 665 670

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 39

<211> 688

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng Fab2-CrossFab (HC) bao gồm hai chuỗi nặng (HC)
<Ang-2> có thay thế K147E và K213E kết hợp với một chuỗi
nặng (HC) <VEGF> có trao đổi miền VL-VH kiểu dại (wt) thông
qua
chất liên kết glyxin-serin

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu 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 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 225 230 235 240
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met
 260 265 270
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp
 275 280 285
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 290 295 300
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 305 310 315 320
 Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 325 330 335
 Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly
 340 345 350
 Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360 365
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 370 375 380
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 405 410 415

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 420 425 430
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 435 440 445
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys
 450 455 460
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 465 470 475 480
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
 500 505 510
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser
 515 520 525
 Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 530 535 540
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 545 550 555 560
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
 565 570 575
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 580 585 590
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 595 600 605
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 610 615 620
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 625 630 635 640
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 645 650 655
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 660 665 670
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 675 680 685
 <210> 40
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nặng CrossFab-Fab (HC) bao gồm một chuỗi nặng (HC)
 <VEGF> có trao đổi miền VL-VH kiểu đại (wt) kết hợp với một
 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu đại (wt) thông qua

chất liên kết glyxin-serin

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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 Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
 210 215 220
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
 225 230 235 240
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
 245 250 255
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
 260 265 270
 Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
 275 280 285
 Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
 290 295 300

Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
305 310 315 320

Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile
325 330 335

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
340 345 350

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
355 360 365

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
370 375 380

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
385 390 395 400

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
405 410 415

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
420 425 430

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
435 440 445

Ser Cys
450

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng CrossFab-Fab (HC) bao gồm một chuỗi nặng (HC)
<VEGF> có trao đổi miền VL-VH kiểu dại (wt) kết hợp với một
chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và K213E thông qua
chất liên kết glyxin-serin

<400> 41

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

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

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

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

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

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

85										90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr				
			100					105					110						
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser				
			115				120					125							
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu				
			130				135				140								
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His				
145				150						155				160					
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser				
			165						170				175						
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys				
			180				185						190						
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu				
			195				200				205								
Pro	Lys	Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu				
			210				215				220								
Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys				
225				230						235			240						
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg				
			245						250			255							
Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn				
			260				265						270						
Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met				
			275				280						285						
Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu				
			290				295				300								
Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro				
305				310						315			320						
Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile				
			325						330						335				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly				
			340						345						350				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly				
			355						360			365							
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val				
			370			375						380							
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe				
385				390						395			400						
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val				

405 410 415
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 420 425 430
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys
 435 440 445
 Ser Cys
 450
 <210> 42
 <211> 667
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CrossFab2-Fab (HC) bao gồm hai chuỗi nặng (HC)
 <VEGF> có trao đổi miền VL-VH kiểu đại (wt) kết hợp với một
 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> kiểu đại (wt) thông qua
 chất liên kết glyxin-serin
 <400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 210 215 220
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 245 250 255
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
 260 265 270
 His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 275 280 285
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 290 295 300
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 340 345 350
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 355 360 365
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 370 375 380
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 405 410 415
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 420 425 430
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 435 440 445
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 450 455 460
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 485 490 495
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 500 505 510

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Thr Ala Val
 515 520 525
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 530 535 540
 Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 545 550 555 560
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 565 570 575
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 595 600 605
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 610 615 620
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 645 650 655
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 660 665
 <210> 43
 <211> 667
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CrossFab2-Fab (HC) bao gồm hai chuỗi nặng (HC)
 <VEGF> có trao đổi miền VL-VH kiểu dại (wt) kết hợp với một
 chuỗi nặng (HC) <Ang-2> có thay thế K147E và K231E thông qua
 chất liên kết glyxin-serin
 <400> 43
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 210 215 220
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 245 250 255
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu
 260 265 270
 His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 275 280 285
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 290 295 300
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 305 310 315 320
 Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 325 330 335
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 340 345 350
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 355 360 365
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 370 375 380
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 405 410 415

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly
 420 425 430
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 435 440 445
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 450 455 460
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 465 470 475 480
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 485 490 495
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 500 505 510
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 515 520 525
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly
 530 535 540
 Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 545 550 555 560
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 565 570 575
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 580 585 590
 Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 595 600 605
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 610 615 620
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 625 630 635 640
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 645 650 655
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 660 665
 <210> 44
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <VEGF> có trao đổi VH-VL với thay thế K147E
 <400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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 Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435
 <210> 45
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có trao đổi VH-VL với thay thế Q124K
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Lys Leu Lys Ser Gly

130 135 140
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 195 200 205
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 210 215 220
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 46
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng (HC) <VEGF> có trao đổi VH-VL với thay thế K147E,
 và K213E
 <400> 46
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435
 <210> 47
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ (LC) <VEGF> có trao đổi VH-VL với thay thế E123K, và Q124K

<400> 47

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly
130             135             140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145             150             155             160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165             170             175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180             185             190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195             200             205

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225             230

```

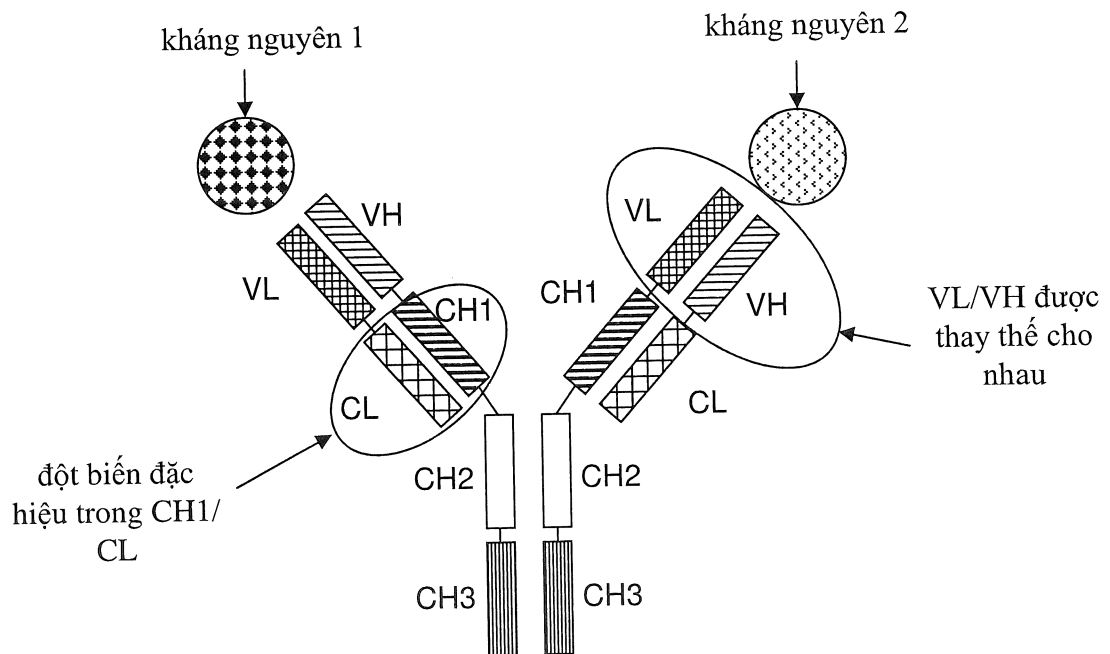
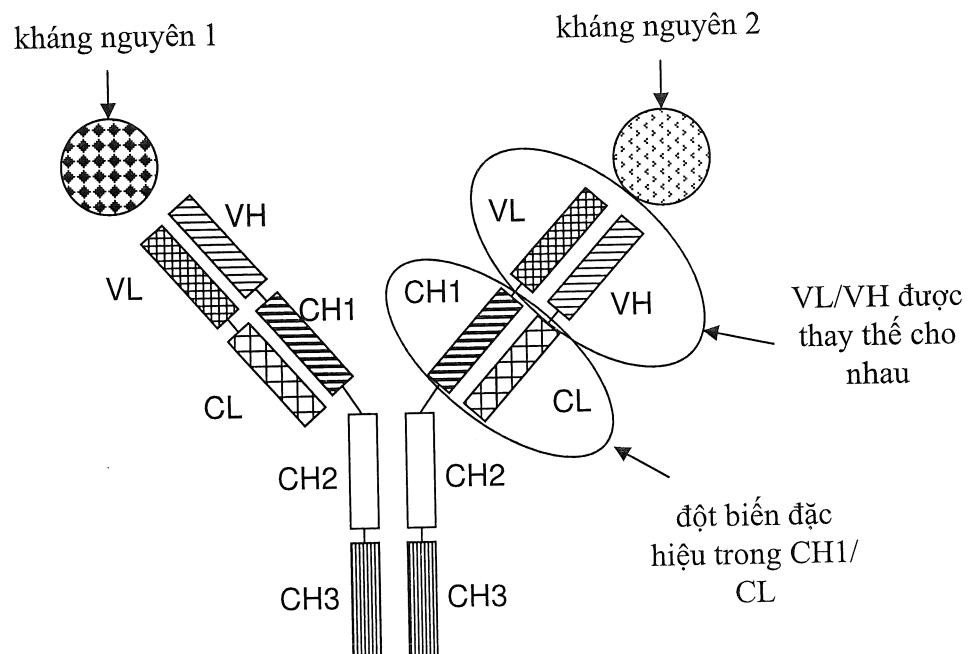

Fig. 1A**Fig. 1B**

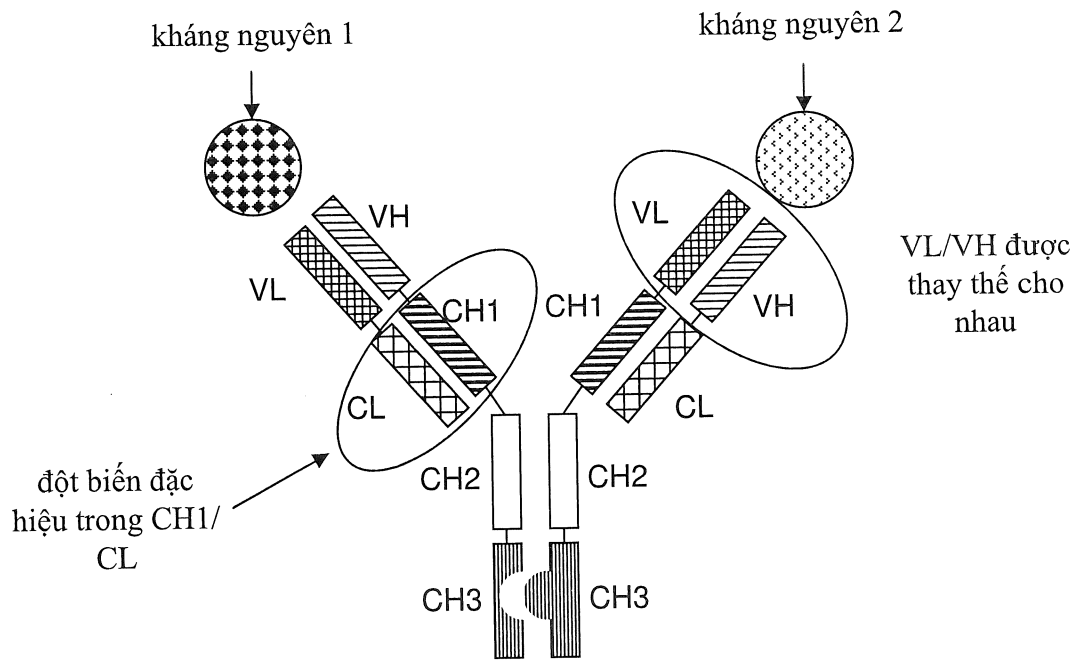
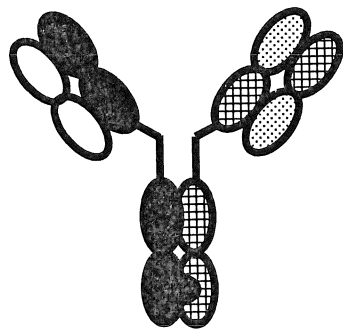
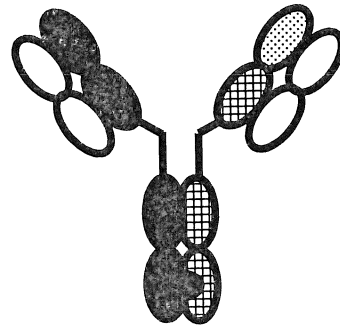
Fig. 1C

Fig. 2A



Kháng thể hai đặc hiệu
mong muốn có trao đổi/
thay thế VH-VL ở một
nhánh liên kết



Sản phẩm phụ chủ yếu:
kết quả của tương tác
Bence-Jones giữa HC
cắt chéo với LC không
cắt chéo

	kháng nguyên 1	kháng nguyên 2
Miền HC		
Miền LC		

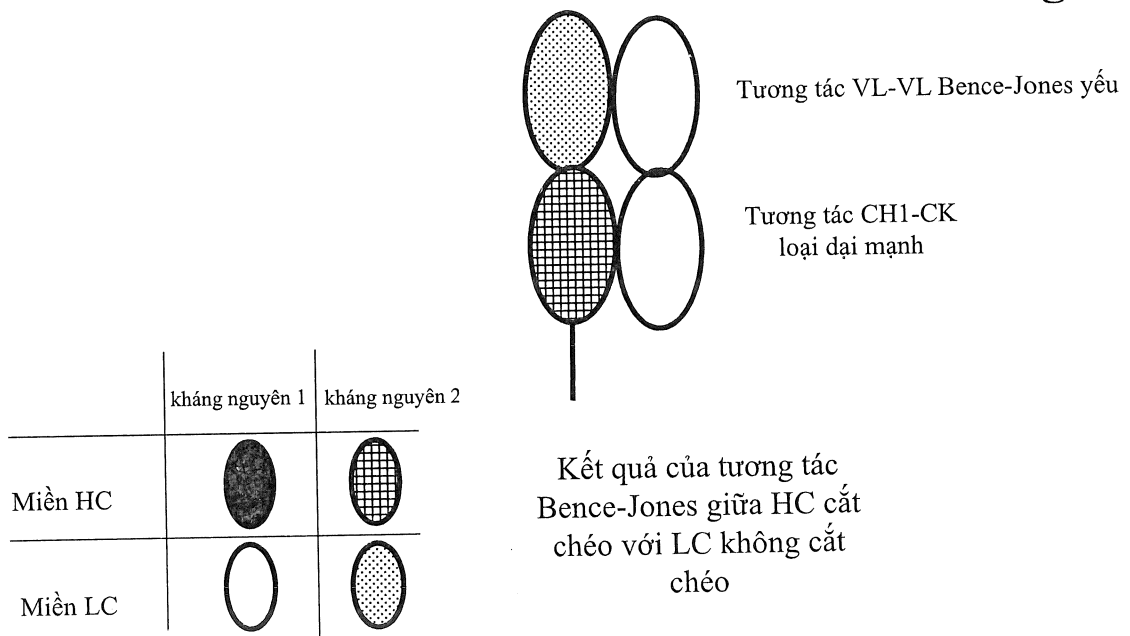
Fig. 2B

Fig. 3A

147 213
 IgG1 CH1 wt: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKGQYFFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 IgG4 CH1 wt: ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKGQYFFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKRVESK
 147 213

Fig. 3B

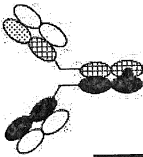
123 124
 CL kappa wt: VAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLINNFYPREARKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEG

Fig. 3C

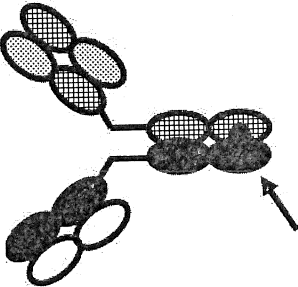
123 124
 CL lambda wt: QPRAAPSVTILFPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTTPSKQSNKNYAASSTLSLTPEQMKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPAEC

Fig. 4A

Không trao đổi VH/VL-không cắt chéo						Trao đổi VH/VL-cắt chéo			Ghép cặp không chính xác Bence-Jones (ghép cặp VL-CH1/VL-CL) (lượng kháng thể với 2 Ang2-LC's) % theo MS
	CL isotyp	CL ANG-2 (vị trí 124)	CL ANG-2 (vị trí 123)	CH1 ANG-2 (vị trí 147)	CH1 ANG-2 (vị trí 213)	CL isotyp	CH1 VEGF	CL VEGF	
Ang2VEGF -0273	kappa	wt: Q124	wt: E123	wt: K147	wt: K213	kappa	wt	wt	~20
Ang2VEGF -0396	kappa	Q124K	wt	K147E	wt	kappa	wt	wt	~3
Ang2VEGF -0397	kappa	Q124K	wt	wt	K213E	kappa	wt	wt	~3
Ang2VEGF -0394	kappa	wt	E123K	K147E	wt	kappa	wt	wt	~15
Ang2VEGF -0395	kappa	wt	E123K	wt	K213E	kappa	wt	wt	~15



ANG-2 VEGF
Không cắt chéo Cắt chéo



Phản phình
IgG1

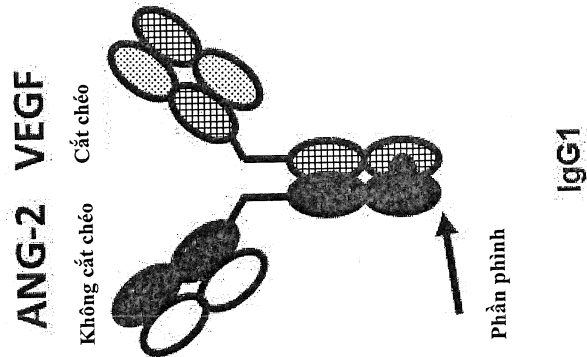
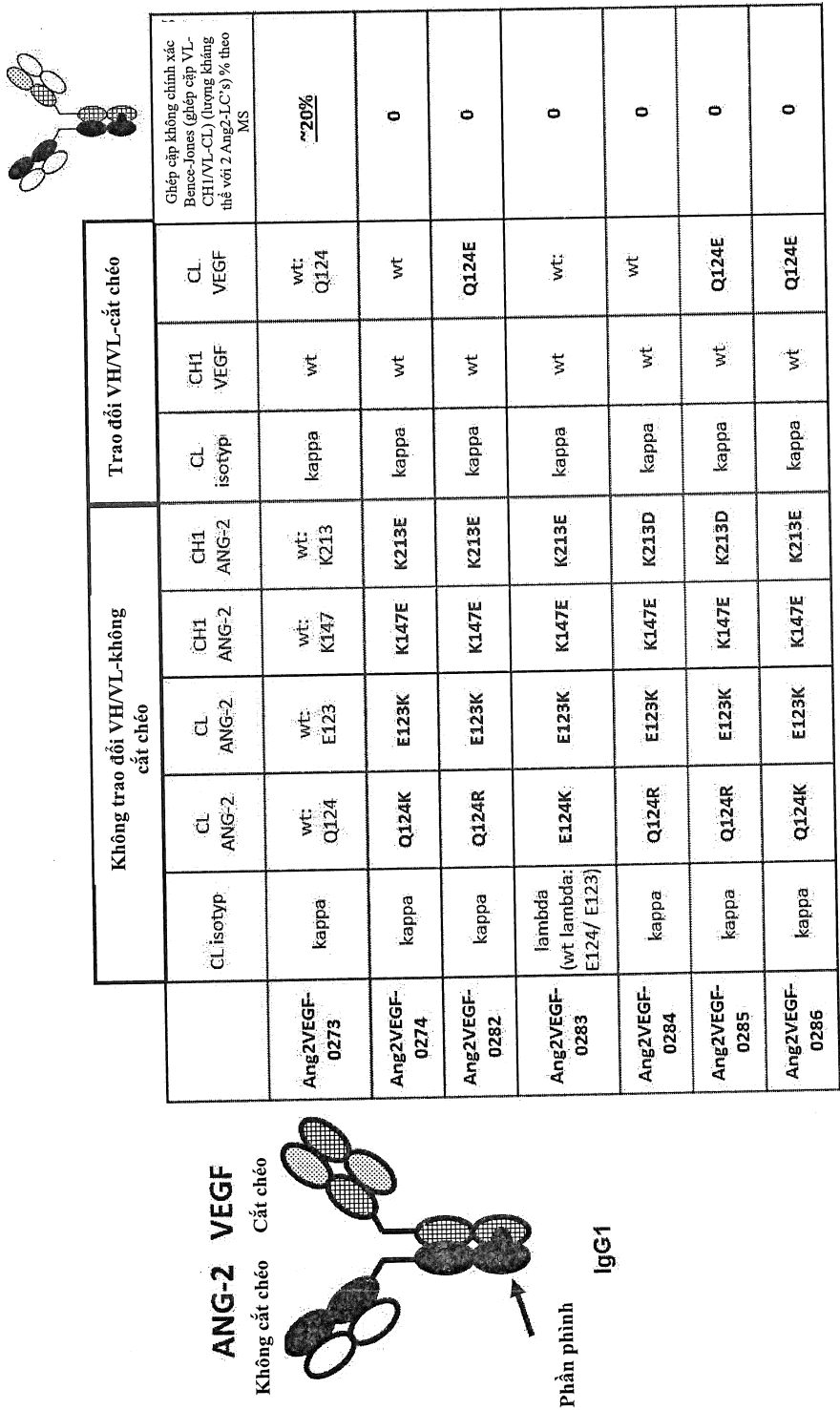


Fig. 4B

Không trao đổi VH/VL- không cắt chéo		Trao đổi VH/VL-cắt chéo	
	LC ANG-2	HC ANG-2	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0396	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0397	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0394	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0395	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 4

Fig. 5A



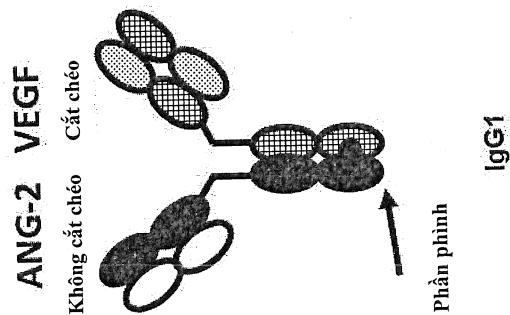
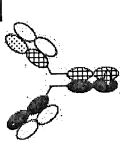


Fig. 5B

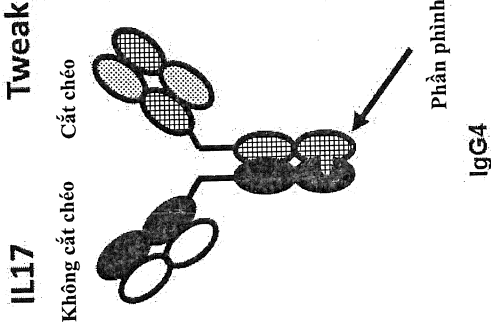
	Không trao đổi VH/ VL-không cắt chéo		Trao đổi VH/VL-cắt chéo	
	LC ANG-2	HC ANG-2	HC VEGF	LC VEGF
Ang2VEGF-0273	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0274	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0282	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0283	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0284	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
Ang2VEGF-0285	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12
Ang2VEGF-0286	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 12

Fig. 6A

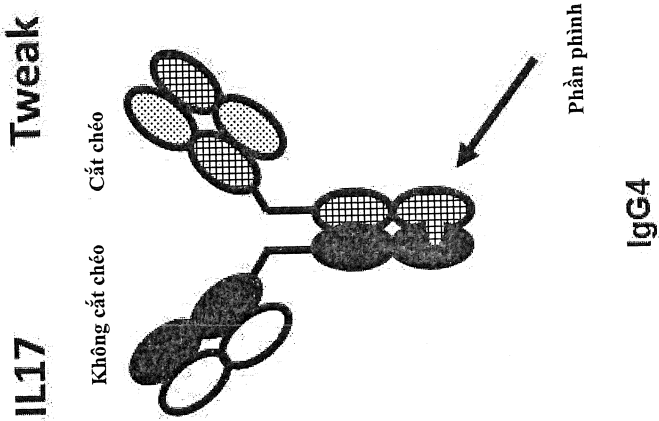


Không trao đổi VH/VL-không cắt chéo					Trao đổi VH/VL-cắt chéo			Ghép cặp không chính xác Bence-Jones (ghép cặp VL-CH1/VL-CL) (lượng kháng thể với 2 IL17-LC's) % theo MS
	CL IL17 (vị trí 124)	CH1 IL17 (vị trí 147)	CH1 IL17 (vị trí 213)	CL isotyp	CL isotyp	CH1 TWEAK (vị trí 124)	CL TWEAK (vị trí 124)	
TweakIL 17-0096	wt: Q124K	wt: E123	wt: K213	kappa	kappa	wt	wt: Q124	~20%
TweakIL 17-0097	wt: Q124K	wt: K147E	wt: K213E	kappa	kappa	wt	wt: Q124E	0
TweakIL 17-0098	wt: Q124K	wt: K147E	wt: K213D	kappa	kappa	wt	wt	0
TweakIL 17-0099	wt: Q124K	wt: E123R	wt: K213D	kappa	kappa	wt	wt: Q124E	0
TweakIL 17-0100	wt: Q124K	wt: E123K	wt: K213E	kappa	kappa	wt	wt: Q124E	0
TweakIL 17-0101	wt: Q124K	wt: E123K	wt: K213E	kappa	kappa	wt	wt	Không xác định

Fig. 6B



Không trao đổi VH/VL- không cắt chéo		Trao đổi VH/VL-cắt chéo	
IL17		LC IL17	HC IL17
Tweak		LC Tweak	HC Tweak
TweakIL17-0096	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
TweakIL17-0097	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0098	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 18
TweakIL17-0099	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0100	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
TweakIL17-0101	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 18



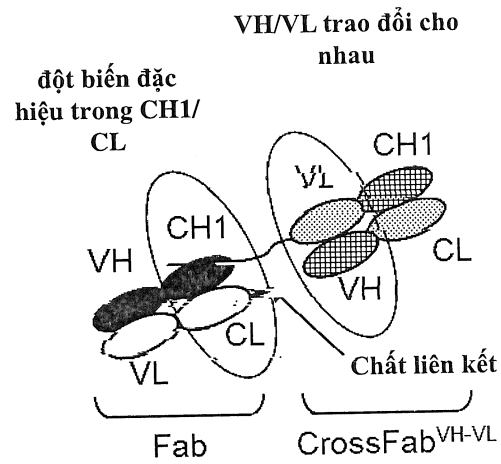


Fig. 7A

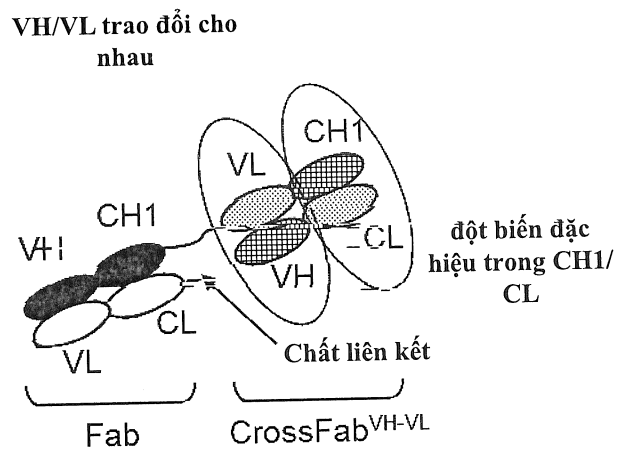


Fig. 7B

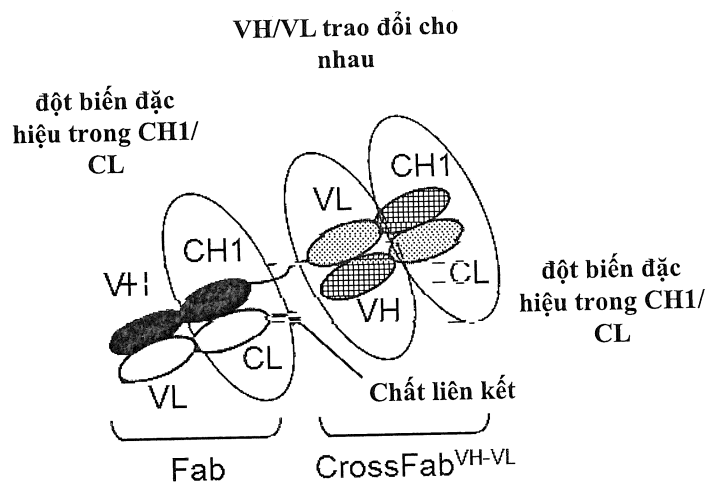


Fig. 7C

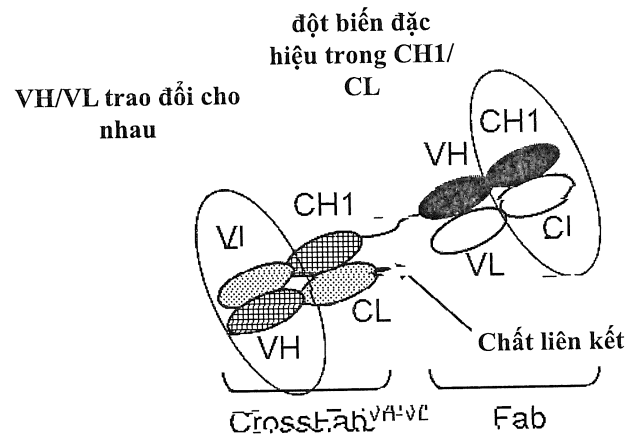


Fig. 7D

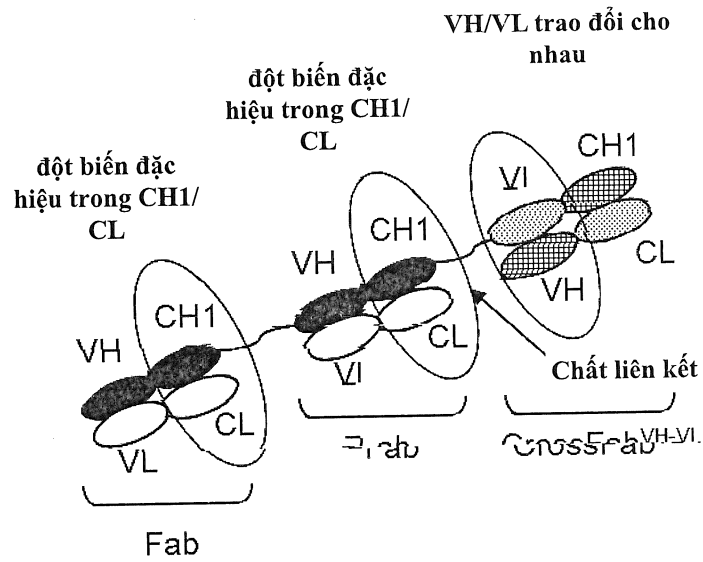


Fig. 8A

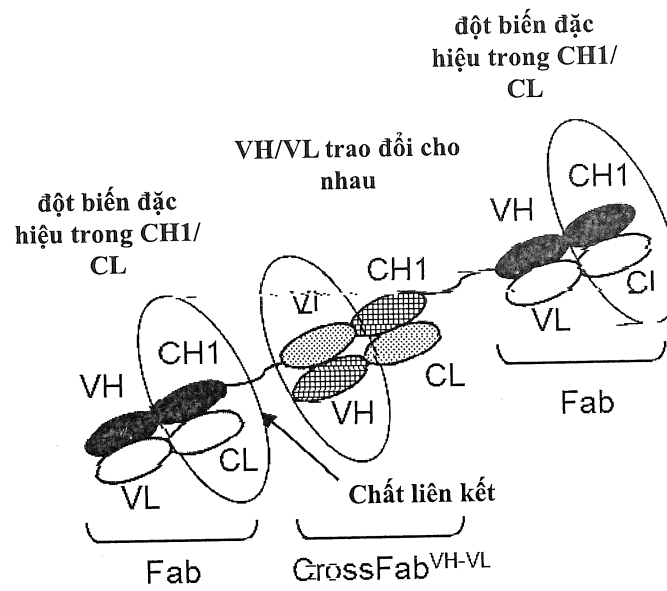


Fig. 8B

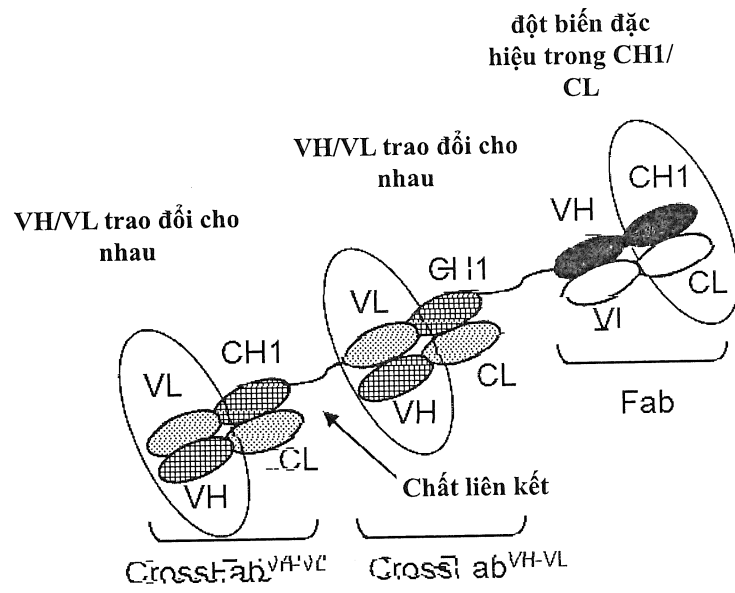


Fig. 8C

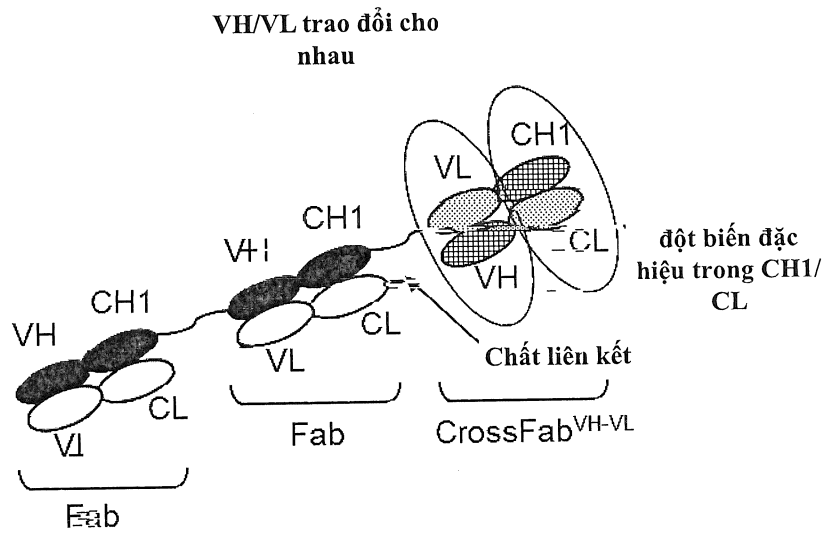


Fig. 8D

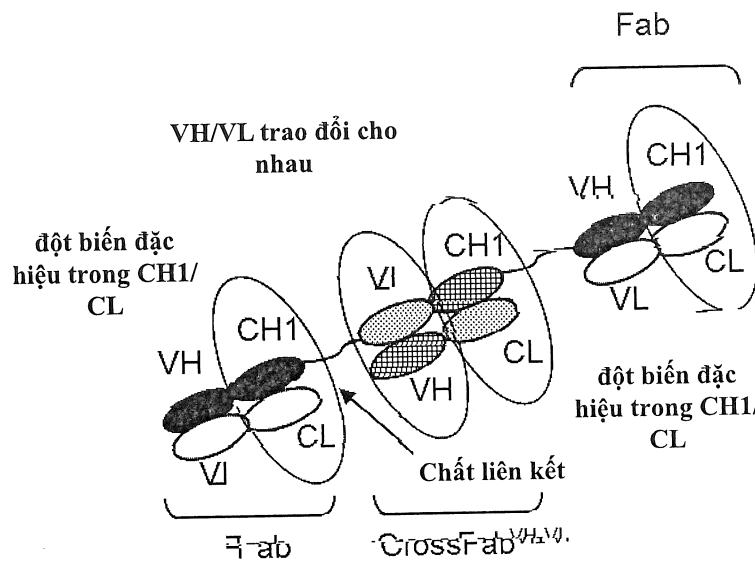


Fig. 8E

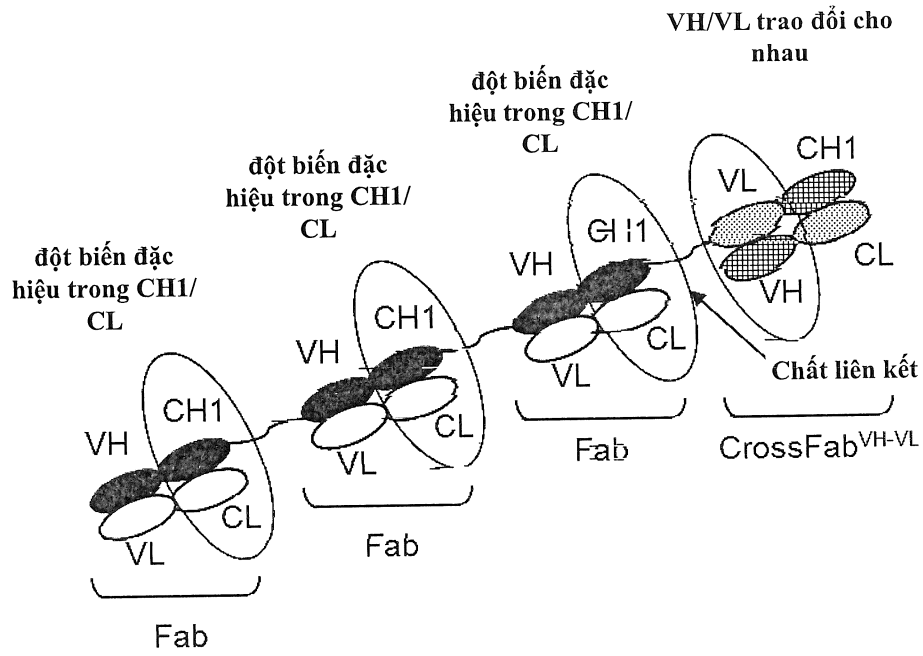


Fig. 9A

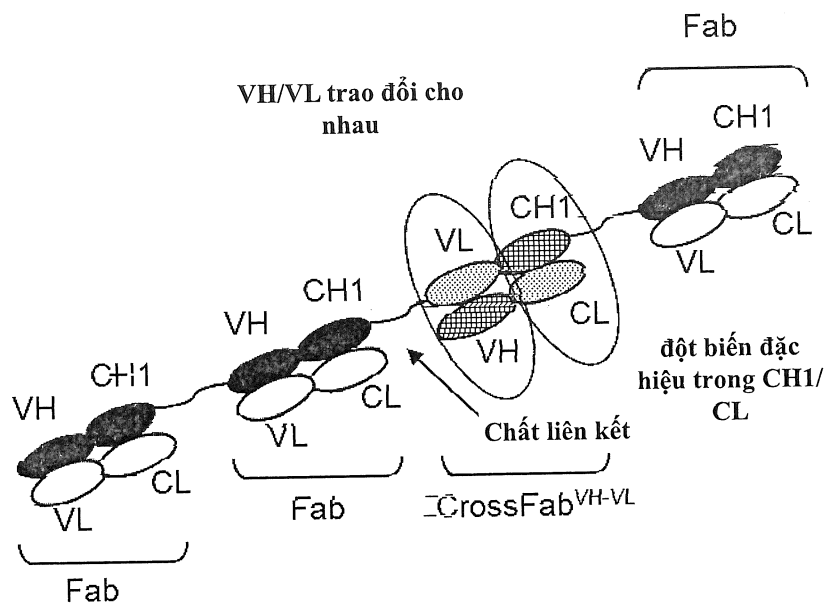


Fig. 9B