



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

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

(11) 
1-0021403

(51)⁷ **C07K 16/18**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2012-02915 | (22) | 28.02.2011 | | |
| (86) | PCT/US2011/026489 | 28.02.2011 | (87) | WO2011/109298 | 09.09.2011 |
| (30) | 61/309,494 | 02.03.2010 | US | | |
| (45) | 25.07.2019 | 376 | (43) | 25.03.2013 | 300 |
| (73) | ABBVIE INC. (US)
1 North Waukegan Road North Chicago, IL 60064, United States | | | | |
| (72) | LI, Yingchun (CN), GU, Jijie, James (US), MORGAN-LAPPE, Susan (US), CHEN, Mingjiu (US), HSIEH, Chung-ming (US) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH T&G (TGVN) | | | | |
-

(54) **PROTEIN LIÊN KẾT VỚI DLL4, KHÁNG THỂ CHỨA PROTEIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN LIÊN KẾT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 bao gồm kháng thể, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm tương thích với người, và các đoạn liên kết với DLL4 của chúng, các protein mà liên kết với ái lực cao với DLL4, và protein liên kết với DLL4 mà trung hòa hoạt tính DLL4 và/hoặc VEGF. Protein liên kết với DLL4 theo sáng chế là hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa ung thư và khối u, cụ thể là hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa sự tạo thành mạch trong khối u.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 và phương pháp ức chế, phòng ngừa, và/hoặc điều trị ung thư, khối u, các bệnh phụ thuộc sự tạo thành mạch khác, các bệnh không phụ thuộc sự tạo thành mạch, và bệnh thoái hóa điểm vàng và bệnh thoái hóa điểm vàng gây ra do tuổi tác được đặc trưng bởi sự biểu hiện hoặc hoạt tính DLL4 khác thường bằng cách dùng nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự liên lạc giữa tế bào với tế bào được yêu cầu cho nhiều quá trình sinh học như là sự biệt hóa, sự tăng sinh, và nội cân bằng. Một hệ thống được sử dụng bởi một nhóm lớn tế bào nhân thực là quy trình tín hiệu Notch. Quy trình này, đặc biệt là thụ thể Notch, cũng là quyết định cho sự tạo thành mạch chức năng trong khối u. Do đó, sự ức chế chức năng của thụ thể Notch, sự phong tỏa thụ thể Notch, và/hoặc sự ngăn chặn quy trình tín hiệu Notch là các chiến lược tiềm năng cho được phẩm và liệu pháp điều trị chống ung thư. Các chất ức chế thụ thể Notch phân tử nhỏ đã được chứng minh là độc bởi vì chúng kìm hãm biểu hiện của các thụ thể Notch trên mô (bình thường) kiểu nguyên thủy khắp cơ thể. Do đó, các yếu tố khác nhau của quy trình tín hiệu Notch nên được coi như các đích tiềm năng cho việc điều trị.

Phôi tử của thụ thể Notch trong hệ mạch là Delta 4 hoặc giống Delta 4 (DLL4). Được biểu hiện ở mức độ lớn trong hệ mạch, DLL4 là quan trọng cho sự phát triển mạch (Yan et al., Clin. Cancer Res., 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., Gens Dev., 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., Gens Dev., 14(11): 1343-1352 (2000)). Các dị hợp tử chuột cho DLL4 gây chết phôi thai do các thiếu sót lớn trong việc phát triển mạch (Gale et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte et al., Gens Dev., 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., Gens Dev., 18(20): 2469-2473 (2004)). Biểu hiện DLL4 có thể được tạo ra bằng VEGF (Liu et al., Mol. Cell Biol., 23(1): 14-25 (2003); Lobov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(9): 3219-3224 (2007)). Nói tóm lại, DLL4 có thể điều chỉnh âm tính tín hiệu VEGF, một phần thông qua việc kiểm chế VEGFR2 và tạo ra VEGFR1 (Harrington et al., Microvasc. Res., 75(2): 144-154 (2008);

Suchting et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(9): 3225-3230 (2007)). Sự phối hợp nhạy giữ DLL4 và VEGF là cần thiết cho sự tạo thành mạch chức năng.

Ngoài vai trò sinh lý của nó, DLL4 được điều chỉnh tăng trong các mạch máu trong khối u (Gale et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., Differentiation, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., Cancer Res., 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., Clin. Cancer Res., 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., Nature, 444(7122): 1032-1037 (2006)). Việc phong bế DLL4 ức chế hiệu quả sự tăng trưởng khối u ban đầu trong nhiều mô hình (Noguera-Troise et al., Nature, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., Nature, 444(7122): 1083-1087s (2006); Scehnet et al., Blood, 109(11): 4753-4760 (2007)). Sự ức chế DLL4 còn có hiệu quả kháng lại khối u mà kháng với liệu pháp kháng VEGF. Sự ức chế tổ hợp cả DLL4 và VEGF tạo ra hoạt tính kháng khối u được gia tăng. Bất ngờ là, không giống sự ức chế VEGF mà tạo ra sự tạo thành mạch khối u, sự phong bế DLL4 dẫn đến làm tăng mật độ mạch trong khối u trong đó có các mạch là bất thường, không thể hỗ trợ việc vận chuyển máu hiệu quả, và không phải là chức năng có ích. Do đó, DLL4 tạo ra đích tiềm năng cho việc điều trị ung thư.

Do đó, trong lĩnh vực này vẫn cần có nhu cầu về các chất có tác dụng điều trị có khả năng đi vào quy trình DLL4-Notch và do đó ức chế, hoặc thậm chí phòng ngừa, sự tạo thành mạch và sự tăng trưởng khối u.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 của người. Protein liên kết với DLL4 theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng chuột, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được làm cho có tính động vật linh trưởng, kháng thể trưởng thành ái lực, và các đoạn của nó mà có khả năng liên kết với DLL4 của người. Tốt hơn là, protein liên kết được mô tả theo sáng chế liên kết với DLL4 của người với ái lực cao. Tốt hơn nữa là, protein liên kết theo sáng chế có khả năng trung hòa DLL4 của người. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra và sử dụng protein liên kết với DLL4.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein liên kết có khả năng liên kết với DLL4 của người, trong đó protein liên kết chứa ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, SEQ ID

NO:159, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163, và SEQ ID NO:164.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein liên kết chứa vùng liên kết kháng nguyên trong đó protein liên kết có khả năng liên kết với DLL4 của người, trong đó vùng liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một hoặc nhiều hơn một (nghĩa là, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) CDR trong đó:

CDR-H1 được chọn từ nhóm bao gồm:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO:151), trong đó;

X_1 là N, H, hoặc Y;

X_2 là F;

X_3 là P;

X_4 là M;

X_5 là A hoặc S;

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:157 (CDR-H1 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:161 (CDR-H1 37D10);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:163 (CDR-H1 32C7);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:165 (CDR-H1 14G1);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:167 (CDR-H1 14A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:169 (CDR-H1 15D6);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:171 (CDR-H1 VH.1 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:172 (CDR-H1 VH.1a 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:173 (CDR-H1 VH.1b 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:174 (CDR-H1 VH.2a 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:179 (CDR-H1 VH.1 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:180 (CDR-H1 VH.1A 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:181 (CDR-H1 VH.1b 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:187 (CDR-H1 h1A11VH.1);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:188 (CDR-H1 h1A11.A6);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:189 (CDR-H1 h1A11.A8);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:190 (CDR-H1 h1A11.C6);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:191 (CDR-H1 h1A11.A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:192 (CDR-H1 h1A11.B5);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:193 (CDR-H1 h1A11.E12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:194 (CDR-H1 h1A11.G3);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:195 (CDR-H1 h1A11.F5); và
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:196 (CDR-H1 h1A11.H2);

CDR-H2 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇
 (SEQ ID NO:152), trong đó;

X₁ là T hoặc S;
 X₂ là I;
 X₃ là S;
 X₄ là S hoặc G;
 X₅ là S;
 X₆ là D;
 X₇ là G, A, D, S, hoặc E;
 X₈ là T hoặc W;
 X₉ là T, P, hoặc A;
 X₁₀ là Y, S, T, hoặc N;
 X₁₁ là Y hoặc I;
 X₁₂ là R hoặc G;
 X₁₃ là D;
 X₁₄ là S;
 X₁₅ là V;
 X₁₆ là K; và
 X₁₇ là G;

các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:157 (CDR-H2 38H12);
 các gốc từ 50-68 của SEQ ID NO:161 (CDR-H2 37D10);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:163 (CDR-H2 32C7);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:165 (CDR-H2 14G1);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:167 (CDR-H2 14A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:169 (CDR-H2 15D6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:171 (CDR-H2 VH.1 1A11);

các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:172 (CDR-H2 VH.1a 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:173 (CDR-H2 VH.1b 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:174 (CDR-H2 VH.2a 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:179 (CDR-H2 VH.1 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:180 (CDR-H2 VH.1A 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:181 (CDR-H2 VH.1b 38H12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:187 (CDR-H2 h1A11.VH.1);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:188 (CDR-H2 h1A11.A6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:189 (CDR-H2 h1A11.A8);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:190 (CDR-H2 h1A11.C6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:191 (CDR-H2 h1A11.A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:192 (CDR-H2 h1A11.B5);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:193 (CDR-H2 h1A11.E12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:194 (CDR-H2 h1A11.G3);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:195 (CDR-H2 h1A11.F5); và
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:196 (CDR-H2 h1A11.H2);

CDR-H3 được chọn từ nhóm bao gồm:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (SEQ ID NO:153), trong đó;

X_1 là G;

X_2 là Y;

X_3 là Y;

X_4 là N;

X_5 là S;

X_6 là P;

X_7 là F;

X_8 là A; và

X_9 là Y, F, hoặc S;

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:157 (CDR-H3 38H12);

các gốc từ 101-111 của SEQ ID NO:161 (CDR-H3 37D10);

các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:163 (CDR-H3 32C7);

các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:165 (CDR-H3 14G1);

các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:167 (CDR-H3 14A11);
 các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:169 (CDR-H3 15D6);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:171 (CDR-H3 VH.1 1A11);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:172 (CDR-H3 VH.1a 1A11);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:173 (CDR-H3 VH.1b 1A11);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:174 (CDR-H3 VH.2a 1A11);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:179 (CDR-H3 VH.1 38H12);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:180 (CDR-H3 VH.1A 38H12);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:181 (CDR-H2 VH.1b 38H12);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:187 (CDR-H3 h1A11VH.1);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:188 (CDR-H3 h1A11.A6);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:189 (CDR-H3 h1A11.A8);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:190 (CDR-H3 h1A11.C6);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:191 (CDR-H3 h1A11.A11);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:192 (CDR-H3 h1A11.B5);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:193 (CDR-H3 h1A11.E12);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:194 (CDR-H3 h1A11.G3);
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:195 (CDR-H3 h1A11.F5); và
 các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:196 (CDR-H3 h1A11.H2);

CDR-L1 được chọn từ nhóm bao gồm:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (SEQ ID NO:154), trong đó;

X_1 là R;

X_2 là A;

X_3 là S;

X_4 là E hoặc Q;

X_5 là D hoặc E;

X_6 là I;

X_7 là Y hoặc W;

X_8 là S, I, Y, N, hoặc R;

X_9 là N;

X_{10} là L; và

X₁₁ là A;

các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:158 (CDR-L1 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:162 (CDR-L1 37D10);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:164 (CDR-L1 32C7);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:166 (CDR-L1 14G1);
 các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:168 (CDR-L1 14A11);
 các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:170 (CDR-L1 15D6);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:175 (CDR-L1 VL.1 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:176 (CDR-L1 VL.1a 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:177 (CDR-L1 VL.1b 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:178 (CDR-L1 VL.2a 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:183 (CDR-L1 VL.1 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:184 (CDR-L1 VL.1a 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:185 (CDR-L1 VL.1b 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:186 (CDR-L1 VL.2a 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:197 (CDR-L1 h1A11VL.1);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:198 (CDR-L1 h1A11.A2);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:199 (CDR-L1 h1A11.A12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:200 (CDR-L1 h1A11.A7);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:201 (CDR-L1 h1A11.B4);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:202 (CDR-L1 h1A11.B5); và
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:203 (CDR-L1 h1A11.E12);

CDR-L2 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO:155), trong đó;

X₁ là D;

X₂ là T;

X₃ là N hoặc S;

X₄ là N, D, S, I, Y, hoặc V;

X₅ là L;

X₆ là A; và

X₇ là D;

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:158 (CDR-L2 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:162 (CDR-L2 37D10);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:164 (CDR-L2 32C7);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:166 (CDR-L2 14G1);
 các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:168 (CDR-L2 14A11);
 các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:170 (CDR-L2 15D6);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:175 (CDR-L2 VL.1 1A11);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:176 (CDR-L2 VL.1a 1A11);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:177 (CDR-L2 VL.1b 1A11);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:178 (CDR-L2 VL.2a 1A11);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:183 (CDR-L2 VL.1 38H12);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:184 (CDR-L2 VL.1a 38H12);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:185 (CDR-L2 VL.1b 38H12);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:186 (CDR-L2 VL.2a 38H12);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:197 (CDR-L2 h1A11VL.1);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:198 (CDR-L2 h1A11.A2);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:199 (CDR-L2 h1A11.A12);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:200 (CDR-L2 h1A11.A7);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:201 (CDR-L2 h1A11.B4);
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:202 (CDR-L2 h1A11.B5); và
 các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:203 (CDR-L2 h1A11.E12);

và

CDR-L3 được chọn từ nhóm bao gồm:

X_1 – X_2 – X_3 – X_4 – X_5 – X_6 – X_7 – X_8 – X_9 (SEQ ID NO:156), trong đó;

X_1 là Q;

X_2 là Q;

X_3 là Y;

X_4 là N, D, hoặc T;

X_5 là N, Y, hoặc W;

X_6 là Y hoặc V;

X_7 là P;

X_8 là P; và

X_9 là T.

các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:158 (CDR-L3 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:162 (CDR-L3 37D10);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:164 (CDR-L3 32C7);
 các gốc từ 89-98 của SEQ ID NO:166 (CDR-L3 14G1);
 các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:168 (CDR-L3 14A11);
 các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:170 (CDR-L3 15D6);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:175 (CDR-L3 VL.1 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:176 (CDR-L3 VL.1a 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:177 (CDR-L3 VL.1b 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:178 (CDR-L3 VL.2a 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:183 (CDR-L3 VL.1 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:184 (CDR-L3 VL.1a 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:185 (CDR-L3 VL.1b 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:186 (CDR-L3 VL.2a 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:197 (CDR-L3 h1A11VL.1);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:198 (CDR-L3 h1A11.A2);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:199 (CDR-L3 h1A11.A12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:200 (CDR-L3 h1A11.A7);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:201 (CDR-L3 h1A11.B4);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:202 (CDR-L3 h1A11.B5);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:203 (CDR-L3 h1A11.E12).

Tốt hơn là, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ít nhất một CDR chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:157 (CDR-H1 38H12); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:157 (CDR-H2 38H12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:157 (CDR-H3 38H12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:158 (CDR-L1 38H12); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:158 (CDR-L2 38H12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:158 (CDR-L3 38H12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:159 (CDR-H1 1A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:159 (CDR-H2 1A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:159 (CDR-H3 1A11); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:160 (CDR-L1 1A11); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:160 (CDR-L2 1A11); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:160 (CDR-L3 1A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:161 (CDR-H1 37D10); các gốc từ 50-68 của SEQ ID NO:161 (CDR-H2 37D10); các gốc từ

101-111 của SEQ ID NO:161 (CDR-H3 37D10); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:162 (CDR-L1 37D10); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:162 (CDR-L2 37D10); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:162 (CDR-L3 37D10); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:163 (CDR-H1 32C7); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:163 (CDR-H2 32C7); các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:163 (CDR-H3 32C7); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:164 (CDR-L1 32C7); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:164 (CDR-L2 32C7); các gốc từ 89-98 của SEQ ID NO:164 (CDR-L3 32C7); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:165 (CDR-H1 14G1); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:165 (CDR-H2 14G1); các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:165 (CDR-H3 14G1); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:166 (CDR-L1 14G1); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:166 (CDR-L2 14G1); các gốc từ 89-98 của SEQ ID NO:166 (CDR-L3 14G1); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:167 (CDR-H1 14A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:167 (CDR-H2 14A11); các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:167 (CDR-H3 14A11); các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:168 (CDR-L1 14A11); các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:168 (CDR-L2 14A11); các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:168 (CDR-L3 14A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:169 (CDR-H1 15D6); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:169 (CDR-H2 15D6); các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:169 (CDR-H3 15D6); các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:170 (CDR-L1 15D6); các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:170 (CDR-L2 15D6); các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:170 (CDR-L3 15D6); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:171 (CDR-H1 VH.1 1A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:171 (CDR-H2 VH.1 1A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:171 (CDR-H3 VH.1 1A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:172 (CDR-H1 VH.1a 1A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:172 (CDR-H2 VH.1a 1A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:172 (CDR-H3 VH.1a 1A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:173 (CDR-H1 VH.1b 1A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:173 (CDR-H2 VH.1b 1A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:173 (CDR-H3 VH.1b 1A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:174 (CDR-H1 VH.2a 1A11); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:174 (CDR-H2 VH.2a 1A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:174 (CDR-H3 VH.2a 1A11); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:175 (CDR-L1 VL.1 1A11); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:175 (CDR-L2 VL.1 1A11); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:175 (CDR-L3 VL.1 1A11); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:176 (CDR-L1 VL.1a 1A11); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:176 (CDR-L2 VL.1a 1A11); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:176 (CDR-L3 VL.1a 1A11); các gốc từ 24-34 của

SEQ ID NO:177 (CDR-L1 VL.1b 1A11); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:177 (CDR-L2 VL.1b 1A11); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:177 (CDR-L3 VL.1b 1A11); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:178 (CDR-L1 VL.2a 1A11); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:178 (CDR-L2 VL.2a 1A11); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:178 (CDR-L3 VL.2a 1A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:179 (CDR-H1 VH.1 38H12); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:179 (CDR-H2 VH.1 38H12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:179 (CDR-H3 VH.1 38H12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:180 (CDR-H1 VH.1A 38H12); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:180 (CDR-H2 VH.1A 38H12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:180 (CDR-H3 VH.1A 38H12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:181 (CDR-H1 VH.1b 38H12); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:181 (CDR-H2 VH.1b 38H12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:181 (CDR-H3 VH.1b 38H12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12); các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:182 (CDR-H2 VH.2a 38H12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:182 (CDR-H3 VH.2a 38H12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:183 (CDR-L1 VL.1 38H12); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:183 (CDR-L2 VL.1 38H12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:183 (CDR-L3 VL.1 38H12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:184 (CDR-L1 VL.1a 38H12); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:184 (CDR-L2 VL.1a 38H12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:184 (CDR-L3 VL.1a 38H12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:185 (CDR-L1 VL.1b 38H12); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:185 (CDR-L2 VL.1b 38H12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:185 (CDR-L3 VL.1b 38H12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:186 (CDR-L1 VL.2a 38H12); các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:186 (CDR-L2 VL.2a 38H12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:186 (CDR-L3 VL.2a 38H12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:187 (CDR-H1 h1A11VH.1), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:187 (CDR-H2 h1A11VH.1); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:187 (CDR-H3 h1A11VH.1); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:188 (CDR-H1 h1A11.A6), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:188 (CDR-H2 h1A11.A6); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:188 (CDR-H3 h1A11.A6); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:189 (CDR-H1 h1A11.A8), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:189 (CDR-H2 h1A11.A8); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:189 (CDR-H3 h1A11.A8); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:190 (CDR-H1 h1A11.C6), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:190 (CDR-H2 h1A11.C6); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:190 (CDR-H3 h1A11.C6); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:191 (CDR-H1 h1A11.A11), các gốc từ

50-66 của SEQ ID NO:191 (CDR-H2 h1A11.A11); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:191 (CDR-H3 h1A11.A11); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:192 (CDR-H1 h1A11.B5), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:192 (CDR-H2 h1A11.B5); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:192 (CDR-H3 h1A11.B5); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:193 (CDR-H1 h1A11.E12), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:193 (CDR-H2 h1A11.E12); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:193 (CDR-H3 h1A11.E12); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:194 (CDR-H1 h1A11.G3), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:194 (CDR-H2 h1A11.G3); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:194 (CDR-H3 h1A11.G3); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:195 (CDR-H1 h1A11.F5), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:195 (CDR-H2 h1A11.F5); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:195 (CDR-H3 h1A11.F5); các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:196 (CDR-H1 h1A11.H2), các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:196 (CDR-H2 h1A11.H2); các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:196 (CDR-H3 h1A11.H2); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:197 (CDR-L1 h1A11.VL.1), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:197 (CDR-L2 h1A11.VL.1); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:197 (CDR-L3 h1A11.VL.1); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:198 (CDR-L1 h1A11.A2), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:198 (CDR-L2 h1A11.A2); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:198 (CDR-L3 h1A11.A2); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:199 (CDR-L1 h1A11.A12), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:199 (CDR-L2 h1A11.A12); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:199 (CDR-L3 h1A11.A12); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:200 (CDR-L1 h1A11.A7), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:200 (CDR-L2 h1A11.A7); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:200 (CDR-L3 h1A11.A7); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:201 (CDR-L1 h1A11.B4), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:201 (CDR-L2 h1A11.B4); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:201 (CDR-L3 h1A11.B4); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:202 (CDR-L1 h1A11.B5), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:202 (CDR-L2 h1A11.B5); các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:202 (CDR-L3 h1A11.B5); các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:203 (CDR-L1 h1A11.E12), các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:203 (CDR-L2 h1A11.E12); và các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:203 (CDR-L3 h1A11.E12).

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ít nhất ba CDR được mô tả theo sáng chế (bên trên hoặc bên dưới). Theo ví dụ không bị giới hạn, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ba CDR được mô tả theo sáng chế, trong đó ba CDR là CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 như được mô tả theo sáng chế. Theo một ví dụ

không bị giới hạn khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ba CDR được mô tả theo sáng chế, trong đó ba CDR là CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 như được mô tả theo sáng chế.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả theo sáng chế (ở trên hoặc bên dưới), như là một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu CDR được mô tả theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa sáu CDR được mô tả theo sáng chế, ví dụ, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 như được mô tả theo sáng chế.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ba CDR được chọn từ tập hợp của các CDR vùng biến đổi, trong đó tập hợp của các vùng biến đổi CDR được chọn từ CDR của các tập hợp vùng biến đổi CDR bao gồm:

Tập hợp CDR VH 38H12

- CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:157;
- CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:157;
- CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:157;

Tập hợp CDR VL 38H12

- CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:158;
- CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:158;
- CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:158;

Tập hợp CDR VH 1A11

- CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:159;
- CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:159;
- CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:159;

Tập hợp CDR VL 1A11

- CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:160;
- CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:160;
- CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:160;

Tập hợp CDR VH 37D10

- CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:161;
- CDR-H2: các gốc từ 50 đến 68 của SEQ ID NO:161;
- CDR-H3: các gốc từ 101 đến 111 của SEQ ID NO:161;

Tập hợp CDR VL 37D10

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:162;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:162;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:162;

Tập hợp CDR VH 32C7

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:163;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:163;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 105 của SEQ ID NO:163;

Tập hợp CDR VL 32C7

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:164;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:164;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 98 của SEQ ID NO:164;

Tập hợp CDR VH 14G1

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:165;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:165;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 105 của SEQ ID NO:165;

Tập hợp CDR VL 14G1

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:166;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:166;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:166;

Tập hợp CDR VH 14A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:167;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:167;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 110 của SEQ ID NO:167;

Tập hợp CDR VL 14A11

CDR-L1: các gốc từ 23 đến 37 của SEQ ID NO:168;

CDR-L2: các gốc từ 53 đến 59 của SEQ ID NO:168;

CDR-L3: các gốc từ 92 đến 100 của SEQ ID NO:168;

Tập hợp CDR VH 15D6

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:169;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:169;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 110 của SEQ ID NO:169;

Tập hợp CDR VL 15D6

CDR-L1: các gốc từ 23 đến 37 của SEQ ID NO:170;
 CDR-L2: các gốc từ 53 đến 59 của SEQ ID NO:170;
 CDR-L3: các gốc từ 92 đến 100 của SEQ ID NO:170;

Tập hợp CDR VH VH.1 1A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:171;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:171;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:171;

Tập hợp CDR VH VH.1a 1A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:172;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:172;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:172;

Tập hợp CDR VH VH.1b 1A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:173;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:173;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:173;

Tập hợp CDR VH VH.2a 1A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:174;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:174;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:174;

Tập hợp CDR VL VL.1 1A11

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:175;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:175;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:175;

Tập hợp CDR VL VL.1a 1A11

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:176;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:176;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:176;

Tập hợp CDR VL VL.1b 1A11

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:177;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:177;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:177;

Tập hợp CDR VL VL.2a 1A11

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:178;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:178;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:178;

Tập hợp CDR VH VH.1 38H12

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:179;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:179;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:179;

Tập hợp CDR VH VH.1a 38H12

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:180;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:180;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:180;

Tập hợp CDR VH VH.1b 38H12

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:181;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:181;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:181;

Tập hợp CDR VH VH.2a 38H12

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:182;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:182;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:182;

Tập hợp CDR VL VL.1 38H12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:183;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:183;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:183;

Tập hợp CDR VL VL.1a 38H12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:184;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:184;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:184;

Tập hợp CDR VL VL.1b 38H12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:185;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:185;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:185;

Tập hợp CDR VL VL.2a 38H12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:186;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:186;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:186;

Tập hợp CDR VH hA11.VH.1

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:187;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:187;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:187;

Tập hợp CDR VH hA11.A6

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:188;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:188;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:188;

Tập hợp CDR VH hA11.A8

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:189;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:189;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:189;

Tập hợp CDR VH hA11.C6

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:190;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:190;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:190;

Tập hợp CDR VH hA11.A11

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:191;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:191;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:191;

Tập hợp CDR VH hA11.B5

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:192;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:192;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:192;

Tập hợp CDR VH hA11.E12

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:193;

CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:193;

CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:193;

Tập hợp CDR VH hA11.G3

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:194;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:194;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:194;

Tập hợp CDR VH hA11.F5

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:195;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:195;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:195;

Tập hợp CDR VH hA11.H2

CDR-H1: các gốc từ 31 đến 35 của SEQ ID NO:196;
 CDR-H2: các gốc từ 50 đến 66 của SEQ ID NO:196;
 CDR-H3: các gốc từ 99 đến 107 của SEQ ID NO:196;

Tập hợp CDR VL h1A11VL.1

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:197;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:197;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:197;

Tập hợp CDR VL h1A11.A2

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:198;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:198;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:198;

Tập hợp CDR VL h1A11.A12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:199;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:199;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:199;

Tập hợp CDR VL h1A11.A7

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:200;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:200;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:200;

Tập hợp CDR VL h1A11.B4

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:201;
 CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:201;
 CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:201;

Tập hợp CDR VL h1A11.B5

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:202;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:202;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:202;

và

Tập hợp CDR VL h1A11.E12

CDR-L1: các gốc từ 24 đến 34 của SEQ ID NO:203;

CDR-L2: các gốc từ 50 đến 56 của SEQ ID NO:203;

CDR-L3: các gốc từ 89 đến 97 của SEQ ID NO:203.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 chứa các CDR ít nhất hai tập hợp của các CDR vùng biến đổi trong nhóm ở trên.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ba CDR được chọn từ tập hợp VH bất kỳ của ba CDR trong nhóm ở trên và ba CDR được chọn từ tập hợp VL bất kỳ của ba CDR trong nhóm ở trên.

Vẫn theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa tập hợp VH của ba CDR như được mô tả ở trên và tập hợp VL của ba CDR như được mô tả ở trên từ một cặp tập hợp VH và VL của các CDR được chọn từ nhóm bao gồm:

tập hợp CDR VH 38H12 và tập hợp CDR VL 38H12;

tập hợp CDR VH 1A11 và tập hợp CDR VL 1A11;

tập hợp CDR VH 37D10 và tập hợp CDR VL 37D10;

tập hợp CDR VH 32C7 và tập hợp CDR VL 32C7;

tập hợp VH 14G1 và tập hợp CDR VL 14G1;

tập hợp CDR VH 14A11 và tập hợp CDR VL 14A11;

tập hợp CDR VH 15D6 và tập hợp CDR VL 15D6;

tập hợp CDR VH VH.1 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1a 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1b 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1 1A11 và tập hợp CDR VL VL.2a 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1a 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1b 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.2a 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1b 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1 1A11;

tập hợp CDR VH VH.1b 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1a 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.1b 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1b 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.1b 1A11 và tập hợp CDR VL VL.2a 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.2a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.2a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1a 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.2a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.1b 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.2a 1A11 và tập hợp CDR VL VL.2a 1A11;
 tập hợp CDR VH VH.1 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1b 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1 38H12 và tập hợp CDR VL VL.2a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1b 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.2a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1b 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1b 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1b 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1b 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.1b 38H12 và tập hợp CDR VL VL.2a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.2a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.2a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1a 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.2a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.1b 38H12;
 tập hợp CDR VH VH.2a 38H12 và tập hợp CDR VL VL.2a 38H12;
 tập hợp CDR VH h1A11.A6 và tập hợp CDR VL h1A11VL.1;
 tập hợp CDR VH h1A11.C6 và tập hợp CDR VL h1A11VL.1;
 tập hợp CDR VH h1A11.A11 và tập hợp CDR VL h1A11VL.1;
 tập hợp CDR VH h1A11.A8 và tập hợp CDR VL h1A11VL.1;
 tập hợp CDR VH h1A11VH.1 và tập hợp CDR VL h1A11.B4;
 tập hợp CDR VH h1A11VH.1 và tập hợp CDR VL h1A11.A7;
 tập hợp CDR VH h1A11VH.1 và tập hợp CDR VL h1A11.A12;
 tập hợp CDR VH h1A11VH.1 và tập hợp CDR VL h1A11.A2;
 tập hợp CDR VH h1A11.B5 và tập hợp CDR VL h1A11.B5;

tập hợp CDR VH h1A11.E12 và tập hợp CDR VL h1A11.E12;
 tập hợp CDR VH h1A11.G3 và tập hợp CDR VL h1A11.E12;
 tập hợp CDR VH h1A11.F5 và tập hợp CDR VL h1A11.E12; và
 tập hợp CDR VH h1A11.H2 và tập hợp CDR VL h1A11.E12.

Theo phương án ưu tiên, protein liên kết với DLL4 có vùng liên kết kháng nguyên DLL4 (hoặc vị trí liên kết) chứa sáu CDR, trong đó CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 có vị trí trong vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 có vị trí trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), và trong đó liên kết của các vùng VH và VL tạo thành vùng liên kết kháng nguyên DLL4 chức năng của protein liên kết với DLL4. Theo ví dụ không bị giới hạn khác của phương án này, protein liên kết với DLL4 mà có hai vùng liên kết kháng nguyên DLL4 chứa hai tập hợp của vùng VH và VL và do đó chứa mười hai CDR.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 có vùng liên kết kháng nguyên DLL4 chứa sáu CDR, trong đó CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 có vị trí trong vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 có vị trí trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và trong đó các trình tự còn lại trong mỗi vùng biến đổi tạo thành vùng khung (vùng khung - FR) sao cho mỗi CDR được định vị giữa hai trình tự vùng FR cho tổng số bốn trình tự FR, nghĩa là, FR1, FR2, FR3, và FR4. Theo phương án này, sự sắp xếp của các trình tự FR và CDR trong vùng biến đổi là FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Theo phương án này, vùng liên kết được tạo ra bằng liên kết của vùng VH và vùng VL chứa tám trình tự FR và sáu CDR.

Protein liên kết với DLL4 của sáng chế chứa kháng thể ghép CDR, trong đó một hoặc nhiều CDR của vùng VH và/hoặc VL của kháng thể của một loài (loài cho) được ghép vào và thay thế các CDR tương ứng của VH và/hoặc VL của kháng thể của một loài khác (loài nhận) sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp có sẵn trong lĩnh vực. Ví dụ của loài cho là kháng thể đơn dòng DLL4 kháng người trên chuột được mô tả theo sáng chế và ví dụ của loài nhận là phân tử gamma globulin miễn dịch người (globulin miễn dịch gamma - IgG), trong đó trình tự FR người của vùng VH và VL của phân tử IgG người là trình tự khung nhận của người mà nhận các trình tự được ghép trong các CDR từ kháng thể đơn dòng chuột cho. Trình tự khung nhận của người của kháng thể ghép CDR thu được có thể được đột biến nữa để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính của kháng thể ghép CDR. Bằng các ví dụ không bị giới hạn, một hoặc nhiều gốc từ trình tự của một hoặc

nhiều trình tự FR của kháng thể ghép CDR có thể được đột biến để tăng cường ái lực liên kết DLL4 hoặc làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể ghép CDR trên đối tượng là người.

Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên còn chứa trình tự khung nhận của người. Tốt hơn là, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tám) trình tự khung nhận của người.

Trình tự khung nhận của người có trong protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều gốc axit amin từ đó được đột biến ngược lại thành một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng có trong kháng thể đơn dòng chuột mà liên kết với DLL4 và/hoặc từ đó được đột biến thành một hoặc nhiều gốc axit amin mà làm giảm hoặc loại bỏ (các) vị trí cho phản ứng không mong muốn, ví dụ, để làm giảm hoặc loại bỏ vị trí cho sự glycoxyl hóa không mong muốn và/hoặc vị trí cho sự hình thành pyroglutamat ở đầu N không mong muốn và/hoặc vị trí tiềm năng cho nguy cơ sinh miễn giảm dịch.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên còn chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tám bất kỳ) cù trình tự khung nhận của người được chọn từ nhóm bao gồm trình tự khung nhận của người được trình bày trong các bảng 3 và 4, bên dưới. Một hoặc nhiều trình tự khung nhận của người từ các bảng 3 và 4 có trong protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều gốc axit amin mà được đột biến ngược thành một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng có trong kháng thể đơn dòng chuột mà liên kết với DLL4 và/hoặc từ đó được đột biến thành một hoặc nhiều axit amin mà làm giảm hoặc loại bỏ (các) vị trí cho phản ứng không mong muốn, ví dụ, để làm giảm hoặc loại bỏ vị trí cho sự glycoxyl hóa không mong muốn và/hoặc vị trí cho sự hình thành pyroglutamat ở đầu tận cùng N không mong muốn và/hoặc vị trí tiềm năng cho nguy cơ sinh miễn giảm dịch.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên, trong đó protein liên kết cũng chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tám bất kỳ trên một vùng liên kết) cù trình tự khung nhận của người được chọn từ trình tự khung bất kỳ có trong trình tự vùng biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:171 VH.1 1A11	SEQ ID NO:180 VH.1a 38H12	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:172 VH.1a 1A11	SEQ ID NO:181 VH.1b 38H12	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8	SEQ ID NO:197 VL h1A11.VL.1
SEQ ID NO:173 VH.1b 1A11	SEQ ID NO:182 VH.2a 38H12	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:174 VH.2a 1A11	SEQ ID NO:183 VL.1 38H12	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:175 VL.1 1A11	SEQ ID NO:184 VL.1a	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:176 VL.1a 1A11	SEQ ID NO:185 VL.1b	SEQ ID NO:193 VH h1A11.E12	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:177 VL.1b 1A11	SEQ ID NO:186 VL.2a	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:178 VL.2a 1A11	SEQ ID NO:187 VH h1A11.VH.1	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:179 VH.1 38H12			

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 còn chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tám bất kỳ) trình tự khung nhận được chọn từ nhóm bao gồm:

khung chuỗi nặng-1 (H-FR1): E-V-Q-L-V-E-S-G-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-X₃₀ (SEQ ID NO:143), trong đó X₃₀ là S, R, hoặc G;

khung chuỗi nặng-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (SEQ ID NO:144);

khung chuỗi nặng-3 (H-FR3): R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R (SEQ ID NO:145), trong đó:

X₁₁ là N hoặc S; và

X₃₁ là A hoặc S;

khung chuỗi nặng-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (SEQ ID NO:146);

khung chuỗi nhẹ-1 (L-FR1): D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (SEQ ID NO:147);

khung chuỗi nhẹ-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-X₁₅ (SEQ ID NO:148), trong đó:

X₉ là A hoặc S; và

X₁₅ là F hoặc Y;

khung chuỗi nhẹ-3 (L-FR3): G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (SEQ ID NO:149), trong đó:

X₁₅ là F hoặc S; và

khung chuỗi nhẹ-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (SEQ ID NO:150).

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên cũng chứa trình tự khung nhận của người được mô tả ở trên trong đó trình tự khung nhận của người chứa ít nhất một sự thay thế axit amin vùng khung ở gốc chính, trong đó gốc chính được chọn từ nhóm bao gồm gốc liền kề CDR, gốc vị trí glycosyl hóa, gốc hiếm, gốc có khả năng tương tác với DLL4 của người, gốc có khả năng tương tác với CDR, gốc chuẩn, gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, gốc trong vùng Vernier, và gốc trong vùng chồng lấn giữa CDR1 chuỗi nặng biến đổi theo định nghĩa Chothia và khung chuỗi nặng đầu tiên theo định nghĩa Kabat.

Theo một phương án khác, trình tự khung nhận của người của protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế chứa ít nhất một sự thay thế axit amin vùng khung, trong đó trình tự axit amin của khung tương đồng ít nhất 65% với trình tự của khung nhận dòng mầm của người và chứa ít nhất 70 gốc axit amin giống với khung nhận dòng mầm người. Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa trình tự a vùng biến đổi người liên ứng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 chứa trình tự khung nhận của người, trong đó protein liên kết chứa ít nhất một vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:171 VH VH.1 1A11	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6
SEQ ID NO:172 VH VH.1a 1A11	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8
SEQ ID NO:173 VH VH.1b 1A11	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6
SEQ ID NO:174 VH VH.2a 1A11	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11
SEQ ID NO:175 VL VL.1 1A11	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5
SEQ ID NO:176	SEQ ID NO:193

VL VL.1a 1A11	VH h1A11.E12
SEQ ID NO:177 VL VL.1b	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3
SEQ ID NO:178 VL VL.2a 1A11	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5
SEQ ID NO:179 VH VH.1 38H12	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:180 VH VH.1a 38H12	SEQ ID NO:197 VL h1A11.VL.1
SEQ ID NO:181 VH VH.1b 38H12	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:182 VH VH.2a 38H12	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:183 VL VL.1 38H12	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:184 VL VL.1a 38H12	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:185 VL VL.1b 38H12	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:186 VL VL.2a 38H12	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:187 VH h1A11.VH.1	

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa hai hoặc nhiều vùng biến đổi được mô tả ở trên. Theo phương án ưu tiên, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa hai vùng biến đổi, trong đó hai vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:175 VH.1 và VL.1 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:186 VH.1a và VL.2a (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:176 VH.1 và VL.1a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:183 VH.1b và VL.1 (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:177 VH.1 và VL.1b 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:184 VH.1b và VL.1a (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:178 VH.1 và VL.2a 1A11(Bảng 12)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:185 VH.1b và VL.1b (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:175 VH.1a và VL.1 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:186 VH.1b và VL.2a (Bảng 16)

SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:176 VH.1a và VL.1a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:183 VH.2a và VL.1 (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:177 VH.1a và VL.1b 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:184 VH.2a và VL.1a (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:178 VH.1a và VL.2a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:185 VH.2a và VL.1b (Bảng 16)
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:175 VH.1b và VL.1 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:186 VH.2a và VL.2a (Bảng 16)
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:176 VH.1b và VL.1a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:188 và SEQ ID NO:197 h1A11.A6 VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:177 VH.1b và VL.1b 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:190 và SEQ ID NO:197 h1A11.C6 VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:178 VH.1b và VL.2a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:191 và SEQ ID NO:197 h1A11.All VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:175 VH.2a và VL.1 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:189 và SEQ ID NO:197 h1A11.A8 VH và h1A11 VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:176 VH.2a và VL.1a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:1878 và SEQ ID NO:201 h1A11VH.1 và h1A11.B4 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:177 VH.2a và VL.1b 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:200 h1A11VH.1 và h1All.A7 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:178 VH.2a và VL.2a 1A11 (Bảng 12)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:199 h1A11VH.1 và h1All.A12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:183 VH.1 và VL.1 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:198 h1A11VH.1 VH và h1All.A2 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:184 VH.1 và VL.1a 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:192 và SEQ ID NO:202 h1A11.B5 VH và h1All.B5 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:185 VH.1 và VL.1b 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:193 và SEQ ID NO:203 h1A11.E12 VH và h1All.E12 VL

	Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:186 VH.1 và VL.2a 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:194 và SEQ ID NO:203 h1A11.G3 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:183 VH.1a và VL.1 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:195 và SEQ ID NO:203 h1A11.F5 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:184 VH.1a và VL.1a 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:196 và SEQ ID NO:203 h1A11.H2 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:185 VH.1a và VL.1b 38H12 (Bảng 16)	

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa ít nhất một vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:157 VH 38H12	SEQ ID NO:181 VH VH.1b 38H12
SEQ ID NO:158 VL 38H12	SEQ ID NO:182 VH VH.2a 38H12
SEQ ID NO:159 VH 1A11	SEQ ID NO:182 VL VL.1 38H12
SEQ ID NO:160 VL 1A11	SEQ ID NO:184 VL VL.1a 38H12
SEQ ID NO:161 VH 37D10	SEQ ID NO:185 VL VL.1b 38H12
SEQ ID NO:162 VL 37D10	SEQ ID NO:186 VL VL.2a 38H12
SEQ ID NO:163 VH 32C7	SEQ ID NO:187 VH h1A11.VH.1
SEQ ID NO:164 VL 32C7	SEQ ID NO:188 VH h1A11.A6
SEQ ID NO:165 VH 14G1	SEQ ID NO:189 VH h1A11.A8
SEQ ID NO:166 VL 14G1	SEQ ID NO:190 VH h1A11.C6
SEQ ID NO:167 VH 14A11	SEQ ID NO:191 VH h1A11.A11

SEQ ID NO:168 VL 14A11	SEQ ID NO:192 VH h1A11.B5
SEQ ID NO:169 VH 15D6	SEQ ID NO:193 VH h1A11.E12
SEQ ID NO:170 VL 15D6	SEQ ID NO:194 VH h1A11.G3
SEQ ID NO:171 VH VH.1 1A11	SEQ ID NO:195 VH h1A11.F5
SEQ ID NO:172 VH VH.1a 1A11	SEQ ID NO:196 VH h1A11.H2
SEQ ID NO:173 VH VH.1b 1A11	SEQ ID NO:197 VL h1A11.VL.1
SEQ ID NO:174 VH VH.2a 1A11	SEQ ID NO:198 VL h1A11.A2
SEQ ID NO:175 VL VL.1 1A11	SEQ ID NO:199 VL h1A11.A12
SEQ ID NO:176 VL VL.1a 1A11	SEQ ID NO:200 VL h1A11.A7
SEQ ID NO:177 VL VL.1b	SEQ ID NO:201 VL h1A11.B4
SEQ ID NO:178 VL VL.2a 1A11	SEQ ID NO:202 VL h1A11.B5
SEQ ID NO:179 VH VH.1 38H12	SEQ ID NO:203 VL h1A11.E12
SEQ ID NO:180 VH VH.1a 38H12	

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa hai vùng biến đổi, trong đó hai vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:157 và SEQ ID NO:158 38H12	SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:186 VH.1 và VL.2a 38H12 (Bảng 16)
SEQ ID NO:159 và SEQ ID NO:160 1A11	SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:183 VH.1a và VL.1 38H12 (Bảng 16)
SEQ ID NO:161 và SEQ ID NO:162 37D10	SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:184 VH.1a và VL.1a 38H12 (Bảng 16)
SEQ ID NO:163 và SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:185

32C7	VH.1a và VL.1b 38H12 (Bảng 16)
SEQ ID NO:165 và SEQ ID NO:166 14G1	SEQ ID NO:180 và SEQ ID NO:186 VH.1a và VL.2a (Bảng 16)
SEQ ID NO:167 và SEQ ID NO:168 14A11	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:183 VH.1b và VL.1 (Bảng 16)
SEQ ID NO:169 và SEQ ID NO:170 15D6	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:184 VH.1b và VL.1a (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:175 VH.1 và VL.1 1A11 (Bảng 11)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:185 VH.1b và VL.1b (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:176 VH.1 và VL.1a 1A11 (Bảng 11)	SEQ ID NO:181 và SEQ ID NO:186 VH.1b và VL.2a (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:177 VH.1 và VL.1b 1A11 (Bảng 11)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:183 VH.2a và VL.1 (Bảng 16)
SEQ ID NO:171 và SEQ ID NO:178 VH.1 và VL.2a (Bảng 11)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:184 VH.2a và VL.1a (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:175 VH.1a và VL.1 (Bảng 11)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:185 VH.2a và VL.1b (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:176 VH.1a và VL.1a (Bảng 11)	SEQ ID NO:182 và SEQ ID NO:186 VH.2a và VL.2a (Bảng 16)
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:177 VH.1a và VL.1b (Bảng 11)	SEQ ID NO:188 và SEQ ID NO:197 h1A11.A6 VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:178 VH.1a và VL.2a (Bảng 11)	SEQ ID NO:190 và SEQ ID NO:197 h1A11.C6 VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:175 VH.1b và VL.1 (Bảng 11)	SEQ ID NO:191 và SEQ ID NO:197 h1A11.All VH và h1A11VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:176 VH.1b và VL.1a (Bảng 11)	SEQ ID NO:189 và SEQ ID NO:197 h1A11.A8 VH và h1A11 VL.1 Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:177 VH.1b và VL.1b (Bảng 11)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:201 h1A11VH.1 và h1A11.B4 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:173 và SEQ ID NO:178 VH.1b và VL.2a (Bảng 11)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:200 h1A11VH.1 và h1All.A7 VL Các bảng 20/21

SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:175 VH.2a và VL.1 (Bảng 11)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:199 h1A11VH.1 và h1A11.A12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:176 VH.2a và VL.1a (Bảng 11)	SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:198 h1A11VH.1 VH và h1A11.A2 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:177 VH.2a và VL.1b (Bảng 11)	SEQ ID NO:192 và SEQ ID NO:202 h1A11.B5 VH và h1A11.B5 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:174 và SEQ ID NO:178 VH.2a và VL.2a (Bảng 11)	SEQ ID NO:193 và SEQ ID NO:203 h1A11.E12 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:183 VH.1 và VL.1 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:194 và SEQ ID NO:203 h1A11.G3 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:184 VH.1 và VL.1a 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:195 và SEQ ID NO:203 h1A11.F5 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21
SEQ ID NO:179 và SEQ ID NO:185 VH.1 và VL.1b 38H12 (Bảng 16)	SEQ ID NO:196 và SEQ ID NO:203 h1A11.H2 VH và h1A11.E12 VL Các bảng 20/21

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa hai vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:188 (h1A11.A6 VH) và SEQ ID NO:197 (h1A11.VL.1),
SEQ ID NO:190 (h1A11.C6 VH) và SEQ ID NO:197 (h1A11.VL.1), và
SEQ ID NO:191 (h1A11.A11 VH) và SEQ ID NO:197 (h1A11.VL.1).

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế chứa hai vùng biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO:181 (VH.1b 38H12) và SEQ ID NO:185 (VL.1b 38H12).

Theo sáng chế, các vùng biến đổi của chuỗi nặng (variable heavy - VH) và các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (variable light - VL) của bất kỳ protein nào của các protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có thể cũng bị dịch chuyển sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp có sẵn trong lĩnh vực để tạo ra và lựa chọn cho protein liên kết với DLL4 khác mà chứa nhiều sự kết hợp của các vùng VH và VL được mô tả theo sáng chế.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế liên kết với DLL4 của người (hu DLL4) và ít nhất một loài khác của DLL4. Tốt hơn nữa là, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế liên kết với DLL4 của người và DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm DLL4 khỉ cynomolgus (cynomolgus DLL4, cyno DLL4), DLL4 chuột nhắt (mu DLL4), DLL4 chuột và các hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có khả năng ngăn cản tương tác DLL4 với protein Notch. Tốt hơn là, protein Notch được chọn từ nhóm bao gồm Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4 và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có khả năng điều hòa, ức chế hoặc trung hòa một hoặc nhiều chức năng sinh học của DLL4 của người. Tốt hơn nữa là, protein liên kết với DLL4 của sáng chế có khả năng điều hòa, ức chế, hoặc trung hòa hoạt tính của DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm DLL4 của người, DLL4 khỉ cynomolgus, DLL4 khỉ, DLL4 chuột và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có khả năng ức chế hoạt tính VEGFR2, hoạt tính VEGFR1, hoặc cả hoạt tính VEGFR2 và VEGFR1.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có khả năng ức chế sự tạo thành mạch bình thường.

Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có hằng số tốc độ kết hợp (K_{on}) với DLL4 ít nhất là khoảng $10^2 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^3 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^4 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^5 M^{-1}s^{-1}$; hoặc ít nhất khoảng $10^6 M^{-1}s^{-1}$, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Tốt hơn là, protein liên kết theo sáng chế có hằng số tốc độ kết hợp (K_{on}) với DLL4 từ $10^2 M^{-1}s^{-1}$ đến $10^3 M^{-1}s^{-1}$; từ $10^3 M^{-1}s^{-1}$ đến $10^4 M^{-1}s^{-1}$; từ $10^4 M^{-1}s^{-1}$ đến $10^5 M^{-1}s^{-1}$; hoặc từ $10^5 M^{-1}s^{-1}$ đến $10^6 M^{-1}s^{-1}$, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có hằng số tốc độ phân ly (K_{off}) của DLL4 là nhiều nhất khoảng $10^{-3} s^{-1}$; nhiều nhất khoảng $10^{-4} s^{-1}$; nhiều nhất khoảng $10^{-5} s^{-1}$; hoặc nhiều nhất khoảng $10^{-6} s^{-1}$, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Tốt hơn là, protein liên kết theo sáng chế có hằng số tốc độ phân ly (K_{off}) với DLL4 là từ $10^{-3} s^{-1}$ đến $10^{-4} s^{-1}$; từ $10^{-4} s^{-1}$ đến $10^{-5} s^{-1}$; hoặc từ $10^{-5} s^{-1}$ đến $10^{-6} s^{-1}$, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có hằng số phân ly (K_D) với DLL4 của nhiều nhất khoảng 10^{-7} M; nhiều nhất khoảng 10^{-8} M; nhiều nhất khoảng 10^{-9} M; nhiều nhất khoảng 10^{-10} M; nhiều nhất khoảng 10^{-11} M; nhiều nhất khoảng 10^{-12} M; hoặc nhiều nhất 10^{-13} M. Tốt hơn là, protein liên kết theo sáng chế có hằng số phân ly (K_D) với DLL4 từ 10^{-7} M đến 10^{-8} M; từ 10^{-8} M đến 10^{-9} M; từ 10^{-9} M đến 10^{-10} M; từ 10^{-10} đến 10^{-11} M; từ 10^{-11} M đến 10^{-12} M; hoặc từ 10^{-12} M đến 10^{-13} M.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể chứa protein liên kết với DLL4 được mô tả ở trên và polypeptit liên kết hoặc vùng bảo toàn globulin miễn dịch. Theo phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm: phân tử globulin miễn dịch, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm tương thích với người, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv được liên kết disulfit, scFv, kháng thể vùng đơn, kháng thể kép, kháng thể có nhiều vị trí liên kết đặc hiệu, kháng thể có vị trí liên kết đặc hiệu kép, và kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu.

Theo phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế chứa vùng bảo toàn globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo toàn IgM của người, vùng bảo toàn IgG1 của người, vùng bảo toàn IgG2 của người, vùng bảo toàn IgG3 của người, vùng bảo toàn IgG4 của người, vùng bảo toàn IgE của người, và vùng bảo toàn IgA của người.

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa vùng bảo toàn globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo toàn chuỗi nặng globulin miễn dịch gamma-1 (IgG-1) (như nêu trong SEQ ID NO:3), vùng bảo toàn chuỗi nặng IgG-1 đột biến (như là SEQ ID NO:4), vùng bảo toàn chuỗi nhẹ globulin miễn dịch kapa (như là SEQ ID NO:5), vùng bảo toàn chuỗi nhẹ globulin miễn dịch lamda (như nêu trong SEQ ID NO:6) và hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án khác, kháng thể được glycosyl hóa. Tốt hơn là, sự glycosyl hóa là kiểu glycosyl hóa trên người.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể liên hợp chứa kháng thể được mô tả theo sáng chế được liên hợp với chất phụ. Tốt hơn là, chất phụ được chọn từ nhóm bao gồm: tác nhân tạo ảnh, tác nhân điều trị, tác nhân gây độc tế bào và phân tử kết dính miễn dịch. Theo phương án ưu tiên, các tác nhân tạo ảnh được chọn từ nhóm bao gồm: chất đánh dấu phóng xạ, enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu có từ tính, và biotin. Tốt hơn nữa là

tác nhân tạo ảnh là chất đánh dấu phóng xạ được chọn từ nhóm bao gồm: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , và ^{153}Sm . Theo phương án ưu tiên, tác nhân điều trị hoặc gây độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm: chất kháng chuyển hóa, chất alkyl hóa, kháng sinh, yếu tố tăng trưởng, xytokin, tác nhân chống tạo mạch, chất chống phân bào, anthraxyclin, độc tố và tác nhân gây chết tế bào theo chương trình.

Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4, kháng thể, hoặc kháng thể liên hợp được mô tả ở trên tồn tại ở dạng tinh thể. Tốt hơn là, tinh thể là tinh thể được phẩm giải phóng được kiểm soát không chứa chất mang. Theo một phương án khác, protein liên kết tinh thể này, kháng thể tinh thể, hoặc kháng thể liên hợp tinh thể có thời gian bán thải *in vivo* lớn hơn dạng tan được của nó. Theo phương án ưu tiên, protein liên kết tinh thể, kháng thể tinh thể, hoặc kháng thể liên hợp tinh thể vẫn giữ hoạt tính sinh học của dạng protein liên kết tan được hoặc không phải tinh thể, kháng thể, hoặc kháng thể liên hợp sau khi kết tinh.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa một hoặc nhiều trình tự axit amin của protein liên kết với DLL4 (bao gồm kháng thể hoặc kháng thể liên hợp bất kỳ) được mô tả theo sáng chế

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa một hoặc nhiều vùng trong số của CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 như được mô tả ở trên; polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa một hoặc nhiều vùng trong số của CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 như được mô tả ở trên; và hỗn hợp của cả hai polypeptit này.

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa protein liên kết với DLL4, kháng thể, kháng thể liên hợp liên kết DLL4, hoặc phần liên kết DLL4 của nó. Đặc biệt ưu tiên là axit nucleic được phân lập mà mã hóa polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2, hoặc CDR-H3 được mô tả ở trên; polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2, hoặc CDR-L3 như được mô tả ở trên; hoặc hỗn hợp của hai polypeptit này.

Một phương án khác đề cập đến vector chứa axit nucleic được phân lập được mô tả theo sáng chế. Theo phương án ưu tiên, vector được chọn từ nhóm bao gồm: pcADN, pTT (Durocher et al., Nucl. Acids Res., 30(2e9): 1-9 (2002)), pTT3 (pTT với nhiều vị

trí làm nhân dòng khác), pEFBOS (Mizushima et al., Nucl. Acids. Res., 18 (17): 5322 (1990)), pBV, pJV và pBJ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ được biến nạp với vector được mô tả ở trên. Tế bào chủ có thể là tế bào nhân chưa có nhân điển hình hoặc nhân thực. Tế bào chủ chưa có nhân điển hình ưu tiên là *Escherichia coli*. Tốt hơn là, tế bào nhân thực được chọn từ nhóm bao gồm: tế bào sinh vật nguyên sinh, tế bào động vật, tế bào thực vật, và tế bào nấm. Tốt hơn nữa là, tế bào chủ là tế bào động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào CHO và COS. Tế bào nấm ưu tiên là *Saccharomyces cerevisiae*. Tế bào côn trùng ưu tiên là tế bào Sf9.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo rprotein liên kết mà liên kết với DLL4 của người bao gồm bước nuôi cấy tế bào bất kỳ trong số các tế bào được mô tả ở trên trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để tạo ra protein liên kết mà liên kết với DLL4 của người.

Một phương án đề cập đến được phẩm giải phóng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế, trong đó được phẩm chứa chế phẩm chứa protein liên kết với DLL4 tinh thể, kháng thể tinh thể, hoặc kháng thể liên hợp tinh thể như được mô tả ở trên và một thành phần, và ít nhất một chất mang polyme khác. Tốt hơn là, chất mang polyme là polyme được chọn từ một hoặc nhiều chất trong số nhóm bao gồm: poly (axit acrylic), poly (xyanoacrylat), poly (axit amin), poly (anhydrit), poly (depsipeptit), poly (este), poly (axit lactic), poly (axit lactic-co-glycolic) hoặc PLGA, poly (b-hydroxybutyrat), poly (caprolacton), poly (dioxanon); poly (etylen glycol), poly ((hydroxypropyl) methacrylamit, poly [(organo)phosphazen], poly (ortho este), poly (rượu vinyl), poly (vinylpyrrolidon), chất đồng trùng hợp anhydrit maleic - ete alkyl vinyl, rượu nhiều lần pluronic, anbumin, anginat, xenluloza và dẫn xuất của xenluloza, collagen, fibrin, gelatin, axit hialuronic, oligosacarit, glycaminoglycan, polisaccarit sulfat, hỗn hợp và chất đồng trùng hợp của chúng. Tốt hơn là, thành phần được chọn từ nhóm bao gồm anbumin, sucroza, trehaloza, lactitol, gelatin, hydroxypropyl- β -xyclodextrin, methoxypolyetylen glycol và polyetylen glycol.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho động vật có vú bao gồm bước dùng một lượng hữu hiệu của được phẩm chứa protein liên kết DLL4 tinh thể, kháng thể tinh thể, hoặc các kháng thể liên hợp tinh thể được mô tả ở trên cho động vật có vú.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa protein liên kết với DLL4 như được mô tả ở trên (bao gồm kháng thể hoặc kháng thể liên hợp như được mô tả ở trên) và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa ít nhất một chất phụ. Chất phụ có thể là chất có tác dụng điều trị để điều trị rối loạn trong đó DLL4 gây hại. Tốt hơn là, dược phẩm theo sáng chế chứa chất phụ được chọn từ nhóm bao gồm: chất có tác dụng điều trị; tác nhân tạo ảnh; chất chống ung thư; chất hóa học trị liệu; chất ức chế tạo thành mạch; kháng thể kháng VEGF; kháng thể kháng EGFR; kháng thể kháng cMet; kháng thể kháng ErbB3; kháng thể kháng HER2; kháng thể kháng CD20; phân tử bắt VEGF; chất ức chế kinaza; chất chẹn phân tử đồng kích thích; kháng thể kháng B7.2; CTLA4-Ig; chất chẹn phân tử kết dính; kháng thể kháng E selectin; kháng thể kháng L selectin; kháng thể kháng xytokin hoặc đoạn chức năng của chúng; kháng thể kháng IL-18; kháng thể kháng TNF; kháng thể kháng IL-6; methotrexat; corticosteroid; cyclosporin; rapamycin; FK506; chất alkyl hóa ADN; cisplatin; carboplatin; chất kháng tubulin; paclitaxel; docetaxel; doxorubicin; gemcitabin; gemzar; anthracyclin; adriamycin; chất ức chế topoisomerasa I; chất ức chế topoisomerasa II; 5-fluoracil (5-FU); leucovorin; irinotecan; chất ức chế thụ thể thyroxin kinaza; chất ức chế gây chết tế bào theo chương trình; chất ức chế Bcl2/Bclx; erlotinib; gefitinib; chất ức chế COX-2; celecoxib; cyclosporin; rapamycin; phân tử đánh dấu có thể dò được hoặc phân tử thông báo; chất đối kháng TNF; thuốc chống thấp khớp; thuốc giãn cơ; thuốc gây ngủ; thuốc giảm đau; thuốc gây mê; thuốc an thần; thuốc gây mê tại chỗ; chất chẹn thần kinh cơ; chất chống vi trùng; chất trị bệnh vẩy nến; cholecalciferol; steroid đồng hóa; erythropoietin; tạo miễn dịch; globulin miễn dịch; chất kìm hãm miễn dịch; hormon tăng trưởng; thuốc thay thế hormon; thuốc có phóng xạ; thuốc chống suy nhược; thuốc chống loạn thần; thuốc kích thích; thuốc chữa hen; chất chủ vận beta; steroid xôn; epinephrin; chất tương tự epinephrin của nó; xytokin; và chất đối kháng xytokin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoạt tính DLL4 của người bao gồm bước cho DLL4 của người tiếp xúc với protein liên kết được mô tả ở trên sao cho DLL4 của người bị ức chế hoặc trung hòa. Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoạt tính DLL4 trong người mắc rối loạn trong đó DLL4 gây hại, bao gồm việc dùng protein liên kết được mô tả ở trên cho người sao cho DLL4 của người trong đối tượng là người bị ức chế và đạt được việc điều trị. Tốt hơn là, rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm ung thư khởi phát và di căn, bao gồm

ung thư biểu mô của vú, ruột kết, rectum, phổi, họng miệng, hầu dưới, thực quản, dạ dày, tuyến tụy, gan, túi mật và ống mật, ruột non, đường niệu (bao gồm thận, bàng quang, và urothelium), đường sinh dục nữ (bao gồm cổ tử cung, tử cung, và buồng trứng cũng như ung thư dạ con và bệnh lá nuôi phôi thai (gestational trophoblastic)), đường sinh dục nam (bao gồm tuyến tiền liệt, túi tinh, tinh hoàn, và khối u tế bào mầm), tuyến nội tiết (bao gồm tuyến giáp, tuyến thượng thận, và tuyến yên), và da, cũng như u mạch, u melanin, xacôm (bao gồm các xacôm sinh ra từ xương và các mô mềm cũng như xacôm Kaposi), khối u của não, thần kinh, mắt, và màng não (bao gồm u bào hình sao, u thần kinh đệm, u nguyên bào đệm, u nguyên bào võng mạc, u dây thần kinh, u nguyên bào thần kinh, u bào sợi thần kinh, và u màng não), khối u rắn sinh ra từ u ác tính tạo huyết như là bệnh bạch cầu và u lym pho (cả u lym pho Hodgkin và không phải Hodgkin), di căn khối u, sự phân bố mạch mới mắt (bao gồm mù do tiểu đường, bệnh màng lưới, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi tác và chứng đỏ da), chứng phù, viêm khớp mạn tính, mảng xơ vữa động mạch, xung cổ trướng khó chữa, bệnh vẩy nến, viêm tụy, bệnh buồng trứng đa u nang (polycystic ovarian bệnh - POD), bệnh lạc nội mạc tử cung, xơ hóa tử cung, phì đại tuyến tiền liệt nhẹ, bệnh bạch cầu tạo lympho bào cấp tính tế bào T-tế bào (T-ALL), bệnh động mạch trội thể nhiễm sắc định hình não cerebral autosomal dominant arteriopathy với chứng nhồi máu dưới vỏ và bệnh não bạch cầu (CADASIL), đa xơ cứng (MS), tứ chứng Fallot (TOF), hội chứng Alagille (AS), bệnh thoái hóa điểm vàng và bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, và các bệnh không phụ thuộc và phụ thuộc vào sự tạo thành mạch khác được đặc trưng bởi biểu hiện hoặc hoạt tính DLL4 khác thường.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc rối loạn trong đó DLL4 của người gây hại bao gồm bước dùng một protein bất kỳ trong số các protein liên kết được mô tả ở trên trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng một lượng hữu hiệu điều trị của chất thứ hai. Theo phương án ưu tiên, chất thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm: chất điều trị phóng xạ; chất chống ung thư; chất hóa học trị liệu; chất alkyl hóa ADN; cisplatin; carboplatin; chất chống tubulin; paclitaxel; docetaxel; taxol; doxorubicin; gemcitabin; gemzar; anthracyclin; adriamycin; chất ức chế topoisomeraza I; chất ức chế topoisomeraza II; 5-flouracil (5-FU); leucovhoăcin; irinotecan; chất ức chế thụ thể tyroxin kinaza; chất ức chế sự gây chết theo chương trình; chất ức chế Bcl2/Bclx; erlotinib; gefitinib; chất ức chế COX-2; celecoxib; chất ức chế kinaza; chất

ức chế sự tạo thành mạch; kháng thể kháng VEGF; kháng thể kháng EGFR; kháng thể kháng cMet; kháng thể kháng ErbB3; kháng thể kháng HER2; kháng thể kháng CD20; bất VEGF (aflibercept); chất chẹn phân tử đồng kích thích; kháng thể kháng B7.1; kháng thể kháng B7.2; CTLA4-Ig; chất chẹn phân tử kết dính; kháng thể kháng LFA-1; kháng thể kháng E selectin; kháng thể kháng L selectin; chất ức chế phân tử nhỏ; kháng thể kháng xytokin hoặc đoạn chức năng của chúng; kháng thể kháng IL-18; kháng thể kháng TNF; kháng thể kháng IL-6; kháng thể kháng thụ thể xytokin; methotrexat; cyclosporin; rapamycin; FK506; chất đánh dấu hoặc thông báo có thể dò được; chất đối kháng TNF; thuốc chống thấp khớp; thuốc giãn cơ; thuốc gây ngủ; thuốc chống viêm không phải steroid (NSAID); thuốc giảm đau; thuốc gây mê; thuốc an thần; gây mê tại chỗ; chất chẹn thần kinh cơ; chất kháng khuẩn; thuốc trị bệnh vẩy nến; corticosteroid; steroid đồng hóa; erythropoietin; tạo miễn dịch; globulin miễn dịch; chất ức chế miễn dịch; hormon tăng trưởng; thuốc thay thế hormon; thuốc phóng xạ; thuốc chống suy nhược; thuốc chống loạn thần; thuốc kích thích; thuốc chữa hen; chất chủ vận beta; steroid xôn; epinephrin; chất tương tự epinephrin; xytokin; và chất đối kháng xytokin.

Theo phương án ưu tiên, được phẩm được mô tả ở trên được dùng cho đối tượng bởi ít nhất một kiểu được chọn từ nhóm bao gồm: đường ngoài ruột, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong khớp, trong phế quản, trong bụng, trong bao, trong sụn, trong khoang, trong khoang cơ thể, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong cơ tim, trong xương, trong chậu hông, trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong bao hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong bàng quang, tiêm nhanh 1 liều, âm đạo, trực tràng, trong miệng, dưới lưỡi, trong mũi, và xuyên qua da.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất ít nhất một kháng thể kháng thể chất di truyền DLL4 đến ít nhất một protein liên kết với DLL4 theo sáng chế. Kháng thể kháng thể chất di truyền bao gồm protein hoặc peptit bất kỳ chứa phân tử chứa ít nhất một phần của phân tử globulin miễn dịch như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một vùng quyết định bổ sung (complementarily determining region - CDR) của chuỗi nặng hoặc nhẹ hoặc phần liên kết phối tử của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, vùng bảo toàn chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, vùng khung, và phần bất kỳ của nó, mà có thể được đưa vào protein liên kết theo sáng chế.

Dạng bất kỳ của nhiều dạng thử nghiệm thăm dò miễn dịch có thể được phỏng theo để dùng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế để dò hoặc đo DLL4 trong hỗn hợp, dung dịch, hoặc mẫu sinh học. Các dạng thử nghiệm thăm dò miễn dịch này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (thử nghiệm phóng xạ miễn dịch - RIA), thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzym-linked immunosorbent assay - ELISA), vết miễn dịch (ví dụ, Westen), thử nghiệm dải miễn dịch (ví dụ, que thăm miễn dịch) chứa protein liên kết với DLL4 theo sáng chế được hấp phụ hoặc cố định vào cơ chất, FACS, và tương tự. Việc dò DLL4 sử dụng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể được thực hiện *in vitro* trên hỗn hợp, dung dịch, hoặc trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học mà có thể được tiếp xúc với protein liên kết theo sáng chế để dò hoặc đo DLL4 trong mẫu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước tiểu, nước bọt, miếng gạc đặt trong miệng (trong miệng, dưới lưỡi, hoặc miếng gạc đặt trong họng), miếng gạc trên da, vết cạo da, miếng gạc đặt trực tràng, miếng gạc đặt âm đạo, mẫu máu toàn phần, mẫu huyết tương, mẫu huyết thanh, sinh thiết mô, và mẫu khác bất kỳ thu được từ cá nhân bằng thủ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 có thể được dùng để dò DLL4 *in vivo* như là các phương pháp chụp cắt lớp và quét, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chụp cắt lớp dùng máy tính tia X (computer assisted tomography - CT), chụp ảnh cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI), và chụp pozitron cắt lớp (positron emission tomography - PET).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4, cụ thể là kháng thể kháng DLL4, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với DLL4. Trình tự axit amin (SEQ ID NO:1) của DLL4 của người được trình bày trong Bảng 1 cùng với trình tự mang mã nucleotit DLL4 tương ứng (SEQ ID NO:2). Nhiều khía cạnh của sáng chế đề cập đến kháng thể và các đoạn kháng thể, và dược phẩm của nó, cũng như axit nucleic, vector biểu hiện tái tổ hợp, và tế bào chủ để tạo ra kháng thể và đoạn kháng thể này. Phương pháp sử dụng kháng thể theo sáng chế để dò DLL4 của người hoặc DLL4 chuột, phương pháp ức chế DLL4 của người hoặc chuột và/hoặc hoạt tính VEGFR2 hoặc VEGFR1 người hoặc chuột, trên *in vitro* hoặc *in vivo*, và phương pháp điều chỉnh việc biểu hiện gen cũng nằm trong sáng chế này.

Bảng 1. Trình tự mang mã axit amin và nucleotit của DLL4 của người

Kiểu trình tự	Trình tự nhận biết	Trình tự
		123456789012345678901234567890
Trình tự axit amin DLL4 của người	SEQ ID NO:1	MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVF QLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFA VRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLA VGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY GDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLP GWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQC TCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECD NPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYGLHCE HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACEC PPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR GPSRMCRCPGFTGTCELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTS IDACASSPCFNCHUQTCTDLSTDTFVCNCPY GFVGSRCFEPVGLPPSFPWVAVSLGVGLAV LLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNN LSDFQKDNLI PAAQLKNTNQQKELEVDCGL DKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGK FPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICS PRDSMYQSVCLIXEMRNECVIATEV
Trình tự mang mã nucleotit DLL4 của người	SEQ ID NO:2	atggcggcagcgtcccggagcgcctctggctgggcgcta ctgctgctggtggcactttggcagcagcgcgcggccggc tccggcgtcttcagctgcagctgcaggagttcatcaac gagcgcggcgtactggccagtgggcggccttgcgagccc ggctgccggactttcttcgcgtctgccttaagcacttc caggcggctcgtctcgcccgaccctgcaccttcgggacc gtctccacgcgcgtattgggcaccaactccttcgctgtc cgggacgacagtagcggcggggggcgcaaccctctccaa ctgcccttcaatttcacctggccgggtaccttctcgctc atcatcgaagcttggcacgcgccaggagacgacctgcgg ccagaggccttgccaccagatgcactcatcagcaagatc gccatccagggtccctagctgtgggtcagaactggtta ttggatgagcaaaccagcaccctcacaaggctgcgctac tcttaccgggtcatctgcagtgacaactactatggagac aactgctcccgcctgtgcaagaagcgcaatgaccacttc ggccactatgtgtgccagccagatggcaacttgtcctgc ctgcccgggttgactggggaatattgccaacagcctatc tgtctttcgggctgtcatgaacagaatggctactgcagc aagccagcagagtgcctctgccgcccaggctggcagggc cggctgtgtaacgaatgcatccccacaaatggctgtcgc

Kiểu trình tự	Trình tự nhận biết	Trình tự
		123456789012345678901234567890
		cacggcacctgcagcactccctggcaatgtacttgtgat gagggctggggaggcctgttttgtgaccaagatctcaac tactgcaccaccactccccatgcaagaatggggcaacg tgctccaacagtgggcagcgaagctacacctgcacctgt cgcccaggctacactgggtgtggactgtgagctggagctc agcgagtgtgacagcaacccctgtcgcaatggaggcagc tgtaaggaccaggaggatggctaccactgcctgtgtcct ccgggctactatggcctgcattgtgaacacagcaccttg agctgcgccgactccccctgcttcaatgggggctcctgc cgggagcgcaaccagggggccaactatgcttgtgaatgt ccccccaacttcaccggctccaactgcgagaagaaagtg gacaggtgcaccagcaacccctgtgccaacgggggacag tgctgaaccgaggtccaagccgcatgtgccgctgccgt cctggattcacgggcacctactgtgaactccacgtcagc gactgtgcccgtaaccttgcgcccacgggtggcacttgc catgacctggagaatgggctcatgtgcacctgccctgcc ggcttctctggccgacgctgtgaggtgcggacatccatc gatgcctgtgcctcgagtccctgcttcaacaggggccacc tgctacaccgacctctccacagacaccttgtgtgcaac tgcccttatggcttctgtgggcagccgctgcgagttcccc gtgggcttgccgcccagcttccccctgggtggccgtctcg ctgggtgtggggctggcagtgctgctgggtactgctgggc atgggtggcagtggtgtgcgccagctgcggcttcgacgg ccggacgacggcagcaggggaagccatgaacaacttgtcg gacttccagaaggacaacctgattcctgccgcccagctt aaaaacacaaaccagaagaaggagctggaagtggactgt ggcctggacaagtccaactgtggcaaacagcaaaaccac acattggactataatctggccccagggcccctggggcgg gggacatgccaggaaagtccccacagtgacaagagc ttaggagagaaggcgccactgcggttacacagtgaaaag ccagagtgtcggatatcagcgatatgctccccaggggac tccatgtaccagtctgtgtgtttgatatcagaggagagg aatgaatgtgtcattgccacggaggtataa

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng có liên quan đến sáng chế sẽ có các nghĩa như thông thường được hiểu bởi người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực. Nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ tuy nhiên nên rõ ràng, trong trường hợp có nhiều nghĩa bất kỳ, các định nghĩa được dùng ở đây quyết định theo từ điển bất kỳ hoặc định nghĩa bên ngoài. Hơn nữa, trừ khi được yêu cầu khác bởi ngữ cảnh, các thuật ngữ đơn sẽ bao gồm các thuật ngữ số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm thuật ngữ đơn. Trong đơn này, việc sử dụng "hoặc" có nghĩa "và/hoặc" trừ khi

được chỉ ra khác. Hơn nữa, việc sử dụng thuật ngữ "bao gồm," cũng như các dạng khác, như là "bao gồm" và "được bao gồm," không bị giới hạn. Hơn nữa, các thuật ngữ như là "yếu tố" hoặc "thành phần" bao gồm cả các yếu tố và các thành phần chứa một đơn vị và các yếu tố và các thành phần mà bao gồm hơn một đơn vị con trừ khi được chỉ ra một cách đặc biệt khác.

Nhìn chung, các thuật ngữ được sử dụng có liên quan đến, và các kỹ thuật của, nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh vật học, di truyền học và hóa học protein và axit nucleic và sự lai giống được mô tả theo sáng chế là các thuật ngữ đã được biết đến và thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Phương pháp và các kỹ thuật của sáng chế nhìn chung được thực hiện theo phương pháp thông thường đã được biết đến trong lĩnh vực này và như được mô tả trong các tài liệu kỹ thuật chung và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn mà được viện dẫn và thảo luận xuyên suốt bản mô tả này trừ khi được quy định khác. Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như thông thường được thực hiện trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả theo sáng chế. Các thuật ngữ được sử dụng có liên quan đến, và các quy trình thử nghiệm và các kỹ thuật như, hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, và hóa chất làm thuốc và hóa dược được mô tả theo sáng chế là các kỹ thuật đã được biết đến và thông thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật chuẩn được sử dụng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, bào chế dược phẩm, dược phẩm, và sự phân phối và việc điều trị của bệnh nhân.

Sáng chế có thể được hiểu rõ ràng hơn với các thuật ngữ được lựa chọn được định nghĩa bên dưới.

Thuật ngữ "polypeptit" theo sáng chế, đề cập đến chuỗi polyme bất kỳ của các axit amin. Các thuật ngữ "peptit" và "protein" được sử dụng hoán đổi với thuật ngữ polypeptit và cũng đề cập đến chuỗi polyme của các axit amin. Thuật ngữ "polypeptit" bao gồm các protein tự nhiên hoặc nhân tạo, các đoạn protein và chất tương tự polypeptit của trình tự protein. Polypeptit có thể là monome hoặc polyme. Sử dụng "polypeptit" ở đây dự định bao gồm polypeptit và các đoạn và các biến đổi (bao gồm các đoạn của các biến đổi) của nó, trừ khi được chỉ ra khác. Đối với polypeptit kháng nguyên, đoạn củopolypeptit tùy ý chứa ít nhất một epitop liên kết hoặc không tuyến tính củopolypeptit. Các ranh giới chính xác của ít nhất một đoạn epitop có thể được khẳng định bằng cách sử dụng kỹ năng bình thường trong lĩnh vực này. Đoạn chứa ít nhất khoảng 5 axit amin

liền nhau, như là ít nhất khoảng 10 axit amin liền nhau, ít nhất khoảng 15 axit amin liền nhau, hoặc ít nhất khoảng 20 axit amin liền nhau. Dạng biến đổi của polypeptit như được mô tả theo sáng chế.

Thuật ngữ "protein được phân lập" hoặc "polypeptit được phân lập" là protein hoặc polypeptit có nguồn gốc hoặc khởi nguồn không có trong tự nhiên hoặc tồn tại cùng với các thành phần liên quan ở trạng thái tự nhiên; về cơ bản không có các protein khác từ các loài như vậy; được biểu hiện bằng tế bào của các loài khác nhau; hoặc không xảy ra trong tự nhiên. Do đó, polypeptit được tổng hợp hóa học hoặc được tổng hợp trong hệ tế bào khác với tế bào có nguồn gốc tự nhiên của nó sẽ "được phân lập" từ các thành phần có liên quan một cách tự nhiên của nó. Protein có thể cũng được đề xuất về cơ bản không có các thành phần có liên quan một cách tự nhiên bằng cách tinh chế, sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein đã biết đến trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ "thu hồi" theo sáng chế, đề cập đến quá trình hoàn lại loại hóa chất như là polypeptit về cơ bản không có các thành phần có liên quan một cách tự nhiên bằng cách tinh chế, ví dụ, sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ "DLL4 của người" (được gọi tắt là "hDLL4" hoặc "huDLL4"), theo sáng chế, bao gồm nhiều vùng giống EGF và vùng DSL mà được yêu cầu để liên kết thụ thể. Thuật ngữ bao gồm protein chứa khoảng 74-75 kDa. ADN cấu trúc và được suy ra và trình tự protein của DLL4 của người được mô tả hơn nữa trong, ví dụ, Shutter et al., *Gens & Dev.*, 4: 1313-1318 (2000). Thuật ngữ "DLL4 của người" dự định bao gồm DLL4 của người tái tổ hợp (rh DLL4), mà có thể được bào chế bằng phương pháp biểu hiện tái tổ hợp chuẩn.

"Hoạt tính sinh học", theo sáng chế về DLL4, đề cập đến tất cả các đặc tính sinh học có sẵn của DLL4. Các đặc tính sinh học của DLL4 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liên kết với thụ thể Notch, hoạt hóa thụ thể Notch, điều hòa âm chu trình tín hiệu VEGF, ngăn chặn VEGFR2, và tạo ra VEGFR1.

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách đặc hiệu", theo sáng chế, về sự tương tác của kháng thể, protein, hoặc peptit với loại hóa chất thứ hai, nghĩa là tương tác phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể (ví dụ, yếu tố quyết định kháng nguyên hoặc epitop) trên loại hóa chất; ví dụ, kháng thể nhận ra và liên kết với cấu trúc protein cụ thể hơn là với các protein nói chung. Nếu kháng thể đặc hiệu với epitop "A",

thì sự có mặt của phân tử chứa epitop A (hoặc A tự do, không được đánh dấu), trong phản ứng chứa "A" đánh dấu và kháng thể, sẽ làm giảm lượng A được đánh dấu liên kết với kháng thể.

"Protein liên kết" là protein monome hoặc multime mà liên kết với và tạo thành phức với chất liên kết, mà có thể là polypeptit, kháng nguyên, hợp chất hóa học hoặc phân tử khác, hoặc cơ chất của loại bất kỳ. Protein liên kết liên kết đặc hiệu với chất liên kết. Các protein liên kết bao gồm kháng thể và các phân tử khác chứa một hoặc nhiều vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với phân tử kháng nguyên hoặc vị trí cụ thể (epitop) trên phân tử kháng nguyên. Protein liên kết bao gồm kháng thể hoặc đoạn bất kỳ trong số các đoạn liên kết kháng nguyên của nó, và nhiều dạng và các dẫn xuất của kháng thể đã được biết trong lĩnh vực này và được mô tả bên dưới. Do đó, protein liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể, globulin miễn dịch có bốn phần, phân tử IgG, phân tử IgG₁, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể đã trưởng thành về ái lực, và các đoạn của kháng thể này bất kỳ mà vẫn giữ khả năng liên kết với kháng nguyên.

Thuật ngữ "kháng thể", theo sáng chế, nói chung đề cập đến phân tử globulin miễn dịch (Ig) bất kỳ bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), hoặc đoạn chức năng bất kỳ, đột biến, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, mà vẫn giữ các đặc tính liên kết epitop thiết yếu của phân tử Ig. Các dạng đột biến, biến thể, hoặc các dạng dẫn xuất kháng thể này đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các phương án không bị giới hạn của chúng được thảo luận bên dưới.

Trong kháng thể có chiều dài đầy đủ, mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Vùng bảo toàn chuỗi nặng bao gồm ba vùng, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Vùng bảo toàn chuỗi nhẹ bao gồm một vùng, CL. Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến đổi, được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining regions - CDR), được đặt rải rác với các vùng mà được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, tính từ đầu amin đến đầu carboxy theo trật tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Các phân tử globulin miễn dịch có thể là loại bất kỳ trong

số các loại (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm (ví dụ, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm.

Thuật ngữ "vùng Fc" được sử dụng để xác định vùng đầu C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, mà có thể được tạo ra bằng cách phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng papain. Vùng Fc có thể là vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc biến đổi. Vùng Fc của globulin miễn dịch nhìn chung chứa hai vùng bảo toàn, vùng CH2 và vùng CH3, và tùy ý chứa vùng CH4. Sự thay thế của các gốc axit amin trong phần Fc để thay đổi chức năng phản ứng kháng thể đã được biết trong lĩnh vực này (xem US 5,648,260 và US 5,624,821). Phần Fc của kháng thể gây ra nhiều chức năng phản ứng quan trọng, ví dụ, tạo ra xytokin, ADCC, sự thực bào, tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), và thời gian bán thải/tỷ lệ thanh thải của kháng thể và phức kháng nguyên-kháng thể. Trong một số trường hợp, các chức năng phản ứng này được mong đợi đối với kháng thể điều trị, nhưng trong các trường hợp khác có thể là không cần thiết hoặc thậm chí có hại, phụ thuộc vào các mục đích điều trị. Các isotyp IgG người nhất định, cụ thể là IgG1 và IgG3, gây ra ADCC và CDC thông qua liên kết với FcγRs và C1q bổ thể, tương ứng. Các thụ thể Fc mới sinh (FcRn) là các thành phần chính quyết định thời gian bán thải của kháng thể. Vẫn theo một phương án khác, ít nhất một gốc axit amin được thay thế trong vùng bảo toàn của kháng thể, ví dụ, vùng Fc của kháng thể, sao cho các chức năng phản ứng của kháng thể thay đổi. Việc kết hợp của hai chuỗi nặng giống hệt của globulin miễn dịch được gây ra bởi sự kết hợp giữa hai vùng CH3 và được ổn định bằng cầu nối disulfit trong vùng bản lề (Huber et al., *Nature*, 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999)). Sự đột biến của các gốc xystein trong các vùng bản lề để phòng các cầu nối disulfit giữa chuỗi nặng – chuỗi nặng sẽ làm mất ổn định kết hợp giữa hai vùng CH3. Các gốc gây ra sự kết hợp giữa hai CH3 đã được nhận biết (Dall'Acqua, *Biochem.*, 37: 9266-9273 (1998)). Do đó, có thể tạo ra nửa Ig đơn hóa trị. Bất ngờ là, các phân tử nửa Ig đơn hóa trị này đã được tìm thấy trong tự nhiên cho cả phân nhóm IgG và IgA (Seligman, *Ann. Immunol.*, 129: 855-70 (1978); Biewenga et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983)). Tỷ lệ đương lượng hóa học của vùng FcRn: Fc Ig đã được xác định là 2:1 (West et al., *Biochem.*, 39: 9698-9708 (2000)), và nửa Fc là đủ để gây ra liên kết FcRn (Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994)). Các đột biến để phá vỡ sự kết hợp giữa hai vùng CH3 có thể không gây hại đáng kể đến liên kết FcRn của nó như các gốc quan trọng cho kết hợp giữa hai

CH3 nằm giữa bề mặt phân giới của cấu trúc phiên CH3 b, trong khi vùng chịu trách nhiệm cho liên kết FcRn lại nằm bên ngoài bề mặt phân giới của vùng CH2-CH3. Tuy nhiên, nửa phân tử Ig có thể có các ưu điểm nhất định trong việc thâm nhập vào mô do kích thước của nó nhỏ hơn so với kích thước của kháng thể thông thường. Theo một phương án, ít nhất một gốc axit amin được thay thế trong vùng bảo toàn của protein liên kết theo sáng chế, ví dụ vùng Fc, sao cho sự nhị trùng hóa của các chuỗi nặng bị phá vỡ, dẫn đến các nửa phân tử Ig. Hoạt tính kháng viêm của IgG hoàn toàn phụ thuộc vào sự sialyl hóa glycan được liên kết N của đoạn Fc IgG. Các yêu cầu chính xác đối với glycan có hoạt tính kháng viêm đã được xác định, sao cho đoạn Fc IgG1 thích hợp có thể được tạo ra, do đó tạo ra Fc IgG1 được sialyl hóa tái tổ hợp đầy đủ với hiệu lực tăng cao (Anthony et al., Science, 320: 373-376 (2008)).

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng thể"), theo sáng chế, đề cập đến một hoặc nhiều đoạn của kháng thể mà vẫn giữ khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (nghĩa là, với epitop cụ thể của kháng nguyên, như là epitop của DLL4). Đã được thấy rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bằng các đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các phương án về kháng thể này có thể cũng là dạng có hai vị trí liên kết đặc hiệu, đặc hiệu kép, hoặc có nhiều vị trí liên kết đặc hiệu; đặc biệt là liên kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau (hoặc hai hoặc nhiều epitop khác nhau của cùng một kháng nguyên). Các ví dụ của các đoạn liên kết được bao gồm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn đơn hóa trị bao gồm vùng VL, VH, CL, và CH1; (ii) đoạn F(ab')₂, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết bởi cầu nối disulfit ở vùng bản lề; (iii) đoạn Fd bao gồm vùng VH và CH1; (iv) đoạn Fv bao gồm vùng VL và VH của cánh tay đơn của kháng thể; (v) đoạn dAb (Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989); WO 90/05144 A1), mà chứa vùng biến đổi đơn; và (vi) vùng quyết định bổ sung được phân lập (complementarity determining region - CDR). Hơn nữa, mặc dù hai vùng của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được liên kết, sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng liên kết tổng hợp mà có thể chúng được tạo ra như chuỗi protein đơn trong đó các vùng VL và VH ghép đôi với nhau tạo thành các phân tử có hóa trị một (được biết như là Fv chuỗi đơn (scFv); ví dụ xem, Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)). Kháng thể chuỗi đơn này cũng dự định được bao gồm

trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Các dạng khác của chuỗi đơn kháng thể, như là thể kép (diabodies), cũng được bao gồm. Các thể kép là kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu có hóa trị hai, kháng thể trong đó vùng VH và VL được biểu diễn trên chuỗi polypeptit đơn, nhưng sử dụng cầu nối quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai vùng trên cùng một chuỗi, do đó ép buộc các vùng này ghép đôi với vùng bổ sung của một chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên (ví dụ xem, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., Structure, 2: 1121-1123 (1994)). Các phần liên kết kháng thể này đã được biết trong lĩnh vực này (xem, Kontermann và Dubel eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, New York, 2001), trang 790 (ISBN 3-540-41354-5)). Ngoài ra, kháng thể chuỗi đơn cũng bao gồm "kháng thể thẳng" chứa một cặp của các đoạn Fv trước sau (VH-CH1-VH-CH1) mà cùng với các polypeptit chuỗi nhẹ bổ sung, tạo thành một cặp của các vùng liên kết kháng nguyên (Zapata et al. Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995); và US 5,641,870).

Thuật ngữ "kháng thể" (hoặc "kháng thể DLL4") theo sáng chế đề cập đến polypeptit chứa một hoặc nhiều phần liên kết kháng nguyên theo sáng chế được liên kết với polypeptit liên kết hoặc vùng bảo toàn globulin miễn dịch. Các polypeptit liên kết chứa hai hoặc nhiều gốc axit amin được liên kết bằng cầu nối peptit và được sử dụng để liên kết một hoặc nhiều phần liên kết kháng nguyên. Các polypeptit liên kết này đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ xem, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., Structure, 2: 1121-1123 (1994)). Vùng bảo toàn globulin miễn dịch đề cập đến vùng bảo toàn chuỗi nặng hoặc nhẹ. Trình tự axit amin vùng bảo toàn chuỗi nặng và chuỗi nhẹ IgG người đã được biết trong lĩnh vực này và được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự của vùng bảo toàn chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ IgG của người

Protein	Ký hiệu trình tự	Trình tự
		12345678901234567890123456789012
vùng bảo toàn Ig gama-1	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

Protein	Ký hiệu trình tự	Trình tự
		12345678901234567890123456789012
		YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
Đột biến vùng bảo toàn Ig gama-1	SEQ ID NO:4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTW SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
vùng bảo toàn Ig kapa	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
vùng bảo toàn Ig lamda	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSXEMLQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Ngoài ra, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó có thể là một phần của phân tử kết dính miễn dịch lớn hơn, được hình thành bởi liên kết cộng hóa trị hoặc không phải cộng hóa trị của kháng thể hoặc phần kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác. Các ví dụ của phân tử kết dính miễn dịch này bao gồm sử dụng vùng nhân streptavidin để tạo thành phân tử scFv có bốn phần (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridoma, 6: 93-101 (1995)) và sử dụng gốc xystein, peptit đánh dấu, và đuôi polyhistidin tận cùng C để tạo thành phân tử scFv có hóa trị hai và được biotinyl hóa (Kipriyanov et al., Mol. Immunol., 31: 1047-1058 (1994)). Các phần kháng thể, như là các đoạn Fab và F(ab')₂, có thể được bào chế từ kháng thể nguyên vẹn sử dụng các kỹ thuật thông thường, như là phân cắt bằng papain hoặc pepsin, tương ứng, của kháng thể nguyên vẹn. Hơn nữa, kháng thể, các phần kháng thể, và các phân tử kết dính miễn dịch có thể thu được sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn, như được mô tả theo sáng chế và đã được biết trong lĩnh vực này.

"Kháng thể được phân lập", theo sáng chế, dự định đề cập đến kháng thể mà về cơ bản không có kháng thể khác có các đặc tính kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với hDLL4 về cơ bản không có kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác hDLL4). Tuy nhiên, kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu hDLL4 có thể có tính phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như

là các phân tử DLL4 từ các loài khác (ví dụ, muDLL4). Hơn nữa, kháng thể được phân lập có thể về cơ bản không có nguyên liệu tế bào và/hoặc các hóa chất phụ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" và viết tắt "MAb" và "mAb", theo sáng chế, đề cập đến kháng thể thu được từ nhóm kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, kháng thể riêng biệt bao gồm nhóm là giống hệt ngoại trừ có thể có các đột biến một cách tự nhiên mà có thể có với số lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng là đặc hiệu cao, có hướng kháng lại kháng nguyên đơn. Hơn nữa, ngược lại với việc bào chế kháng thể đa dòng mà thông thường bao gồm kháng thể khác nhau có hướng kháng lại các yếu tố quyết định khác nhau (các epitop), mỗi mAb trực tiếp kháng lại yếu tố quyết định đơn trên kháng nguyên. Sự biến đổi "đơn dòng" không được hiểu như yêu cầu tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ.

Thuật ngữ "kháng thể của người", theo sáng chế, dự định bao gồm kháng thể có các vùng biến đổi và không đổi có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bằng trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến xôma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người", theo sáng chế, dự định bao gồm kháng thể trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của một loài động vật có vú khác, như là chuột, được ghép trên trình tự khung của người.

Thuật ngữ "kháng thể của người tái tổ hợp", theo sáng chế, bao gồm tất cả kháng thể của người mà được bào chế, biểu hiện, tạo ra, hoặc tinh chế bằng cách tái tổ hợp, như là kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được truyền vào tế bào chủ, kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể của người tái tổ hợp, tái tổ hợp (Hoogenboom, Trends Biotechnol., 15:62-70 (1997); Azzazy và Highsmith, Clin. Biochem., 35: 425-445 (2002); Gavilondo và Larrick, BioTechnologies, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom và Chames, Immunol. Today, 21: 371-378 (2000)), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà được chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch người (xem, Taylhoac et al., Nucl. Acids Res., 20: 6287-6295 (1992); Kellermann và Green, Curr. Opin. Biotechnol., 13: 593-597 (2002); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)) hoặc kháng thể được bào chế, biểu hiện, tạo ra hoặc tinh chế bằng các phương pháp khác bất kỳ mà liên quan đến sự ghép nối của trình tự gen globulin

miễn dịch người với trình tự ADN khác. Các kháng thể của người tái tổ hợp này có vùng biến đổi và không đổi có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Theo một số phương án nhất định, tuy nhiên, kháng thể của người tái tổ hợp này chịu gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen cho trình tự Ig người được sử dụng, gây đột biến xôma *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của các vùng VH và VL của kháng thể tái tổ hợp là trình tự mã, trong đó có nguồn gốc từ và có liên quan đến trình tự VH và VL dòng mầm người, có thể không tồn tại một cách tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" đề cập đến kháng thể mà chứa các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ từ một loài và trình tự vùng bảo toàn từ một loài khác, như là kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ chuột liên kết với các vùng bảo toàn của người.

Theo sáng chế, thuật ngữ "CDR" đề cập đến vùng quyết định bổ sung trong trình tự biến đổi kháng thể. Có ba CDR trong mỗi vùng của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mà được tạo ra "CDR1", "CDR2", và "CDR3", đối với từng vùng trong các vùng biến đổi. Thuật ngữ "tập hợp CDR" theo sáng chế đề cập đến nhóm ba CDR có trong vùng biến đổi đơn mà liên kết với kháng nguyên. Ranh giới chính xác của các CDR này đã được xác định khác nhau theo các hệ thống khác nhau. Hệ được mô tả bởi Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) và (1991)) không chỉ đề cập đến hệ đánh số gốc rõ ràng có thể áp dụng được với vùng biến đổi bất kỳ của kháng thể, mà còn đề cập đến các ranh giới gốc chính xác xác định ba CDR. Các CDR này có thể được đề cập đến như "các CDR Kabat". Chothia và các đồng nghiệp (Chothia và Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342: 877-883 (1989)) đã tìm thấy rằng các phần con nhất định trong các CDR Kabat chấp nhận cấu tạo khung chính peptit gần giống hệt, dù có tính đa dạng lớn ở mức độ trình tự axit amin. Các phần con này được tạo ra như "L1", "L2", và "L3", hoặc "H1", "H2", và "H3", trong đó "L" và "H" là các vùng chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng. Các vùng này có thể được đề cập đến như "các CDR Chothia", mà có đường biên chồng lấn lên các CDR Kabat. Các đường biên khác xác định các CDR chồng lấn lên các CDR Kabat đã được mô tả bởi Padlan, FASEB J., 9: 133-139 (1995) và MacCallum, J. Mol. Biol., 262(5): 732-745 (1996). Về các định nghĩa đường biên CDR khác có thể không tuân theo hoàn toàn một trong số các hệ thống theo sáng

chế, nhưng chấp nhận rằng chúng sẽ chồng lấn lên các CDR Kabat, mặc dù chúng có thể làm ngắn hơn hoặc dài hơn tùy theo dự đoán hoặc thử nghiệm đối với các gốc cụ thể hoặc các nhóm gốc hoặc thậm chí toàn bộ CDR miễn là không ảnh hưởng đáng kể đến liên kết kháng nguyên. Phương pháp được sử dụng ở đây có thể sử dụng các CDR được xác định theo hệ bất kỳ trong số các hệ này, mặc dù các phương án nhất định sử dụng các CDR theo định nghĩa Kabat hoặc Chothia.

Các thuật ngữ "đánh số Kabat," "các định nghĩa Kabat", và "đánh dấu Kabat" được sử dụng thay thế lẫn nhau theo sáng chế. Các thuật ngữ này, đã được biết trong lĩnh vực này, đề cập đến hệ đánh số các gốc axit amin mà biến đổi nhiều hơn (nghĩa là, siêu biến đổi) các gốc axit amin khác trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó (Kabat et al., Ann. NY Acad. Sci., 190: 382-391 (1971) và Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). Với vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), vùng siêu biến đổi nằm trong khoảng từ axit amin ở vị trí 31 đến 35 cho CDR1, axit amin ở vị trí từ 50 đến 65 cho CDR2, và axit amin ở vị trí từ 95 đến 102 cho CDR3. Với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), vùng siêu biến đổi nằm trong khoảng axit amin ở vị trí từ 24 đến 34 cho CDR1, axit amin ở vị trí từ 50 đến 56 cho CDR2, và axit amin ở vị trí từ 89 đến 97 cho CDR3.

Sự tăng trưởng và phân tích cơ sở dữ liệu công rộng rãi của trình tự axit amin của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong hai mươi năm qua đã dẫn đến sự hiểu biết của các đường biên giới thông thường giữa các vùng khung (FR) và trình tự CDR trong trình tự vùng biến đổi và cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định chính xác các CDR theo hệ đánh số Kabat, đánh số Chothia, hoặc các hệ khác. Ví dụ xem bài báo, Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," Trong Kontermann and Dübel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chương 31, các trang 432-433. Phương pháp hữu ích xác định trình tự axit amin của các CDR Kabat, và do đó cũng như trình tự của các FR Kabat, trong trình tự axit amin của các vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) được đưa ra bên dưới:

Để xác định trình tự axit amin CDR-L1:

Bắt đầu khoảng 24 gốc axit amin từ đầu amin của vùng VL;

Gốc trước trình tự CDR-L1 luôn luôn là xystein (C);

Gốc sau trình tự CDR-L1 luôn luôn là tryptophan (W), thường là Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), mà còn là Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q), và Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

Thường dài từ 10 đến 17 gốc axit amin.

Để xác định trình tự axit amin CDR-L2:

Luôn bắt đầu là 16 gốc sau kết thúc của CDR-L1;

Các gốc trước trình tự CDR-L2 nhìn chung là Ile-Tyr (I-Y), mà còn là Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K), và Ile-Phe (I-F);

Luôn có chiều dài là 7 gốc axit amin.

Để xác định trình tự axit amin CDR-L3:

Luôn bắt đầu là 33 axit amin sau kết thúc của CDR-L2;

Gốc trước trình tự axit amin CDR-L3 luôn luôn là cystein (C);

Các gốc sau đó luôn luôn là Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO:7), trong đó X là axit amin bất kỳ;

Thường dài từ 7 đến 11 gốc axit amin.

Để xác định trình tự axit amin CDR-H1:

Bắt đầu khoảng 31 gốc axit amin từ đầu amino của vùng VH và luôn luôn là 9 gốc sau cystein (C);

Các gốc trước luôn luôn là Cys-X-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO:8), trong đó X là axit amin bất kỳ;

Gốc sau luôn luôn là Trp (W), thông thường là Trp-Val (W-V), mà còn là Trp-Ile (W-I), và Trp-Ala (W-A);

Thường dài từ 5 đến 7 gốc axit amin.

Để xác định trình tự axit amin CDR-H2:

Bắt đầu luôn luôn là 15 gốc axit amin từ sau kết thúc của CDR-H1;

Các gốc trước thông thường là Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO:9), mà còn là các biến đổi khác;

Các gốc sau là Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

Chiều dài thông thường là từ 16 đến 19 gốc axit amin.

Để xác định trình tự axit amin CDR-H3:

Luôn bắt đầu là 33 gốc axit amin từ sau kết thúc của CDR-H2 và luôn luôn là 3 sau xystein (C);

Các gốc trước luôn luôn là Cys-X-X (C-X-X), trong đó X là axit amin bất kỳ, thông thường là Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Các gốc sau luôn luôn là Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO:10), trong đó X là axit amin bất kỳ;

Thường dài từ 3 đến 25 gốc axit amin.

Thuật ngữ "kháng thể ghép CDR" đề cập đến kháng thể chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ từ một loài nhưng trong đó trình tự của một hoặc nhiều vùng CDR của VH và/hoặc VL được thay thế bằng trình tự CDR của một loại khác, như là kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ chuột trong đó một hoặc nhiều CDR trong số các CDR chuột (ví dụ, CDR3) được thay thế bằng trình tự CDR người.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" đề cập đến kháng thể chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ từ loài không phải người (ví dụ, chuột), nhưng trong đó ít nhất một phần của trình tự VH và/hoặc VL được thay đổi để "tương thích với người," hơn nghĩa là, tương tự trình tự biến đổi dòng mầm của người. "Kháng thể được làm tương thích với người" là kháng thể hoặc biến thể, dẫn xuất, dạng tương tự, hoặc đoạn của nó, mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên đang quan tâm và chứa vùng khung (FR) về cơ bản có trình tự axit amin của kháng thể của người và vùng quyết định bổ sung (CDR) về cơ bản có trình tự axit amin của kháng thể không phải của người. Theo sáng chế, thuật ngữ "về cơ bản" trong ngữ cảnh của CDR đề cập đến CDR có mức độ tương đồng về trình tự axit amin ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% so với trình tự axit amin của CDR kháng thể không phải của người. Kháng thể được làm tương thích với người chứa về cơ bản tất cả của ít nhất một, và thông thường là hai vùng biến đổi (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng của globulin miễn dịch không phải của người (nghĩa là, kháng thể nhận) và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng khung là các vùng khung của trình tự liên ứng globulin miễn dịch người. Theo một phương án, kháng thể được làm tương thích với người cũng chứa ít nhất một phần của vùng bảo toàn globulin miễn dịch (Fc), thông thường là một phần của globulin miễn dịch người. Theo một số phương án, kháng thể được làm tương thích với người chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể cũng có thể bao

gồm các vùng CH1, bản lề, CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm tương thích với người chỉ chứa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người. Theo một số phương án, kháng thể được làm tương thích với người chỉ chứa chuỗi nặng được làm tương thích với người. Theo các phương án cụ thể, kháng thể được làm tương thích với người chỉ chứa vùng biến đổi được làm tương thích với người của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được làm tương thích với người.

Kháng thể được làm tương thích với người có thể được chọn từ nhóm bất kỳ của các globulin miễn dịch, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA, và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm không bị giới hạn ở IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Kháng thể được làm tương thích với người có thể bao gồm trình tự từ hơn một nhóm hoặc isotyp, và các vùng bảo toàn cụ thể có thể được chọn để tối ưu các chức năng phản ứng mong muốn bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết trong lĩnh vực này.

Các vùng khung và các CDR của kháng thể được làm tương thích với người cần không tương ứng chính xác với trình tự gốc, ví dụ, CDR kháng thể nhận hoặc khung liên ứng có thể được gây đột biến bằng cách thế, chèn, và/hoặc xóa ít nhất một gốc axit amin sao cho CDR hoặc gốc khung ở vị trí đó không tương ứng với kháng thể nhận hoặc khung liên ứng. Theo phương án ưu tiên, tuy nhiên, các đột biến này sẽ không rộng. Thông thường, ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 95% của các gốc kháng thể được làm tương thích với người sẽ tương ứng với các gốc của trình tự FR và CDR ban đầu. Theo sáng chế, thuật ngữ "khung liên ứng" đề cập đến vùng khung trong trình tự globulin miễn dịch liên ứng. Theo sáng chế, thuật ngữ "trình tự globulin miễn dịch liên ứng" đề cập đến trình tự được tạo thành từ các axit amin thường xuất hiện ra nhất (hoặc nucleotit) trong họ của trình tự globulin miễn dịch có liên quan (ví dụ xem, Winnaker, From Gens to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Do đó, "trình tự globulin miễn dịch liên ứng" có thể bao gồm "(các) vùng khung liên ứng" và/hoặc "(các) CDR liên ứng". Trong họ của các globulin miễn dịch, mỗi vị trí trong trình tự liên ứng được chiếm giữ bởi axit amin thường xuất hiện ra nhất ở vị trí đó trong họ. Nếu hai axit amin xuất hiện với tần xuất bằng nhau, thì có thể được bao gồm trong trình tự liên ứng.

Kháng thể "trưởng thành về ái lực" là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều CDR của nó mà dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể với kháng nguyên đích, so với kháng thể ban đầu mà không có (các) thay đổi. Kháng thể trưởng thành về

ái lực ví dụ sẽ có ái lực nanomol hoặc thậm chí picomol với kháng nguyên đích. Sự thay đổi của các quy trình sản xuất kháng thể trưởng thành về ái lực là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) mô tả sự làm trưởng thành về mặt ái lực bởi sự sắp xếp lại vùng VH và VL. Sự gây đột biến ngẫu nhiên của CDR và/hoặc các gốc vùng khung được mô tả bởi Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gen*, 169: 147- 155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). Sự đột biến chọn lọc ở vị trí gây đột biến chọn lọc và ở vị trí tiếp xúc hoặc siêu đột biến với gốc axit amin có hoạt tính tăng được mô tả trong US 6,914,128 B1.

Thuật ngữ "protein liên kết đa hóa trị" biểu thị protein liên kết chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên (cũng được đề cập ở đây như "các vùng liên kết kháng nguyên"). Protein liên kết đa hóa trị tốt hơn là được thao tác để có ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên, và nhìn chung không phải là kháng thể xuất hiện một cách tự nhiên. Thuật ngữ "protein liên kết đa đặc hiệu" đề cập đến protein liên kết có khả năng liên kết hai hoặc nhiều đích có liên quan hoặc không liên quan, bao gồm protein liên kết có khả năng liên kết hai hoặc nhiều epitop khác nhau của cùng một phân tử đích.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép", theo sáng chế, đề cập đến kháng thể có chiều dài đầy đủ mà được tạo ra bằng kỹ thuật quadroma (xem bài báo của Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), bằng cách hóa kết hợp hai kháng thể đơn dòng khác nhau (xem, Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)), hoặc bằng kỹ thuật đột biến điểm hoặc các nghiên cứu tương tự mà đưa các đột biến vào vùng Fc (xem bài báo của Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), dẫn đến nhiều loại globulin miễn dịch khác nhau của chúng chỉ là kháng thể đặc hiệu kép chức năng. Bởi chức năng phân tử, kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu liên kết với một kháng nguyên (hoặc epitop) trên kháng nguyên của hai cánh tay liên kết của nó (một cặp HC/LC), và liên kết với kháng nguyên khác nhau (hoặc epitop) trên cánh tay thứ hai của nó (một HC/LC cặp khác). Bằng định nghĩa này, kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu có hai cánh tay liên kết kháng nguyên khác nhau (trong cả tính đặc hiệu và CDR), và là có hóa trị một đối với mỗi kháng nguyên liên kết với nó.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép", theo sáng chế, đề cập đến kháng thể có chiều dài đầy đủ mà có thể liên kết với hai kháng nguyên khác nhau (hoặc các epitop) trong

mỗi kháng thể của hai cánh tay liên kết của nó (một cặp HC/LC) (xem công bố đơn PCT số WO 02/02773). Do đó, protein liên kết đặc hiệu kép có hai cánh tay liên kết kháng nguyên giống nhau, với tính đặc hiệu giống hệt và trình tự CDR giống hệt, và có hóa trị hai đối với mỗi kháng nguyên liên kết với nó.

Các protein liên kết "vùng biến đổi kép" ("DVD") theo sáng chế chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên và có thể là các protein liên kết có hóa trị hai (hai vị trí liên kết kháng nguyên), có hóa trị bốn (bốn vị trí liên kết kháng nguyên), hoặc nhiều hóa trị. Các DVD có thể là đơn đặc hiệu, nghĩa là, có khả năng liên kết với một kháng nguyên (hoặc một epitop đặc hiệu), hoặc đa đặc hiệu, nghĩa là, có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên (nghĩa là, hai hoặc nhiều epitop của cùng một phân tử kháng nguyên đích hoặc hai hoặc nhiều epitop của các kháng nguyên đích khác nhau). Protein liên kết DVD ưu tiên chứa hai polypeptit DVD chuỗi nặng và hai polypeptit DVD chuỗi nhẹ được đề cập đến như "globulin miễn dịch DVD" hoặc "DVD-Ig". Protein liên kết DVD-Ig này do đó có bậc bốn và gọi lại phân tử IgG, nhưng cung cấp nhiều vị trí liên kết kháng nguyên hơn phân tử IgG. Do đó, mỗi nửa của phân tử DVD-Ig có bốn phần gọi lại một nửa phân tử IgG và chứa polypeptit DVD chuỗi nặng và polypeptit DVD chuỗi nhẹ, nhưng không giống một cặp của chuỗi nặng và nhẹ của phân tử IgG mà tạo ra vùng liên kết kháng nguyên đơn, một cặp của chuỗi nặng và nhẹ của DVD-Ig tạo ra hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên.

Mỗi vị trí liên kết kháng nguyên của protein liên kết DVD-Ig có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng cho ("ban đầu") và do đó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) với tổng sáu CDR có liên quan đến liên kết kháng nguyên trên các vị trí liên kết kháng nguyên. Do đó, protein liên kết DVD-Ig mà liên kết hai epitop khác nhau (nghĩa là, hai epitop khác nhau của hai phân tử kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitop khác nhau của cùng một phân tử kháng nguyên) chứa vị trí liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng ban đầu đầu tiên và vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể đơn dòng ban đầu thứ hai.

Mô tả kiểu, sự biểu hiện, và đặc tính của các phân tử liên kết DVD-Ig được đưa ra trong công bố PCT số WO 2007/024715, US 7,612,181, và Wu et al., Nature Biotech., 25: 1290-1297 (2007). Ví dụ ưu tiên của các phân tử DVD-Ig này chứa chuỗi nặng chứa công thức cấu trúc VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, trong đó VD1 là vùng biến đổi chuỗi nặng đầu tiên, VD2 là vùng biến đổi chuỗi nặng thứ hai, C là vùng bảo toàn chuỗi nặng,

X1 là cầu nối miễn là không phải là CH1, X2 là vùng Fc, và n là 0 hoặc 1, nhưng tốt hơn là 1; và chuỗi nhẹ chứa công thức cấu trúc VD1-(X1)ⁿ-VD2-C-(X2)ⁿ, trong đó VD1 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ đầu tiên, VD2 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ thứ hai, C là vùng bảo toàn chuỗi nhẹ, X1 là cầu nối miễn là không phải là CH1, và X2 không bao gồm vùng Fc; và n là 0 hoặc 1, nhưng tốt hơn là 1. DVD-Ig này có thể bao gồm hai chuỗi nặng này và hai chuỗi nhẹ này, trong đó mỗi chuỗi chứa các vùng biến đổi được liên kết theo trật tự trước sau không có vùng bảo toàn xen kẽ giữa các vùng biến đổi, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kết hợp để tạo thành các vị trí liên kết kháng nguyên chức năng trước sau, và một cặp chuỗi nặng và nhẹ có thể kết hợp với một cặp chuỗi nặng và nhẹ khác để tạo thành protein liên kết có bốn phần với bốn vị trí liên kết kháng nguyên chức năng. Theo một ví dụ khác, phân tử DVD-Ig có thể chứa chuỗi nặng và nhẹ mà mỗi chuỗi chứa ba vùng biến đổi (VD1, VD2, VD3) được liên kết theo trật tự trước sau không có vùng bảo toàn xen kẽ giữa các vùng biến đổi, trong đó một cặp chuỗi nặng và nhẹ có thể kết hợp để tạo thành ba vị trí liên kết kháng nguyên, và trong đó một cặp chuỗi nặng và nhẹ có thể kết hợp với một cặp chuỗi nặng và nhẹ khác để tạo thành protein liên kết có bốn phần với sáu vị trí liên kết kháng nguyên.

Theo phương án ưu tiên, protein liên kết DVD-Ig theo sáng chế không chỉ liên kết với cùng các phân tử đích được liên kết bởi kháng thể đơn dòng ban đầu của nó, nhưng cũng có một hoặc nhiều đặc tính mong muốn của một hoặc nhiều của kháng thể đơn dòng ban đầu của nó. Tốt hơn là, đặc tính thêm này là thông số kháng thể của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng ban đầu. Các thông số kháng thể mà có thể đóng góp vào protein liên kết DVD-Ig từ một hoặc nhiều kháng thể của kháng thể đơn dòng ban đầu của nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính đặc hiệu kháng nguyên, ái lực kháng nguyên, hiệu lực, chức năng sinh học, nhận dạng epitop, độ ổn định protein, độ hòa tan protein, hiệu lực sản xuất, tính sinh miễn dịch, được động học, tính sinh khả dụng, tính phản ứng chéo của mô, và liên kết kháng nguyên tiến hóa thẳng.

Protein liên kết DVD-Ig theo sáng chế liên kết với ít nhất một epitop của protein DLL4 của người. Các ví dụ không bị giới hạn của protein liên kết DVD-Ig theo sáng chế bao gồm protein liên kết DVD-Ig liên kết với một hoặc nhiều epitop của DLL4 của người, protein liên kết DVD-Ig liên kết với epitop của DLL4 của người và epitop của DLL4 của một loài khác (ví dụ, chuột), và protein liên kết DVD-Ig liên kết với epitop

của DLL4 của người và epitop của một phân tử đích khác (ví dụ, VEGFR2 hoặc VEGFR1).

"Vị trí liên kết kháng nguyên chức năng" của protein liên kết là vị trí có khả năng liên kết với kháng nguyên đích. Ái lực liên kết kháng nguyên của vị trí liên kết kháng nguyên không cần mạnh như kháng thể ban đầu mà có vị trí liên kết kháng nguyên đó, nhưng khả năng liên kết kháng nguyên có thể đo được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết để đánh giá liên kết kháng thể với kháng nguyên. Hơn nữa, ái lực liên kết kháng nguyên của mỗi vị trí trong số các vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể nhiều hóa trị ở đây không cần định lượng giống nhau.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "chất nhận" và "kháng thể nhận" đề cập đến kháng thể hoặc trình tự axit nucleic tạo ra hoặc mã hóa ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc 100% trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng khung (các FR). Theo một số phương án, thuật ngữ "chất nhận" đề cập đến trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể tạo ra hoặc mã hóa (các) vùng bảo toàn. Theo một phương án khác, thuật ngữ "chất nhận" đề cập đến trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể tạo ra hoặc mã hóa một hoặc nhiều vùng khung và (các) vùng bảo toàn. Theo phương án cụ thể, thuật ngữ "chất nhận" đề cập đến trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể của người mà tạo ra hoặc mã hóa ít nhất 80%, tốt hơn là, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc 100% trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng khung. Theo phương án này, chất nhận có thể chứa ít nhất 1, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, hoặc ít nhất 10 gốc axit amin mà không có ở một hoặc nhiều vị trí cụ thể của kháng thể của người. Vùng khung chất nhận và/hoặc (các) vùng bảo toàn chất nhận ví dụ có thể có nguồn gốc hoặc thu được từ gen kháng thể dòng mầm, gen kháng thể trưởng thành, kháng thể chức năng (ví dụ, kháng thể đã được biết đến trong lĩnh vực này, kháng thể đang tìm kiếm, hoặc kháng thể có bán trên thị trường).

Theo sáng chế, thuật ngữ gốc "chuẩn" đề cập đến gốc trong CDR hoặc khung mà xác định cấu trúc CDR chuẩn cụ thể như được xác định bởi Chothia et al. (J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227: 799-817 (1992), cả hai được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo Chothia et al., các phần chính của các CDR của nhiều kháng thể có cấu hình khung peptit chính gần giống nhau mặc dù tính đa dạng ở mức độ trình tự axit amin lớn. Mỗi cấu trúc chuẩn chỉ ra tập hợp đầu tiên của các góc xoắn của khung peptit chính của phần kề nhau của các gốc axit amin tạo thành vòng.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "chất cho" và "kháng thể cho" đề cập đến kháng thể tạo ra một hoặc nhiều CDR. Theo phương án ưu tiên, kháng thể cho là kháng thể từ loại khác với kháng thể mà vùng khung thu được hoặc có nguồn gốc từ đó. Trong phần nội dung của kháng thể được làm tương thích với người, thuật ngữ "kháng thể cho" đề cập đến kháng thể không phải của người tạo ra một hoặc nhiều CDR.

Theo sáng chế, thuật ngữ "khung" hoặc "trình tự khung" đề cập đến trình tự còn lại của vùng biến đổi không có các CDR. Bởi vì định nghĩa chính xác của trình tự CDR có thể được xác định bằng các hệ thống khác nhau (ví dụ, xem ở trên), nghĩa của trình tự khung được hiểu khác nhau tương ứng. Sáu CDR (CDR-L1, -L2, và -L3 của chuỗi nhẹ và CDR-H1, -H2, và -H3 của chuỗi nặng) cũng chia các vùng khung trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thành bốn phân vùng (FR1, FR2, FR3, và FR4) trên mỗi chuỗi, trong đó CDR1 có vị trí giữa FR1 và FR2, CDR2 giữa FR2 và FR3, và CDR3 giữa FR3 và FR4. Không được chỉ rõ như các phân vùng cụ thể như FR1, FR2, FR3, hoặc FR4, vùng khung, như được đề cập đến khác, biểu diễn các FR tổ hợp trong vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch đơn xuất hiện một cách tự nhiên. Theo sáng chế, FR biểu diễn các phân vùng bốn, và các FR biểu diễn hai hoặc nhiều phân vùng bốn tạo thành vùng khung.

Các trình tự khung chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người (FR) đã được biết trong lĩnh vực này mà có thể được sử dụng như trình tự khung "chất nhận" chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (hoặc đơn giản là, trình tự "chất nhận") để làm cho có tính người kháng thể không phải của người bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án của sáng chế, các trình tự nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người được chọn từ trình tự khung được liệt kê trong cơ sở dữ liệu có sẵn công khai như là cơ sở V (quy trình chuyển siêu văn bản://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) hoặc trong hệ thống thông tin quốc tế ImMunoGenTics® (hệ thống thông tin IMGT®) (quy trình chuyển siêu văn bản://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGens/). Bảng 3, bên dưới, cung cấp danh sách không giới hạn của các ví dụ của trình tự nhận chuỗi nặng người đã được biết trong lĩnh vực này. Bảng 4, bên dưới, cung cấp danh sách không giới hạn của các ví dụ của trình tự nhận chuỗi nhẹ người đã được biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người được chọn từ trình tự axit amin được mô tả trong Bảng 3 và Bảng 4, bên dưới, tuy nhiên, các trình tự nhận chuỗi nặng và nhẹ người khác không được liệt kê trong các bảng 3 và 4 có thể cũng được sử dụng để làm cho có tính người kháng thể theo sáng chế.

Bảng 3. Trình tự nhận chuỗi nặng

SEQ ID NO:	Vùng protein / Họ dòng mầm gần nhất	Trình tự axit amin
		12345678901234567890123456789012
11	VH3-7 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
12	VH3-7 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
13	VH3-7 FR3	RFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
14	JH4 FR4	WGQGTLLTVVSS
15	VH3 liên ứng FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3 liên ứng FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3 liên ứng FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
18	JH4 FR4	WGQGTLLTVVSS
19	VH1-46 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
20	VH1-46 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
21	VH1-46 FR3	RVTMTTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAR
22	JH4 FR4	WGQGTLLTVVSS
23	VH3-30 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS
24	VH3-30 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
25	VH3-30 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR
26	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
27	VH3 liên ứng FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
28	VH3 liên ứng FR2	WVRQAPGKGLEWVS
29	VH3 liên ứng FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR
30	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
31	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRSGPALVKPTQTTLTCTFSGFSL
32	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
33	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDT SKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
34	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
35	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETTLTCTVSGFSL
36	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
37	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDT SKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
38	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
39	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
40	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
41	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDD SKNSLYLQMNSLKTED TAVYYCAR
42	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
43	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
44	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
45	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR
46	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
47	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFS
48	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
49	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
50	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
51	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
52	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
53	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
54	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
55	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPTẬP HọPLSLTCTVSGGSIS
56	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG

SEQ ID NO:	Vùng protein / Họ dòng mầm gần nhất	Trình tự axit amin
57	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
58	IGHV4-59/JH FR4	WGQGLTVTVSS
59	IGHV3-66 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
60	IGHV3-66 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
61	IGHV3-66 FR3	RVTISVDTSKNSFYLMNSLRAEDTAVYYCAR
62	IGHV3-66/JH FR4	WGQGLTVTVSS
63	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
64	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
65	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLLKLSSVRAEDTAVYYCAR
66	IGHV4-59/JH FR4	WGQGLTVTVSS
67	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
68	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
69	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYYCAR
70	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
71	IGHV2-70 FR1	EVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS
72	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
73	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDATYYCAR
74	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
75	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
76	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
77	IGHV3-15 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
78	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
79	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
80	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
81	IGHV3-43 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
82	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMTVTVSS

Bảng 4. Trình tự nhận chuỗi nhẹ

SEQ ID NO:	Vùng protein/ Họ dòng mầm gần nhất	Trình tự
		12345678901234567890123456789012
83	O2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
84	O2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
85	O2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
86	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
87	L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGEGCHUỘTLSC
88	L2 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
89	L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
90	JK2 FR4	FGQGTKLEIK
91	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGEGCHUỘTINC
92	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
93	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
94	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
95	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGEGCHUỘTLSC
96	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
97	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
98	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
99	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC

SEQ ID NO:	Vùng protein/ Họ dòng mầm gần nhất	Trình tự
100	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
101	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
102	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
103	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
104	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
105	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
106	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
107	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
108	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
109	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
110	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
111	IGLV3-1 FR1	syeltqppsvsvspgqtasitc
112	IGLV3-1 FR2	wyqqkpgqspvlviy
113	IGLV3-1 FR3	giperfsgsngsgdtatltisgtqpmdeadyyc
114	IGLV3-1/JL FR4	ggggtkltvlg
115	IGLV3-1 FR1	yeltqppsvsvspgqtasitc
116	IGLV3-1 FR2	wyqqkpgqspvlviy
117	IGLV3-1 FR3	giperfsgsngsgdtatltisgtqpmdeadyyc
118	IGLV3-1/JL FR4	ggggtkltvlg
119	IGLV3-1 FR1	lyvltqppsvsvspgqtasitc
120	IGLV3-1 FR2	wyqqkpgqspvlviy
121	IGLV3-1 FR3	giperfsgsngsgdtatltisgtqtmdeadylc
122	IGLV3-1/JL FR4	fgggtkvtvlg
123	IGKV6D-21 FR1	eyvltqspdfqsvtpkekvtitc
124	IGKV6D-21 FR2	wyqqkpdqspklviy
125	IGKV6D-21 FR3	gvpsrfsgsngsgddatltinsleadaatyyyc
126	IGKV6D-21/JK FR4	fgggtkveikr
127	IGKV3D-15 FR1	Eyvltqspatlsvspgeratlsc
128	IGKV3D-15 FR2	Wyqqkpgqsprlviy
129	IGKV3D-15 FR3	diparfsgsngsgdeatltisslqsedfavyyyc
130	IGKV3D-15/JK FR4	Fgggtrleikr
131	IGKV4-1 FR1	dyvltqspdslavslgeratinc
132	IGKV4-1 FR2	wyqqkpgqspklviy
133	IGKV4-1 FR3	gipdrfsgsngsgddatltisslqaedvavyyyc
134	IGKV4-1/JK FR4	fgggtkveikr
135	IGLV3-1 FR1	lpvltqppsvsvspgqtasitc
136	IGLV3-1 FR2	wyqqkpgqspvlviy
137	IGLV3-1 FR3	giperfsgsngsgntatltisgtqtmdeadylc
138	IGLV3-1/JL FR4	fgggtkvtvl
139	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
140	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
141	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
142	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

Theo một phương án, các trình tự khung nhận của người chuỗi nặng từ Bảng 3 để sử dụng trong việc tạo kháng thể được làm tương thích với người liên kết với DLL4 theo sáng chế bao gồm tập hợp bao gồm trình tự nhận VH3-7 FR1, VH3-7 FR2, VH3-7 FR3,

và JH4 FR4; tập hợp bao gồm trình tự nhận VH3 liên ứng FR1, VH3 liên ứng FR2, VH3 liên ứng FR3, và JH4 FR4; tập hợp bao gồm trình tự nhận VH1-46 FR1, VH1-46 FR2, VH1-46 FR3, và JH4 FR4; tập hợp bao gồm trình tự nhận VH3-30 FR1, VH3-30 FR2, VH3-30 FR3, và JH3 FR4; và tập hợp bao gồm trình tự nhận VH3 liên ứng FR1, VH3 liên ứng FR2, VH3 liên ứng FR3 và JH3 FR4.

Theo một phương án, trình tự khung nhận của người chuỗi nhẹ từ Bảng 4 để sử dụng tạo ra kháng thể được làm tương thích với người liên kết DLL4 theo sáng chế bao gồm tập hợp bao gồm các trình tự nhận O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, và JK2 FR4 và tập hợp bao gồm trình tự nhận L2 FR1, L2 FR2, L2 FR3, và JK2 FR4.

Theo một phương án, tập hợp trình tự khung nhận của người để sử dụng tạo ra kháng thể được làm tương thích với người liên kết DLL4 theo sáng chế chứa một hoặc nhiều (ví dụ, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tám bất kỳ trong vùng liên kết) của trình tự khung nhận được chọn từ nhóm bao gồm:

khung chuỗi nặng-1 (H-FR1): E-V-Q-L-V-E-S-G-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-X₃₀ (SEQ ID NO:143), trong đó X₃₀ là S, R, hoặc G;

khung chuỗi nặng-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (SEQ ID NO:144);

khung chuỗi nặng-3 (H-FR3): R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R (SEQ ID NO:145), trong đó;

X₁₁ là N hoặc S; và

X₃₁ là A hoặc S;

khung chuỗi nặng-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (SEQ ID NO:146);

khung chuỗi nhẹ-1 (L-FR1): D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (SEQ ID NO:147);

khung chuỗi nhẹ-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-X₁₅ (SEQ ID NO:148), trong đó;

X₉ là A hoặc S; và

X₁₅ là F hoặc Y;

khung chuỗi nhẹ-3 (L-FR3): G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (SEQ ID NO:149), trong đó;

X₁₅ là F hoặc S; và

khung chuỗi nhẹ-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (SEQ ID NO:150).

Theo phương án ưu tiên, kháng thể liên kết DLL4 theo sáng chế được làm tương thích với người bằng cách sử dụng tập hợp trình tự nhận của người bao gồm trình tự nhận H-FR1, H-FR2, H-FR3, H-FR-4, L-FR1, L-FR2, L-FR3, và L-FR4 được mô tả ở trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ "gen kháng thể dòng mầm" hoặc "đoạn gen" đề cập đến trình tự globulin miễn dịch được mã hóa bởi các tế bào không phải lymphô mà không trải qua quy trình thuần thực dẫn đến sự tái sắp xếp gen và đột biến để biểu hiện globulin miễn dịch cụ thể. (Ví dụ xem, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol., 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv. Exp. Med. Biol., 484:13-30 (2001)). Một ưu điểm được đưa ra bởi nhiều phương án của sáng chế xuất phát từ việc nhận biết rằng các gen kháng thể dòng mầm có vẻ thích hợp hơn các gen kháng thể thuần thực trong việc bảo tồn đặc tính cấu trúc trình tự axit amin thiết yếu của các cá nhân trong các loài, do đó có vẻ ít phù hợp để được nhận biết từ nguồn lạ khi được sử dụng điều trị trong các loài đó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "gốc chính" đề cập đến các gốc nhất định trong vùng biến đổi mà có nhiều ảnh hưởng đến tính đặc hiệu liên kết và/hoặc ái lực của kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người. Gốc chính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều gốc sau đây: gốc ở cạnh CDR, vị trí glycosyl hóa tiềm năng (có thể là vị trí glycosyl hóa N hoặc O), gốc hiếm, gốc có thể tương tác với kháng nguyên, gốc có thể tương tác với CDR, gốc chuẩn, gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, gốc trong vùng Vernier, và gốc trong vùng chồng lên giữa định nghĩa Chothia của CDR1 chuỗi nặng biến đổi và định nghĩa Kabat của khung chuỗi nặng đầu tiên.

Theo sáng chế, vùng "Vernier" đề cập đến tập hợp con của các gốc khung mà có thể điều chỉnh cấu trúc CDR và tinh chỉnh chúng phù hợp với kháng nguyên như được mô tả bởi Foote và Winter (J. Mol. Biol., 224: 487-499 (1992)). Các gốc trong vùng Vernier tạo thành lớp nằm dưới các CDR và có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của các CDR và ái lực của kháng thể.

Theo sáng chế, thuật ngữ "trung hòa" đề cập đến việc làm mất hoạt tính sinh học của kháng nguyên khi protein liên kết liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một phương án, protein liên kết trung hòa liên kết kháng nguyên và làm giảm hoạt tính sinh học của nó ít nhất khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc nhiều hơn.

Thuật ngữ "hoạt tính" bao gồm các hoạt động như là tính đặc hiệu liên kết/ái lực của kháng thể với kháng nguyên, ví dụ, kháng thể kháng hDLL4 mà liên kết với kháng nguyên DLL4 và/hoặc hiệu lực trung hòa của kháng thể, hoặc kháng thể kháng hDLL4 của người liên kết với hDLL4 ức chế hoạt tính sinh học của hDLL4, ví dụ ức chế sự tăng sinh phun PHA hoặc ức chế liên kết thụ thể trong thử nghiệm liên kết thụ thể Notch người, hoặc thử nghiệm tạo ra interferon-gama phun PHA.

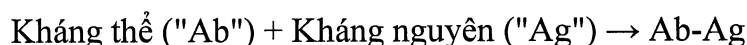
Thuật ngữ "epitop" bao gồm yếu tố quyết định polypeptit bất kỳ mà liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T. Theo các phương án nhất định, các yếu tố quyết định epitop bao gồm các nhóm hoạt động bề mặt hóa học của các phân tử như là các axit amin, các chuỗi phụ đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc trưng, và/hoặc các đặc tính điện tích đặc trưng. Epitop là vùng kháng nguyên mà được liên kết bởi kháng thể. Do đó, epitop bao gồm các gốc axit amin của vùng kháng nguyên (hoặc đoạn của nó) đã được biết là liên kết với vị trí bổ sung trên vùng liên kết đặc hiệu. Kháng nguyên hoặc đoạn kháng nguyên có thể chứa hơn một epitop. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng mỗi "vị trí liên kết kháng nguyên" của phân tử kháng thể liên kết epitop của phân tử kháng nguyên và mỗi phân tử kháng nguyên có một, hai, vài, hoặc nhiều epitop. Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng hai kháng thể được phân lập độc lập của phân tử kháng nguyên có thể liên kết với cùng một epitop hoặc với hai epitop khác nhau trên phân tử kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được gọi là liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi nó nhận ra kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức của các protein và/hoặc các cao phân tử. Kháng thể được gọi là "liên kết với cùng một epitop" nếu kháng thể cạnh tranh chéo (kháng thể ngăn cản tác dụng liên kết hoặc điều hòa của kháng thể khác). Ngoài ra, các định nghĩa cấu trúc của epitop (chồng lên nhau, giống nhau, đồng nhất) có nhiều tài liệu, nhưng các định nghĩa chức năng thường có liên quan khi chúng bao gồm các thông số cấu trúc (sự liên kết) và chức năng (sự điều hòa, cạnh tranh).

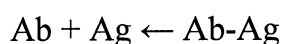
Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt," theo sáng chế, đề cập đến hiện tượng quang học mà cho phép phân tích các tương tác đặc hiệu sinh học theo thời gian thực bằng việc dò các thay đổi của nồng độ protein trong khuôn cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ BIAcore® (BIAcore InteARNtional AB, công ty GE Healthcare,

Uppsala, Sweden và Piscataway, New Jersey, Hoa Kỳ). Các mô tả hơn nữa, xem Jönsson et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26 (1993); Jönsson et al. *Biotechnology*, 11: 620-627 (1991); Jönsson et al., *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131 (1995); và Jönsson et al., *Anal. Biochem.*, 198: 268-277 (1991).

Thuật ngữ " K_{on} ", theo sáng chế, dự định đề cập đến hằng số tốc độ kết hợp của liên kết của protein liên kết (ví dụ, kháng thể) với chất phản ứng cùng gốc (ví dụ, kháng nguyên) để tạo thành phức hợp chất phản ứng liên kết /chất phản ứng cùng gốc (ví dụ, kháng thể/kháng nguyên) như đã được biết trong lĩnh vực này. " K_{on} " cũng được biết đến như "hằng số tốc độ kết hợp," hoặc " k_a ," mà có thể sử dụng thay thế lẫn nhau theo sáng chế. Giá trị này chỉ ra tốc độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên đích của nó hoặc tốc độ của sự hình thành phức giữa kháng thể và kháng nguyên cũng được mô tả bởi phương trình:



Thuật ngữ " K_{off} " theo sáng chế, dự định đề cập đến hằng số tốc độ phân ly protein liên kết (ví dụ, kháng thể) từ, ví dụ, phức kháng thể/kháng nguyên như đã được biết trong lĩnh vực này. " K_{off} " cũng được biết bởi các thuật ngữ "hằng số tốc độ phân ly" hoặc " k_d " được sử dụng thay thế lẫn nhau theo sáng chế. Giá trị này chỉ ra tốc độ phân ly của kháng thể từ kháng nguyên đích của nó hoặc sự phân tách của phức Ab-Ag theo thời gian thành kháng thể và kháng nguyên tự do như được mô tả bởi phương trình sau:



Thuật ngữ "hằng số phân ly cân bằng" hoặc " K_D ", như được sử dụng thay thế lẫn nhau theo sáng chế, đề cập đến giá trị thu được trong phương pháp đo chuẩn độ ở mức cân bằng, hoặc bằng việc chia hằng số tốc độ phân ly (K_{off}) cho hằng số tốc độ kết hợp (K_{on}). Hằng số tốc độ kết hợp, hằng số tốc độ phân ly, và hằng số phân ly cân bằng được sử dụng để biểu diễn ái lực liên kết của kháng thể với kháng nguyên. Phương pháp xác định hằng số tốc độ kết hợp và phân ly đã được biết đến trong lĩnh vực này. Sử dụng các kỹ thuật dựa trên huỳnh quang đưa ra sự nhạy cao và khả năng kiểm tra các mẫu trong dung dịch đệm sinh lý ở cân bằng. Các nghiên cứu và thiết bị thí nghiệm khác như là thí nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIAcore® (phân tích tương tác phân tử sinh học) có thể được sử dụng (ví dụ, thiết bị có bán sẵn BIAcore InteARNtional AB, công ty GE Healthcare, Uppsala, Thụy điển). Ngoài ra, thí nghiệm KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), có bán bởi Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) có thể cũng được sử dụng.

"Chất đánh dấu" và "chất đánh dấu có thể dò được" nghĩa là gốc gắn vào chất phản ứng liên kết đặc hiệu, như là kháng thể hoặc chất phân tích được liên kết bằng kháng thể, ví dụ, để tạo ra phản ứng giữa các thành viên của cặp liên kết đặc hiệu, như là kháng thể và chất phân tích, có thể dò được. Chất phản ứng liên kết đặc hiệu, ví dụ, kháng thể hoặc chất phân tích, mà được đánh dấu được đề cập đến như là "đánh dấu có thể dò được". Do đó, thuật ngữ "protein liên kết được đánh dấu" theo sáng chế, đề cập đến protein có chất đánh dấu được đưa vào để tạo ra sự nhận biết protein liên kết. Theo một phương án, chất đánh dấu là chất đánh dấu có thể dò được mà có thể tạo ra tín hiệu mà có thể dò được bằng phương pháp nhìn hoặc máy, ví dụ, đưa axit amin có đánh dấu phóng xạ hoặc gắn vào polypeptit của các gốc biotinyl mà có thể được dò bằng avidin đánh dấu (ví dụ, avidin hoặc streptavidin chứa chất đánh dấu huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể dò được bằng phương pháp quang học hoặc đo màu). Các ví dụ của chất đánh dấu cho các polypeptit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất sau đây: đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , và ^{153}Sm); thể nhuộm sắc, các chất đánh dấu huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, và lantanit photpho), chất đánh dấu enzym (ví dụ, peroxidaza cây cải ngựa, luciferaza, phosphataza kiềm); chất đánh dấu phát quang hóa học; các nhóm biotinyl; các epitop polypeptit được xác định trước được nhận ra bởi chất thông báo thứ hai (ví dụ, trình tự cặp chặn kéo leuxin, các vị trí liên kết cho kháng thể thứ hai, vùng liên kết kim loại, và các thể epitop); và các chất có từ tính, như là gadolini chelat. Các ví dụ điển hình của các chất đánh dấu thường được dùng trong các thử nghiệm miễn dịch bao gồm các gốc mà phát sáng, ví dụ, hợp chất acridinium, và các gốc phát huỳnh quang, ví dụ, fluoretxein. Các chất đánh dấu khác đã được biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả theo sáng chế. Về điểm này, gốc bản thân nó có thể không được đánh dấu có thể dò được nhưng có thể trở nên dò được nhờ vào phản ứng với một gốc khác nữa. Sử dụng "đánh dấu có thể dò được" dự định bao gồm kiểu cuối cùng của việc đánh dấu có thể dò được.

Thuật ngữ "kháng thể liên hợp" đề cập đến protein liên kết, như là kháng thể, được liên kết hóa học với gốc hóa học thứ hai, như là chất có tác dụng điều trị hoặc chất gây độc tế bào. Thuật ngữ "chất" được sử dụng ở đây để biểu thị hợp chất hóa học, hỗn hợp của các hợp chất hóa học, cao phân tử sinh học, hoặc dịch chiết được tạo ra từ các nguyên liệu sinh học. Tốt hơn là, chất có tác dụng điều trị hoặc gây độc tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độc tố ho gà, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium

bromua, emetin, mitomycin, etoposit, tenoposit, vincristin, vinblastin, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dion, mitoxantron, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, các glucocorticoit, procain, tetracain, lidocain, propranolol, và puromycin và các chất tương tự hoặc các đồng đẳng của nó.

Các thuật ngữ "tinh thể" và "được kết tinh" theo sáng chế, đề cập đến protein liên kết (ví dụ, kháng thể), hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà tồn tại ở dạng tinh thể. Các tinh thể là một dạng vật chất ở trạng thái rắn, mà khác với các dạng khác như là trạng thái rắn vô định hình hoặc trạng thái kết tinh lỏng. Các tinh thể bao gồm các dãy thông thường, lặp lại, ba chiều của các nguyên tử, các ion, các phân tử (ví dụ, các protein như là kháng thể), hoặc tập hợp phân tử (ví dụ, phức hợp kháng nguyên/kháng thể, bao gồm phức hợp Fab/kháng nguyên). Các dãy ba chiều này được sắp xếp theo các mối quan hệ toán học đặc biệt mà đã được hiểu đến trong lĩnh vực. Đơn vị cơ bản, hoặc khối đơn thể, mà được lặp lại trong tinh thể được gọi là đơn vị không đối xứng. Sự lặp lại của đơn vị không đối xứng trong sự sắp xếp mà làm phù hợp với tính đối xứng tinh thể học hoàn toàn xác định đã cho tạo ra "tế bào đơn vị" của tinh thể. Sự lặp lại tế bào đơn vị bằng sự dịch chuyển thông thường trong cả ba chiều tạo ra tinh thể. Xem, Giegé et al., trong bài báo Crystallization of Axit nucleic and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., (Ducruix và Giegé, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), chương 1, các trang 1-16.

Thuật ngữ "polynucleotit" nghĩa là dạng polyme của hai hoặc nhiều nucleotit, các ribonucleotit hoặc các deoxyribonucleotit hoặc dạng biến đổi của mỗi kiểu trong số nucleotit đó. Thuật ngữ bao gồm dạng ADN sợi đơn và kép.

Thuật ngữ "polynucleotit được phân lập" sẽ có nghĩa polynucleotit (ví dụ, của hệ gen, cADN, hoặc nguồn gốc tổng hợp, hoặc một số kết hợp của chúng) mà, theo nguồn gốc của nó, "polynucleotit được phân lập" không liên quan với tất cả hoặc một phần của polynucleotit với "polynucleotit được phân lập" được tìm thấy trong tự nhiên; được liên kết thực hiện được với polynucleotit mà không được liên kết với trong tự nhiên; hoặc không xuất hiện trong tự nhiên như là một phần của trình tự lớn hơn.

Thuật ngữ "vector" dự định đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một axit nucleic khác đến phân tử mà nó liên kết. Một kiểu vector là "plasmid", đề cập đến vòng ADN sợi đôi tròn trong đó các đoạn ADN khác có thể được buộc. Một kiểu vector khác là vector virus, trong đó các đoạn ADN khác có thể được buộc vào hệ

gen virut. Các vector nhất định có khả năng sao chép tự sinh trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, các vector vi khuẩn có bản chất sao chép của vi khuẩn và các vector động vật có vú ở thể bổ sung). Các vector khác (ví dụ, các vector động vật có vú không ở thể bổ sung) có thể được liên hợp vào hệ gen của tế bào chủ nhờ đưa vào tế bào chủ, và do đó được sao chép cùng với hệ gen chủ. Hơn nữa, các vector nhất định có khả năng hướng vào biểu hiện của các gen mà chúng có thể thực hiện liên kết. Các vector này được đề cập ở đây như "các vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là, "các vector biểu hiện"). Nói chung, các vector biểu hiện sử dụng trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vector" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau như plasmit là dạng được sử dụng thông thường nhất của vector. Tuy nhiên, sáng chế dự định bao gồm các dạng khác của vector biểu hiện này, như là vector virut (ví dụ, retrovirut không có khả năng tự sao chép, adenovirut và virut có liên quan đến adenovirut), mà có các chức năng tương đương. Các phiên bản ARN của các vector (bao gồm ARN vector virut) có thể cũng tìm sử dụng trong sáng chế.

Thuật ngữ "có thể thực hiện liên kết" đề cập đến vị trí kề nhau trong đó các thành phần được mô tả ở trong mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo cách dự định của chúng. Trình tự chúng "có thể thực hiện liên kết" với trình tự mang mã được buộc vào theo cách này mà biểu hiện của trình tự mang mã đạt được dưới các điều kiện tương thích với trình tự chúng. Trình tự "có thể thực hiện liên kết" bao gồm trình tự chúng biểu hiện mà kề với gen đang quan tâm, trình tự chúng biểu hiện mà hoạt động *in trans*, nghĩa là, định vị trên phân tử axit nucleic khác gen đang quan tâm, cũng như trình tự chúng biểu hiện mà định vị trên cùng một phân tử axit nucleic đó, nhưng ở khoảng cách, so với gen đang quan tâm. Thuật ngữ "trình tự chúng biểu hiện" theo sáng chế đề cập đến trình tự polynucleotit mà cần để ảnh hưởng đến sự biểu hiện và quá trình xử lý của trình tự mang mã với trình tự mà chúng liên kết. Trình tự chúng biểu hiện bao gồm trình tự ban đầu, trình tự kết thúc sao chép thích hợp, trình tự ban đầu (chất khởi đầu) và trình tự tăng cường; các tín hiệu xử lý ARN hiệu quả như là các tín hiệu ghép nối và adenyl hóa nhiều lần; trình tự mà ổn định mARN bào tương; trình tự mà tăng cường hiệu quả dịch mã (nghĩa là, trình tự liên ứng Kozak); trình tự mà thúc đẩy độ ổn định protein; và khi muốn, trình tự mà tăng cường bài tiết protein. Bản chất của trình tự chúng này khác nhau phụ thuộc vào sinh vật chủ; trong sinh vật chưa có nhân thực, trình tự chúng này nhìn chung bao gồm gen khởi đầu, vị trí liên kết ribôsom, và trình tự kết

thức sao chép; trong sinh vật có nhân thực, nhìn chung, trình tự chứng này bao gồm gen khởi đầu và trình tự kết thúc sao chép. Thuật ngữ "trình tự chứng" dự định bao gồm các thành phần mà sự có mặt của chúng là cần thiết cho sự biểu hiện và quá trình xử lý, và có thể cũng bao gồm các thành phần khác mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, trình tự dẫn đầu và trình tự chất kết hợp.

"Quá trình biến đổi" đề cập đến quy trình bất kỳ bởi axit nucleic ngoại sinh (ví dụ, phân tử ADN) nhập vào tế bào chủ. Quá trình biến đổi có thể xảy ra trong các điều kiện tự nhiên hoặc nhân tạo bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Quá trình biến đổi có thể dựa vào phương pháp đã biết bất kỳ để chèn trình tự axit nucleic lạ vào tế bào chủ chưa có nhân điển hình hoặc nhân thực. Phương pháp được chọn dựa vào tế bào chủ được biến đổi và có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự hấp thu plasmit qua màng tế bào, nhiễm trùng virus, điện di, lipofection, và sự bắn phá hạt. Các tế bào "bị biến đổi" bao gồm các tế bào biến đổi ổn định trong đó ADN chèn vào có khả năng sao chép như plasmit tự sao chép hoặc như một phần của nhiễm sắc thể chủ. Chúng cũng bao gồm các tế bào mà biểu hiện nhất thời ADN hoặc ARN chèn vào trong các khoảng thời gian giới hạn.

Thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "tế bào chủ"), dự định đề cập đến tế bào trong đó ADN ngoại sinh được đưa vào. Theo một phương án, tế bào chủ chứa hai hoặc nhiều (ví dụ, nhiều) axit nucleic mã hóa kháng thể, như là, bằng cách ví dụ nhưng không bị giới hạn, tế bào chủ được mô tả trong US 7,262,028. Các thuật ngữ này dự định đề cập đến không chỉ tế bào đối tượng cụ thể, nhưng, còn đề cập đến thế hệ sau của tế bào này. Bởi vì các biến đổi nhất định có thể xảy ra trong các thế hệ tiếp theo do đột biến hoặc các ảnh hưởng của môi trường, thế hệ sau này thực tế có thể không giống hệt tế bào cha mẹ, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ bao gồm các tế bào nhân chưa có nhân điển hình và nhân thực được chọn từ các giới bất kỳ của đời sống. Theo một phương án khác, các tế bào nhân thực bao gồm các tế bào sinh vật đơn bào, nấm, thực vật và động vật. Theo một phương án khác, tế bào chủ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các loài chưa có nhân điển hình, *Escherichia coli* này; các dòng tế bào động vật có vú, như là CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2, và PER.C6; dòng tế bào côn trùng Sf9; và các loại tế bào nấm, như là *Saccharomyces cerevisiae*.

Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, sự tổng hợp oligonucleotit, và quá trình nuôi cấy mô và quá trình biến đổi (ví dụ, điện di, lipofection). Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo bản mô tả của nhà sản xuất hoặc như được thực hiện thông thường trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả theo sáng chế. Các kỹ thuật và các quy trình đã nêu trên nhìn chung có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường đã được biết đến trong lĩnh vực này và như được mô tả trong nhiều tài liệu tham khảo chung và nhiều tài liệu tham khảo cụ thể mà được viện dẫn và được thảo luận trong suốt bản mô tả sáng chế này. Ví dụ xem, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

"Sinh vật chuyển gen," như được biết trong lĩnh vực này, đề cập đến sinh vật có các tế bào chứa gen chuyển đổi, trong đó gen chuyển đổi được đưa vào sinh vật (hoặc tổ tiên của sinh vật) biểu hiện polypeptit không được biểu hiện một cách tự nhiên trong sinh vật. "Gen chuyển đổi" là cấu trúc ADN, mà được liên hợp ổn định và có thể thực hiện được vào hệ gen của tế bào từ đó sinh vật chuyển gen phát triển, hướng vào sự biểu hiện của sản phẩm gen được mã hóa trong một hoặc nhiều kiểu tế bào hoặc mô của sinh vật chuyển gen.

Thuật ngữ "điều chỉnh" và "điều hòa" được sử dụng thay thế lẫn nhau, và, theo sáng chế, đề cập đến sự thay đổi hoặc sự biến đổi trong hoạt tính của phân tử đang quan tâm (ví dụ, hoạt tính sinh học của hDLL4). Sự điều hòa có thể là cường độ của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử đang quan tâm tăng hoặc giảm. Các hoạt tính và chức năng ví dụ của phân tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đặc tính liên kết, hoạt tính enzym, sự hoạt hóa thụ thể tế bào, và sự truyền tín hiệu.

Do đó, thuật ngữ "chất điều hòa" theo sáng chế, là hợp chất có khả năng làm thay đổi hoặc biến đổi hoạt tính hoặc chức năng của phân tử đang quan tâm (ví dụ, hoạt tính sinh học của hDLL4). Ví dụ, chất điều hòa có thể gây ra tăng hoặc giảm cường độ của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với cường độ của hoạt tính hoặc chức năng được quan sát khi không có chất điều hòa. Theo các phương án nhất định, chất điều hòa là chất ức chế, mà làm giảm cường độ của ít nhất một hoạt tính hoặc chức năng của phân tử. Các chất ức chế ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, peptit, kháng thể, các peptibody, carbohydrat hoặc các phân tử hữu cơ nhỏ. Các peptibody đã được mô tả. Ví dụ xem, công bố đơn PCT số WO01/83525.

Thuật ngữ "chất chủ vận", theo sáng chế, đề cập đến chất điều hòa mà, khi tiếp xúc với phân tử đang quan tâm, khiến tăng cường độ của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với cường độ của hoạt tính hoặc chức năng được quan sát khi không có mặt chất chủ vận. Các chất chủ vận cụ thể đang quan tâm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trong con đường tín hiệu Notch, Polypeptit DLL4 và axit nucleic, carbohydrat, hoặc các phân tử khác bất kỳ liên kết với DLL4.

Thuật ngữ "chất đối vận" hoặc "chất ức chế", theo sáng chế, đề cập đến chất điều hòa mà, khi tiếp xúc với phân tử đang quan tâm gây giảm cường độ của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với cường độ của hoạt tính hoặc chức năng được quan sát khi không có chất đối vận. Các chất đối vận cụ thể đang quan tâm bao gồm các chất mà ngăn cản hoặc điều hòa hoạt tính sinh học hoặc miễn dịch của DLL4, đặc biệt là DLL4 của người (hDLL4). Các chất đối vận và các chất ức chế của hDLL4 có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, axit nucleic, carbohydrat, hoặc phân tử khác bất kỳ, mà liên kết với hDLL4 và/hoặc DLL4 của động vật gặm nhấm.

Theo sáng chế, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" đề cập đến lượng chất điều trị mà đủ để làm giảm hoặc cải thiện mức độ nặng và/hoặc khoảng cách xảy ra rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó; ức chế hoặc phòng ngừa sự tiến bộ của rối loạn; gây ra sự thoái lui của rối loạn; ức chế hoặc phòng ngừa sự tái phát, sự phát triển, sự khởi phát, hoặc sự tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến rối loạn; phát hiện rối loạn; hoặc làm tăng hoặc cải thiện (các) tác dụng phòng hoặc điều trị của một liệu pháp điều trị khác (ví dụ, chất phòng hoặc điều trị).

"Bệnh nhân" và "đối tượng" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau theo sáng chế đề cập đến động vật, như là động vật có vú, bao gồm động vật linh trưởng (ví dụ, người, khỉ, và tinh tinh), động vật không phải linh trưởng (ví dụ, bò, lợn, lạc đà, lạc đà không bướu, ngựa, dê, thỏ, cừu, chuột đồng, chuột lang, mèo, chó, chuột, chuột, và cá voi), chim (ví dụ, vịt hoặc ngỗng), và cá mập. Tốt hơn là, bệnh nhân hoặc đối tượng là người, như là người đang được điều trị hoặc đánh giá bị bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh; người có nguy cơ bị bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh; người có bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh; và/hoặc người đang được điều trị bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh. Tốt hơn nữa là, bệnh nhân hoặc đối tượng đang được điều trị hoặc đánh giá bị ung thư hoặc bệnh khác trong đó biểu hiện DLL4 khác thường hiện nay xác nhận ung thư hoặc

bệnh khác và sự ức chế hoặc phá vỡ hoạt tính DLL4 có thể mong đợi để điều trị ung thư hoặc bệnh khác.

Thuật ngữ "mẫu," theo sáng chế, được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó. "Mẫu sinh học," theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, số lượng bất kỳ của chất từ vật sống hoặc vật trước đây sống. Các vật sống này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, người, chuột nhắt, chuột, khỉ, chó, thỏ và các động vật khác. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, (ví dụ, máu toàn phần), huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, dịch màng ối, dịch hoạt dịch, các tế bào màng trong, bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, các tế bào khác, các cơ quan, mô, tủy xương, hạch bạch huyết và lá lách.

"Thành phần," "các thành phần," và "ít nhất một thành phần," nhìn chung đề cập đến kháng thể bất giữ, kháng thể thăm dò hoặc liên hợp, chứng, bộ định cỡ, một loạt bộ định cỡ, bảng nhạy cảm, vật chứa, dung dịch đệm, chất pha loãng, muối, enzym, đồng yếu tố cho enzym, thuốc thử thăm dò, thuốc thử được xử lý trước/dung dịch, cơ chất (ví dụ, dung dịch), dung dịch dừng, và tương tự mà có thể được bao gồm trong kit để thử nghiệm của mẫu thử nghiệm, như là nước tiểu bệnh nhân, mẫu huyết thanh hoặc huyết tương, theo phương pháp được mô tả theo sáng chế và phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Do đó, trong ngữ cảnh của bản mô tả này, "ít nhất một thành phần," "thành phần," và "các thành phần" có thể bao gồm polypeptit hoặc chất phân tích khác như ở trên, như là dược phẩm chứa chất phân tích như là polypeptit, mà tùy ý được cố định trên giá rắn, như là bằng cách liên kết với kháng thể kháng chất phân tích (ví dụ, kháng polypeptit). Một số thành phần có thể ở dạng dung dịch hoặc được đông khô để hoàn nguyên để sử dụng trong thử nghiệm.

"Nguy cơ" đề cập đến khả năng hoặc xác suất của hiện tượng cụ thể xảy ra hiện tại hoặc ở một số thời điểm trong tương lai. "Sự phân tầng nguy cơ" đề cập đến một dãy các yếu tố nguy cơ lâm sàng đã biết mà cho phép thầy thuốc phân loại các bệnh nhân thành nguy cơ thấp, trung bình, cao hoặc cao nhất của sự phát triển bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể.

"Đặc biệt" và "tính đặc hiệu" trong ngữ cảnh của tương tác giữa các thành viên của cặp liên kết đặc hiệu (ví dụ, kháng nguyên hoặc đoạn của nó và kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó) đề cập đến tính phản ứng chọn lọc của tương tác. Cụm từ "liên kết đặc hiệu với" và các cụm từ tương tự đề cập đến khả năng của các protein liên kết, như là kháng thể (hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó), liên kết đặc hiệu với

phân tử đang quan tâm (hoặc đoạn của nó) và không liên kết đặc hiệu với các thực thể khác.

"Chất liên kết đặc hiệu" là một thành viên của cặp liên kết đặc hiệu. Cặp liên kết đặc hiệu chứa hai phân tử khác nhau, mà liên kết đặc hiệu với mỗi phân tử khác qua con đường hóa học hoặc vật lý. Do đó, ngoài các cặp liên kết đặc hiệu kháng nguyên và kháng thể, các cặp liên kết đặc hiệu khác có thể bao gồm biotin và avidin (hoặc streptavidin), carbohydrchuột và lectin, trình tự nucleotit bổ sung, các phân tử phản ứng và thụ thể, các đồng yếu tố và các enzym, các chất ức chế enzym và các enzym, và tương tự. Hơn nữa, các cặp liên kết đặc hiệu có thể bao gồm các thành phần mà tương tự với các thành phần liên kết đặc hiệu ban đầu, ví dụ, chất tương tự chất phân tích. Các thành phần liên kết đặc hiệu phản ứng miễn dịch bao gồm các kháng nguyên, các đoạn kháng nguyên, và kháng thể, bao gồm kháng thể đơn dòng và đa dòng cũng như các phức, các đoạn, và biến thể (bao gồm các đoạn của các biến thể) của nó, được sản xuất được phân lập hoặc tái tổ hợp.

"Biến thể" theo sáng chế nghĩa là polypeptit khác với polypeptit đã cho (ví dụ, polypeptit DLL4 hoặc kháng thể kháng DLL4) trong trình tự axit amin bằng việc thêm, (ví dụ, chèn), xóa, hoặc thay thế bảo toàn các axit amin, nhưng vẫn giữ hoạt tính sinh học của polypeptit đã cho (ví dụ, biến thể DLL4 có thể cạnh tranh DLL4 kiểu đại để liên kết với kháng thể kháng DLL4 nếu DLL4 biến thể vẫn giữ vị trí liên kết kháng thể (epitop) ban đầu của DLL4 kiểu đại). Sự thể bảo toàn của axit amin, nghĩa là, thay thế axit amin bằng axit amin khác của đặc tính tương tự (ví dụ, tính ưa nước và mức độ và sự phân bố của các vùng điện tích) được nhận ra trong lĩnh vực này thông thường là có liên quan với sự thay đổi nhỏ. Các thay đổi nhỏ này có thể được nhận biết, một phần, bằng việc xem xét chỉ số chữa bệnh bằng nước của các axit amin, như đã được biết trong lĩnh vực này (ví dụ xem, Kyte et al., J. Mol. Biol., 157: 105-132 (1982)). Chỉ số chữa bệnh bằng nước của axit amin dựa trên việc xem xét tính kỵ nước và điện tích của nó. Đã được biết trong lĩnh vực này là các axit amin có các chỉ số chữa bệnh bằng nước tương tự có thể được thay thế và vẫn giữ chức năng protein. Theo một khía cạnh, các axit amin có các chỉ số chữa bệnh bằng nước là ± 2 được thay thế. Tính ưa nước của các axit amin cũng có thể được sử dụng để phát hiện các sự thể sẽ dẫn đến các protein duy trì chức năng sinh học. Việc xem xét tính ưa nước của các axit amin trong ngữ cảnh của peptit cho phép tính toán trị số ưa nước trung bình tại chỗ lớn nhất của peptit đó, sự đo

lượng hữu ích mà được báo cáo là tương ứng tốt với tính kháng nguyên và tính sinh miễn dịch (ví dụ xem, US 4,554,101). Việc thể các axit amin có trị số ưa nước tương tự có thể dẫn đến các peptit vẫn giữ hoạt tính sinh học, ví dụ tính sinh miễn dịch, như được hiểu trong lĩnh vực này. Theo một khía cạnh, sự thể được thực hiện bằng các axit amin có trị số ưa nước là ± 2 của mỗi axit amin khác. Cả chỉ số kỵ nước và trị số ưa nước của các axit amin bị ảnh hưởng bởi chuỗi phụ cụ thể của axit amin đó. Phù hợp với quan sát này, sự thay thế axit amin mà tương thích với chức năng sinh học đã được hiểu tùy theo sự tương tự tương đối của các axit amin, và cụ thể là các chuỗi phụ của các axit amin đó, như được bộc lộ bằng tính kỵ nước, ưa nước, điện tích, kích thước, và các tính chất phụ. "Biến thể" cũng có thể được sử dụng để mô tả polypeptit hoặc đoạn của nó mà được xử lý theo cách khác nhau, như là bằng cách phân giải protein, phosphoryl hóa, hoặc sự biến đổi sau dịch mã khác, mà vẫn giữ hoạt tính sinh học hoặc tính phản ứng kháng nguyên, ví dụ, khả năng liên kết với DLL4. Sử dụng "biến thể" ở đây dự định bao gồm các đoạn biến thể trừ khi được chỉ ra khác bởi ngữ cảnh.

Thuật ngữ "mẫu", theo sáng chế, được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó. "Mẫu sinh học", theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, số lượng bất kỳ của chất từ vật sống hoặc vật trước đây sống. Các vật sống như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, người, chuột, chuột, khỉ, chó, thỏ và các động vật khác. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máu, huyết thanh, nước tiểu, dịch hoạt dịch, các tế bào, các cơ quan, mô, tủy xương, hạch bạch huyết, và lá lách.

I. Kháng thể liên kết DLL4 của người

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập chuột, hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với DLL4 với ái lực cao, tốc độ phân ly thấp, và/hoặc khả năng trung hòa cao. Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể khảm liên kết DLL4. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể ghép CDR, hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết DLL4. Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết DLL4. Theo một phương án, kháng thể, hoặc các đoạn của nó, là kháng thể được phân lập hoặc các đoạn được phân lập của nó. Theo một phương án khác, kháng thể, hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó, của sáng chế là kháng thể kháng DLL trung hòa. Thuận lợi là, kháng thể này hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết DLL4 tìm thấy sử dụng như chất có tác dụng điều trị mà

có thể được dùng cho cá nhân (người hoặc động vật có vú khác). Tốt hơn là, kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể kháng DLL4 và/hoặc kháng VEGFR2 trung hòa.

A. Phương pháp tạo kháng thể kháng DLL4

Kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các khía cạnh của nhiều kỹ thuật mà có thể được dùng để thu được kháng thể đơn dòng DLL4 theo sáng chế được mô tả bên dưới.

1. Kháng thể đơn dòng kháng DLL4 sử dụng kỹ thuật lai

Kháng thể đơn dòng có thể được bào chế sử dụng rất nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bao gồm việc sử dụng của kỹ thuật lai, tái tổ hợp, và biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc hỗn hợp của nó. Ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật lai bao gồm các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này và đã được hướng dẫn, ví dụ, trong Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, second edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., *Trong Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridoma*, (Elsevier, New York, 1981). Cần lưu ý thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" theo sáng chế không bị giới hạn ở các kháng thể được tạo ra thông qua kỹ thuật lai. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" đề cập đến kháng thể có nguồn gốc từ hệ vô tính đơn, bao gồm hệ vô tính nhân thực, chưa có nhân điển hình, hoặc thể thực khuẩn, và nó không được tạo ra bởi phương pháp nào.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo kháng thể đơn dòng cũng như kháng thể được tạo ra bằng phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào lai bài tiết kháng thể theo sáng chế trong đó, tốt hơn là, tế bào lai được tạo ra bằng việc liên hợp các tế bào lách được phân lập từ động vật, ví dụ, chuột hoặc chuột nhắt, được gây miễn dịch bằng DLL4 với các tế bào u tủy và sau đó sàng lọc các tế bào lai do việc liên hợp các hệ vô tính lai bài tiết kháng thể có khả năng liên kết polypeptit theo sáng chế. Tóm lại, chuột có thể được gây miễn dịch với kháng nguyên DLL4 (xem các ví dụ, bên dưới). Theo phương án ưu tiên, kháng nguyên DLL4 được dùng với chất phụ để kích thích đáp ứng miễn dịch. Các chất phụ này bao gồm tá dược Freund đầy đủ hoặc không đầy đủ, RIBI (các muramyl dipeptit) hoặc ISCOM (các phức kích thích miễn dịch). Các chất phụ này có thể bảo vệ polypeptit khỏi sự phân tán nhanh chóng bằng cách tách nó ra trong chất lỏng tại chỗ, hoặc chúng có thể chứa các chất mà kích thích vật chủ bài tiết các yếu tố mà là hóa chất đối với các đại thực bào và các thành phần khác của hệ miễn

dịch. Tốt hơn là, nếu dùng polypeptit, thì kế hoạch tạo miễn dịch sẽ liên quan đến hai hoặc nhiều việc dùng polypeptit, rải ra trong nhiều tuần; tuy nhiên, polypeptit dùng một lần duy nhất có thể cũng được sử dụng.

Sau khi gây miễn dịch cho động vật bằng kháng nguyên DLL4, thì có thể thu được kháng thể và/hoặc các tế bào tạo ra kháng thể từ động vật. Huyết thanh chứa kháng thể kháng DLL4 được thu từ động vật bằng cách lấy máu hoặc giết động vật. Huyết thanh có thể được sử dụng như được thu từ động vật, phần globulin miễn dịch có thể thu được từ huyết thanh, hoặc kháng thể kháng DLL4 có thể được tinh chế từ huyết thanh. Huyết thanh hoặc các globulin miễn dịch thu được theo cách này là đa dòng, do đó có một dãy đặc tính khác biệt.

Mỗi lần dò được đáp ứng miễn dịch, ví dụ, kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên DLL4 được dò trong huyết thanh chuột, thì lá lách chuột được thu lại và các tế bào lách được phân lập. Sau đó, các tế bào lách được liên hợp với các tế bào u tủy thích hợp bất kỳ bằng các kỹ thuật đã được biết đến, ví dụ các tế bào từ dòng tế bào SP20 có bán sẵn từ American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, Hoa Kỳ). Các tế bào lai được chọn và được nhân dòng bằng sự pha loãng có giới hạn. Các hệ vô tính lai sau đó được thử nghiệm bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này đối với các tế bào bài tiết kháng thể có khả năng liên kết DLL4. Dịch cổ trướng, mà nhìn chung chứa các mức kháng thể cao, có thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho chuột bằng các hệ vô tính lai dương tính.

Theo một phương án khác, các tế bào lai được làm bất tử sản xuất kháng thể có thể được bào chế từ động vật được tạo miễn dịch. Sau khi tạo miễn dịch, động vật bị giết và các tế bào B lá lách được liên hợp với các tế bào u tủy được làm bất tử như đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ xem, Harlow và Lane, ở trên. Theo phương án ưu tiên, các tế bào u tủy không bài tiết các polypeptit globulin miễn dịch (dòng tế bào không bài tiết). Sau khi liên hợp và chọn lọc kháng sinh, các tế bào lai được sàng lọc sử dụng DLL4, hoặc một phần của nó, hoặc tế bào biểu hiện DLL4. Theo phương án ưu tiên, sự sàng lọc ban đầu được thực hiện sử dụng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết (enzym-linked immunosorbent assay - ELISA) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmuno assay - RIA), tốt hơn là ELISA. Ví dụ của việc sàng lọc ELISA được đưa ra trong công bố đơn PCT số WO 00/37504.

Các tế bào lai sản xuất kháng thể kháng DLL4 được chọn lọc, nhân dòng, và hơn nữa được sàng lọc các đặc điểm mong muốn, bao gồm sự tăng trưởng tế bào lai mạnh, sản xuất kháng thể cao, và các đặc điểm kháng thể mong muốn, như được thảo luận thêm bên dưới. Các tế bào lai có thể được nuôi cấy và phát triển *in vivo* trong các động vật bẩm sinh, trong các động vật thiếu hệ miễn dịch, ví dụ, chuột trụi lông, hoặc trong dịch nuôi cấy tế bào *in vitro*. Phương pháp chọn lọc, nhân dòng và phát triển các tế bào lai đã được biết đến đối với người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực này.

Theo phương án ưu tiên, các tế bào lai là các tế bào lai của chuột, như được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án khác, các tế bào lai được sản xuất trong các loài không phải là người, không phải là chuột như là chuột nhắt, cừu, lợn, dê, trâu bò, hoặc ngựa. Theo một phương án ưu tiên khác nữa, các tế bào lai là các tế bào lai của người, trong đó tế bào u tủy không bài tiết của người được liên hợp với tế bào của người biểu hiện kháng thể kháng DLL4.

Các đoạn kháng thể mà nhận biết các epitop đặc hiệu có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các đoạn Fab và F(ab')₂ theo sáng chế có thể được tạo ra bằng sự phân cắt phân giải protein của các phân tử globulin miễn dịch, sử dụng các enzym như là papain (để tạo ra hai đoạn Fab giống nhau) hoặc pepsin (để tạo ra đoạn F(ab')₂). Đoạn F(ab')₂ của phân tử IgG vẫn giữ hai vị trí liên kết kháng nguyên của phân tử IgG lớn hơn ("gốc"), bao gồm cả các chuỗi nhẹ (chứa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và không đổi chuỗi nhẹ), vùng CH1 của các chuỗi nặng, và vùng bản lề tạo thành disulfua của phân tử IgG gốc. Do đó, đoạn F(ab')₂ vẫn có khả năng liên kết chéo với các phân tử kháng nguyên giống như phân tử IgG gốc.

2. Kháng thể đơn dòng kháng DLL4 sử dụng SLAM

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể tái tổ hợp được tạo ra từ các tế bào lympho đơn, được phân lập sử dụng quy trình được đề cập đến trong lĩnh vực này như phương pháp kháng thể tế bào lympho chọn lọc (SLAM), như được mô tả trong US 5,627,052; công bố đơn PCT số WO 92/02551; và Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7843-7848 (1996). Trong phương pháp này, các tế bào đơn bài tiết kháng thể đang quan tâm, ví dụ, các tế bào lympho có nguồn gốc từ động vật bất kỳ trong số các động vật được gây miễn dịch được mô tả trong phần I.A.1 (ở trên), được sàng lọc sử dụng thử nghiệm tan huyết đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên DLL4, khối con của DLL4, hoặc đoạn của nó, được ghép đôi với các tế bào hồng cầu cừu sử dụng

cầu nối, như là biotin, và được sử dụng để xác định các tế bào đơn mà bài tiết kháng thể đặc hiệu với DLL4. Sự nhận biết sau đây của các tế bào bài tiết kháng thể đang quan tâm, các cADN vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được phóng thích từ các tế bào bằng PCR phiên mã ngược (RT-PCR) và các vùng biến đổi này sau đó có thể được biểu hiện, trong ngữ cảnh của các vùng bảo toàn globulin miễn dịch thích hợp (ví dụ, các vùng bảo toàn người), trong tế bào chủ động vật có vú, như là các tế bào COS hoặc CHO. Tế bào chủ được truyền nhiễm trình tự globulin miễn dịch khuếch đại, có nguồn gốc từ các tế bào lympho chọn lọc *in vivo*, sau đó trải qua sự phân tích và chọn lọc *in vitro* thêm nữa, ví dụ, bằng cách phân tích trọng lượng các tế bào truyền nhiễm để phân tách các tế bào biểu hiện kháng thể với DLL4. Trình tự globulin miễn dịch được khuếch đại còn có thể được thao tác *in vitro*, như là bằng phương pháp trưởng thành về mặt ái lực *in vitro*. Ví dụ xem, công bố đơn PCT số WO 97/29131 và công bố đơn PCT số WO 00/56772.

3. Tạo kháng thể đơn dòng kháng DLL4 bằng động vật chuyển gen

Theo một phương án khác của sáng chế này, kháng thể được sản xuất bằng việc gây miễn dịch động vật không phải là người chứa một số, hoặc tất cả các cụm của globulin miễn dịch người với kháng nguyên DLL4. Theo một phương án, động vật không phải người là chuột chuyển gen XENOMOUSE®, chủng chuột được xử lý mà chứa các đoạn lớn của cụm globulin miễn dịch người và bị thiếu trong việc sản xuất kháng thể chuột. Ví dụ xem, Green et al., Nature Genetics, 7: 13-21 (1994) và US 5,916,771; US 5,939,598; US 5,985,615; US 5,998,209; US 6,075,181; US 6,091,001; US 6,114,598; và US 6,130,364. Cũng xem các công bố đơn PCT số WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 00/09560; và WO 00/37504. Chuột chuyển gen XENOMOUSE® tạo ra thư viện kháng thể có chiều dài đầy đủ giống ở người trưởng thành, và tạo ra các kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên. Chuột chuyển gen XENOMOUSE® chứa khoảng 80% của thư viện kháng thể của người thông quan việc đưa các đoạn YAC có cấu hình dòng mầm có kích thước megabase của cụm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ người. Xem Mendez et al., Nature Genetics, 15: 146-156 (1997), Green và Jakobovits, J. Exp. Med., 188: 483-495 (1998), nội dung của tài liệu được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

4. Kháng thể đơn dòng kháng DLL4 sử dụng thư viện kháng thể tái tổ hợp

Phương pháp *in vitro* cũng có thể được sử dụng để tạo kháng thể theo sáng chế, trong đó thư viện kháng thể được sàng lọc để xác định kháng thể có tính đặc hiệu liên kết DLL4 mong muốn. Phương pháp sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp này đã được biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm phương pháp được mô tả trong, ví dụ, US 5,223,409 (Ladner et al.); công bố đơn PCT số WO 92/18619 (Kang et al.); công bố đơn PCT số WO 91/17271 (Dower et al.); công bố đơn PCT số WO 92/20791 (Winter et al.); công bố đơn PCT số WO 92/15679 (Markland et al.); công bố đơn PCT số WO 93/01288 (Breitling et al.); công bố đơn PCT số WO 92/01047 (McCafferty et al.); công bố đơn PCT số WO 92/09690 (Garrard et al.); Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); US 2003/0186374; và công bố đơn PCT số WO 97/29131, nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể tạo ra từ đối tượng được gây miễn dịch với DLL4, hoặc một phần của DLL4. Theo một cách khác, thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể được tạo ra từ đối tượng chưa gây miễn dịch, nghĩa là, đối tượng chưa được gây miễn dịch bằng DLL4, như là thư viện kháng thể của người từ đối tượng là người mà chưa được gây miễn dịch bằng DLL4 của người. Kháng thể theo sáng chế được chọn lọc bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp với peptit chứa DLL4 của người để từ đó chọn lọc các kháng thể nhận biết DLL4. Phương pháp thực hiện sự sàng lọc và lựa chọn này đã được biết đến trong lĩnh vực này, như là được mô tả trong các tài liệu tham khảo trong các đoạn ở trên. Để lựa chọn kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết cụ thể với DLL4, như là các kháng thể phân lập DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} cụ thể, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để lựa chọn kháng thể có hằng số tốc độ K_{off} mong muốn. Để lựa chọn kháng thể theo sáng chế có hoạt tính trung hòa hDLL4 cụ thể, như là các kháng thể có IC_{50} cụ thể, phương pháp chuẩn đã được biết trong lĩnh vực này để đánh giá sự ức chế hoạt tính DLL4 có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết DLL4 của người. Tốt hơn là, kháng thể là kháng thể trung hòa. Theo nhiều phương án, kháng thể là kháng thể tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng.

Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể cũng được tạo ra sử dụng nhiều phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn đã được biết trong lĩnh vực này. Trong phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, vùng kháng thể chức năng được hiển thị trên bề mặt của các hạt thể thực khuẩn mang trình tự polynucleotit mã hóa chúng. Thể thực khuẩn này có thể được sử dụng để hiển thị vùng liên kết kháng nguyên được biểu diễn từ kho hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ, người hoặc chuột). Thể thực khuẩn biểu hiện vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với kháng nguyên đang quan tâm có thể được lựa chọn hoặc được nhận biết bằng kháng nguyên, ví dụ, sử dụng kháng nguyên được đánh dấu hoặc kháng nguyên liên kết hoặc bị bắt giữ bởi bề mặt rắn hoặc hạt. Thể thực khuẩn được sử dụng trong các phương pháp này thông thường là thể thực khuẩn dạng sợi bao gồm các vùng liên kết fd và M13 được biểu hiện từ thể thực khuẩn với các vùng kháng thể Fab, Fv, hoặc Fv ổn định disulfite được liên hợp tái tổ hợp với protein gen III hoặc gen VIII thể thực khuẩn. Các ví dụ về phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn mà có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế bao gồm các phương pháp được mô tả trong Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gen*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994); công bố đơn PCT số WO 92/01047; các công bố đơn PCT số WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; và US 5,698,426; US 5,223,409; US 5,403,484; US 5,580,717; US 5,427,908; US 5,750,753; US 5,821,047; US 5,571,698; US 5,427,908; US 5,516,637; US 5,780,225; US 5,658,727; US 5,733,743; và US 5,969,108.

Như được mô tả trong các tài liệu tham khảo ở trên, sau khi lựa chọn thể thực khuẩn, các vùng mã hóa kháng thể từ thể thực khuẩn có thể được phân tách và được sử dụng để tạo ra kháng thể nguyên vẹn bao gồm kháng thể của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên mong muốn khác bất kỳ, và được biểu hiện trong vật chủ mong muốn bất kỳ, bao gồm các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, các tế bào thực vật, nấm men, và vi khuẩn, ví dụ, như được mô tả chi tiết bên dưới. Ví dụ, các kỹ thuật để sản

xuất tái tổ hợp các đoạn Fab, Fab', và F(ab')₂ có thể cũng được dùng sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như là các kỹ thuật được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechnologies, 12(6): 864-869 (1992); Sawai et al., Am. J. Reprod. Immunol., 34: 26-34 (1995); và Better et al., Science, 240: 1041-1043 (1988). Ví dụ của các kỹ thuật mà có thể được sử dụng để sản xuất các Fv chuỗi đơn và kháng thể bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong US 4,946,778 và US 5,258,498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88 (1991); Shu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7995-7999 (1993); và Skerra et al., Science, 240: 1038-1041 (1988).

Một cách khác để sàng lọc các thư viện kháng thể tái tổ hợp bằng biểu hiện thể thực khuẩn, các phương pháp khác đã được biết trong lĩnh vực này để sàng lọc các thư viện tổ hợp lớn có thể được áp dụng để nhận biết kháng thể theo sáng chế. Một kiểu của hệ biểu hiện khác là kiểu trong đó thư viện kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện như dạng liên hợp ARN-protein, như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 98/31700 (Szostak và Roberts), và trong Roberts và Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-12302 (1997). Trong hệ này, sự liên hợp cộng hóa trị được tạo ra giữa mARN và peptit hoặc protein mà nó mã hóa bằng sự dịch mã *in vitro* của các mARN tổng hợp mang puromycin, kháng sinh nhận peptidyl, ở đầu 3' của nó. Do đó, mARN đặc hiệu có thể được làm giàu từ hỗn hợp phức của các mARN (ví dụ, thư viện tái tổ hợp) dựa vào các đặc tính của peptit hoặc protein được mã hóa, ví dụ, kháng thể, hoặc phần của nó, như là liên kết của kháng thể, hoặc phần của nó, với kháng nguyên đặc hiệu kép. Các trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể, hoặc các đoạn của nó, được tách rời từ việc sàng lọc thư viện này có thể được biểu hiện bằng các phương pháp tái tổ hợp như được mô tả ở trên (ví dụ, trong các tế bào chủ động vật có vú) và, hơn nữa, có thể phải chịu thêm sự làm trưởng thành về mặt ái lực bằng các vòng sàng lọc dạng liên hợp mARN-peptit khác trong đó sự đột biến được đưa vào (các) trình tự được lựa chọn ban đầu, hoặc bằng phương pháp làm trưởng thành về mặt ái lực *in vitro* khác của kháng thể tái tổ hợp, như được mô tả ở trên. Ví dụ ưu tiên của phương pháp này, là kỹ thuật hiển thị PROfusion được dùng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ở dưới).

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp hiển thị nấm men đã được biết trong lĩnh vực này. Trong phương pháp hiển thị nấm men, phương pháp di truyền được sử dụng để buộc các vùng kháng thể vào thành tế bào nấm men và hiển thị chúng trên bề mặt của nấm men. Cụ thể

là, nấm men này có thể được sử dụng để hiển thị vùng liên kết kháng nguyên được biểu diễn từ kho hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ, người hoặc chuột). Các ví dụ của phương pháp hiển thị nấm men mà có thể được sử dụng để tạo kháng thể theo sáng chế bao gồm các phương pháp được mô tả trong US 6,699,658 (Wittrup et al.) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

B. Sản xuất của kháng thể DLL4 tái tổ hợp

Kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số một số kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, biểu hiện từ tế bào chủ, trong đó (các) vector biểu hiện mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ được truyền nhiễm vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Các dạng khác của thuật ngữ "truyền nhiễm" được dự định bao gồm rất nhiều các kỹ thuật thông thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ chưa có nhân điển hình hoặc nhân thực, ví dụ, điện di, kết tủa canxi-phosphat, sự truyền nhiễm DEAE-dextran và tương tự. Mặc dù, có thể biểu hiện kháng thể theo sáng chế trong tế bào chủ chưa có nhân điển hình hoặc nhân thực, sự biểu hiện kháng thể trong các tế bào nhân thực được ưu tiên, và ưu tiên nhất là tế bào chủ động vật có vú, bởi vì các tế bào nhân thực này (và cụ thể là các tế bào động vật có vú) phù hợp hơn các tế bào nhân chưa có nhân điển hình để kết hợp và bài tiết kháng thể gấp nếp thích hợp và có hoạt tính miễn dịch.

Tế bào chủ động vật có vú mẫu để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (Chinese Hamster Ovary - tế bào CHO) (bao gồm tế bào dhfr- CHO, được mô tả trong Urlaub và Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216-4220 (1980), được sử dụng với chất đánh dấu chọn lọc DHFR, ví dụ, như được mô tả trong Kaufman và Sharp, J. Mol. Biol., 159: 601-621 (1982), các tế bào u tủy NS0, tế bào COS, và tế bào SP2. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen kháng thể được đưa vào tế bào chủ động vật có vú, kháng thể được tạo ra bằng việc nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc, tốt hơn nữa là, bài tiết kháng thể vào môi trường nuôi cấy trong đó tế bào chủ được sinh trưởng. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế protein chuẩn.

Tế bào chủ có thể cũng được sử dụng để tạo ra các đoạn kháng thể chức năng, như là các đoạn Fab hoặc các phân tử scFv. Sẽ được hiểu rằng các thay đổi trong quy trình ở trên nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn truyền nhiễm tế bào

chủ với ADN mã hóa các đoạn chức năng của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể cũng được sử dụng để loại bỏ một số, hoặc tất cả ADN mã hóa một hoặc cả chuỗi nhẹ và nặng mà không cần để liên kết với các kháng nguyên đang quan tâm. Các phân tử được biểu diễn từ các phân tử ADN bị cắt đứt này cũng được bao gồm bởi kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, kháng thể hai chức có thể được tạo ra trong đó một chuỗi nặng và một nhẹ là kháng thể theo sáng chế (nghĩa là, liên kết với DLL4 của người) và chuỗi nặng và nhẹ khác là đặc hiệu đối với kháng nguyên khác DLL4 của người bằng cách liên kết chéo kháng thể theo sáng chế với kháng thể thứ hai bằng phương pháp liên kết chéo hóa học chuẩn.

Theo hệ ưu tiên biểu hiện tái tổ hợp kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, vectơ biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cả chuỗi nặng kháng thể và chuỗi nhẹ kháng thể được đưa vào các tế bào dhfr- CHO bằng việc chuyển nạp qua canxi phosphat. Trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp, các gen chuỗi nặng và nhẹ kháng thể được liên kết thực hiện được với yếu tố điều chỉnh chất tăng cường CMV/gen khởi đầu AdMLP để đạt sự sao chép gen ở mức độ cao. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, mà cho phép lựa chọn các tế bào CHO được chuyển nạp bằng vectơ sử dụng sự chọn lọc/khuếch đại methotrexat. Tế bào chủ biến đổi chọn lọc được nuôi cấy để cho phép biểu hiện các chuỗi nặng và nhẹ kháng thể và kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được sử dụng để bào chế vectơ biểu hiện tái tổ hợp, truyền nhiễm tế bào chủ, lựa chọn các thể biến đổi, nuôi cấy tế bào chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bằng việc nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đến khi kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được tổng hợp. Phương pháp hơn nữa có thể bao gồm việc phân lập kháng thể tái tổ hợp từ môi trường nuôi cấy.

1. Kháng thể kháng DLL4

Trình tự axit amin của các vùng VH và VL của kháng thể đơn dòng chuột được phân lập mà liên kết với DLL4 của người được trình bày cho các hệ vô tính 38H12, 1A11, 37D10, 32C7, 14G1, 14A11, và 15D6 trong Bảng 9 (Xem, Ví dụ 4, bên dưới). Các trình tự CDR kháng thể kháng DLL4 phân lập được mô tả theo sáng chế tạo thành họ protein liên kết với DLL4, được phân lập theo sáng chế này, và chứa các polypeptit chứa trình tự CDR có nguồn gốc từ đó và các hệ vô tính được trưởng thành về mặt ái

lực của nó. Trình tự của các vùng biến đổi và các CDR của kháng thể đơn dòng và các dẫn chất được trưởng thành về mặt ái lực của nó được liệt kê trong các bảng 9, 11, 16, 20, và 21. Để tạo ra và lựa chọn các CDR cho các protein liên kết theo sáng chế liên kết DLL4 và/hoặc hoạt tính trung hòa ưu tiên đối với DLL4 của người, phương pháp chuẩn đã được biết trong lĩnh vực này để tạo ra các protein liên kết theo sáng chế và việc đánh giá liên kết DLL4 và/hoặc các đặc tính trung hòa của các protein liên kết này có thể được sử dụng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp cụ thể được mô tả theo sáng chế.

Dựa vào sự so sánh trình tự axit amin của các CDR của các vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của các hệ vô tính kháng thể kháng DLL4 được mô tả theo sáng chế, sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 chứa vùng liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với DLL4 của người, vùng liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một hoặc nhiều CDR trong số sáu CDR, nghĩa là, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, và CDRL-3, được xác định bên dưới:

CDR-H1 được chọn từ nhóm bao gồm:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (SEQ ID NO:151), trong đó;

X_1 là N, H, hoặc Y;

X_2 là F;

X_3 là P;

X_4 là M; và

X_5 là A hoặc S;

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:157 (CDR-H1 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:161 (CDR-H1 37D10);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:163 (CDR-H1 32C7);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:165 (CDR-H1 14G1);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:167 (CDR-H1 14A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:169 (CDR-H1 15D6);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:171 (CDR-H1 VH.1 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:172 (CDR-H1 VH.1a 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:173 (CDR-H1 VH.1b 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:174 (CDR-H1 VH.2a 1A11);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:179 (CDR-H1 VH.1 38H12);

các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:180 (CDR-H1 VH.1A 38H12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:181 (CDR-H1 VH.1b 38H12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:187 (CDR-H1 h1A11VH.1);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:188 (CDR-H1 h1A11.A6);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:189 (CDR-H1 h1A11.A8);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:190 (CDR-H1 h1A11.C6);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:191 (CDR-H1 h1A11.A11);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:192 (CDR-H1 h1A11.B5);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:193 (CDR-H1 h1A11.E12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:194 (CDR-H1 h1A11.G3);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:195 (CDR-H1 h1A11.F5); và
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:196 (CDR-H1 h1A11.H2);

CDR-H2 được chọn từ nhóm bao gồm:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$

(SEQ ID NO:152), trong đó;

X_1 là T hoặc S;

X_2 là I;

X_3 là S;

X_4 là S hoặc G;

X_5 là S;

X_6 là D;

X_7 là G, A, D, S, hoặc E;

X_8 là T hoặc W;

X_9 là T, P, hoặc A;

X_{10} là Y, S, T, hoặc N;

X_{11} là Y hoặc I;

X_{12} là R hoặc G;

X_{13} là D;

X_{14} là S;

X_{15} là V;

X_{16} là K; và

X₁₇ là G;

các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:157 (CDR-H2 38H12);
 các gốc từ 50-68 của SEQ ID NO:161 (CDR-H2 37D10);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:163 (CDR-H2 32C7);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:165 (CDR-H2 14G1);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:167 (CDR-H2 14A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:169 (CDR-H2 15D6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:171 (CDR-H2 VH.1 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:172 (CDR-H2 VH.1a 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:173 (CDR-H2 VH.1b 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:174 (CDR-H2 VH.2a 1A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:179 (CDR-H2 VH.1 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:180 (CDR-H2 VH.1A 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:181 (CDR-H2 VH.1b 38H12);
 các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:187 (CDR-H2 h1A11VH.1);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:188 (CDR-H2 h1A11.A6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:189 (CDR-H2 h1A11.A8);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:190 (CDR-H2 h1A11.C6);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:191 (CDR-H2 h1A11.A11);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:192 (CDR-H2 h1A11.B5);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:193 (CDR-H2 h1A11.E12);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:194 (CDR-H2 h1A11.G3);
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:195 (CDR-H2 h1A11.F5); và
 các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:196 (CDR-H2 h1A11.H2);

CDR-H3 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO:153), trong đó;

X₁ là G;

X₂ là Y;

X₃ là Y;

X₄ là N;

X₅ là S;

X₆ là P;

X₇ là F;

X₈ là A; và

X₉ là Y, F, hoặc S;

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:157 (CDR-H3 38H12);

các gốc từ 101-111 của SEQ ID NO:161 (CDR-H3 37D10);

các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:163 (CDR-H3 32C7);

các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:165 (CDR-H3 14G1);

các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:167 (CDR-H3 14A11);

các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:169 (CDR-H3 15D6);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:171 (CDR-H3 VH.1 1A11);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:172 (CDR-H3 VH.1a 1A11);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:173 (CDR-H3 VH.1b 1A11);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:174 (CDR-H3 VH.2a 1A11);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:179 (CDR-H3 VH.1 38H12);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:180 (CDR-H3 VH.1A 38H12);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:181 (CDR-H2 VH.1b 38H12);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:182 (CDR-H1 VH.2a 38H12);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:187 (CDR-H3 h1A11VH.1);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:188 (CDR-H3 h1A11.A6);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:189 (CDR-H3 h1A11.A8);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:190 (CDR-H3 h1A11.C6);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:191 (CDR-H3 h1A11.A11);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:192 (CDR-H3 h1A11.B5);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:193 (CDR-H3 h1A11.E12);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:194 (CDR-H3 h1A11.G3);

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:195 (CDR-H3 h1A11.F5);

và

các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:196 (CDR-H3 h1A11.H2);

CDR-L1 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO:154), trong đó;

X₁ là R;

X_2 là A;
 X_3 là S;
 X_4 là E hoặc Q;
 X_5 là D hoặc E;
 X_6 là I;
 X_7 là Y hoặc W;
 X_8 là S, I, Y, N, hoặc R;
 X_9 là N;
 X_{10} là L; và
 X_{11} là A;

các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:158 (CDR-L1 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:162 (CDR-L1 37D10);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:164 (CDR-L1 32C7);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:166 (CDR-L1 14G1);
 các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:168 (CDR-L1 14A11);
 các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:170 (CDR-L1 15D6);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:175 (CDR-L1 VL.1 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:176 (CDR-L1 VL.1a 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:177 (CDR-L1 VL.1b 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:178 (CDR-L1 VL.2a 1A11);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:183 (CDR-L1 VL.1 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:184 (CDR-L1 VL.1a 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:185 (CDR-L1 VL.1b 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:186 (CDR-L1 VL.2a 38H12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:197 (CDR-L1 h1A11VL.1);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:198 (CDR-L1 h1A11.A2);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:199 (CDR-L1 h1A11.A12);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:200 (CDR-L1 h1A11.A7);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:201 (CDR-L1 h1A11.B4);
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:202 (CDR-L1 h1A11.B5); và
 các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:203 (CDR-L1 h1A11.E12);

CDR-L2 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO:155), trong đó;

X₁ là D;

X₂ là T;

X₃ là N hoặc S;

X₄ là N, D, S, I, Y, hoặc V;

X₅ là L;

X₆ là A; và

X₇ là D;

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:158 (CDR-L2 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:162 (CDR-L2 37D10);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:164 (CDR-L2 32C7);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:166 (CDR-L2 14G1);

các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:168 (CDR-L2 14A11);

các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:170 (CDR-L2 15D6);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:175 (CDR-L2 VL.1 1A11);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:176 (CDR-L2 VL.1a 1A11);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:177 (CDR-L2 VL.1b 1A11);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:178 (CDR-L2 VL.2a 1A11);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:183 (CDR-L2 VL.1 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:184 (CDR-L2 VL.1a 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:185 (CDR-L2 VL.1b 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:186 (CDR-L2 VL.2a 38H12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:197 (CDR-L2 h1A11.VL.1);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:198 (CDR-L2 h1A11.A2);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:199 (CDR-L2 h1A11.A12);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:200 (CDR-L2 h1A11.A7);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:201 (CDR-L2 h1A11.B4);

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:202 (CDR-L2 h1A11.B5); và

các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:203 (CDR-L2 h1A11.E12);

và

CDR-L3 được chọn từ nhóm bao gồm:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO:156), trong đó;

X_1 là Q;
 X_2 là Q;
 X_3 là Y;
 X_4 là N, D, hoặc T;
 X_5 là N, Y, hoặc W;
 X_6 là Y hoặc V;
 X_7 là P;
 X_8 là P; và
 X_9 là T;

các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:158 (CDR-L3 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:162 (CDR-L3 37D10);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:164 (CDR-L3 32C7);
 các gốc từ 89-98 của SEQ ID NO:166 (CDR-L3 14G1);
 các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:168 (CDR-L3 14A11);
 các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:170 (CDR-L3 15D6);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:175 (CDR-L3 VL.1 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:176 (CDR-L3 VL.1a 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:177 (CDR-L3 VL.1b 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:178 (CDR-L3 VL.2a 1A11);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:183 (CDR-L3 VL.1 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:184 (CDR-L3 VL.1a 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:185 (CDR-L3 VL.1b 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:186 (CDR-L3 VL.2a 38H12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:197 (CDR-L3 h1A11VL.1);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:198 (CDR-L3 h1A11.A2);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:199 (CDR-L3 h1A11.A12);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:200 (CDR-L3 h1A11.A7);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:201 (CDR-L3 h1A11.B4);
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:202 (CDR-L3 h1A11.B5); và
 các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:203 (CDR-L3 h1A11.E12).

Tốt hơn là, protein liên kết với DLL4 chứa ít nhất một CDR được mô tả ở trên, tốt hơn nữa là hai CDR bất kỳ được mô tả ở trên, tốt hơn nữa là ba CDR bất kỳ được mô tả

ở trên, thậm chí tốt hơn nữa là bốn CDR bất kỳ được mô tả ở trên, vẫn còn tốt hơn nữa là năm CDR bất kỳ được mô tả ở trên, và tốt nhất là sáu CDR bất kỳ được mô tả ở trên (nghĩa là, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 như được mô tả ở trên). Protein liên kết với DLL4 ưu tiên đặc biệt chứa ba CDR chứa CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 như được mô tả ở trên.

Tốt hơn là, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên liên kết với DLL4 của người ("hu", "h") và còn một hoặc nhiều protein DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm: DLL4 chuột ("chuột", "mu"), DLL4 khỉ cynomolgus ("cynomolgus", "cyno"), và DLL4 chuột.

Tốt hơn là, protein liên kết với DLL4 chứa một hoặc nhiều CDR được mô tả ở trên liên kết với DLL4 của người ("hu") và còn với DLL4 khỉ cynomolgus ("cynomolgus", "cyno").

2. Kháng thể khảm kháng DLL4

Kháng thể khảm là phân tử trong đó các đoạn khác nhau của kháng thể có nguồn gốc từ các loài động vật khác nhau, như là kháng thể có vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng chuột và vùng bảo toàn globulin miễn dịch người. Ví dụ xem, Morrison, Science, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., Biotechnology, 4: 214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Phương pháp, 125: 191-202 (1989); US 5,807,715; US 4,816,567; và US 4,816,397. Ngoài ra, các kỹ thuật được phát hiện để sản xuất "kháng thể khảm" bằng việc ghép các gen từ phân tử kháng thể chuột có tính đặc hiệu kháng nguyên kháng nguyên thích hợp cùng với các gen từ phân tử kháng thể của người có hoạt tính sinh học thích hợp có thể được sử dụng. Ví dụ xem, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature, 314: 452-454 (1985), mà được đưa trọn vẹn vào đây bằng cách tham khảo.

3. Kháng thể ghép CDR kháng DLL4

Trình tự CDR kháng thể kháng DLL4 được phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo kháng thể ghép CDR để điều hòa các đặc tính của kháng thể ban đầu. Các đặc tính này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở động học liên kết, ái lực, hoạt tính sinh học, phản ứng chéo theo loài, phản ứng chéo theo phân tử, epitop, các đặc tính hóa lý, các đặc tính hóa lý dược, các đặc tính dược động học, hoặc các đặc tính dược lý. Kháng thể ghép CDR chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ từ kháng thể của

người hoặc kháng thể động vật linh trưởng không phải người trong đó một hoặc nhiều vùng trong số các vùng CDR của VH và/hoặc VL được thay thế bằng trình tự CDR của kháng thể kháng DLL4 ban đầu. Trình tự khung từ kháng thể của người hoặc động vật linh trưởng không phải người có thể dùng như khuôn để ghép CDR. Tuy nhiên, sự thay thế chuỗi thẳng trên khung này thường dẫn đến mất một số ái lực liên kết với kháng nguyên. Nhiều kháng thể của người hoặc loài khác tương đồng với kháng thể của người ban đầu, dường như ít có khả năng kết hợp các CDR với khung người mới hoặc khung động vật linh trưởng không phải người sẽ đưa sự méo mó vào các CDR mà có thể làm giảm ái lực hoặc các đặc tính khác. Do đó, tốt hơn là khung biến đổi được chọn để thay thế khung vùng biến đổi người ngoại trừ các CDR có ít nhất 30% trình tự đồng nhất với khung vùng biến đổi kháng thể của người. Tốt hơn nhiều là khung vùng biến đổi được chọn để thay thế khung vùng biến đổi người ngoại trừ các CDR có ít nhất 40% trình tự đồng dạng với khung vùng biến đổi kháng thể của người. Tốt hơn nhiều là khung vùng biến đổi được chọn để thay thế khung biến đổi người ngoại trừ các CDR có ít nhất 50% trình tự đồng dạng với khung vùng biến đổi kháng thể của người. Tốt hơn nhiều là khung vùng biến đổi được chọn để thay thế khung biến đổi người ngoại trừ các CDR có ít nhất 60% trình tự đồng dạng với khung vùng biến đổi kháng thể của người. Tốt hơn nhiều là khung vùng biến đổi người mới hoặc động vật linh trưởng không phải người và người ban đầu ngoại trừ các CDR có ít nhất 70% trình tự đồng dạng. Thậm chí tốt hơn nhiều nữa là khung vùng biến đổi người mới hoặc động vật linh trưởng không phải người và người ban đầu ngoại trừ các CDR có ít nhất 75% trình tự đồng dạng. Tốt nhất là khung vùng biến đổi người mới hoặc động vật linh trưởng không phải người và người ban đầu ngoại trừ các CDR có ít nhất 80% trình tự đồng dạng. Thậm chí bằng cách sử dụng khung người hoặc động vật linh trưởng không phải người tương đồng để ghép các CDR của kháng thể kháng DLL4 của người ban đầu, thì kháng thể được ghép thu được có thể vẫn mất ái lực liên kết với kháng nguyên ở một mức độ nào đó. Trong trường hợp này, để lấy lại ái lực cần phải chứa ít nhất một hoặc nhiều sự thế (các) gốc khung chính của kháng thể ban đầu ở vị trí tương ứng của kháng thể được ghép mới. Gốc chính này có thể được chọn từ nhóm bao gồm:

- gốc cạnh CDR;
- gốc ở vị trí glycosyl hóa;
- gốc hiếm;

gốc có khả năng tương tác với DLL4 của người
 gốc chuẩn;
 gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ;
 gốc trong vùng Vernier; và
 gốc trong vùng chồng lên giữa CDR1 chuỗi nặng biến đổi theo định nghĩa
 Chothia và khung chuỗi nặng đầu tiên theo định nghĩa Kabat.

4. Kháng thể được làm tương thích với người kháng DLL4

Trong khi các được phẩm theo sáng chế loại bỏ yêu cầu để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, thì kháng thể DLL4 được làm tương thích với người có thể được bào chế bằng cách sử dụng được phẩm theo sáng chế. Kháng thể được làm tương thích với người là các phân tử kháng thể từ kháng thể của loài không phải người mà liên kết với kháng nguyên mong muốn có một hoặc nhiều vùng quyết định bổ sung (complementarity determining regions - CDRs) từ các loài không phải người và các vùng khung từ phân tử globulin miễn dịch người. Trình tự Ig người đã biết được mô tả ở web sites có sẵn qua trang web toàn thế giới (www.), ví dụ, ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; atcc.org/phage/hdb.html; sciquest.com/; abcam.com/; antibodyresource.com/onlinecomp.html; public.iastate.edu/.about.pedro-research_tools.html; mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; whfreeman.com/immunology-/CH05/kuby05.htm; library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; path.-cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks-/Immunology.html; immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; bio-tech.ufl.edu/.about.hcl/; pebio.com/pa/340913-/340913.html; nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; m.ehimeu.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html; biodesign.com/table.asp; icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; ibt.unam.mx/-vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; unizh.ch/.about.honegger/AHO-seminar/Slide01.html; cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; ibt.unam.mx/vir/

structure/stat_aim.-html; biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages-/Pept/spottech.html; jerini.de/frroducts.htm; patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), mỗi tài liệu trong số đó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trình tự nhập khẩu này có thể được sử dụng để làm giảm tính sinh miễn dịch hoặc làm giảm, làm tăng hoặc biến đổi liên kết, ái lực, tốc độ kết hợp, tốc độ phân ly, ái lực, tính đặc hiệu, bán thải sinh học, hoặc đặc tính thích hợp khác bất kỳ, như đã được biết trong lĩnh vực này.

Các gốc khung trong các vùng khung người có thể được thế bằng gốc tương ứng từ kháng thể cho CDR để thay đổi, tốt hơn là cải thiện, sự liên kết kháng nguyên. Các sự thế khung này được nhận biết bằng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng việc tạo mẫu các tương tác của CDR và các gốc khung từ để nhận biết các gốc khung quan trọng để liên kết kháng nguyên và so sánh trình tự để nhận biết các gốc khung hiếm ở vị trí cụ thể. (Ví dụ xem, US 5,585,089 (Queen et al.); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), mà được đưa trọn vẹn vào đây bằng cách viện dẫn.) Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều thông thường có sẵn và là quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chương trình máy tính có sẵn mà minh họa và hiển thị cấu trúc hình dạng ba chiều có thể xảy ra của trình tự globulin miễn dịch ứng viên chọn lọc. Sự kiểm tra các hiển thị này cho phép phân tích vai trò phù hợp của các gốc trong hoạt động của trình tự globulin miễn dịch ứng viên, nghĩa là, phân tích các gốc ảnh hưởng đến khả năng liên kết của globulin miễn dịch ứng viên với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được lựa chọn và được kết hợp từ trình tự liên ứng và đưa vào sao cho đạt được đặc tính kháng thể mong muốn, như là ái lực với (các) kháng nguyên đích tăng lên. Nhìn chung, các gốc CDR trực tiếp và phần lớn về cơ bản có liên quan đến việc ảnh hưởng đến liên kết kháng nguyên. Kháng thể có thể được làm tương thích với người bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như là nhưng không chỉ giới hạn ở các kỹ thuật được mô tả trong Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988), Sims et al., J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993); Chothia và Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151: 2623-2632 (1993), Padlan, E.A., Molecular Immunology, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6): 805-814 (1994);

Roguska. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973 (1994); các công bố đơn PCT số WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO90/14443, WO90/14424, và WO90/14430; EP 0 592 106, EP 0 519 596, và EP 0 239 400; US. 5,565,332; US 5,723,323; US 5,976,862; US 5,824,514; US 5,817,483; US 5,814,476; US 5,763,192; US 5,723,323; US 5,766,886; US 5,714,352; US 6,204,023; US 6,180,370; US 5,693,762; US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,225,539; và US 4,816,567, mỗi tài liệu nêu trên được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung, kể cả các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó.

C. Sản xuất kháng thể và các dòng tế bào sản xuất kháng thể

Tốt hơn là, kháng thể kháng DLL4 theo sáng chế thể hiện khả năng làm giảm hoặc trung hòa hoạt tính tạo thành mạch trong khối u cao, ví dụ, như được đánh giá bằng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các kháng thể này trung hòa tương tác DLL4 trong con đường tín hiệu Notch với giá trị IC_{50} trong DLL4 nằm trong khoảng ít nhất khoảng 10^{-7} M, hoặc khoảng 10^{-8} M. Tốt hơn là, kháng thể kháng DLL4 theo sáng chế cũng thể hiện khả năng làm giảm hoặc trung hòa hoạt tính DLL4 cao.

Theo các phương án ưu tiên, kháng thể được phân lập, hoặc phân liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với DLL4 của người, trong đó kháng thể, hoặc phân liên kết kháng nguyên của nó, phân lập từ DLL4 của người với hằng số K_{off} khoảng $0,1 \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc kháng thể mà ức chế DLL4 và/hoặc hoạt tính DLL4 của người với trị số IC_{50} khoảng 1×10^{-6} M hoặc ít hơn. Theo một cách khác, kháng thể, hoặc phân liên kết kháng nguyên của nó, có thể tách ra khỏi DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} khoảng $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế DLL4 của người và/hoặc hoạt tính DLL4 của người với trị số IC_{50} khoảng 1×10^{-7} M hoặc ít hơn. Theo một cách khác, kháng thể, hoặc phân liên kết kháng nguyên của nó, có thể tách ra khỏi DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} khoảng $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế DLL4 của người với trị số IC_{50} khoảng 1×10^{-8} M hoặc ít hơn. Theo một cách khác, kháng thể,

hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể tách ra từ DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} khoảng $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế hoạt tính DLL4 với trị số IC_{50} khoảng $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ hoặc ít hơn. Theo một cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể tách ra từ DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} khoảng $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế DLL4 và/hoặc hoạt tính DLL4 của người với trị số IC_{50} khoảng $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ hoặc ít hơn. Theo một cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể tách ra từ DLL4 của người với hằng số tốc độ K_{off} khoảng $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ hoặc ít hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế DLL4 và/hoặc hoạt tính DLL4 của người với trị số IC_{50} khoảng $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ hoặc ít hơn.

Theo các phương án nhất định, kháng thể chứa vùng bảo toàn chuỗi nặng, như là vùng bảo toàn IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, hoặc IgD. Tốt hơn là, vùng bảo toàn chuỗi nặng là vùng bảo toàn chuỗi nặng IgG1 hoặc vùng bảo toàn chuỗi nặng IgG4. Hơn nữa, kháng thể có thể chứa vùng bảo toàn chuỗi nhẹ, vùng bảo toàn chuỗi nhẹ kappa hoặc vùng bảo toàn chuỗi nhẹ lamda. Tốt hơn là, kháng thể chứa vùng bảo toàn chuỗi nhẹ kappa. Theo một cách khác, phần kháng thể, ví dụ, có thể là đoạn Fab hoặc đoạn Fv chuỗi đơn.

Sự thay thế các gốc axit amin trong phần Fc để thay đổi chức năng phản ứng kháng thể đã được biết trong lĩnh vực này (xem, US 5,648,260 và US 5,624,821 (Winter et al.)). Phần Fc của kháng thể gây ra nhiều chức năng phản ứng quan trọng ví dụ tạo ra xytokin, ADCC, sự thực bào, gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), và bán thải sinh học/tỷ lệ thanh thải của kháng thể và phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Trong một số trường hợp, các chức năng phản ứng này được mong đợi đối với kháng thể có tác dụng điều trị nhưng trong một số trường hợp khác có thể là không cần hoặc thậm chí có hại, phụ thuộc vào các mục đích điều trị. Các isotyp IgG người nhất định, cụ thể là IgG1 và IgG3, gây ra ADCC và CDC qua việc liên kết với FcγRs và C1q bổ thể, tương ứng. Các thụ thể Fc mới sinh (FcRn) là các thành phần quan trọng quyết định thời gian bán thải của kháng thể. Vẫn theo một phương án khác, ít nhất một gốc axit amin được thay thế trong vùng bảo toàn của kháng thể, ví dụ vùng Fc của kháng thể, sao cho các chức năng phản ứng của kháng thể thay đổi.

Một phương án theo sáng chế đề xuất protein liên kết được đánh dấu trong đó kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế là dẫn xuất hoặc được liên kết với một phân tử chức năng khác (ví dụ, một peptit hoặc protein khác). Ví dụ, protein liên kết được đánh dấu theo sáng chế có thể được suy ra bằng cách liên kết về mặt chức năng kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế (bằng ghép đôi hóa học, liên hợp gen, liên kết không phải cộng hóa trị hoặc các liên kết khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như là một kháng thể khác (ví dụ, kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu hoặc kháng thể kép), chất dò được, chất gây độc tế bào, dược chất, và/hoặc protein hoặc peptit mà có thể gây ra liên kết của kháng thể hoặc phần kháng thể với một phân tử khác (như là vùng nhân streptavidin hoặc đuôi polyhistidin).

Các chất dò được hữu ích với kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế mà có thể được bắt nguồn bao gồm các hợp chất huỳnh quang. Các chất dò được huỳnh quang mẫu bao gồm fluoretxein, fluoretxein isothioxyanat, rhodamin, 5-dimetylamin-1-naptalensulfonyl clorua, phycoerythrin và tương tự. Kháng thể có thể cũng được bắt nguồn với các enzym dò được, như là kiềm phosphataza, peroxidaza của cây cải ngựa, glucoza oxidaza và tương tự. Khi kháng thể được bắt nguồn với enzym dò được, nó được dò bằng việc thêm thuốc thử khác mà enzym sử dụng để sản xuất sản phẩm phản ứng dò được. Ví dụ, khi chất dò được peroxidaza của cây cải ngựa có mặt, thì việc thêm hydro peroxit và diaminobenzidin dẫn đến sản phẩm phản ứng có màu, mà dò được. Kháng thể có thể cũng được bắt nguồn với biotin, và dò được gián tiếp thông qua phép đo liên kết avidin hoặc streptavidin.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến protein liên kết với DLL4 tinh thể. Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến các tinh thể của protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế, bao gồm kháng thể kháng DLL4 nguyên vẹn, các đoạn của nó, cũng như các kháng thể và dạng protein liên kết liên hợp (bao gồm các dạng kháng thể liên hợp) như được mô tả theo sáng chế, và các chế phẩm và dược phẩm chứa các tinh thể này. Theo một phương án, protein liên kết được kết tinh có thời gian bán thải *in vivo* lớn hơn các dạng protein liên kết tan được. Theo một phương án khác, protein liên kết vẫn giữ hoạt tính sinh học sau khi kết tinh. Các protein liên kết được kết tinh theo sáng chế có thể được tạo ra theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và như được mô tả trong WO 02/72636, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến protein liên kết được glycosyl hóa trong đó kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều gốc carbohydrat. Việc sản xuất protein *in vivo* mới sinh có thể thực hiện quá trình xử lý nữa, đã biết như sự biến đổi sau dịch mã. Cụ thể là, các gốc đường (glycosyl) có thể được thêm enzym, một quá trình đã biết như là sự glycosyl hóa. Các protein thu được mang các chuỗi phụ oligosaccarit được liên kết cộng hóa trị đã được biết như là các protein hoặc glycoprotein được glycosyl hóa. Sự glycosyl hóaprotein phụ thuộc vào trình tự axit amin của protein đang quan tâm, cũng như tế bào chủ trong đó biểu hiện protein. Các sinh vật khác nhau có thể tạo ra các enzym glycosyl hóa khác nhau (ví dụ, glycosyltransferaza và glycosidaza), và có các cơ chất khác nhau (các đường nucleotit) có sẵn. Do các tác nhân này, mô hình glycosyl hóaprotein, và dược phẩm chứa gốc glycosyl, có thể khác nhau phụ thuộc vào hệ vật chủ trong đó protein cụ thể được biểu hiện. Các gốc glycosyl hữu ích theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, glucoza, galactoza, mannoza, fucoza, n-acetylglucosamin và axit sialic. Tốt hơn là protein liên kết được glycosyl hóa chứa các gốc glycosyl sao cho mô hình glycosyl hóa là người.

Đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là sự glycosyl hóa protein khác nhau có thể dẫn đến các đặc tính protein khác nhau. Ví dụ, hiệu lực của protein có tác dụng điều trị tạo ra trong vật chủ vi sinh vật, như là nấm men, và được glycosyl hóa sử dụng con đường nội sinh nấm men có thể bị giảm so với hiệu lực của protein tương tự được biểu hiện trong tế bào động vật có vú, như là dòng tế bào CHO. Các glycoprotein này có thể cũng được gây miễn dịch trong người và cho thấy làm giảm thời gian bán thải *in vivo* sau khi dùng. Các thụ thể đặc hiệu trong người và các động vật khác có thể nhận ra các gốc glycosyl đặc hiệu và đẩy mạnh sự thanh thải nhanh chóng của protein khỏi dòng máu. Các tác dụng có hại khác có thể bao gồm các thay đổi trong sự gấp nếp protein, độ hòa tan, tính nhạy cảm với các proteaza, sự chuyên chở, sự vận chuyển, sự chia ngăn, sự bài tiết, sự nhận biết bằng các protein hoặc các tác nhân khác, tính kháng nguyên, hoặc tính gây dị ứng. Do đó, người thực hành có thể thích protein có tác dụng điều trị với dược phẩm và mô hình glycosyl hóa cụ thể, ví dụ dược phẩm và mô hình glycosyl hóa đồng nhất, hoặc ít nhất tương tự, với dược phẩm và mô hình được tạo ra trong các tế bào người hoặc trong các tế bào đặc hiệu loài của động vật được dự định.

Các protein được glycosyl biểu hiện khác với protein của tế bào chủ có thể đạt được bằng cách biến đổi di truyền tế bào chủ để biểu hiện các enzym glycosyl hóa khác loại. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này người thực hành có thể tạo ra kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó biểu thị protein glycosyl hóa kiểu người. Ví dụ, các chủng nấm men được biến đổi di truyền để biểu hiện các enzym glycosyl hóa xảy ra một cách không tự nhiên sao cho các protein được glycosyl hóa (các glycoprotein) được tạo ra trong các chủng nấm men này biểu thị sự glycosyl hóaprotein giống với của các tế bào động vật, đặc biệt là các tế bào người (US 2004/0018590 và US 2002/0137134).

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá đúng rằng protein đang quan tâm có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng thư viện của các tế bào chủ được xử lý về mặt di truyền để biểu hiện nhiều enzym glycosyl hóa, sao cho các tế bào chủ trong thư viện tạo ra protein đang quan tâm với các mô hình glycosyl hóa khác nhau. Sau đó một người thực hành có thể lựa chọn và phân tách protein đang quan tâm bằng các mô hình glycosyl hóa mới cụ thể. Tốt hơn là, protein có mô hình glycosyl hóa mới được lựa chọn cụ thể biểu thị các tính chất sinh học được cải thiện hoặc thay đổi.

D. Sử dụng các protein liên kết với DLL4

Dựa vào khả năng liên kết của chúng với DLL4 của người và DLL4 chuột, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế, bao gồm kháng thể và các đoạn của nó, có thể được sử dụng để dò hoặc đo DLL4 trong mẫu (ví dụ, trong hỗn hợp, dung dịch, hoặc mẫu sinh học, như là máu, huyết thanh, hoặc huyết tương), sử dụng thử nghiệm miễn dịch bất kỳ trong số các thử nghiệm miễn dịch thông thường đã biết trong lĩnh vực này, như là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), hoặc hóa học mô miễn dịch mô. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp dò DLL4 của người và/hoặc DLL4 chuột trong mẫu bao gồm việc cho mẫu tiếp xúc với protein liên kết với DLL4 và dò protein liên kết với DLL4 được liên kết với DLL4 của người và/hoặc DLL4 chuột hoặc protein liên kết không được liên kết để từ đó dò DLL4 của người và/hoặc DLL4 chuột trong mẫu. Protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp với chất dò được dễ dàng dò protein liên kết với DLL4 được liên kết hoặc không được liên kết. Các chất dò được thích hợp bao gồm các enzym, các nhóm giả, vật liệu huỳnh quang, vật liệu phát quang

và vật liệu phóng xạ. Các ví dụ của các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza của cây cải ngựa, kiềm phosphataza, β -galactositaza, hoặc axetylcholinesteaza; ví dụ của các phức nhóm giả bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ của vật liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbeliferon, fluoretxein, fluoretxein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin fluoretxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ của vật liệu phát quang bao gồm luminol; và ví dụ của các vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , hoặc ^{153}Sm .

Các mẫu sinh học mà có thể được thử nghiệm cho DLL4 bao gồm mẫu nước tiểu, phân, máu, huyết thanh, huyết tương, mồ hôi, nước bọt, miếng gạc trong miệng (trong má, trong lưỡi, trong họng), miếng gạc trong âm đạo, miếng gạc trong trực tràng, miếng gạc trên da, vết nạo da, sinh thiết mô, cũng như mẫu mô khác bất kỳ mà có thể thu được bằng phương pháp có sẵn trong lĩnh vực này.

Một cách khác để đánh dấu protein liên kết, DLL4 của người có thể được thử nghiệm trong các dịch sinh học bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh sử dụng các DLL4 tái tổ hợp người chuẩn (rh) được đánh dấu bằng chất dò được và protein liên kết với DLL4 không được đánh dấu được mô tả theo sáng chế. Trong thử nghiệm này, mẫu sinh học, các rhDLL4 chuẩn được đánh dấu, và protein liên kết với DLL4 được kết hợp và lượng rhDLL4 chuẩn được đánh dấu được liên kết với protein liên kết không được đánh dấu được xác định. Lượng DLL4 của người trong mẫu sinh học tỷ lệ nghịch với lượng rhDLL4 chuẩn được đánh dấu liên kết với protein liên kết với DLL4. Tương tự, DLL4 của người có thể cũng được thử nghiệm trong các dịch sinh học bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh sử dụng rhDLL4 chuẩn được đánh dấu bằng chất dò được và protein liên kết với DLL4 không được đánh dấu được mô tả theo sáng chế.

Protein liên kết với DLL4 theo sáng chế tốt hơn là có khả năng trung hòa hoạt tính DLL4, cụ thể là hoạt tính hDLL4, cả *in vitro* và *in vivo*. Do đó, các protein liên kết theo sáng chế này có thể được sử dụng để ức chế hoạt tính DLL4, ví dụ, trong dịch nuôi cấy tế bào chứa DLL4, trong các đối tượng người, hoặc trong các đối tượng động vật có vú khác biểu hiện DLL4 với protein liên kết theo sáng chế phản ứng chéo với nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoạt tính DLL4 bao gồm việc cho DLL4 tiếp xúc với kháng thể DLL4 hoặc phần kháng thể theo sáng chế mà hoạt tính DLL4 bị ức chế. Ví dụ, trong dịch nuôi cấy tế bào chứa hoặc nghi ngờ chứa DLL4,

kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy để ức chế hoạt tính DLL4 trong dịch nuôi cấy.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính DLL4 trong đối tượng, tốt hơn là là từ đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn trong đó DLL4 hoặc hoạt tính DLL4 gây hại. Sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm DLL4 hoặc hoạt tính DLL4 trong đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn này, phương pháp đó bao gồm việc dùng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế cho đối tượng để DLL4 hoặc hoạt tính DLL4 trong đối tượng bị giảm. Tốt hơn là, DLL4 là DLL4 của người, và đối tượng là đối tượng là người. Theo một cách khác, đối tượng có thể là động vật có vú biểu hiện DLL4 mà có khả năng liên kết với protein liên kết với DLL4 theo sáng chế. Vẫn hơn nữa, đối tượng có thể là động vật có vú trong đó DLL4 được đưa vào (ví dụ, bằng cách dùng DLL4 hoặc bằng cách biểu hiện DLL4 chuyển gen). Kháng thể hoặc protein liên kết với DLL4 theo sáng chế khác có thể được dùng cho đối tượng là người cho các mục đích điều trị. Hơn nữa, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể được dùng cho động vật có vú không phải người biểu hiện DLL4 với protein liên kết có khả năng liên kết với nó cho các mục đích thú y hoặc như mô hình động vật của người bệnh. Xét về cái sau cùng, các mô hình động vật có thể là hữu ích để đánh giá hiệu quả điều trị của kháng thể và protein liên kết với DLL4 khác theo sáng chế (ví dụ, thử nghiệm liều lượng và khoảng thời gian sử dụng).

Theo sáng chế, thuật ngữ "rối loạn trong đó DLL4 và/hoặc hoạt tính tín hiệu Notch gây hại" dự định bao gồm bệnh, như là ung thư, và các rối loạn khác trong đó sự có mặt của DLL4 và/hoặc hoạt tính tín hiệu Notch trong đối tượng mắc rối loạn đã được thấy là hoặc bị nghi ngờ chịu trách nhiệm cho sinh lý bệnh học của rối loạn hoặc tác nhân mà góp phần làm rối loạn tồi hơn. Do đó, rối loạn trong đó DLL4 và/hoặc hoạt tính tín hiệu Notch gây hại là rối loạn trong đó sự giảm bớt DLL4 và/hoặc hoạt tính tín hiệu Notch được trông đợi để làm tốt hơn các triệu chứng và/hoặc sự tiến triển của rối loạn (ví dụ, sự tăng trưởng khối u). Các rối loạn này có thể được chứng minh, ví dụ, bằng sự tăng tạo thành mạch trong đối tượng mắc rối loạn (ví dụ, tăng nồng độ của nhiều protein đã biết trong lĩnh vực này để làm tăng huyết thanh, huyết tương, dịch hoạt dịch, .v.v., của đối tượng trong khi tăng trưởng và hình thành khối u), mà có thể dò được, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng DLL4 như được mô tả ở trên. Các ví dụ không bị giới hạn của rối loạn mà có thể được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm các rối

loạn được thảo luận trong phần bên dưới gắn liền với dược phẩm của kháng thể theo sáng chế.

II. Dược phẩm và việc sử dụng điều trị

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa protein liên kết với DLL4 theo sáng chế và chất mang dược dụng. Dược phẩm chứa protein liên kết với DLL4 theo sáng chế là để sử dụng trong, nhưng không chỉ giới hạn ở, chẩn đoán, thăm dò, hoặc kiểm soát rối loạn; trong phòng ngừa, điều trị, kiểm chế, hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó; và/hoặc trong nghiên cứu. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein liên kết với DLL4 theo sáng chế. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein liên kết theo sáng chế và một hoặc nhiều chất dự phòng hoặc điều trị khác các protein liên kết theo sáng chế để điều trị rối loạn trong đó DLL4 và/hoặc hoạt tính DLL4 gây hại. Tốt hơn là, chất dự phòng hoặc điều trị đã biết có ích để hoặc đã được hoặc đang được sử dụng để phòng ngừa, điều trị, kiểm soát, hoặc cải thiện rối loạn, như là ung thư hoặc khối u, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó. Theo các phương án này, dược phẩm có thể còn chứa chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược.

Các protein liên kết theo sáng chế có thể được đưa vào dược phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng. Thông thường là, dược phẩm chứa protein liên kết với DLL4 (hoặc phần liên kết DLL4 của nó) theo sáng chế và chất mang dược dụng. Theo sáng chế, "chất mang dược dụng" bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất tráng ngoài, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và làm chậm hấp thu, và tương tự mà tương thích sinh lý. Các ví dụ của các chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều chất trong số nước, nước muối, nước muối đậm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol và tương tự, cũng như hỗn hợp của nó. Trong nhiều trường hợp, sẽ tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, các đường, các rượu đa chức như là manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Các chất mang dược dụng có thể còn chứa lượng nhỏ chất hỗ trợ như là chất làm ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản hoặc dung dịch đậm, mà làm tăng đời sống hoặc hiệu lực của kháng thể hoặc phần kháng thể.

Nhiều hệ phân phối đã được biết và có thể được sử dụng để dùng một hoặc nhiều protein liên kết với DLL4 theo sáng chế hoặc hỗn hợp của một hoặc nhiều protein liên kết theo sáng chế và chất dự phòng hoặc chất điều trị hữu ích để phòng ngừa, kiểm soát,

điều trị, hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, ví dụ, làm giảm sự tạo thành mạch khối u, bao trên hạt mỡ, các hạt vi mô, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein liên kết với DLL4, sự thực bào qua trung gian thụ thể (ví dụ xem, Wu và Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987)), cấu trúc của axit nucleic như một phần của retrovirus hoặc vectơ khác, .v.v. Phương pháp dùng chất dự phòng hoặc điều trị theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng đường ngoài ruột (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), dùng gây tê ngoài màng cứng, dùng trong khối u, và dùng trên niêm mạc (ví dụ, đường trong mũi và qua miệng). Ngoài ra, đường vào phổi có thể được dùng, ví dụ, bằng việc sử dụng máy xông hoặc ống phun, và dạng bào chế với chất tạo sol khí. Ví dụ, xem, US 6,019,968; US 5,985, 320; US 5,985,309; US 5,934, 272; US 5,874,064; US 5,855,913; US 5,290,540; và US 4,880,078; và các công bố đơn PCT số WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, và WO 99/66903, mỗi patent trong số chúng được đưa trọn vẹn vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế, liệu pháp điều trị kết hợp, hoặc dược phẩm theo sáng chế được dùng sử dụng kỹ thuật phân phối thuốc vào phổi Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, Hoa Kỳ). Theo một phương án cụ thể, chất dự phòng hoặc điều trị theo sáng chế được dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khối u, qua miệng, trong mũi, vào phổi, hoặc dưới da. Chất dự phòng hoặc điều trị có thể được dùng bằng đường thuận tiện bất kỳ, ví dụ bằng truyền hoặc tiêm khối lớn, bằng sự hấp thu thông qua biểu mô hoặc các lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, .v.v.) và có thể được dùng cùng với hoạt chất sinh học khác. Việc dùng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ.

Theo một phương án cụ thể, có thể mong muốn dùng chất dự phòng hoặc điều trị theo sáng chế tại chỗ vào khu vực cần điều trị; điều này có thể đạt được bằng, ví dụ, và không bị giới hạn ở, truyền tại chỗ, bằng tiêm, hoặc bằng cách cấy ghép, việc cấy ghép này là của nguyên liệu có lỗ hoặc không có lỗ, bao gồm màng và khuôn, như là màng cao su, polime, khuôn dạng sợi (ví dụ, Tissuel®), hoặc khuôn collagen. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều protein liên kết với DLL4 của chất đối kháng theo sáng chế được dùng tại chỗ vào khu vực bị nhiễm của đối tượng để phòng ngừa, điều trị, kiểm soát, và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc triệu chứng của nó. Theo một phương án khác, lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều protein liên kết với DLL4 theo sáng chế

được dùng tại chỗ vào khu vực bị nhiễm kết hợp với lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều liệu pháp điều trị (ví dụ, một hoặc nhiều chất dự phòng hoặc điều trị) khác protein liên kết theo sáng chế cho đối tượng để phòng ngừa, điều trị, kiểm soát, và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó.

Theo một phương án khác, chất dự phòng hoặc điều trị có thể được phân phối trong hệ giải phóng được kiểm soát hoặc giải phóng được duy trì. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng để đạt được sự giải phóng được kiểm soát hoặc được duy trì (xem, Langer (Science, 249: 1527-1533 (1990)); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14: 201-240 (1987); Buchwald et al., Surgery, 88: 507-516 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med., 321: 574-579 (1989)). Theo một phương án khác, nguyên liệu polyme có thể được sử dụng để đạt được sự giải phóng được kiểm soát hoặc được duy trì của các liệu pháp điều trị theo sáng chế. Xem, ví dụ, Goodson, J.M, In Medical Applications of Controlled Release, Vol. II, Applications and Evaluations, (Langer và Wise, eds.), (CRC Press Inc., Boca Raton, 1984), chương 6, các trang 115-138; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen và Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer và Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys., C23: 61-126 (1983); cũng xem, Levy et al., Science, 228: 190-192 (1985); During et al., Ann. Neurol., 25: 351-356 (1989); Howard et al., J. Neurosurg., 71: 105-112 (1989); US 5,679,377; US 5,916,597; US 5,912,015; US 5,989,463; và US 5,128,326; và các công bố đơn PCT số WO 99/15154 và WO 99/20253. Các ví dụ của polime được sử dụng trong dược phẩm giải phóng duy trì bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(2-hydroxy etyl methacrylat), poly(metyl methacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit methacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhydrit, poly(N- vinyl pyrrolidon), poly(rượu vinyl), polyacrylamit, poly(etylen glycol), polylactit (PLA), poly(lactit-co-glycolit) (PLGA), và polyorthoeste. Theo phương án ưu tiên, polyme được sử dụng trong dược phẩm giải phóng duy trì là trơ, không có tạp chất có thể lọc được, ổn định trong bảo quản, vô trùng, và thoái biến sinh học. Theo một phương án khác nữa, hệ giải phóng được kiểm soát và được duy trì có thể được đặt gần đích dự phòng hoặc điều trị, do đó chỉ yêu cầu một phần của liều toàn thân (ví dụ xem, Goodson, trong Medical Applications of Controlled Release, (1984), các trang 115-138).

Các hệ giải phóng được kiểm soát được thảo luận trong bài báo bởi Langer (Science, 249: 1527-1533 (1990)). Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra các dược phẩm giải phóng được duy trì chứa một hoặc nhiều chất điều trị theo sáng chế. Ví dụ xem, US 4,526,938; các công bố đơn PCT số WO 91/05548 và WO 96/20698; Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiother. Oncol.*, 39: 179-189 (1996); Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsion," *PDA J. Pharm. Sci.Tech.*, 50: 372-377 (1996); Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Proceed. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854 (1997), và Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759-760 (1997), mỗi tài liệu này được đưa trọn vẹn vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể, khi dược phẩm theo sáng chế là axit nucleic mã hóa chất dự phòng hoặc điều trị, thì axit nucleic có thể được dùng *in vivo* để đẩy mạnh sự biểu hiện của chất dự phòng hoặc điều trị được mã hóa của nó, bằng việc tạo ra nó như một phần của vector biểu hiện axit nucleic thích hợp và dùng nó để nó trở thành nội bào, ví dụ, bằng việc sử dụng vector retrovirus (xem US 4,980,286), hoặc bằng tiêm trực tiếp, hoặc bằng sử dụng sự bắn phá hạt vi mô (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, DuPont), hoặc bao bằng các lipid hoặc các thụ thể bề mặt tế bào hoặc chất chuyển nạp, hoặc bằng việc dùng nó trong liên kết với peptit giống gen giảm phân mà đã biết nhập vào nhân (xem, ví dụ, Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1864-1868 (1991)). Theo một cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào trong tế bào và được đưa vào ADN tế bào chủ để biểu hiện bởi sự tái tổ hợp tương ứng.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế tương thích với đường dùng dự định của nó. Ví dụ của các đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường ngoài ruột (ví dụ, trong tĩnh mạch), trong da, dưới da, qua miệng, trong mũi (ví dụ, xông), qua da (ví dụ, tại chỗ), qua niêm mạc, và đường trực tràng. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm được bào chế phù hợp với các quy trình thông thường như với dược phẩm được chấp nhận để dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, qua miệng, trong mũi, hoặc tại chỗ cho người cần điều trị. Thông thường là, dược phẩm để dùng trong tĩnh mạch là các dung dịch trong dung dịch đệm đẳng trương vô trùng. Khi cần, dược phẩm có thể cũng

bao gồm chất làm hòa tan và chất gây mê tại chỗ như là lignocamne để làm giảm đau ở vị trí tiêm.

Nếu dược phẩm theo sáng chế được dùng tại chỗ, thì các dược phẩm có thể được bào chế ở dạng thuốc mỡ, kem, miếng đắp qua da, dung dịch nước, gel, dầu gội đầu, thuốc xịt, xon khí, dung dịch, nhũ tương, hoặc dạng khác đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ xem, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). Với dạng liều dùng tại chỗ không phải thuốc xịt, các dạng nhót đến bán rắn hoặc rắn chứa chất mang hoặc một hoặc nhiều tá dược tương thích với việc dùng tại chỗ và có độ nhót động tốt hơn là lớn hơn nước thông thường được dùng. Các dược phẩm thích hợp bao gồm, không chỉ giới hạn ở, dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, kem, thuốc mỡ, bột, dầu xoa bóp, sáp, và tương tự, mà nếu muốn chúng được làm vô khuẩn hoặc trộn với chất bổ trợ (ví dụ, chất bảo quản, chất ổn định, chất làm ẩm, dung dịch đệm, hoặc muối) để làm ảnh hưởng đến nhiều đặc tính, như là, ví dụ, áp lực thẩm thấu. Các dạng liều dùng tại chỗ thích hợp khác bao gồm dược phẩm xon khí xịt trong đó hoạt chất, tốt hơn là kết hợp với chất mang trợ rắn hoặc lỏng, được đóng gói trong hỗn hợp với chất dễ bay hơi bị nén (ví dụ, chất đẩy thể khí, như là FREON®) hoặc trong chai nhựa bóp để đẩy thuốc ra. Kem giữ ẩm hoặc chất hút ẩm có thể được thêm vào dược phẩm và các dạng liều dùng nếu muốn. Các ví dụ của các thành phần khác này đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Nếu phương pháp theo sáng chế bao gồm việc dùng dược phẩm trong mũi, thì dược phẩm có thể được bào chế trong dạng xon khí, thuốc xịt, phun mù hoặc ở dạng nhỏ giọt. Cụ thể là, chất dự phòng hoặc điều trị để sử dụng theo sáng chế có thể được phân phối thuận tiện ở dạng trình bày xịt xon khí từ các túi bị nén hoặc ống phun, bằng cách sử dụng chất đẩy thích hợp (ví dụ, diclodifometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, carbon dioxit hoặc khí thích hợp khác). Trong trường hợp của đơn vị liều dùng xon khí bị nén có thể được xác định bằng cách cung cấp van để phân phối một lượng được đo trước. Viên nang và viên đạn (ví dụ, bao gồm gelatin) để sử dụng trong máy xông hoặc máy bơm có thể được bào chế chứa hỗn hợp bột của hợp chất và chất nền bột thích hợp như là lactoza hoặc tinh bột.

Nếu phương pháp theo sáng chế bao gồm việc dùng qua miệng, dược phẩm có thể được bào chế qua miệng ở dạng của viên nén, viên nang, viên nhộng, viên nang vỡ

gel, dung dịch, hỗn dịch, và tương tự. Viên nén hoặc viên nang có thể được bào chế bằng cách thông thường với các tá dược được dụng như là chất liên kết (ví dụ, tinh bột ngô đã được gelatin hóa, polyvinylpyrrolidon, hoặc hydroxypropyl methylxenluloza); chất độn (ví dụ, lactoza, xenluloza vi kết tinh, hoặc canxi hydro phosphat); chất bôi trơn (ví dụ, magie stearat, talc, hoặc silica); chất làm tan rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat); hoặc chất làm ẩm (ví dụ, natri lauryl sulphat). Viên nén có thể được bao bằng phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Dược phẩm lỏng để dùng qua miệng có thể ở dạng, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, sirô hoặc hỗn dịch, hoặc chúng có thể được trình bày như sản phẩm khô để hoàn nguyên với nước hoặc tá dược lỏng thích hợp khác trước khi sử dụng. Dược phẩm lỏng này có thể được bào chế bằng cách thông thường với chất phụ được dụng khác như là chất tạo huyền phù (ví dụ, sirô sorbitol, dẫn xuất của xenluloza, hoặc chất béo ăn được được hydro hóa); chất nhũ hóa (ví dụ, lexitin hoặc cây keo); tá dược lỏng không có nước (ví dụ, dầu hạnh nhân, este dầu, rượu etyl, hoặc dầu thực vật được phân đoạn); và chất bảo quản (ví dụ, methyl hoặc propyl-p-hydroxybenzoat hoặc axit sorbic). Dược phẩm có thể cũng chứa muối đệm, chất thơm, chất màu, và tác nhân đường hóa khi thích hợp. Dược phẩm để dùng qua miệng có thể được bào chế thích hợp để giải phóng được kiểm soát, giải phóng chậm hoặc giải phóng duy trì (các) chất dự phòng hoặc điều trị.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc dùng vào phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng máy xông hoặc ống phun, của dược phẩm được bào chế với chất tạo xon khí. Ví dụ xem, US 6,019,968; US 5,985,320; US 5,985,309; US 5,934,272; US 5,874,064; US 5,855,913; US 5,290,540; và US 4,880,078; và các công bố đơn PCT số WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, và WO 99/66903, mỗi tài liệu trong số chúng được đưa trọn vẹn vào đây bằng cách tham khảo. Theo một phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế, liệu pháp điều trị kết hợp, và/hoặc dược phẩm theo sáng chế được dùng bằng cách sử dụng kỹ thuật phân phối thuốc vào phổi Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, Hoa Kỳ).

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc dùng dược phẩm được bào chế để dùng đường ngoài ruột bằng cách tiêm (ví dụ, bằng tiêm khối lớn hoặc truyền liên tục). Dược phẩm để tiêm có thể được trình bày trong dạng liều dùng đơn vị (ví dụ, trong các ống thuốc tiêm hoặc vật chứa nhiều liều) với chất bảo quản. Các dược phẩm có thể ở các dạng này như hỗn dịch, dung dịch, hoặc nhũ tương trong tá dược lỏng dầu hoặc

nước, và có thể chứa chất tạo công thức bào chế như là chất tạo hỗn dịch, chất làm ổn định và/hoặc chất gây phân tán. Theo một cách khác, hoạt chất có thể ở dạng bột để hoàn nguyên với tá dược lỏng thích hợp (ví dụ, nước không có chất gây sốt vô trùng) trước khi sử dụng.

Phương pháp theo sáng chế ngoài ra có thể bao gồm việc dùng dược phẩm được bào chế như dược phẩm dạng kho dự trữ. Dược phẩm hoạt động kéo dài này có thể được dùng bằng cách cấy ghép (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Do đó, ví dụ, các dược phẩm có thể được bào chế với nguyên liệu polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví dụ, như nhũ tương trong dầu có thể chấp nhận) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc như dẫn xuất tan được ít (ví dụ, như muối ít tan).

Phương pháp theo sáng chế đề cập đến việc dùng dược phẩm được bào chế như dạng trung tính hoặc muối. Muối được dùng bao gồm các chất được tạo thành với các anion như là các chất có nguồn gốc từ axit hydrocloric, phosphoric, axetic, oxalic, tartaric, .v.v., và các chất được tạo thành với các cation như là các chất có nguồn gốc từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain, .v.v..

Nhìn chung, các thành phần của dược phẩm được cung cấp riêng biệt hoặc trộn cùng với nhau trong dạng liều dùng đơn vị, ví dụ, như bột đông khô khô hoặc dạng đậm đặc không có nước trong vật chứa được hàn kín mít như là ống thuốc tiêm hoặc túi chất dẻo nhỏ chỉ ra số lượng của hoạt chất. Khi kiểu dùng là truyền, thì dược phẩm có thể được phân tán trong chai truyền chứa nước dùng trong dược phẩm vô trùng hoặc nước muối. Khi kiểu dùng là bằng tiêm, ống thuốc tiêm của nước vô trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp để các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Cụ thể là, sáng chế cũng đề cập đến một hoặc nhiều của chất dự phòng hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế được đóng gói trong vật chứa được hàn kín như là ống thuốc tiêm hoặc túi chỉ ra số lượng chất. Theo một phương án, một hoặc nhiều chất dự phòng hoặc điều trị, hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp như bột đông khô tiệt trùng khô hoặc đậm đặc không có nước trong vật chứa được hàn kín và có thể được hoàn nguyên (ví dụ, với nước hoặc nước muối) đến nồng độ thích hợp để dùng cho đối tượng. Tốt hơn là, một hoặc nhiều chất dự phòng hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế được dùng như bột đông khô tiệt trùng khô trong vật chứa được hàn kín ở liều dùng đơn vị là ít nhất 5 mg, tốt hơn nữa là ít nhất 10 mg, ít nhất 15 mg, ít nhất 25 mg, ít

nhất 35 mg, ít nhất 45 mg, ít nhất 50 mg, ít nhất 75 mg, hoặc ít nhất 100 mg. Chất dự phòng hoặc điều trị đông khô hoặc dược phẩm theo sáng chế nên được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của nó và chất dự phòng hoặc điều trị, hoặc dược phẩm theo sáng chế nên được dùng trong 1 tuần, tốt hơn là trong 5 ngày, trong 72 giờ, trong 48 giờ, trong 24 giờ, trong 12 giờ, trong 6 giờ, trong 5 giờ, trong 3 giờ, hoặc trong 1 giờ sau khi được hoàn nguyên. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều chất dự phòng hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa được hàn kín chỉ ra số lượng và nồng độ của chất. Tốt hơn là, dạng lỏng của dược phẩm được dùng được dùng trong vật chứa được hàn kín ít nhất là 0,25 mg/ml, tốt hơn nữa là ít nhất 0,5 mg/ml, ít nhất 1 mg/ml, ít nhất 2,5 mg/ml, ít nhất 5 mg/ml, ít nhất 8 mg/ml, ít nhất 10 mg/ml, ít nhất 15 mg/kg, ít nhất 25 mg/ml, ít nhất 50 mg/ml, ít nhất 75 mg/ml, hoặc ít nhất 100 mg/ml. Dạng lỏng nên được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của nó.

Các protein liên kết theo sáng chế có thể được đưa vào dược phẩm thích hợp để dùng đường ngoài ruột. Tốt hơn là, protein liên kết sẽ được bào chế như dung dịch tiêm được chứa 0,1-250 mg/ml kháng thể. Dung dịch tiêm được có thể bao gồm dạng liều dùng lỏng hoặc đông khô trong lọ thủy tinh flin hoặc màu hổ phách, ống thuốc tiêm hoặc bơm tiêm được làm đầy sẵn. Dung dịch đệm có thể là L-histidin (1-50 mM), tối ưu là 5-10 mM, ở pH từ 5,0 đến 7,0 (tối ưu là pH 6,0). Dung dịch đệm thích hợp khác bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, natri succinat, natri xitrat, natri phosphat hoặc kali phosphat. Natri clorua có thể được sử dụng để thay đổi độ tính của dung dịch ở nồng độ 0-300 mM (tối ưu là 150 mM cho dạng liều dùng lỏng). Các chất bảo vệ cryo có thể được bao gồm cho dạng liều dùng đông khô, phần lớn là 0-10% sucroza (tối ưu là 0,5-1,0%). Các chất bảo vệ cryo thích hợp khác bao gồm trehaloza và lactoza. Chất độn có thể được bao gồm cho dạng liều dùng đông khô, phần lớn là 1-10% manitol (tối ưu là 2-4%). Chất ổn định có thể được sử dụng trong cả dạng liều dùng lỏng và đông khô, phần lớn là 1-50 mM L-methionin (tối ưu là 5-10 mM). Các chất độn thích hợp khác bao gồm glyxin, arginin, có thể được bao gồm như là 0-0,05% polysorbat-80 (tối ưu là 0,005-0,01%). Các chất có hoạt tính bề mặt khác bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở polysorbat 20 và chất có hoạt tính bề mặt BRIJ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở nhiều dạng. Các dạng này bao gồm, ví dụ, dạng liều dùng lỏng, bán rắn và rắn, như là dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm được và có

thể pha được), dạng phân tán hoặc hỗn dịch, viên nén, viên tròn, bột, liposom và viên đạn. Dạng ưu tiên phụ thuộc vào kiểu dùng dự định và áp dụng điều trị. Dược phẩm ưu tiên điển hình ở dạng dung dịch tiêm được hoặc có thể pha được, như là dược phẩm tương tự các dược phẩm được sử dụng để gây miễn dịch thụ động của người với kháng thể khác. Kiểu dùng ưu tiên là đường ngoài ruột (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong màng bụng, trong cơ). Theo phương án ưu tiên, protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế được dùng bằng tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch. Theo một phương án ưu tiên khác, protein liên kết với DLL4 được dùng bằng tiêm trong cơ hoặc dưới da.

Dược phẩm điều trị thông thường là phải tiệt trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Dược phẩm có thể được bào chế như là dung dịch, vi nhũ tương, dạng phân tán, liposom, hoặc cấu trúc được sắp xếp khác thích hợp với nồng độ thuốc cao. Dung dịch tiêm được tiệt trùng có thể được bào chế bằng việc đưa hoạt chất (nghĩa là, kháng thể hoặc phần kháng thể) với lượng được yêu cầu trong dung môi thích hợp với một hoặc hỗn hợp của các thành phần được liệt kê ở trên, như được yêu cầu, tiếp theo bằng lọc vô trùng. Nhìn chung, dạng phân tán được bào chế bằng việc đưa hoạt chất trong tá dược lỏng vô trùng mà chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần khác được yêu cầu từ các thành phần được liệt kê ở trên. Trong trường hợp vô trùng, bột đông khô để bào chế dung dịch tiêm được vô trùng, phương pháp bào chế ưu tiên là làm khô trong chân không và làm khô bằng xít mà thu được bột hoạt chất cộng với thành phần mong muốn khác bất kỳ từ dung dịch được lọc vô trùng trước đó của nó. Trạng thái lỏng thích hợp của dung dịch có thể được duy trì, ví dụ, bằng việc sử dụng màng bao như là lexitin, bằng sự duy trì kích cơ hạt theo yêu cầu trong trường hợp dạng phân tán và bằng việc sử dụng chất có hoạt tính bề mặt. Sự hấp thu kéo dài của dược phẩm tiêm được có thể được mang khoảng bao gồm, trong dược phẩm, chất làm chậm hấp thu, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, mặc dù trong nhiều áp dụng điều trị, đường dùng/kiểu dùng ưu tiên là tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch, hoặc truyền. Như sẽ được đánh giá đúng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, đường dùng và/hoặc kiểu dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào các kết quả mong muốn. Theo các phương án nhất định, hoạt chất có thể được bào chế với chất mang mà sẽ bảo vệ hợp chất kháng lại sự giải phóng nhanh, như là dược phẩm giải phóng được kiểm soát, bao gồm cấy ghép, thuốc đắp qua

da, và hệ phân phối bao nang. Polime thoái biến sinh học, tương hợp sinh học có thể được sử dụng, như là etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các dược phẩm này đã có bằng sáng chế hoặc nhìn chung đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

Theo các phương án nhất định, protein liên kết theo sáng chế có thể được dùng qua miệng, ví dụ, với chất pha loãng trợ hoặc chất mang ăn được có thể tiêu hóa. Hợp chất (và các thành phần khác, nếu muốn) có thể được bao gồm trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, được nén thành viên nén, hoặc được đưa trực tiếp vào chế độ ăn đối tượng. Để dùng điều trị qua miệng, các hợp chất có thể được đưa cùng với các tá dược và được sử dụng trong dạng viên nén ăn được, viên nén dùng trong má, viên ngậm, viên nang, cốm thuốc, hỗn dịch, sirô, bánh xốp, và tương tự. Để dùng hợp chất theo sáng chế bằng đường dùng khác đường ngoài ruột, có thể cần phải bao hợp chất với, hoặc dùng đồng thời với hợp chất với, chất phòng ngừa sự bất hoạt của nó.

Các hoạt chất phụ có thể cũng được đưa vào dược phẩm. Theo các phương án nhất định, protein liên kết theo sáng chế được bào chế đồng thời và/hoặc được dùng đồng thời với một hoặc nhiều chất điều trị khác mà có ích để điều trị các rối loạn trong đó hoạt tính DLL4 gây hại. Ví dụ, kháng thể hoặc phần kháng thể kháng huDLL4 theo sáng chế có thể được bào chế đồng thời và/hoặc được dùng đồng thời với một hoặc nhiều kháng thể khác mà liên kết với các đích khác (ví dụ, kháng thể mà liên kết các xytokin khác hoặc mà liên kết các phân tử bề mặt tế bào). Hơn nữa, một hoặc nhiều protein liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với hai hoặc nhiều chất điều trị đã nói ở trên. Các liệu pháp điều trị kết hợp này thuận lợi là có thể sử dụng các liều thấp hơn của chất điều trị được dùng, do đó tránh các độc tính có thể xảy ra hoặc các biến chứng có liên quan đến nhiều liệu pháp điều trị đơn.

Theo các phương án nhất định, protein liên kết với DLL4 theo sáng chế được liên kết với tá dược lỏng kéo dài thời gian bán thải đã biết trong lĩnh vực này. Các tá dược lỏng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng Fc, polyetylen glycol, và dextran. Các tá dược lỏng được mô tả, ví dụ, US 6,660,843 B1 và công bố đơn PCT được công bố số WO 99/25044, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể, trình tự axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa protein liên kết theo sáng chế hoặc một chất dự phòng hoặc điều trị theo sáng chế được dùng để điều trị, phòng ngừa, kiểm soát, hoặc làm cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó bằng liệu pháp gen. Liệu pháp gen đề cập đến liệu pháp điều trị thực hiện bằng cách dùng axit nucleic được biểu diễn hoặc có thể biểu diễn cho đối tượng. Theo phương án này của sáng chế, axit nucleic tạo rprotein liên kết được mã hóa của nó hoặc chất dự phòng hoặc điều trị theo sáng chế mà gây ra tác dụng dự phòng hoặc điều trị.

Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp gen có sẵn trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo sáng chế. Để xem chung về phương pháp của liệu pháp gen, xem Goldspiel et al., Clin. Pharmacy, 12: 488-505 (1993); Wu và Wu, Biotherapy, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science, 260: 926- 932 (1993); và Morgan và Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217 (1993); Robinson, C., Trends Biotechnol., 11(5):155 (1993). Phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này về kỹ thuật ADN tái tổ hợp mà có thể được sử dụng được mô tả trong Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); và Kriegler, Gen Transfer and Expression, A Laboratory Manual, (Stockton Press, New York, 1990). Mô tả chi tiết của các phương pháp của liệu pháp gen được mô tả trong US 20050042664 A1, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị (ví dụ chữa, kìm hãm, cải thiện, làm chậm, hoặc phòng ngừa khởi phát, hoặc phòng ngừa sự tái diễn hoặc tái phát) hoặc phòng ngừa khối u có liên quan đến DLL4 trong đối tượng. Phương pháp bao gồm việc dùng protein liên kết với DLL4 cho đối tượng, ví dụ, kháng thể kháng DLL4 hoặc đoạn của nó như được mô tả theo sáng chế, trong một lượng đủ để điều trị hoặc phòng ngừa khối u hoặc ung thư có liên quan đến DLL. Chất đối kháng DLL4, nghĩa là, kháng thể kháng DLL4 hoặc đoạn của nó, có thể được dùng cho đối tượng đơn lẻ hoặc kết hợp với cách điều trị khác như được mô tả theo sáng chế.

DLL4 đóng vai trò quan trọng trong bệnh học có liên quan đến nhiều bệnh có liên quan đến miễn dịch và các yếu tố viêm, cụ thể là sự tạo thành mạch ung thư và khối u. Ví dụ của các rối loạn có liên quan đến DLL4 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các rối loạn tác dụng có hại đến các quy trình sinh học sau đây: chức năng và phát triển

noron; sự ổn định của cửa và sự tạo thành mạch máu trong động mạch; sự điều chỉnh của các sự kiện liên lạc tế bào chủ yếu giữa màng trong tim và cơ tim trong suốt sự hình thành của van ban đầu và sự phát triển và sự biệt hóa tâm thất; nội cân bằng van tim, cũng như các hệ quả trong các rối loạn người có liên quan đến hệ tim mạch; đặc tính dòng giống tế bào đúng lúc của cả tuyến tụy nội tiết và ngoại tiết; ảnh hưởng của quyết định của nhị phân của các tế bào mà phải chọn giữa dòng giống bài tiết và hấp thụ trong ruột; sự mở rộng của khoang tế bào gốc tạo huyết trong quá trình phát triển xương và sự tham gia trong sự cam kết với dòng giống tế bào tạo xương như là chứng loãng xương; sự điều tiết của quyết định số phận tế bào trong tuyến vú ở nhiều giai đoạn phát triển khác nhau; và các cơ chế không nhân nhất định, như là sự kiểm soát của bộ khung tế bào actin thông qua tyrosin kinase Abl. Cụ thể hơn, các rối loạn có liên quan đến DLL4 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư, T-ALL (bệnh bạch cầu tạo lympho bào cấp tế bào T), CADASIL (bệnh động mạch trội thể nhiễm sắc điển hình não với chứng nhồi máu dưới vỏ và bệnh chất trắng não), MS (đa xơ cứng), tứ chứng Fallot (TOF), và hội chứng Alagille (AS), bệnh thoái hóa điểm vàng và bệnh thoái hóa điểm vàng có liên quan đến tuổi tác, và các bệnh phụ thuộc và không phụ thuộc vào sự tạo thành mạch khác được đặc trưng bởi sự biểu hiện hoặc hoạt tính DLL4 khác thường.

Tốt hơn là, protein liên kết DLL4, như là kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả theo sáng chế, được sử dụng để điều trị ung thư và khối u.

Các protein liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp, nghĩa là, nhiều hơn một protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế, để điều trị ung thư, khối u, hoặc rối loạn khác trong đó việc liên kết với, sự ức chế, và/hoặc sự trung hòa DLL4 có thể được coi như hoặc có lợi khác với sức khỏe của từng cá nhân.

Nên hiểu rằng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể cũng được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với chất phụ, ví dụ, chất có tác dụng điều trị, mà chất phụ này được chọn bởi chuyên gia cho mục đích được dự định của nó. Ví dụ, chất phụ này có thể là chất có tác dụng điều trị mà đã được biết trong lĩnh vực này là có ích để điều trị ung thư, khối u, hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh khác trong đó việc liên kết với hoặc sự ức chế DLL4 được xem như có thể mong đợi hoặc thuận lợi để điều trị ung thư, khối u, hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh khác. Chất phụ cũng có thể là chất mang lại lợi ích cho được phẩm điều trị, ví dụ, chất làm ảnh hưởng đến độ nhớt của dược phẩm.

Hơn nữa nên được hiểu rằng các dược phẩm kết hợp được bao gồm trong sáng chế này là các dược phẩm kết hợp có ích cho mục đích dự định của chúng. Các chất được công bố bên dưới với mục đích minh họa và không định giới hạn sáng chế. Các dược phẩm kết hợp, mà là một phần của sáng chế này, có thể là kháng thể theo sáng chế và ít nhất một chất phụ được chọn từ danh sách bên dưới. Dược phẩm kết hợp có thể cũng bao gồm hơn một chất phụ, ví dụ, hai hoặc ba chất phụ, nếu dược phẩm kết hợp là như vậy thì dược phẩm được tạo thành có thể thực hiện chức năng dự định của nó.

Dược phẩm kết hợp ưu tiên của các chất có tác dụng điều trị có thể can thiệp ở các thời điểm khác nhau trong các con đường tín hiệu tạo khối u hoặc tạo mạch. Các ví dụ ưu tiên của các chất có tác dụng điều trị có ích trong phương pháp và dược phẩm của sáng chế bao gồm chất chống ung thư, phép trị liệu bằng phóng xạ, và hóa học trị liệu như là chất alkyl hóa ADN, cisplatin, carboplatin, chất kháng tubulin, paclitaxel, docetaxel, taxol, doxorubicin, gemcitabin, gemzar, anthracyclin, adriamycin, các chất ức chế topoisomeraza I, các chất ức chế topoisomeraza II, 5-flouracil (5-FU), leucovorin, irinotecan, các chất ức chế thụ thể tyroxin kinaza (ví dụ, erlotinib, gefitinib), các chất ức chế COX-2 (ví dụ, celecoxib), và các chất ức chế kinaza.

Protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể cũng được dùng kết hợp với các chất, như là methotrexat, 6-MP, azathioprin sulphasalazin, mesalazin, olsalazin cloquinin/hydroxycloquin, pencillamin, aurothiomalat (trong cơ và qua miệng), azathioprin, conchixin, corticosteroid (qua miệng, xông và tiêm tại chỗ), các chất chủ vận thụ thể adrenalin beta-2 (salbutamol, terbutalin, salmeteral), các xanthin (theophylin, aminophylin), cromoglycat, nedocromil, ketotifen, ipratropium và oxitropium, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolat mofetil, leflunomil, các NSAID, ví dụ, ibuprofen, corticosteroid như là prednisolon, các chất ức chế phosphodiesteraza, các chất chủ vận adenosin, chất kháng tạo huyết khối, các chất ức chế bổ thể, chất gây tiết adrenalin, chất can thiệp vào tín hiệu bằng các cytokin gây viêm như là TNF α hoặc IL-1 (ví dụ các chất ức chế IRAK, NIK, IKK, p38 hoặc MAP kinaza), các chất ức chế enzym chuyển IL-1 β , các chất ức chế enzym chuyển TNF α (TACE), các chất ức chế tín hiệu tế bào T như là các chất ức chế kinaza, các chất ức chế metalloproteinaza, sulfasalazin, azathioprin, 6-mercaptopurin, các chất ức chế enzym chuyển angiotensin, các thụ thể cytokin tan được và các dẫn xuất của nó (ví dụ, các thụ thể p55 hoặc p75 TNF tan được và các dẫn xuất p75TNFRIgG (EnbrelTM) và

p55TNFRIgG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), các xytokin chống viêm (ví dụ, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 và TGF β), celecoxib, axit folic, hydroxycloquin sulfat, rofecoxib, etanercept, infliximab, naproxen, valdecoxib, sulfasalazin, metylprednisolon, meloxicam, metylprednisolon axetat, vàng natri thiomalat, aspirin, triamcinolon axetonit, propoxyphen napsylat/apap, folat, nabumeton, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac natri, oxaprozin, oxycodon hcl, hydrocodon bitartrat/apap, diclofenac natri/misoprostol, fentanyl, anakinra, tái tổ hợp người, tramadol hcl, salsalat, sulindac, xyanocobalamin/fa/pyridoxin, axetaminophen, alendronat natri, prednisolon, morphin sulfat, lidocain hydroclorua, indomethacin, glucosamin sulf/chondroitin, amitriptylin HCl, sulfadiazin, oxycodon HCl/axetaminophen, olopatadin hcl, misoprostol, naproxen natri, omeprazol, xyclophosphamit, rituximab, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, kháng IL-18, kháng IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, và Mesopram.

Ví dụ không bị giới hạn của các chất có tác dụng điều trị ung thư có thể được dùng đồng thời hoặc sử dụng kết hợp với protein liên kết với DLL4 theo sáng chế bao gồm các chất sau đây: budenosit; tác nhân tăng trưởng biểu bì; sulfasalazin; aminosalixylat; 6-mercaptopurin; azathioprin; metronidazol; các chất ức chế lipoxigenaza; mesalamin; olsalazin; balsalazit; chất chống oxi hóa; các chất ức chế thromboxan; chất đối kháng thụ thể IL-1; kháng thể đơn dòng kháng IL-1 β ; kháng thể đơn dòng kháng IL-6; tác nhân tăng trưởng; các chất ức chế elastaza; các hợp chất pyridinyl-imidazol; và các kháng thể với hoặc các chất đối kháng của các người xytokin người khác hoặc các tác nhân tăng trưởng, ví dụ, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, và PDGF. Kháng thể theo sáng chế, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể được kết hợp với kháng thể với các phân tử bề mặt tế bào như là CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90, hoặc các phối tử của chúng.

Các ví dụ của các chất có tác dụng điều trị khác mà có thể được kết hợp với protein liên kết với DLL4 theo sáng chế bao gồm các chất sau đây: chất đối kháng TNF, ví dụ, kháng thể kháng TNF, D2E7 (công bố đơn PCT số WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, các cấu trúc TNFR-Ig (p55TNFRIgG (ENBRELE®) và p55TNFRIgG (LENERCEPT)), và các chất ức chế PDE4. Các protein liên kết theo sáng chế có thể được kết hợp với mesalamin, prednison, azathioprin, mercaptopurin,

infiximab, metylprednisolon natri succinat, diphenoxylat/atrop sulfat, loperamit hydroclorua, methotrexat, omeprazol, folat, ciprofloxacin/dextroza-nước, hydrocodon bitartrat/apap, tetraoxycyclin hydroclorua, fluoxinonit, metronidazol, thimerosal/axit boric, cholestyramin/sucroza, ciprofloxacin hydroclorua, hyosxyamin sulfat, meperidin hydroclorua, midazolam hydroclorua, oxycodon hcl/axetaminophen, promethazin hydroclorua, natri phosphat, sulfamethoxazole/trimethoprim, celecoxib, polycarbophil, propoxyphene napsylate, hydrocortison, các multivitamin, balsalazit dinatri, codein phosphat/apap, colesevelam hcl, xyanocobalamin, axit folic, levofloxacin, metylprednisolon, natalizumab, và interferon-gama.

Ví dụ không bị giới hạn của các chất có tác dụng điều trị mà protein liên kết theo sáng chế có thể được kết hợp với bao gồm các chất sau đây: aspirin, nitroglycerin, isosorbit mononitrat, metoprolol succinat, atenolol, metoprolol tartrat, amlodipin besylat, diltiazem hydroclorua, isosorbit dinitrat, clopidogrel bisulfat, nifedipin, atorvastatin canxi, kali clorua, furosemit, simvastatin, verapamil hcl, digoxin, propranolol hydroclorua, carvedilol, lisinopril, spironolacton, hydroclothiazit, enalapril maleat, nadolol, ramipril, enoxaparin natri, heparin natri, valsartan, sotalol hydroclorua, fenofibrat, ezetimibe, bumetanit, losartan kali, lisinopril/hydroclothiazit, felodipin, captopril, và bisoprolol fumarat.

Được phẩm theo sáng chế có thể bao gồm "một lượng hữu hiệu điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu dự phòng" của protein liên kết theo sáng chế. "Lượng hữu hiệu điều trị" đề cập đến một lượng hữu hiệu, ở liều dùng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu điều trị của protein liên kết có thể được quyết định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể thay đổi theo nhiều yếu tố như là tình trạng bệnh, tuổi, giới tính và trọng lượng của từng cá nhân, và khả năng của protein liên kết để tạo ra đáp ứng mong muốn trong từng cá nhân. Lượng hữu hiệu điều trị cũng là lượng trong đó tác dụng độc hoặc có hại bất kỳ của protein liên kết nhiều hơn tác dụng điều trị có lợi. "Lượng hữu hiệu dự phòng" đề cập đến một lượng hữu hiệu, ở liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt kết quả dự phòng mong muốn. Thông thường là, khi liều dự phòng được sử dụng trong các đối tượng trước hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, thì lượng hữu hiệu dự phòng sẽ ít hơn lượng hữu hiệu điều trị.

Chế độ liều dùng có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc dự phòng). Ví dụ, một liều đơn lớn được dùng, thì nhiều liều được chia có thể được dùng theo thời gian hoặc liều có thể được làm giảm hoặc tăng lên cân xứng như được chỉ ra bởi tình trạng cấp bách của tình trạng điều trị. Đặc biệt là thuận lợi để bào chế được phẩm đường ngoài ruột trong dạng đơn vị liều dùng để dễ dùng và đồng đều liều dùng. Dạng đơn vị liều dùng theo sáng chế đề cập đến các đơn vị riêng rẽ về vật lý thích hợp như là các liều dùng đơn nhất cho các đối tượng động vật có vú đang được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng hoạt chất được xác định trước được tính để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng được yêu cầu. Phần mô tả về các dạng đơn vị liều dùng theo sáng chế được đọc chính tả bằng và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính duy nhất của hoạt chất và tác dụng điều trị hoặc dự phòng cụ thể đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực tạo hợp chất như là hoạt chất để điều trị sự nhạy cảm của các cá nhân.

Khoảng lượng hữu hiệu điều trị hoặc dự phòng không bị giới hạn mẫu của protein liên kết với DLL4 theo sáng chế là 0,1-20 mg/kg, tốt hơn nữa là 1-10 mg/kg. Nên nhớ rằng giá trị liều dùng có thể thay đổi theo kiểu và tình trạng nặng của tình trạng bệnh được làm giảm bớt. Hơn nữa nên được hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều dùng cụ thể nên được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cá nhân và sự quyết định chuyên nghiệp của người dùng hoặc giám sát việc dùng dược phẩm, và các khoảng liều dùng được công bố ở đây chỉ là ví dụ và không dự định giới hạn phạm vi hoặc việc thực hành của dược phẩm được bảo hộ.

III. Sử dụng trong các kỹ thuật miễn dịch

Kiểu bất kỳ trong số các kiểu thử nghiệm thăm dò miễn dịch có thể được phỏng theo để dùng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế trong việc dò DLL4 có mặt trong hỗn hợp, dung dịch, hoặc mẫu sinh học. Các kiểu thử nghiệm thăm dò miễn dịch này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA), thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm vết miễn dịch (ví dụ, thẩm tách Westen), băng miễn dịch (ví dụ, que thử nghiệm miễn dịch) mà chứa protein liên kết với DLL4 theo sáng chế được hấp phụ hoặc cố định trên cơ chất, phân loại tế bào hoạt động huỳnh quang (FACS), và tương tự. Protein liên kết với DLL4 được mô tả theo sáng chế có thể được hấp phụ hoặc cố định trên cơ chất, ví dụ, hạt nhựa hoặc nguyên liệu khác, để sử dụng trong cột ái lực hoặc kiểu ái lực khác

bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để tinh chế DLL4 từ mẫu. Việc dò DLL4 sử dụng protein liên kết với DLL4 theo sáng chế có thể được thực hiện *in vitro* trong hỗn hợp, dung dịch, hoặc trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học mà có thể tiếp xúc với protein liên kết với DLL4 theo sáng chế để dò hoặc đo DLL4 trong mẫu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước tiểu, nước bọt, miếng gạc qua miệng (miếng gạc thuộc miệng, dưới lưỡi, hoặc trong họng), miếng gạc trên da, vết nạo da, miếng gạc trực tràng, miếng gạc âm đạo, mẫu máu toàn phần, mẫu huyết tương, mẫu huyết thanh, sinh thiết mô, và mẫu khác bất kỳ thu được từ cá nhân bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án khác, protein liên kết với DLL4 có thể được dùng để dò DLL4 *in vivo* như là nhiều phương pháp chụp cắt lớp và quét, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chụp cắt lớp nhờ máy tính bằng tia X (CT), chụp ảnh cộng hưởng từ (MRI), và chụp cắt lớp phát ra pozitron (PET).

Sẽ được đánh giá đúng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là các biến đổi và sự phỏng theo thích hợp khác của phương pháp theo sáng chế được mô tả theo sáng chế là rõ ràng và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tương đương mà không ra khỏi phạm vi của sáng chế hoặc các phương án được mô tả theo sáng chế. Bây giờ sáng chế được mô tả chi tiết, sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây, mà được bao gồm chỉ để minh họa và không nhằm giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thử nghiệm *in vitro* được sử dụng để xác định hoạt tính chức năng của kháng thể DLL4

Ví dụ 1.1: Xác định ái lực bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt BIAcore®.

Thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIAcore® (Biacore, Inc., Piscataway, New Jersey, US) để xác định ái lực của kháng thể bằng các phép đo động học về hằng số tốc độ kết hợp và phân ly. Liên kết của kháng thể DLL4 với vùng ngoại tế bào DLL4 tái tổ hợp tinh khiết (ECD) được xác định bằng các phép đo dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt bằng thiết bị Biacore® (Biacore 2000, Biacore 3000, hoặc Biacore T100; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, Hoa Kỳ) sử dụng dung dịch đệm chạy HBS-EPB (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,1 mg/ml BSA và chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) ở 25°C. Ví dụ, khoảng 9000 RU của kháng thể đa

dòng đặc hiệu Fc kháng người của dê (Thermofisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, Hoa Kỳ) được pha loãng trong natri axetat 10 mM (pH 4,5) được cố định trên chip cảm biến sinh học mức độ nghiên cứu CM5 bằng cách sử dụng kit ghép đôi amin chuẩn theo các hướng dẫn của nhà sản xuất và các quy trình ở 25 µg/ml. Các gốc không được phản ứng trên bề mặt chip cảm biến sinh học được chặn bằng etanolamin. Đối với phân tích động học, các phương trình tỷ lệ có nguồn gốc từ mô hình liên kết Langmuir 1:1 được làm thích hợp đồng thời với nhiều lần tiêm kháng nguyên (bằng cách sử dụng phân tích phù hợp toàn cầu) với việc sử dụng Scrubber 2 (Phần mềm sinh học), phần mềm đánh giá sinh học Biacore Biaevalue 4.0.1 hoặc phần mềm đánh giá Biacore T100. Kháng thể tinh khiết được pha loãng trong dung dịch đệm chạy để bắt giữ trên các bề mặt phản ứng Fc kháng người của dê. Kháng thể được bắt giữ như là phối tử (1 µg/ml) được tiêm trên các khuôn phản ứng ở tốc độ chảy 10 µl/phút. Trong suốt quá trình thử nghiệm, tất cả các phép đo được tham chiếu dựa vào bề mặt bắt giữ đơn lẻ (nghĩa là, không bắt giữ kháng thể kháng DLL4). Các hằng số tốc độ kết hợp và phân ly, K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) và K_{off} (s^{-1}) được xác định dưới tốc độ chảy liên tục 80 µl/phút. Các hằng số tốc độ được suy ra bằng việc tạo phép đo liên kết động học ở các nồng độ kháng nguyên khác nhau nằm trong khoảng từ 1,23 đến 900 nM, như một sự pha loãng hàng loạt gấp 3 lần, và bao gồm các lần tiêm chỉ dung dịch đệm (được sử dụng để làm tham chiếu kép). Hằng số phân ly cân bằng K_D (M) của phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên đích sau đó được tính từ các hằng số tốc độ động học bằng công thức sau đây: $K_D = K_{off}/K_{on}$. Việc liên kết theo hàm thời gian và tính các hằng số tốc độ động học. Trong thử nghiệm này, có thể đo được tốc độ kết hợp cao đến mức $10^6 M^{-1}s^{-1}$ và tốc độ phân ly thấp đến mức $10^{-6} s^{-1}$.

Ví dụ 1.2: Liên kết của kháng thể DLL4 với vùng ngoại tế bào DLL4 tan được được xác định bằng ELISA.

Phương pháp 1 (bắt giữ bằng ELISA)

Các đĩa miễn dịch Nunc 96 giếng (#439454) được bao bằng kháng thể 5µg/ml kháng lại IgG người (đoạn đặc hiệu Fcγ, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, 100 µl/giếng) trong D-PBS (Gibco #14190) và được ủ qua đêm ở 4°C. Các đĩa ELISA được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa (PBS, Tween-20 0,05%) và sau đó được phong bế bằng dung dịch đệm phong bế 200 ml/giếng (D-PBS, BSA 1%, $CaCl_2$ 1mM, Tween-20 0,05%) trong 1 giờ ở 25°C. Các đĩa được rửa 3 lần và được ủ với nồng độ kháng thể

DLL4 100 μ l/giếng (0,0001-100 nM, pha loãng hàng loạt gấp 10 lần trong dung dịch đệm phong bế) trong 1 giờ ở 25°C, và sau đó rửa lại 3 lần. Các đĩa chứa kháng thể DLL4 bị bắt giữ được ủ với vùng ngoài tế bào DLL4 của người được đánh dấu bằng biotin (10 nM trong dung dịch đệm phong bế, 100 μ l/giếng) trong 1 giờ ở 25°C, được rửa 3 lần, và được ủ với streptavidin liên hợp với HRP (KPL #474-3000, pha loãng với tỷ lệ 1:10,000 trong dung dịch đệm phong bế, 100 μ l/giếng) trong 1 giờ ở 25°C. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được ủ bằng cơ chất ELISA 100 μ l/giếng (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280). Phản ứng được dừng lại sau 2 phút ở 25°C với H₂SO₄ 2N 100 μ l/giếng và sự hấp thụ được đọc ở 450nm. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và giá trị EC₅₀ được báo cáo.

Phương pháp 2 (đĩa được bao đồng).

Các đĩa được bao đồng 96-giếng (Thermo Scientific #15143) được rửa 3 lần với dung dịch đệm (PBS, Tween-20 0,05%) trước khi sử dụng và sau đó được ủ với vùng ngoài tế bào DLL4 tái tổ hợp được đánh dấu 6xHis ở nồng độ 100 μ l/giếng (ECD) ("6xHis" được mô tả như là SEQ ID NO: 206) ở 1 μ g/ml trong PBS, 1 giờ ở 25°C với lắc. Các đĩa sau đó được rửa 3 lần. Sau đó, kháng thể kháng DLL4 khảm người/chuột tái tổ hợp hoặc người tái tổ hợp ở nồng độ 100 μ l/giếng được thêm vào đĩa (0,00164-27 nM, sự pha loãng hàng loạt gấp 4 lần trong dung dịch đệm ELISA = PBST, Superblock 10% (Pierce #37515)) trong 1 giờ ở 25°C với lắc và sau đó rửa lại 3 lần. Các đĩa được ủ với HRP kháng người của dê (Pierce #31412) (pha loãng với tỷ lệ 1:40,000 trong dung dịch đệm ELISA, 100 μ l/giếng) trong 1 giờ ở 25°C với lắc, sau đó rửa 3 lần. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được ủ với cơ chất ELISA 100 μ l/giếng (Sigma #T8665). Phản ứng được dừng sau 8 phút ở 25°C với HCl 1N 100 μ l/giếng và sự hấp thụ được đọc ở 450 nm. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism, và giá trị EC₅₀ được báo cáo.

Ví dụ 1.3: Liên kết của kháng thể đơn dòng DLL4 với bề mặt của dòng tế bào khối u người như được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào kiểu dòng (FACS)

Các dòng tế bào ổn định biểu hiện quá mức DLL4 bề mặt tế bào thu được từ các bình nuôi cấy mô, được rửa bốn lần và được tạo huyền phù lại trong nước muối đệm phosphat (PBS) chứa anbumin huyết thanh bò 1% và CaCl₂ 1mM (dung dịch đệm FACS). 1,5 x 10⁵ tế bào được ủ với kháng thể ở các nồng độ trong dung dịch đệm FACS trong 60 phút trên đá. Các tế bào được rửa hai lần và thêm vào 50 μ L đoạn F(ab')₂, IgG

kháng chuột liên hợp R-phycoerythrin (pha loãng 1:200 trong dung dịch đệm FACS) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, Cat.#112-116-072). Sau khi ủ trên đá (4°C, 60 phút), các tế bào được rửa ba lần và được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS. Sự phát huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và các giá trị EC₅₀ được báo cáo như nồng độ của kháng thể để đạt 50% lượng kháng thể DLL4 tối đa liên kết với các tế bào biểu hiện DLL4.

Ví dụ 1.4: Sự ức chế tương tác của Notch-1 với vùng ngoài tế bào DLL4 tan được bằng kháng thể DLL4 (cạnh tranh ELISA)

Các đĩa Nunc-Immuno 96-giếng (#439454 cho ELISA huDLL4) và các đĩa Costar 96-giếng (#9018 cho ELISA muDLL4) được bao bằng 16 nM Notch-1 người (hệ R&D #3647-TK, 100 µl/giếng trong D-PBS) và được ủ qua đêm ở 4°C. Các đĩa sau đó được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa (PBS, Tween-20 0,05%) và được phong bế bằng dung dịch đệm phong bế 200 µl/giếng (D-PBS, BSA 1%, CaCl₂ 1mM, Tween-20 0,05%) trong 1 giờ ở 25°C. Trong khi phong bế, vùng ngoài tế bào DLL4 được đánh dấu biotin (14nM) được trộn với kháng thể (30 pM-66 nM, pha loãng hàng loạt gấp 3 lần trong dung dịch đệm phong bế) trong 1 giờ ở 25°C với lắc. Các đĩa thử nghiệm được rửa sau khi phong bế, và được ủ với hỗn hợp DLL4/kháng thể (100 µl/giếng, 1 giờ ở 25°C với lắc). Các đĩa được rửa lại và thêm vào HRP liên hợp streptavidin với nồng độ 100 µl/giếng (Fitzgerald #65R-S104PHRPx, được pha loãng 1:5 000 trong dung dịch đệm phong bế) trong 1 giờ ở 25°C với lắc. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất với nồng độ 100 µl/giếng (TMB Sigma #T8665), và phản ứng được dừng bằng cách sử dụng HCl 1N với nồng độ 100 µl/giếng, và sự hấp thụ được đọc ở 450 nm. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism và giá trị IC₅₀ được báo cáo như nồng độ của kháng thể để đạt làm giảm 50% lượng DLL4 liên kết với Notch1.

Ví dụ 1.5: Ức chế liên kết của Notch tan được với các tế bào biểu hiện quá mức DLL4 293G bằng kháng thể đơn dòng kháng DLL4 theo đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào kiểu dòng (FACS cạnh tranh)

Thử nghiệm ức chế Notch: Tóm lược, các dòng tế bào ổn định biểu hiện quá mức DLL4 bề mặt tế bào được thu từ các bình nuôi cấy mô và được tạo huyền phù lại trong nước muối đệm phosphat (PBS) chứa anbumin huyết thanh bò 1% và CaCl_2 1mM (dung dịch đệm FACS). Các tế bào HEK293G-DLL4 được phân phối vào đĩa 96 giếng (đáy v) ở nồng độ $1,5 \times 10^5$ tế bào/giếng trong dung dịch đệm FACS. Sau khi lộn xoáy các tế bào xuống và loại bỏ dịch nổi bề mặt, 50 μL IgG đã tinh chế với sự pha loãng thích hợp được thêm vào mỗi giếng, và được ủ trên đá ở 4°C trong 60 phút, tiếp theo bằng thêm 50 μL /giếng Notch1-biotin ở 0,2 $\mu\text{g/mL}$ đối với DLL4 của người-293G hoặc 2,0 $\mu\text{g/mL}$ đối với DLL4 chuột-293G (nồng độ cuối cùng 1,0 hoặc 0,1 $\mu\text{g/mL}$) để ủ thêm 1 giờ trong đá ở 4°C. Sau khi rửa các tế bào hai lần với dung dịch đệm FACS, thêm vào 50 μL streptavidin liên hợp với R-phycoerythrin (pha loãng 1:150 trong dung dịch đệm FACS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.#016-110-084). Sau khi ủ trong đá (4°C, 60 phút), các tế bào được rửa ba lần và tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS. Huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism, và giá trị IC_{50} được báo cáo như là nồng độ của kháng thể để đạt làm giảm 50% Notch1 liên kết với các tế bào biểu hiện DLL4.

Ví dụ 1.6: Ức chế hoạt động của Notch phụ thuộc DLL4 trong các tế bào EA.hy926 bằng kháng thể DLL4 bằng chất thông báo thử nghiệm

Các đĩa nuôi cấy mô đáy trong 96-giếng được rắc các tế bào EA.hy926 được xử lý biểu hiện luciferaza được khởi động bằng chất khởi đầu phản ứng Notch với nồng độ 7,000 tế bào/giếng qua đêm. Kháng thể được pha loãng hàng loạt từ nồng độ 200 nM được trộn trong 15 phút với thể tích bằng nhau của 5,000 tế bào HEK293G/giếng biểu hiện DLL4 có chiều dài đầy đủ. Các tế bào 293G/DLL4 được nuôi cấy đồng thời với các tế bào thông báo Notch EA.hy926 trong 24 giờ với sự có mặt của kháng thể thử nghiệm. Hoạt tính luciferaza được phân tích bằng cơ chất Promega (Promega # E2940). Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism, và giá trị IC_{50} được báo cáo bằng nồng độ kháng thể để đạt làm giảm 50% hoạt động Notch được gây ra bởi DLL4.

Ví dụ 1.7: Phương pháp phân tích và các kỹ thuật để mô tả đặc tính hóa lý.

Phương pháp kết tủa PEG

Việc sử dụng PEG để tạo ra sự phân tách pha của protein rắn theo các nguyên tắc loại trừ thể tích biểu diễn nghiên cứu có thể thực hiện được để đánh giá độ hòa tan của protein. PEG có nhiều ưu điểm so với các chất làm kết tủa khác, bao gồm sự biến tính tối thiểu của các protein ở các nhiệt độ xung quanh (không ảnh hưởng đến cấu trúc bậc ba của các protein) và nằm trong khoảng từ 4°C đến 30°C, mẫu nhiệt độ làm chứng không được yêu cầu, nghĩa là, các nghiên cứu kết tủa có thể được thực hiện ở nhiệt độ môi trường trong phòng thí nghiệm.

Nhìn chung, sự kết tủa các protein bằng các PEG được giải thích trên cơ sở các tác dụng loại trừ thể tích. Theo lý thuyết này, các protein loại bỏ về không gian các vùng của dung môi được chiếm giữ bằng các chuỗi mạch thẳng PEG. Kết quả là, các protein được cô đặc và rốt cuộc được kết tủa khi vượt quá độ hòa tan của chúng. Theo các thuật ngữ nhiệt động học, việc loại trừ theo không gian dẫn đến tăng khả năng hóa học của protein cho đến khi nó vượt quá độ hòa tan của trạng thái rắn tinh khiết, dẫn đến sự kết tủa protein. Điều này xảy ra phần lớn bởi vì lượng lớn năng lượng tự do bất lợi của tương tác giữa PEG và các protein, làm giảm sự hydrat hóa protein ưu tiên do các tác dụng loại trừ trong không gian. Trong dung dịch nước, sự hydrat ưu tiên giúp duy trì cấu trúc tự nhiên của các protein. Nhìn chung, việc loại trừ thể tích đã cho thấy trở nên có nhiều hiệu quả khi tăng trọng lượng phân tử của PEG, nghĩa là, ít cần PEG phải làm tăng trọng lượng phân tử PEG để kết tủa các protein.

Trọng lượng phân tử PEG 3000 được chọn để ước tính độ hòa tan của kháng thể được đề cập đến trong patent này. Dung dịch PEG 50% được tạo ra bằng cách hòa tan PEG trong nước khử ion hóa với tỷ lệ một gam PEG trên 1 mL nước. Sau đó, dung dịch PEG được thêm vào dung dịch kháng thể mà ban đầu có nồng độ ít hơn hoặc bằng 0,5 mg/ml và thể tích là 0,5 mL. Dung dịch PEG tiếp tục được thêm vào và được trộn cho đến khi đám mây đầu tiên vẫn duy trì. Phần trăm PEG 3000 cần để gây ra sự kết tủa này được tính như là $(50) \times (\text{thể tích của dung dịch PEG 3000 thêm vào}) / (\text{thể tích ban đầu của dung dịch kháng thể trước khi thêm PEG})$.

Phần trăm của PEG 3000 cần để kết tủa được so với phần trăm cần để kết tủa protein có độ hòa tan trong nước đã biết. Ví dụ, độ hòa tan trong nước của adalimumab vượt quá 200 mg/mL. Do đó, nếu phần trăm của PEG 3000 được yêu cầu để kết tủa protein đang quan tâm tương tự với phần trăm cần để kết tủa adalimumab, thì sau đó độ hòa tan dự đoán của protein đó sẽ tương tự với độ hòa tan của adalimumab.

Phương pháp tính độ hòa tan thực

Độ hòa tan thực được xác định bằng cách sử dụng máy lọc ly tâm Amicon để cô đặc protein trong dung dịch cho đến khi protein được quan sát thấy kết tủa trong dung dịch hoặc cho đến khi đạt được thể tích tối thiểu của protein có thể được cô đặc trong đơn vị máy lọc. Trong trường hợp sau cùng, máy lọc ly tâm Amicon 15 mL có thể tích tối thiểu ~50 μ L trong khi máy lọc ly tâm Amicon 4 mL có thể tích tối thiểu ~15 μ L.

Đầu tiên, protein được thẩm tách thành (các) dược phẩm cụ thể. Trong các nghiên cứu này, lượng kháng thể là 10 mg hoặc nhiều hơn một ít. Sau đó dung dịch protein được đưa vào buồng giữ máy lọc ly tâm Amicon. Buồng được kẻ dòng với màng nitroxenluloza với các giếng cho phép các phân tử ít hơn từ 10 đến 30 kDa đi qua khi phải chịu lực ly tâm. Kháng thể, mà thông thường là trên 140 kDa, được giữ lại trong khi nước, các phân tử đệm, các tá dược nhỏ và muối đi qua. Máy lọc ly tâm sau đó được ly tâm theo các hướng dẫn của nhà sản xuất cho đến khi protein được quan sát thấy kết tủa trong dung dịch hoặc cho đến khi đạt được thể tích tối thiểu mà protein có thể được cô đặc trong đơn vị máy lọc.

Sau khi ly tâm, dung dịch protein được loại bỏ khỏi phòng giữ, và nồng độ được đo bằng sự hấp thụ tia cực tím. Sau đó, dung dịch được giữ ở 25°C và 5°C trong từ 1 đến 2 ngày và được theo dõi về các dấu hiệu kết tủa.

Kỹ thuật UV-CD gần

Quang phổ UV-CD gần cung cấp thông tin quan trọng về cấu trúc bậc ba của các protein và là một trong các kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực này. CD đề cập đến sự hấp thụ khác nhau của các thành phần phân cực tròn trái và phải của bức xạ phân cực mặt phẳng. Đối với các protein, các nhóm mang màu trong vùng UVCD gần (250 – 320 nm) là các axit amin thơm (nghĩa là, tryptophan, tyroxin, và phenylalanin) và các liên kết disulfid, và tác dụng CD xảy ra khi các nhóm mang màu có trong môi trường không đối xứng (bị chôn vùi). Các tín hiệu trong vùng từ 250-270 nm có thể quy cho các gốc phenylalanin, các tín hiệu từ 270-290 nm có thể quy cho tyroxin, và các tín hiệu từ 280-300 nm có thể quy cho tryptophan. Các liên kết disulfid làm tăng các tín hiệu yếu rộng thông qua phổ UV gần. Phổ UV CD gần có thể nhạy cảm với các thay đổi nhỏ trong cấu trúc bậc ba như là các thay đổi do các tương tác protein-protein và/hoặc các thay đổi trong điều kiện bào chế.

Có một số tác nhân khác mà có thể ảnh hưởng đến phổ CD của các axit amin thơm. Trong số chúng đó là (1) độ cứng của protein, (2) bản chất của liên kết hydro, và (3) các tương tác giữa nhiều axit amin thơm. Ngoài ra, các protein với số lượng lớn các axit amin này có thể có băng CD nhỏ hơn do xóa bỏ các băng dương tính và âm tính.

Tóm lại, protein được thẩm tách thành (các) công thức mong muốn ở nồng độ 1 mg/ml và được quét từ 250-320 nm hoặc 240-320 nm bằng quang phổ kế Jasco 800 CD. Công thức tương ứng không có protein cũng được quét, và các chỉ số được trừ từ chỉ số của việc quét dung dịch protein. Phổ UV-CD gần là biểu đồ có tính elip phân tử so với chiều dài bước sóng từ 250 hoặc 240 đến 320 nm.

Đối với kháng thể nói chung, phổ UV-CD gần với profil nửa hình xích ma chỉ ra sự gấp nếp của cấu trúc bậc ba tốt trong khi profil phẳng hơn và ít đặc trưng chỉ ra khuynh hướng không gấp nếp lớn hơn. Sự gấp nếp đặc có liên quan đến sự ổn định tốt trong khi sự gấp nếp tồi bộc lộ phần trong kị nước mà có thể dẫn đến các tương tác kị nước giữa các phân tử protein dẫn đến hình thành các khối kết tập không mong muốn.

Kỹ thuật DSC

Độ ổn định với nhiệt của kháng thể được đánh giá bằng cách sử dụng thiết bị đo nhiệt lượng quét vi phân (DSC). Thiết bị DSC được sử dụng là thiết bị VP-DSC tự động với tế bào mao dẫn (Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, Anh). Sự không gấp nếp của các phân tử được nghiên cứu bằng cách sử dụng tốc độ quét 1°C/phút trong khoảng nhiệt độ từ 25°C - 95°C cho các mẫu ở nồng độ 1 mg/mL. Các thông số đo khác được áp dụng là thời gian phù hợp 16 giây, thời gian chờ trước khi quét 10 phút, và việc đo được thực hiện trong mô hình không điều hòa ngược. Để đo riêng, 420 μL mẫu/trắng được đổ đầy vào dụng cụ chứa mẫu đo DSC, với sơ đồ làm đầy đĩa như được cung cấp bên dưới. Biểu đồ nhiệt thu được được làm phù hợp với mô hình không phải hai trạng thái để thu được các nhiệt độ trung bình và entanpi của các giai đoạn chuyển tiếp khác nhau.

Yêu cầu khác cho thành viên phát triển sinh học thành công là protein vẫn giữ ở trạng thái hoặc hình dạng tự nhiên của nó. Protein trong dung dịch nước là ở trạng thái cân bằng giữa hình dạng tự nhiên (có gấp nếp) và hình dạng biến tính của nó (không gấp nếp). Độ ổn định của trạng thái tự nhiên dựa trên cường độ của năng lượng tự do Gibb (DG) của hệ thống và mối liên quan nhiệt động học giữa các thay đổi entanpi (DH) và entropi (DS). DG dương tính chỉ ra trạng thái tự nhiên ổn định hơn trạng thái bị biến

tính – DG dương tính nhiều, thì độ ổn định lớn hơn. Đối với protein để không gấp nếp, lực ổn định cần được phá vỡ. Entropi cấu tạo vượt qua lực ổn định cho phép protein không gấp nếp ở các nhiệt độ ở đó entropi trở nên nổi trội. DSC đo DH của protein không gấp nếp do sự biến tính nhiệt. Như một nguyên tắc chung, có thể tuyên bố rằng trung điểm chuyển tiếp cao hơn (T_m), protein ổn định hơn ở nhiệt độ thấp hơn. Trong thử nghiệm tương tự, DSC cũng đo sự thay đổi trong khả năng cấp nhiệt (DCp) cho sự biến tính protein. Các thay đổi khả năng cấp nhiệt có liên quan đến việc trải nếp protein đầu tiên là do các thay đổi trong việc hydrat hóa các chuỗi phụ mà được giấu trong trạng thái tự nhiên, nhưng trở thành dung môi được bộc lộ trong trạng thái biến tính. DSC đã được thấy là chất dự báo có giá trị của được phẩm lỏng ổn định đối với các protein và các cao phân tử sinh học khác (Remmele, R.L. Jr., Gombotz, W.R., BioPharm 13, 36-46, 2000, và ; Remmele, R.L. Jr., Nightlinger, N.S., Srinivasen, S., Gombotz, W.R., Pharm. Res. 15, 200-208, 1998).

Kỹ thuật SEC

Sắc ký loại trừ kích thước (Size exclusion chromatography - SEC) được sử dụng để phân tách các protein dựa vào kích thước. Các protein được mang trong pha động nước và thông qua nhựa pha tĩnh rồi được đóng gói trong cột. Thời gian duy trì trong cột là hàm của kích cỡ thủy động lực của protein và kích cỡ của các giếng trong tầng nhựa được đóng gói. Các phân tử nhỏ hơn có thể xâm nhập vào các giếng nhỏ hơn trong nhựa và được giữ lâu hơn các phân tử lớn hơn. Nhờ sự tách rửa từ cột, các protein được dò bằng sự hấp thụ UV. Phương pháp SEC đã sử dụng chấn gel TSK (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, PA, số catalô 08543) và gel TSK G3000SWxL (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, PA, số catalô 08541). Pha động là Na_2HPO_4 100 mM, Na_2SO_4 200 mM, pH 6,8. Tốc độ chảy là 0,25 mL/phút. Thể tích tiêm là 20 μL mẫu có nồng độ 1 mg/mL. Nhiệt độ cột là nhiệt độ trong phòng. Nhiệt độ mẫu tự động là 2-8°C. Tổng thời gian hoạt động là 55 phút. Việc dò được dựa trên sự hấp thụ UV ở chiều dài bước sóng 214 nm, với chiều dài băng được đặt là 8 nm, bằng cách sử dụng chiều dài bước sóng tham chiếu là 360 nm với chiều dài băng 100 nm.

Phương pháp tan đông

Các dung dịch kháng thể ở nồng độ 1 mg/ml trong (các) được phẩm mong muốn được đông lạnh ở -80°C trong ít nhất 4 giờ và sau đó được làm tan ở 30°C trong chậu

nước. Sau đó, dung dịch được làm đông lại ở -80°C . Điều này được lặp lại trong 5 vòng. Sau các vòng đông-tan đông nhất định, ví dụ, thứ hai và thứ tư, một phần dung dịch được rút ra để phân tích bằng SEC trước khi tái kết đông. Thử nghiệm ổn định đông-tan đông được thực hiện ở nồng độ protein thấp để thu được "trường hợp tồi hơn" do tiếp xúc của các phân tử protein lớn hơn với bề mặt chung nước-đá biến tính. Ở các nồng độ cao hơn, ít protein cân xứng chạm trán bề mặt chung đá-nước, thay cho việc tương tác với các phân tử protein khác.

Phương pháp ổn định được gia tốc

Dung dịch kháng thể ở nồng độ 1mg/ml trong (các) dược phẩm mong muốn được cho đi qua màng lọc PVDF 0,22 μm trong các điều kiện vô trùng và được ủ ở 40°C và/hoặc 50°C trong ít nhất 21 ngày. Ở ngày 7 và ngày 21, các phần nước được lấy ra trong các điều kiện vô trùng và chịu phân tích bằng GIẤY. Sau đó, dung dịch được cho ủ lại.

Ví dụ 2: Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng DLL4 của chuột bằng kỹ thuật dùng cho chuột

Chuột được gây miễn dịch theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, E Harlow, D. Lane, Antibody: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998). Dòng tế bào người biểu hiện DLL4 của người có chiều dài đầy đủ cũng như các protein DLL4 chuột-ECD tái tổ hợp (vùng ngoài tế bào DLL4) được sử dụng như chất kháng nguyên. Các dòng tế bào chuột biểu hiện DLL4 của người hoặc DLL4 chuột được sử dụng để xác định độ chuẩn kháng huyết thanh và để sàng lọc các tế bào lai bài tiết kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Các liều dùng gây miễn dịch chứa 1×10^6 tế bào/chuột/tiêm cho cả việc gây miễn dịch ban đầu và tăng cường. Để làm tăng đáp ứng miễn dịch với DLL4 chuột, chuột được tăng cường thêm với DLL4-ECD chuột tái tổ hợp trong dạng nhũ tương với tá dược Freud không đầy đủ (Sigma, St. Louis, MO, Hoa Kỳ). Tóm lại, hỗn hợp tá dược-kháng nguyên được bào chế bằng việc đầu tiên trộn nhẹ tá dược trong lọ thủy tinh nhỏ bằng cách sử dụng luồng xoáy. Lượng tá dược mong muốn được loại bỏ khỏi lọ thủy tinh nhỏ và đặt vào trong ống vi ly tâm có thể tích 1,5 mL được hấp. Kháng nguyên được bào chế trong PBS hoặc nước muối với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5-1,0 mg/ml. Lượng kháng nguyên được tính sau đó được thêm vào ống vi ly tâm với tá dược, và dung dịch được trộn bằng luồng xoáy nhẹ nhàng trong 2 phút để tạo ra nhũ tương nước trong dầu. Sau đó, dung

dịch tá dược-kháng nguyên được rút ra vào xylanh thích hợp để tiêm cho động vật. Tổng 50 µg kháng nguyên được tiêm trong thể tích là 50-100 µl. Mỗi con vật được gây miễn dịch, và sau đó được tăng cường từ 2 đến 3 lần phụ thuộc vào độ chuẩn. Các con vật có chuẩn độ tốt được dùng liều tăng cường dưới da cuối cùng với dòng tế bào biểu hiện DLL4 của người trước khi dung hợp.

Dung hợp và sàng lọc tế bào lai

Các tế bào của dòng tế bào u tủy chuột (SP2/0-Ag14, ATCC CRL-1581) được nuôi cấy để đạt log bước pha đứng trước khi dung hợp. Các tế bào lá lách chuột được gây miễn dịch được bào chế vô trùng và được liên hợp với các tế bào u tủy theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, E Harlow, D. Lane, *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998); Kohler G, và Milstein C., "Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256: 495-497 (1975)). "Các tế bào lai" được dung hợp sau đó được cấy vào các đĩa 96-giếng trong môi trường DMEM/20%FCS/HAT. Các cụm tế bào lai sống sót được quan sát dưới kính hiển vi từ bảy đến mười ngày sau khi dung hợp. Sau hai tuần, dịch nổi bề mặt từ mỗi giếng phải chịu sự sàng lọc liên kết dựa vào tế bào bằng cách sử dụng các dòng tế bào chuột biểu hiện DLL4 của người hoặc DLL4 chuột tái tổ hợp. Tóm lại, hỗn hợp (tỷ lệ 1:1) của các dòng tế bào chuột biểu hiện DLL4 của người hoặc chuột được phân tán vào đĩa 96-giếng (đáy tròn) ở nồng độ 1×10^6 tế bào/giếng và được ủ với dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào lai (50 µl) ở 4°C trong 1 giờ. Các tế bào sau đó được rửa 3 lần với dung dịch đệm FACS (PBS+2% BSA), sử dụng Ig-PE kháng chuột HRP-dê (phycoerythrin) để dò trong máy FACS. Các tế bào lai được sàng lọc bằng cách sử dụng khuôn ELISA theo quy trình dưới đây. Các đĩa ELISA được bao bằng 50 µl DLL4 của người hoặc DLL4 chuột (2,0 µg/ml trong PBS) qua đêm ở 4°C. Các đĩa được rửa 3 lần với 250 µl PBS/Tween₂₀ 0,5% và được phong bế với 200 µl dung dịch đệm phong bế (BSA 2% trong PBS với Tween₂₀ 0,5%). Huyết thanh pha loãng hoặc dịch nổi bề mặt tế bào lai (100 µl) được thêm vào mỗi giếng, và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Các đĩa sau đó được rửa 3 lần với PBS/Tween₂₀ 0,5%, sử dụng IgG kháng chuột HRP-dê để dò, và các OD liên kết được quan sát ở 450 nm. Kháng thể bài tiết tế bào lai dương tính mà liên kết với DLL4 của người hoặc DLL4 chuột hoặc cả hai sau đó được lựa chọn và chuyển vào các đĩa 24-giếng và được nhân dòng một phần bằng sự

pha loãng giới hạn để đảm bảo tính nhân dòng vô tính của dòng tế bào. Isotyp của mỗi kháng thể đơn dòng được xác định bằng cách sử dụng kit Zymed's Mouse MonoAb-ID. Các dòng vô tính lai tạo ra kháng thể đã cho thấy hoạt tính liên kết đặc hiệu cao đã được nhân dòng một phần và được tinh chế (Bảng 5), và ái lực (Biacore) và hiệu lực (thử nghiệm FACS phong bế Notch và thử nghiệm chất thông báo) của kháng thể được đặc trưng như sau.

Bảng 5. Danh sách kháng thể kháng DLL4 được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật lai dùng cho chuột

Thế lai	Isotyp	liên kết FACS	
		DLL4 người	DLL4 chuột
MC10-37D10.1C2	IgG2a/k	+	+
MC10-40B10.3C3	IgG2a/k	+	+
MC10-32C7.5A4	IgG2a/k	+	+
MC10-38H12.2G8	IgG2a/k	+	–
MC13-14A11.3A4	IgG2a/K	+	+
MC13-14G1.1B4	IgG2a/K	+	–
MC13-1A11.2E1	IgG1/K	+	+
MC13-13E4.4A3	IgG1/K	+	+
MC13-15D6.1G7	IgG2a/K	+	+

"+" chỉ kháng thể liên kết với tế bào;

"–" chỉ ra kháng thể không liên kết với tế bào

Ví dụ 3. Đặc điểm *in vitro* của kháng thể đơn dòng chuột kháng DLL4

Các ái lực liên kết kháng nguyên của các kháng thể đơn dòng chuột này (các mAb) được xác định bằng kỹ thuật BIACore như được mô tả trong Ví dụ 1.1, và được trình bày trong các bảng 6 và 7, bên dưới. Các hoạt tính *in vitro* của chúng còn được kiểm tra bằng cách sử dụng phương pháp khác được mô tả trong Ví dụ 1, và được tổng kết trong Bảng 8. Hơn nữa đặc điểm được xác định 37D10 và 40B10 là giống hệt các mAb chuột.

Bảng 6. Động học Biacore của kháng thể lai chuột kháng DLL4 liên kết với DLL4 người và khỉ Cynomolgus

Dòng vô tính	Động học trên Biacore					
	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K _D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K _D (nM)
38H12	4,0 x 10 ⁺⁵	1,1 x 10 ⁻⁴	0,3	2,6 x 10 ⁺⁵	9,8 x 10 ⁻⁵	0,4
1A11	1,9 x 10 ⁺⁵	1,1 x 10 ⁻³	5,8	1,1 x 10 ⁺⁵	9,3 x 10 ⁻⁴	8,1
37D10 = 40B10	1,4 x 10 ⁺⁵	7,0 x 10 ⁻²	484	4,0 x 10 ⁺⁴	Quá nhanh*	<617
32C7	2,8 x 10 ⁺⁵	7,0 x 10 ⁻⁶	0,03	2,2 x 10 ⁺⁵	6,3 x 10 ⁻⁶	0,03
15D6	1,1 x 10 ⁺⁵	1,0 x 10 ⁻³	9,2	5,6 x 10 ⁺⁴	8,3 x 10 ⁻⁴	14,9
14A11	1,2 x 10 ⁺⁵	1,2 x 10 ⁻³	10,3	1,1 x 10 ⁺⁵	1,2 x 10 ⁻³	11,6
14G1	5,4 x 10 ⁺⁴	3,9 x 10 ⁻⁴	7,2	3,9 x 10 ⁺⁴	4,1 x 10 ⁻⁴	10,5
13E4	2,3 x 10 ⁺⁵	3,9 x 10 ⁻⁴	1,7	1,5 x 10 ⁺⁵	4,2 x 10 ⁻⁴	2,8

hu = người; cyno = khỉ cynomolgus; * = nằm ngoài khoảng đo

Bảng 7. Động học Biacore của kháng thể lai chuột kháng DLL4 liên kết với DLL4 chuột và chuột cống

Dòng vô tính	Động học trên Biacore					
	ECD DLL4 chuột			ECD DLL4 chuột cống		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K _D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K _D (nM)
38H12	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
1A11	1,3 x 10 ⁺⁵	2,9 x 10 ⁻³	23	N/B	N/B	N/B
37D10 = 40B10	1,0 x 10 ⁺⁵	1,35 x 10 ⁻²	135	N/D	N/D	N/D
32C7	4,8 x 10 ⁺⁴	4,1 x 10 ⁻³	88	N/D	N/D	N/D
15D6	7,4 x 10 ⁺⁴	5,1 x 10 ⁻⁵	0,7	N/B	N/B	N/B
14A11	7,0 x 10 ⁻⁴	9,0 x 10 ⁻⁵	1,3	N/B	N/B	N/B
14G1	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
13E4	1,8 x 10 ⁺⁵	1,9 x 10 ⁻⁴	1,1	N/B	N/B	N/B

NB= liên kết không đáng kể; N/D = không được xác định, mu = chuột

Bảng 8. Đặc điểm *in vitro* của kháng thể kháng DLL4 có nguồn gốc từ tế bào lai của chuột

	Các thử nghiệm liên kết trực tiếp				Các thử nghiệm ngăn chặn chức năng				
mAb chuột	ELISA liên kết (EC ₅₀ , nM)		FACS (EC ₅₀ , nM)		Cạnh tranh ELISA (IC ₅₀ , nM)		Cạnh tranh FACS (IC ₅₀ , nM)		Ức chế hoạt động Notch (IC ₅₀ , nM)
	DLL4 ECD		Các tế bào DLL4		DLL4 ECD/huNotch-1		huNotch-1/các tế bào DLL4		tế bào huDLL4 / các tế bào thông báo Notch
	hu	mu	hu	mu	hu	mu	hu	mu	
1A11	0,06	0,11	34,8	0,8	0,78	0,79	8,4	0,8	2,9
38H12	0,06	–	1,2	–	3,63	–	1,7	–	0,5
37D10 = 40B10	0,12	0,14	2,3	0,7	5,39	3,36	5,5	3,8	–
32C7	0,08	0,15	3,1	0,8	–	–	–	–	Chất chủ vận
14G1	N/D	N/D	8,6	>50	N/D	N/D	4,2	–	6,1
14A11	N/D	N/D	>50	2,1	–	19,8	205	1,6	2,7
15D6	N/D	N/D	15	1,6	–	–	25	1,5	3,2
13E4	N/D	N/D	26	1,3	–	–	5,2	> 200	–

"–" = không có hoạt tính hoặc dưới giới hạn dò của các thử nghiệm được sử dụng;

"N/D" = không được xác định;

hu = người; cyno = khỉ cynomolgus; mu = chuột.

Ví dụ 4. Làm giảm các trình tự protein vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng chuột kháng DLL4 bằng việc nhân dòng và so sánh trình tự ADN

Tổng ARN được chiết từ các hạt tế bào lai bằng cách sử dụng kit mini RNeasy (Qiagen, catalog # 74104) bằng cách sử dụng quy trình sau đây. 600 µl RLT đệm được thêm vào để phá vỡ các tế bào bằng việc nhỏ giọt lên và xuống nhiều lần. Dịch thủy phân tế bào được đồng nhất bằng cách cho đi qua nó 10 lần qua kim tiêm 20-gauge được làm phù hợp với bơm tiêm không có RNaza. Một thể tích 70% etanol được thêm vào dịch thủy phân được đồng nhất và được trộn kỹ bằng nhỏ giọt. Lên tới 700 µl ở thời điểm mẫu được thêm vào cột quay RNeasy và quay trong 15 giây ở tốc độ 10,000 vòng/phút, loại bỏ dòng chảy qua. 700 µl RW1 đệm được thêm vào cột và quay trong 15 giây ở tốc độ 10,000 vòng/phút, loại bỏ dòng chảy qua. 500 µl RPE đệm được thêm vào để rửa màng cột và quay trong 15 giây ở 10,000 vòng/phút, loại bỏ dòng chảy qua. Bước này được lặp lại hơn một lần, nhưng cột được ly tâm trong 2 phút. Mẫu sau đó

được ly tâm trong 1 phút ở 10,000 vòng/phút để loại bỏ phần đầu bất kỳ của RPE đệm. ARN được tách rửa với 30 µl nước không có RNaza bằng quay ly tâm trong 1 phút ở 10,000 vòng/phút. Sau đó, 2 µg tổng ARN được sử dụng để tổng hợp cADN sợi đầu tiên bằng cách sử dụng hệ SuperScript First-Strand Synthesis đối với RT-PCR (Invitrogen, số catalo 11904-018) theo quy trình dưới đây: 2 µg ARN + 2 µl dNTP + 2 µl Oligo (dT) + DEPC-H₂O (đến 20 µl) được ủ ở 65°C trong 5 phút, sau đó được chuyển vào đá trong ít nhất 1 phút. Mẫu sau đó được thêm vào hỗn hợp dưới đây: 4 µl dung dịch đệm RT nồng độ gấp 10 lần + 8 µl MgCl₂ 25 mM + 4 µl DTT 0,1 M + 2 µl RNaza OUT và được ủ ở 42°C trong 2 phút. Sau đó, 2 µl SuperScript II RT được thêm vào mẫu và được ủ ở 42°C trong 50 phút. Mẫu sau đó được ủ ở 70°C trong 15 phút và được làm lạnh trên đá. 2 µl RNaza H sau đó được thêm vào và mẫu được ủ ở 37°C trong 20 phút. cADN sau đó được sử dụng như khuôn trong khuếch đại PCR của các vùng biến đổi của kháng thể. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN sợi đầu tiên, đoạn khởi đầu từ tập hợp đoạn khởi đầu Ig chuột (Novagen, số catalo 69831-3) và Platinum Super Mix High Fidelity (Invitrogen, catalog # 12532-016). Để khuếch đại các vùng biến đổi chuỗi nặng, các mẫu PCR được kết hợp như sau: 22,5 µl PCR Super Mix + 0,25 µl MuIgG V_H3'-2 đoạn môi ngược + 1 µl cADN + 1,25 µl của một trong các đoạn khởi đầu phía trước (VH-A, VH-B) hoặc 0,5 µl của một trong các đoạn môi phía trước (VH-C, VH-D, VH-E, VH-F). Để khuếch đại các vùng biến đổi chuỗi nhẹ thì các mẫu PCR được kết hợp như sau: 22,5 µl PCR Super Mix + 0,25 µl MuIgKV_L3'-1 đoạn môi ngược + 1 µl cADN + 1,25 µl của một trong số các đoạn môi phía trước (VL-A, VL-B) hoặc 0,5 µl của một trong số các đoạn môi phía trước (VL-C, VL-D, VL-E, VL-F, VL-G).

Trong các mẫu có các đoạn môi VH-A, VH-B, VL-A và VL-B, các vòng PCR dưới đây được sử dụng (40-45 vòng, các bước từ 2 đến 4):

- 1-Biến tính 94°C 2 phút.
- 2-Biến tính 94°C 30 giây.
- 3-Ủ 50°C 30 giây.
- 4-Kéo dài 68°C 1 phút.
- 5-sự kéo dài cuối cùng 68°C 5 phút.
- 6-làm mát 4°C không xác định thời gian

Trong các mẫu với các đoạn mồi VH-C đến VH-F, và VL-C đến VL-G, các vòng PCR dưới đây được sử dụng (40-45 vòng, các bước từ 2 đến 4):

- 1-Biến tính 94°C 2 phút.
- 2-Biến tính 94°C 30 giây.
- 3-Ủ 60°C 30 giây.
- 4-Kéo dài 68°C 1 phút.
- 5-Sự kéo dài cuối cùng 68°C 5 phút.
- 6-Làm mát 4°C không xác định thời gian.

Các sản phẩm PCR được hoạt động trên gel agarosa 1,2%, và các băng di chuyển ở kích thước mong đợi (400-500 bp) được cắt để chiết ADN. ADN được tinh chế bằng cách sử dụng kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, số catalo 28704) theo quy trình dưới đây: các lát gel được cân. 3 thể tích QG đệm với 1 thể tích gel được thêm vào mỗi lát gel. Các mẫu được ủ ở 50°C trong 10 phút cho đến khi các lát gel được hòa tan hoàn toàn, trộn cứ mỗi 2-3 phút. Một thể tích gel của isopropanol sau đó được thêm vào mỗi mẫu và được trộn. Các mẫu sau đó được đưa vào cột QIAquick và quay ly tâm trong 1 phút ở 13000 vòng/phút. Để rửa, 750 µl PE đệm được thêm vào các mẫu và quay trong 1 phút ở 13000 vòng/phút. Các cột sau đó được ly tâm trong một phút nữa ở 13,000 vòng/phút để loại bỏ hoàn toàn etanol dư. ADN được tách rửa bằng việc thêm 30 µl H₂O vào mỗi cột và bằng cách quay 1 phút ở 13,000 vòng/phút. Các sản phẩm PCR đã tinh chế sau đó được so sánh trình tự để xác định các trình tự vùng biến đổi (Bảng 9, bên dưới).

Bảng 9. Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể đơn dòng kháng DLL4 chuột

SEQ ID NO:	Vùng protein		Trình tự
			123456789012345678901234567890
157	VH 38H12		EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPTKGLQWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRADNKSTLYLQMDSLRSED TATYHCAALNWELGIDYWGQGVMVTVSS
	VH 38H12 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:157	NYGMY

	VH 38H12 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:157	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH 38H12 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:157	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
158	VL 38H12		DIQMTQSPASLSASLGETISIECRASEDIY SNLAWYQKKSGKSPQLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQ GSKFPLTFGSGTKLEIKR
	VL 38H12 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:158	RASEDIYSNLA
	VL 38H12 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:158	AANRLQD
	VL 38H12 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:158	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
159	VH 1A11		EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFR NFPMAWVRQAPTRGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRADNKSTLYLQVNSLRSED TATYYCSRGGYNSPFAYWGQGLVTVSS
	VH 1A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:159	NFPMA
	VH 1A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:159	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH 1A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:159	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
160	VL 1A11		DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASEDIY SNLAWYQQKPGNSPQLLIFDTNNLADGVPS RFGSGSGTQSSLKINSLQSEDAVASYFCQQ YNNYPPTFGGGTKLELKR
	VL 1A11 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:160	RASEDIYSNLA
	VL 1A11 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:160	DTNNLAD
	VL 1A11 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:160	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
161	VH 37D10		AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFS

			NAAMYWVRLAPGKGLEWVARIRTKPNNYAT YYAESVKGRFTISRDDSKSMVYVQMDNLKT EDTAMYYCTAAPWRDSYAHVYWGQGVMTV SS
	VH 37D10 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:161	NAAMY
	VH 37D10 CDR-H2	Các gốc từ 50-68 của SEQ ID NO:161	RIRTKPNNYATYYAESVKG
	VH 37D10 CDR-H3	Các gốc từ 101-111 của SEQ ID NO:161	APWRDSYAHVY
			123456789012345678901234567890
162	VL 37D10		DIQMTQSPPVLSASVGDRVTLSCKASQNIH KNLDWYQQKHGDAPKLLIYYTDHLQTVPS RFGSGSATDYTLTISLQPEDVATYYCYQ YNGGPFTEGSGTKLEIKR
	VL 37D10 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:162	KASQNIHKNLD
	VL 37D10 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:162	YTDHLQT
	VL 37D10 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:162	YQYNGGPFTE
			123456789012345678901234567890
163	VH 32C7		EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFPFS SVWMTWIRQAPGKLEWIATITNSGASTYY SASVKGRFTISRDNVKSTLYLQMTSLGSED TATYYCTRVGTSFDYWGQGVMTVSS
	VH 32C7 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:163	SVWMT
	VH 32C7 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:163	titnsgastyysasvkg
	VH 32C7 CDR-H3	Các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:163	vgtsfdy
			123456789012345678901234567890
164	VL 32C7		DIQMTQSPASLSASLGTVTIECRASDDIY NGLAWFQQKPGKSPQLLIYDANTLHTGVPS RFGSGSGTQFSLKINSLSQSEDVASYFCQQ FYDYPPYTFGAGTKLELKR
	VL 32C7 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:164	rasddiyn gla

	VL 32C7 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:164	dantlht
	VL 32C7 CDR-L3	Các gốc từ 89-98 của SEQ ID NO:164	qqfydyppyt
			123456789012345678901234567890
165	VH 14G1		EVQLQQSGAELAKPGSSVKISCKASGYTFT NYDISWIKQTNGQGLEYLGYINTGSGGIYS NEKFKGKATLTVDKSSNTAFMQLSSLTPED TAVYYCVREGNNFDHWGQGVKVTVSS
	VH 14G1 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:165	NYDIS
	VH 14G1 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:165	YINTGSGGIYSNEKFKG
	VH 14G1 CDR-H3	Các gốc từ 99-105 của SEQ ID NO:165	EGNNFDH
			123456789012345678901234567890
166	VL 14G1		DTVMTQSPASMSTSVGERVTVNCKASQSVG TIVAWFQQKPGQSPKRLIYLATYRHTGVPD RFIGSGFGRDFTLTISNVEAEDLAVYYCLQ YGSRPFTFGAGTKLEIKR
	VL 14G1 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:166	KASQSVGTIVA
	VL 14G1 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:166	LATYRHT
	VL 14G1 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:166	LQYGSRPFT
			123456789012345678901234567890
167	VH 14A11		EVQLQQSGPELAKPGSSVKISCKASGYTFT NSYISWIKQTTGQGLEIVGYINTGSGGADY NEKFKGKATLTVDKSSRTAFMQLSSLTPGD SAVYYCAKSILLGSTCYFDYWGQGVLTVS S
	VH 14A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:167	NSYIS
	VH 14A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:167	YINTGSGGADYNEKFKG
	VH 14A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:167	SILLGSTCYFDY
			123456789012345678901234567890
168	VL 14A11		NTVLTQSPALAVSLGQRVTISCKASRSVSS PMYSYIYWYQQKPGQPKLLIYRASTLASG

			VPARFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIATYF CQQSWSDPFTFGSGTKLEIKR
	VL 14A11 CDR-L1	Các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:168	KASRSVSSPMYSYIY
	VL 14A11 CDR-L2	Các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:168	RASTLAS
	VL 14A11 CDR-L3	Các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:168	QQSWSDPFT
			123456789012345678901234567890
169	VH 15D6		EVQLQQSGPELAKPGSSVKISCKASGYTFT SSYISWIKQTTGQGLEIYIGYINTGSGGTDY NEKFKDKATLTVDKSSRTVFMQLSSLTPGD SAVYYCAKSILLGSTYYLDYWGQGMVTVSS
	VH 15D6 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:169	SSYIS
	VH 15D6 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:169	YINTGSGGTDYNEKFKD
	VH 15D6 CDR-H3	Các gốc từ 99-110 của SEQ ID NO:169	SILLGSTYYLDY
			123456789012345678901234567890
170	VL 15D6		DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCKASRSLSS PMYSYIYWYQQKLGQQPRLLIYRASTLASG VPARFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIATYF CQQSWSDPFTFGSGTKLEIKR
	VL 15D6 CDR-L1	Các gốc từ 23-37 của SEQ ID NO:170	KASRSLSSPMYSYIY
	VL 15D6 CDR-L2	Các gốc từ 53-59 của SEQ ID NO:170	RASTLAS
	VL 15D6 CDR-L3	Các gốc từ 92-100 của SEQ ID NO:170	QQSWSDPFT

Ví dụ 5. Tạo kháng thể khảm

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ của các mAb chuột kháng DLL4 (Bảng 9, ở trên) được nhân dòng vô tính trong khung để đột biến các vùng bảo toàn chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kapa IgG1 người (L234, 235A) tương ứng. Hoạt tính của các kháng thể khảm thu được được khẳng định trong các thử nghiệm liên kết và cạnh tranh dựa trên FACS (Bảng 10, bên dưới), và có thể so sánh với các mAb chuột cha mẹ của chúng.

Bảng 10. Hoạt tính trung hòa và liên kết dựa trên FACS của các kháng thể khảm tái tổ hợp chứa các vùng biến đổi của các mAb chuột kháng DLL4

	Liên kết FACS (EC ₅₀ nM)		Cạnh tranh FACS (IC ₅₀ nM)	
	các tế bào DLL4		các tế bào huNotch-1/DLL4	
kháng thể khảm	DLL4 người	DLL4 chuột	DLL4 người	DLL4 chuột
1A11	19,59	0,74	2,338	0,682
38H12	1,468	N/D	1,443	N/D
32C7	3,706	4,114	ND	ND
37D10	2,32	0,99	5,951	4,395
14G1	0,994	N/D	4,11	N/D
14A11	1,613	2,139	4,025	1,391
15D6	1,715	1,817	10,48	1,49

N/D = không được xác định.

Ví dụ 6. Làm kháng thể đơn dòng chuột kháng DLL4 1A11 tương thích với người

Kháng thể kháng DLL4 chuột 1A11 (Bảng 9, ở trên) được làm tương thích với người. Trình tự axit amin biến đổi được làm tương thích với người VH.1, VH.1a, VH.1b, VH.2a, VL.1, VL.1a, VL.1b, và VL.2a (Bảng 11, bên dưới) được chuyển thành trình tự ADN dựa trên các dòng mầm của người tương đồng nhất và được tổng hợp. Đối với các biến thể chuỗi nặng, các trình tự nhận chuỗi nặng dòng mầm của người VH3-7 FR1, VH3-7 FR2, VH3-7 FR 3, và JH4 FR4 được sử dụng (xem, Bảng 3, ở trên). Đối với các biến thể chuỗi nhẹ VL.1, VL.1a, và VL.1b, trình tự nhận chuỗi nhẹ dòng mầm của người O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, và JK2 FR4 được sử dụng (xem, Bảng 3, ở trên). Đối với biến thể chuỗi nhẹ VL.2a, trình tự nhận chuỗi nhẹ dòng mầm của người L2 FR1, L2 FR2, L2 FR3, và JK2 FR4 được sử dụng (xem, Bảng 4, ở trên). Các cấu trúc riêng biệt là trình tự được biến đổi để kiểm tra tính chính xác. Các biến thể dương tính sau đó được tiêm vào 250 ml môi trường Luria bổ sung ampicilin và được cấy qua đêm ở 37°C. ADN được chiết từ dịch nuôi cấy biến thể bằng cách sử dụng kit chuẩn bị tối đa tốc độ Qiagen Hi (12662).

Bảng 11. Trình tự axit amin VH và VL của các kiểu kháng thể đơn dòng kháng DLL4 chuột được làm tương thích với người 1A11

SEQ ID NO:	Vùng protein		Trình tự
			123456789012345678901234567890
171	VH.1 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAYWGQGTLLTVSS
	VH.1 1A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:171	NFPMA
	VH.1 1A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:171	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.1 1A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:171	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
172	VH.1a 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRADNKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGTLLTVSS
	VH.1a A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:172	NFPMA
	VH.1a A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:172	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.1a A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:172	GYNSPFAY
173	VH.1b 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGTLLTVSS
	VH.1b A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:173	NFPMA
	VH.1b A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:173	TISSSDGTTYRDSVKG

	VH.1b A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:173	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
174	VH.2a 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGTLLTVSS
	VH.2a A11 CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:174	NFPMA
	VH.2a A11 CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:174	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.2a A11 CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:174	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
175	VL.1 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1 1A11 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:175	RASEDIYSNLA
	VL.1 1A11 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:175	DTNNLAD
	VL.1 1A11 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:175	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
176	VL.1a 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKSPKLLIFAUDTNNLADGVPS RFGSGSGTDSTLTISLQPEDFATYFCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1a 1A11 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:176	RASEDIYSNLA
	VL.1a 1A11 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:176	DTNNLAD

	VL.1a 1A11 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:176	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
177	VL.1b 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIFDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1b 1A11CDR- L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:177	RASEDIYSNLA
	VL.1b 1A11 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:177	DTNNLAD
	VL.1b 1A11 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:177	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
178	VL.2A 1A11		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIY SNLAWYQQKPGQSPRLIFDTNNLADGVPA RFGSGSGTESTLTISLQSEDFAVYFCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.2a 1A11 CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:178	RASEDIYSNLA
	VL.2a 1A11 CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:178	DTNNLAD
	VL.2a 1A11 CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:178	QQYNNYPPT

Kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách kết hợp mỗi biến thể chuỗi nặng với mỗi biến thể chuỗi nhẹ cho tổng 16 biến thể (Bảng 12, bên dưới). Các biến thể từ 1-4 mỗi biến thể chứa VH.1 cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 0 đột biến ngược, VL.1a: 4 đột biến ngược, VL.1b: 1 đột biến ngược, và VL.2a: 5 đột biến ngược. Các biến thể từ 5-8 mỗi biến thể chứa VH.1a cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 2 đột biến ngược, VL.1a: 6 đột biến ngược, VL.1b: 3 đột biến ngược, và VL.2a: 7 đột biến ngược. Các biến thể từ 9-12 mỗi biến thể chứa VH.1b cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 1 đột biến ngược, VL.1a: 5 đột biến ngược, VL.1b: 2 đột biến ngược, và VL.2a:

6 đột biến ngược. Các biến thể từ 13-16 mỗi biến thể chứa VH.2a cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 3 đột biến ngược, VL.1a: 7 đột biến ngược, VL.1b: 4 đột biến ngược, VL.2a: 8 đột biến ngược.

Bảng 12. Tổng kết kháng thể 1A11 được làm tương thích với người được tạo ra và các đột biến ngược

Tên	Sự kết hợp VH/VL	Các đột biến ngược trong các vùng biến đổi [†] (VH/VL)
h1A11.1	VH.1/VL.1	0/0
h1A11.2	VH.1/VL.1a	0/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.3	VH.1/VL.1b	0/Y49F
h1A11.4	VH.1/VL.2a	0/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.5	VH.1a/VL.1	N76S, A93S/0
h1A11.6	VH.1a/VL.1a	N76S, A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.7	VH.1a/VL.1b	N76S, A93S/Y49F
h1A11.8	VH.1a/VL.2a	N76S, A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.9	VH.1b/VL.1	A93S/0
h1A11.10	VH.1b/VL.1a	A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.11	VH.1b/VL.1b	A93S/Y49F
h1A11.12	VH.1b/VL.2a	A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.13	VH.2a/VL.1	S49A, N76S, A93S/0
h1A11.14	VH.2a/VL.1a	S49A, N76S, A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.15	VH.2a/VL.1b	S49A, N76S, A93S/ Y49F
h1A11.16	VH.2a/VL.2a	S49A, N76S, A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F

[†] sử dụng cách đánh số Kabat.

Tất cả 16 biến thể được chuyển tạm thời vào 50 ml dịch nuôi cấy tế bào hỗn dịch HEK 293 6e với tỷ lệ cấu trúc chuỗi nhẹ/chuỗi nặng là 60%/40%. Sử dụng 1mg/ml PEI để truyền nhiễm các tế bào. Dịch nổi trên bề mặt tế bào được thu hoạch sau sáu ngày trong các bình lắc, quay xuống thành các tế bào hạt, và được lọc qua các màng lọc 0,22 µm để phân tách IgG từ các chất nhiễm bẩn trong dịch nuôi cấy. Biến thể liên kết với

DLL4 của người đầu tiên được đánh giá qua ELISA liên kết bất giữ (Ví dụ 1.2), mà sử dụng kháng thể bất giữ kháng Fc người của dê (Jackson Immunoresearch, 109-005-008) để bất giữ IgG trong dịch nổi bề mặt tế bào 293 6e được lọc (Bảng 13, bên dưới). Tất cả 16 biến thể có ái lực rất có thể so sánh và được tinh chế cho sự mô tả đặc tính khác.

Tất cả 16 biến thể (h1A11.1-h1A11.16) được tinh chế theo lô bằng cách thêm 1 thể tích dịch nổi bề mặt của dung dịch đệm liên kết IgG protein A (Thermo Scientific 21001) và 1 ml hạt rProteinA sepharosa chảy nhanh (GE Healthcare, 17-1279-04). Các dịch nổi bề mặt, có các hạt và dung dịch đệm được thêm, được làm đu đưa qua đêm ở 4°C, và ngày sau khi các hạt được thu bằng lực hấp dẫn qua các cột sắc ký chuẩn bị nhiều lần (Bio Rad, 731-1550). Mỗi lần dịch nổi bề mặt đi qua các cột, thì các hạt được rửa bằng 10 thể tích cột của dung dịch đệm liên kết, và IgG được tách rửa bằng dung dịch đệm rửa giải Immunopure IgG (Pierce, 185 1520) và được thu thập trong các phần phân ước 1 ml. Các phần chứa IgG được dự trữ và thẩm tách trong PBS qua đêm ở 4°C.

Các biến thể được tinh chế còn được đặc trưng bởi ái lực của chúng đối với DLL4 của người, chuột và cynomolgus bằng ELISA liên kết (Ví dụ 1.2, Phương pháp 2), bằng Biacore (Ví dụ 1.1), và bằng sự đếm tế bào chảy (FACS). Tất cả 16 biến thể đã được trình bày có thể so sánh ái lực với kháng thể tái tổ hợp cha mẹ 1A11 trong tất cả ba thử nghiệm (Bảng 13). Các biến thể được làm tương thích với người sau đó được thử nghiệm về chức năng với DLL4 của người và chuột bằng ELISA cạnh tranh (Ví dụ 1.3) và bằng thử nghiệm chất thông báo Notch (Ví dụ 1.6). Tất cả 16 biến thể đã cho thấy có thể so sánh hiệu lực với kháng thể tái tổ hợp cha mẹ 1A11 trong cả hai thử nghiệm (Bảng 14, bên dưới).

Bảng 13. Tổng kết hoạt tính liên kết của các mAb 1A11 được làm tương thích với người

Số liệu liên kết

	DLL4 người			DLL4 chuột			DLL4 Cyno
mAb	ELISA liên kết (EC50, nM)	Biacore (KD, M)	Liên kết FACS (EC50, nM)	ELISA liên kết (EC50, nM)	Biacore (KD, M)	Liên kết FACS (EC50, nM)	ELISA liên kết (EC50, nM)
h1A11-1	0,08	$1,5 \times 10^{-8}$	3,13	0,09	$3,8 \times 10^{-8}$	0,21	0,13
h1A11-2	0,08	$1,0 \times 10^{-8}$	2,85	0,09	$1,9 \times 10^{-8*}$	0,21	0,13

h1A11-3	0,07	$1,5 \times 10^{-8}$	3,51	0,08	$3,7 \times 10^{-8}$	0,24	0,16
h1A11-4	0,08	$1,6 \times 10^{-8}$	3,61	0,09	$3,9 \times 10^{-8}$	0,22	0,17
h1A11-5	0,07	$0,96 \times 10^{-8}$	3,61	0,08	$2,2 \times 10^{-8}$	0,21	0,16
h1A11-6	0,08	$1,13 \times 10^{-8}$	3,74	0,10	$3,1 \times 10^{-8}$	0,15	0,13
h1A11-7	0,06	$1,3 \times 10^{-8}$	3,71	0,09	$3,5 \times 10^{-8}$	0,18	0,14
h1A11-8	0,06	$1,1 \times 10^{-8}$	3,34	0,09	$2,4 \times 10^{-8}$	0,18	0,17
h1A11-9	0,07	$1,3 \times 10^{-8}$	3,28	0,09	$3,4 \times 10^{-8}$	0,18	0,15
h1A11-10	0,06	$1,3 \times 10^{-8}$	nt	0,09	$3,5 \times 10^{-8}$	nt	0,15
h1A11-11	0,07	$1,2 \times 10^{-8}$	nt	0,09	$2,7 \times 10^{-8}$	nt	0,15
h1A11-12	0,06	$1,4 \times 10^{-8}$	nt	0,08	$3,5 \times 10^{-8}$	nt	0,16
h1A11-13	0,06	$1,4 \times 10^{-8}$	nt	0,09	$3,7 \times 10^{-8}$	nt	0,16
h1A11-14	0,055	$1,3 \times 10^{-8}$	nt	0,07	$2,8 \times 10^{-8}$	nt	0,14
h1A11-15	0,07	$1,4 \times 10^{-8}$	nt	0,09	$3,7 \times 10^{-8}$	nt	0,13
h1A11-16	0,06	$1,5 \times 10^{-8}$	nt	0,09	$3,9 \times 10^{-8}$	nt	0,12
1A11 (khảm)	0,2	$0,9 \times 10^{-8}$	6,29	0,3	$2,4 \times 10^{-8}$	0,53	0,33
1A11 (mAb của chuột)		$0,6 \times 10^{-8}$					

nt = không được thử nghiệm

Bảng 14. Tổng kết hiệu lực chức năng *in vitro* của các mAb 1A11 được làm tương thích với người

Số liệu chức năng			
	DLL4 người		DLL4 chuột
mAb	Cạnh tranh ELISA (IC50, nM)	Thử nghiệm chất thông báo (EC50, nM)	Cạnh tranh ELISA (IC50, nM)
h1A11-1	0,4	2,53	1,3
h1A11-2	0,3	3,92	0,9
h1A11-3	0,2	2,53	0,9
h1A11-4	0,3	3,28	0,9
h1A11-5	0,3	3,8	0,8
h1A11-6	0,4	1,45	0,8
h1A11-7	0,5	4,84	0,9
h1A11-8	0,35	4,24	0,9
h1A11-9	0,3	3,18	0,9
h1A11-10	0,35	5,88	0,9
h1A11-11	0,4	3,73	0,8
h1A11-12	0,4	2,89	0,9

h1A11-13	0,3	10,42	1
h1A11-14	0,25	4,1	0,7
h1A11-15	0,2	5,4	0,7
h1A11-16	0,3	2,61	0,7
1A11 (khảm)	1,8	5,98	3,5
1A11 (mAb lai giống chuột)	0,5		1,1

Các thiết kế khác cho việc làm cho có tính người các kháng thể 1A11 kháng DLL4

Các thiết kế VH và VL khác cho việc làm cho có tính người kháng thể đơn dòng chuột kháng DLL4 1A11 được trình bày trong bảng bên dưới.

Bảng 15. Các thiết kế VH và VL khác cho việc làm cho có tính người các kháng thể 1A11

Thiết kế VH hoặc VL	Trình tự khung nhận	Đột biến ngược [†]
h1A11VH.2	VH3 liên ứng + JH4	0
h1A11VH.2b	VH3 liên ứng + JH4	S49A, A93S
h1A11VH.3	VH1-46 + JH4 (với Q1E để phòng sự hình thành pyroglutamat đầu tận N)	0
h1A11VH.3b	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, A93S
h1A11VH.3c	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, V67F, M69I, T73N, V78L, A93S, và T75I (để tránh dấu hiệu glycosyl hóa đầu N có thể không mong muốn)
h1A11VH.3d	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, V67F, M69I, V78L, A93S (T73N bị bỏ qua để tránh dấu hiệu glycosyl hóa đầu N có thể không mong muốn)
h1A11VL.1c	O2 + JK2	Y49F, F71S
h1A11VL.2	3-15/L2 + JK2	0
h1A11VL.2b	3-15/L2 + JK2	Y49F
h1A11VL.2c	-15/L2 + JK2	Y49F, F71S

[†] sử dụng cách đánh số Kabat.

Ví dụ 7. Làm cho mAb 38H12 chuột kháng DLL4 tương thích với người

Kháng thể kháng DLL4 chuột 38H12 (Bảng 9, ở trên) được làm tương thích với người. Các trình tự axit amin biến đổi được làm tương thích với người VH.1, VH.1a, VH.1b, VH.2a, VL.1, VL.1a, VL.1b, và VL.2a (Bảng 16, bên dưới) được chuyển thành trình tự ADN, dựa vào các dòng mầm của người tương đồng nhất, và được tổng hợp. Các trình tự nhận chuỗi nặng dòng mầm của người VH3-30 FR1, VH3-30 FR2, VH3-30 FR3, và JH3 FR4 (xem, Bảng 3) được sử dụng để tạo ra các biến thể chuỗi nặng được làm tương thích với người được trình bày trong Bảng 16. Các trình tự nhận chuỗi nhẹ dòng mầm của người O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, và JK2 FR4 (xem, Bảng 4) được sử dụng để tạo ra các biến thể chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được trình bày trong Bảng 16. Các cấu trúc riêng rẽ là trình tự được biến đổi để kiểm tra tính chính xác. Các biến thể dương tính sau đó được tiêm vào 150 ml môi trường Luria bổ sung ampicilin và được cấy qua đêm ở 37°C. ADN được chiết từ các dịch nuôi cấy biến thể bằng cách sử dụng kit chuẩn bị tối đa tốc độ Qiagen Hi (12662).

Bảng 16. Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể đơn dòng kháng DLL4 chuột được làm tương thích với người 38H12

SEQ ID NO:	Vùng protein		Trình tự
			123456789012345678901234567890
179	VH.1 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARLNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.1 38H12 CDR-H1	Các gốc từ 31- 35 của SEQ ID NO:179	NYGMY
	VH.1 38H12 CDR-H2	Các gốc từ 50- 66 của SEQ ID NO:179	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1 38H12 CDR-H3	Các gốc từ 99- 107 của SEQ ID NO:179	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
180	VH.1a 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKSTLYLQMNSLRAED

			TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVTVSS
	VH.1a 38H12 CDR-H1	Các gốc từ 31- 35 của SEQ ID NO:180	NYGMY
	VH.1a 38H12 CDR-H2	Các gốc từ 50- 66 của SEQ ID NO:180	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1a 38H12 CDR-H3	Các gốc từ 99- 107 của SEQ ID NO:180	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
181	VH.1b 38H12		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAALNWELGIDYWGQGTMTVTVSS
	VH.1b 38H12 CDR-H1	Các gốc từ 31- 35 của SEQ ID NO:181	NYGMY
	VH.1b 38H12 CDR-H2	Các gốc từ 50- 66 của SEQ ID NO:181	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1b 38H12 CDR-H3	Các gốc từ 99- 107 của SEQ ID NO:181	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
182	VH.2a 38H12		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDN SKSTLYLQMNSLRAED TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVTVSS
	VH.2a 38H12 CDR-H1	Các gốc từ 31- 35 của SEQ ID NO:182	NYGMY
	VH.2a 38H12 CDR-H2	Các gốc từ 50- 66 của SEQ ID NO:182	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.2a 38H12 CDR-H3	Các gốc từ 99- 107 của SEQ ID NO:182	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
183	VL.1 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS

			RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1 38H12 CDR-L1	Các gốc từ 24- 34 của SEQ ID NO:183	RASEDIYSNLA
	VL.1 38H12 CDR-L2	Các gốc từ 50- 56 của SEQ ID NO:183	AANRLQD
	VL.1 38H12 CDR-L3	Các gốc từ 89- 97 của SEQ ID NO:183	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
184	VL.1a 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQKKPGKSPKLLIYAANRLQDGVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1a 38H12 CDR-L1	Các gốc từ 24- 34 của SEQ ID NO:184	RASEDIYSNLA
	VL.1a 38H12 CDR-L2	Các gốc từ 50- 56 của SEQ ID NO:184	AANRLQD
	VL.1a 38H12 CDR-L3	Các gốc từ 89- 97 của SEQ ID NO:184	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
185	VL.1b 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1b 38h12 CDR-L1	Các gốc từ 24- 34 của SEQ ID NO:185	RASEDIYSNLA
	VL.1b 38H12 CDR-L2	Các gốc từ 50- 56 của SEQ ID NO:185	AANRLQD
	VL.1b 38H12 CDR-L3	Các gốc từ 89- 97 của SEQ ID NO:185	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
186	VL.2a 38H12		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIY

			SNLAWYQKKPGQSPRLLIYAANRLQDGVPA RFSGSGSGTEYTLTISSLQSEDFAVYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.2a 38H12 CDR-L1	Các gốc từ 24- 34 của SEQ ID NO:186	RASEDIYSNLA
	VL.2a 38H12 CDR-L2	Các gốc từ 50- 56 của SEQ ID NO:186	AANRLQD
	VL.2a 38H12 CDR-L3	Các gốc từ 89- 97 của SEQ ID NO:186	LQGSKFPLT

Kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách kết hợp mỗi biến thể chuỗi nặng với mỗi biến thể chuỗi nhẹ cho tổng 16 biến thể (Bảng 17, bên dưới). Các biến thể từ 1-4 mỗi biến thể chứa VH.1 được cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 0 đột biến ngược, VL.1a: 4 đột biến ngược, VL.1b: 1 đột biến ngược, và VL.2a: 5 đột biến ngược. Các biến thể từ 5-8 mỗi biến thể chứa VH.1a được cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 4 đột biến ngược, VL.1a: 8 đột biến ngược, VL.1b: 5 đột biến ngược, và VL.2a: 9 đột biến ngược. Các biến thể từ 9-12 mỗi biến thể chứa VH.1b được cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 1 đột biến ngược, VL.1a: 5 đột biến ngược, VL.1b: 2 đột biến ngược, và VL.2a: 5 đột biến ngược. Các biến thể từ 13-16 mỗi biến thể chứa VH.2a được cặp đôi với mỗi biến thể VL: VL.1: 5 đột biến ngược, VL.1a: 9 đột biến ngược, VL.1b: 6 đột biến ngược, VL.2a: 10 đột biến ngược.

Bảng 17. Tổng kết các kháng thể 38H12 được làm tương thích với người được tạo ra và các đột biến ngược

Tên	Sự kết hợp VH/VL	Các đột biến ngược trong các vùng biến đổi [†] (VH/VL)
h38H12.1	VH.1/VL.1	0/0 (Q1E trong VH để phòng ngừa sự hình thành pyroglutamat đầu N)
h38H12.2	VH.1/VL.1a	0/Q38K, A43S, F71Y, Y87F (Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12.3	VH.1/VL.1b	0/F71Y (Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12.4	VH.1/VL.2a	0/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F

		(Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12.5	VH.1a/VL.1	V37I, N76S, Y91H, R94A/0
h38H12.6	VH.1a/VL.1a	V37I, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.7	VH.1a/VL.1b	V37I, N76S, Y91H, R94A/F71Y
h38H12.8	VH.1a/VL.2a	V37I, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F
h38H12.9	VH.1b/VL.1	R94A/0
h38H12.10	VH.1b/VL.1a	R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.11	VH.1b/VL.1b	R94A/F71Y
h38H12.12	VH.1b/VL.2a	R94A/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F
h38H12.13	VH.2a/VL.1	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/0
h38H12.14	VH.2a/VL.1a	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.15	VH.2a/VL.1b	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/F71Y
h38H12.16	VH.2a/VL.2a	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/ Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F

[†] sử dụng cách đánh số Kabat.

Tất cả 16 biến thể được chuyển tạm thời vào 50 mls dịch nuôi cấy tế bào hỗn dịch HEK 293 6e với tỷ lệ cấu trúc chuỗi nhẹ/nặng là 60%/40%. Sử dụng 1 mg/ml PEI để chuyển các tế bào. Dịch nổi trên bề mặt tế bào được thu hoạch sau bảy ngày trong các bình lắc, quay xuống thành các tế bào dạng hạt, và lọc qua các màng lọc 0,22 μ m để phân tách IgG từ các chất nhiễm bẩn của dịch nuôi cấy. Biến thể liên kết với DLL4 của người đầu tiên được đánh giá qua ELISA liên kết bất giữ (Ví dụ 1.2), mà sử dụng kháng thể bất giữ kháng Fc người của dê - (Jackson immuno research, 109-005-008) để bất giữ IgG trong các dịch nổi bề mặt tế bào 293 6e được lọc (xem, EC₅₀ ELISA liên kết, Bảng 18, bên dưới). Các biến thể chứa VH.1 biểu thị ái lực liên kết thấp nhất khi so với các biến thể khác và được coi như ngoài sự sàng lọc. VH.1 là CDR-ghép với khung không có các đột biến ngược.

Các biến thể liên kết tốt (h38H12.5-h38H12.16) sau đó được tinh chế theo lô bằng cách thêm 1 thể tích dịch nổi trên bề mặt của dung dịch đệm liên kết protein A IgG (Thermo Scientific 21001) và 800 μ l của các hạt chảy nhanh protein A sepharosa (GE Healthcare, 17-1279-04). Các dịch nổi bề mặt, với các hạt và dung dịch đệm được thêm vào, được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, và các hạt được thu bằng lực hấp dẫn qua các cột sắc ký chuẩn bị nhiều lần (Bio Rad, 731-1550). Mỗi lần dịch nổi bề mặt đi qua

các cột thì các hạt được rửa với 10 mls dung dịch đệm liên kết và IgG được rửa giải bằng dung dịch rửa giải IgG Immunopure (Pierce, 185 1520) và được thu trong 1 ml các phần được trung hòa với 100 μ l 1M Tris, pH 8.

Các biến thể đã tinh chế còn được đặc trưng trong các ELISA cạnh tranh Notch-1 người (Ví dụ 1.4), mà sử dụng khuôn bọc Fc Notch-1 trên các đĩa ELISA và ủ trước DLL4 của người đã biotinyl hóa cộng với kháng thể được chuẩn độ. Dấu hiệu được đánh giá bằng DLL4 đã biotinyl hóa tự do liên kết với Fc Notch-1. Các chất liên kết mạnh đã ức chế dấu hiệu ở nồng độ kháng thể thấp. Từ h38H12.5 đến h38H12.7 đã biểu thị hiệu lực cạnh tranh thấp hơn khi so với các biến thể khác (xem, EC₅₀ ELISA cạnh tranh Notch, Bảng 18, bên dưới).

Các biến thể liên kết tốt, như được xác định bằng ELISA liên kết, được đánh giá bằng Biacore (Ví dụ 1.1) đồng thời với các sự sàng lọc bằng thử nghiệm dựa vào tế bào. K_D của DLL4 của người là tương tự cho tất cả các biến thể (xem, Biacore, K_D trong Bảng 18, bên dưới). Các biến thể được sàng lọc trong các thử nghiệm dựa vào tế bào mà kiểm tra liên kết trực tiếp với DLL4 của người (Ví dụ 1.3; EC₅₀ liên kết FACS trong Bảng 18, bên dưới) và sự ức chế việc phát tín hiệu Notch-1 (Ví dụ 1.6; EC₅₀ của thử nghiệm chất thông báo Notch trong Bảng 18 sau đây).

Bảng 18. Tổng kết hoạt tính *in vitro* của các mAb 38H12 được làm cho có tính kháng lại DLL4 của người

Tên	EC ₅₀ của ELISA liên kết (nM)	EC ₅₀ của ELISA cạnh tranh Notch (nM)	EC ₅₀ của FACS liên kết (nM)	EC ₅₀ của thử nghiệm chất thông báo Notch (nM)	Biacore, K _D (nM)
h38H12.1	21,5		17,84		
h38H12.2	26,88				
h38H12.3	5,57				
h38H12.4	20,65				
h38H12.5	0,2015	14,81	77,15	7,307	0,401
h38H12.6	0,1584	26,96	12,29	6,317	0,434
h38H12.7	0,1798	12,49	19,06	2,598	0,34
h38H12.8	0,1972	8,315	20,02	5,557	0,397

h38H12.9	0,1155	4,158	3,71	1,436	0,986
h38H12.10	0,1226	3,902	2,489	0,7861	0,578
h38H12.11	0,1264	3,8	2,477	0,6572	0,554
h38H12.12	0,1651	3,228	1,478	1,062	0,819
h38H12.13	0,1534	5,287	2,556	0,7943	0,507
h38H12.14	0,146	5,839	1,04	1,014	0,303
h38H12.15	0,0904	5,714	2,369	0,837	0,355
h38H12.16	0,1696	3,766	2,914	1,185	0,392

Các thiết kế khác để kháng thể 38H12 kháng DLL4 tương thích với người.

Các thiết kế VH và VL khác để kháng thể đơn dòng chuột kháng DLL4 38H12 được làm tương thích với người được trình bày trong bảng bên dưới.

Bảng 19. Các thiết kế VH và VL khác để làm cho có tính người kháng thể 38H12

Thiết kế VH hoặc VL	Các trình tự khung nhận dòng mầm	Các đột biến ngược†
h38H12VH.2	VH3 liên ứng + JH3	0
h38H12VH.2b	VH3 liên ứng + JH3	S49A, R94A
h38H12VH.3	VH1-46 + JH3	0 (Q1E trong VH để phòng ngừa sự hình thành pyroglutamat ở đầu N)
h38H12VH.3b	VH1-46 + JH3	Y27F, M48V, G49A, R94A (Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12VH.3c	VH1-46 + JH3	Y27F, Y37I, M48V, G49A, V67F, M69I, T73N, V78L, Y91H, R94A (T75I để loại bỏ dấu hiệu glycosyl hóa đầu N không mong muốn, Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12VH.3d	VH1-46 + JH3	Y27F, Y37I, M48V, G49A, V67F, M69I, V78L, Y91H, R94A (Q1E trong VH như được ghi chú ở trên)
h38H12VL.2	3-15/L2 + JK2	0
h38H12VL.2b	3-15/L2 + JK2	F71Y

† sử dụng cách đánh số Kabat.

Ví dụ 8. Sự trưởng thành về ái lực của h1A11.1.

Kháng thể được làm tương thích với người h1A11.1 được sử dụng làm khuôn để trưởng thành về ái lực. Mô tả thiết kế của thư viện được cung cấp bên dưới. Cách đánh số các trình tự vùng biến đổi của các kháng thể đơn dòng được chú thích bằng cách đánh số Kabat (như được mô tả ở trên; hoặc xem website trên toàn thế giới bioinf.org.uk/abs/#kabatnum) và được sử dụng để tạo ra các thư viện được mô tả bên dưới.

Ba thư viện được tạo ra như được mô tả bên dưới.

Thư viện H1+H2 (kích thích: 76080808):

11 gốc kích thích từ 30, 31, 32, 35, 50, 52, 52a, 55, 56, 57, và 58.

Cột giữa dòng mầm và trình tự h1A11 ở vị trí 76(V/I).

10⁹ biến thể mẫu trong thư viện với 4 hoặc ít hơn gốc đột biến ít nhất 3,7 lần.

Phần lớn của thư viện là các biến thể mang từ 4 đến 6 gốc được đột biến bằng kích thích.

Thư viện H3 (kích thích: 70101010)

8 gốc được kích thích từ @ 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, và 102.

Cột giữa dòng mầm và trình tự h1A11 ở vị trí 93(A/S) và 101 (D/A).

10⁹ biến thể mẫu trong thư viện với 4 hoặc ít hơn gốc đột biến ít nhất 4,7 lần.

Phần lớn của thư viện là các biến thể mang từ 4 đến 5 gốc được đột biến bằng kích thích.

Thư viện LC (kích thích: 70101010):

9 gốc được kích thích từ 28, 30, 31, 50, 53, 92, 93, 94, và 96.

Cột giữa dòng mầm và trình tự h1A11 ở 7 vị trí 27(Q/E), 43(A/S), 49(Y/F), 52(S/N), 71(F/S), 87(Y/F), và 91(S/Y).

10⁹ biến thể mẫu trong thư viện với 4 hoặc ít hơn gốc đột biến ít nhất 1 lần.

Phần lớn của thư viện là các biến thể mang từ 4 đến 6 gốc được đột biến bằng kích thích.

Thư viện rHC: tái tổ hợp các đầu ra của thư viện H1+H2 và H3.

Thư viện rHCLC: tái tổ hợp các đầu ra của thư viện H1+H2, H3, và LC.

Cả dòng mầm khung VH và VL đều làm giảm tính sinh miễn dịch dự đoán. Đột biến dòng mầm mong đợi nhất trong h1A11VL.1a là S43A và S71F sử dụng các codon được chỉ ra ở đây trong các gốc được kích thích:

Nếu prolin là được kích thích, thì oligo kích thích sẽ có $C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$ codon không quan tâm đến codon ban đầu trong trình tự kháng thể. Các codon này được chọn dựa trên tiêu chí sau:

1. làm tăng đột biến không đồng nghĩa
2. làm tăng sự bao phủ của nhiều axit amin khi được đột biến
3. sử dụng các codon tần số cao
4. tránh các codon SSS và WWW.

Trật tự kích thích là A-C-G-T

$A_{(85-5-5-5)}, A_{(70-10-10-10)}$

$C_{(5-85-5-5)}, C_{(10-70-10-10)}$

$G_{(5-5-85-5)}, G_{(10-10-70-10)}$

$T_{(5-5-5-85)}, T_{(10-10-10-70)}$

Alanin (A):

GCN $G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

Threonin (T):

ACN $A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

Prolin (P):

CCN $C_{(10-70-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$

Serin (S):

Nếu TCN $T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}S$ $T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}S$

Nếu AGY $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}$

Valin (V):

GTN $G_{(10-10-70-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $G_{(5-5-85-5)}T_{(5-5-5-85)}S$

Glyxin (G):

GGN $G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}S$

Leuxin (L):

Nếu CTN $C_{(10-70-10-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $C_{(5-85-5-5)}T_{(5-5-5-85)}S$

Nếu TTR $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$

Arginin (R):

Nếu CGN $C_{(10-70-10-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $C_{(5-85-5-5)}G_{(5-5-85-5)}S$

Nếu AGR $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$

Methionin (M):

ATG $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$

Tryptophan (W):

TGG $T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$

PheylAlanin (F):

TTY $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$

Isoleuxin (I): cần hai oligo

50% ATY $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$

50% ATA $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}$

Tyroxin (Y):

TAY $T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

Histidin (H):

CAY $C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

Glutamin (Q):

CAR $C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$

Các asparagin (N):

AAV $A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

Lysin (K):

AAR $A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$

Axit aspartic (D):

GAY $G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$ $G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$

Axit glutamic (E):

GAR $G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$

Xystein (C):

TGY luôn luôn là NNS

Thư viện h1A11.1 được truyền vào các tế bào nấm men và được hiển thị trên bề mặt tế bào để lựa chọn kháng lại nồng độ thấp của vùng ngoài tế bào DLL4 đã biotinyl hóa bằng từ sau đó phân loại tế bào hoạt động huỳnh quang. Sự lựa chọn tốc độ kết hợp hoặc tốc độ phân ly được cải thiện hoặc cả hai được thực hiện, và trình tự protein kháng thể của các dòng vô tính hu1A11 điều hòa ái lực (Các bảng 20 và 21, bên dưới) được thu từ các tế bào nấm men để chuyển ngược thành khuôn IgG để mô tả đặc tính hơn nữa (xem, tổng kết các dòng vô tính trong Bảng 22). Bảng 23 liệt kê các axit amin được quan sát trong sự lựa chọn làm trưởng thành về mặt ái lực trong các vùng khung (FR) và các CDR.

Bảng 20. Trình tự VH của các dòng vô tính 1A11.1 được làm tương thích với người trưởng thành về ái lực

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
187	h1A11VH.1 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNF PMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11VH.1 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:187	NFPMA
	h1A11VH.1 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:187	TISSSDGTTYRDSVKG
	h1A11VH.1 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:187	GYNSPFAY
188	h1A11.A6 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRHF PMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDAWPSYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A6 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:188	HFPMA
	h1A11.A6 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:188	TISSSDAWPSYRDSVKG
	h1A11.A6 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:188	GYNSPFAY
189	h1A11.A8 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNF PMSWVRQAPGKGLEWVASISSSDSWATIGDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A8 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:189	NFPMS
	h1A11.A8 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:189	SISSSDSWATIGDSVKG

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
	h1A11.A8 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:189	GYNSPFAY
190	h1A11.C6 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNF PMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGWPTYRDSV KGRFTISRADNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.C6 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:190	NFPMA
	h1A11.C6 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:190	TISSSDGWPTYRDSVKG
	h1A11.C6 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:190	GYNSPFAY
191	h1A11.A11 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRHF PMAWVRQAPGKGLEWVATISSDDWPNYRDSV KGRFTISRADNKSSLYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A11 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:191	HFPMA
	h1A11.A11 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:191	TISSDDWPNYRDSVKG
	h1A11.A11 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:191	GYNSPFAY
192	h1A11.B5 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRYF PMSWVRQAPGKGLEWVASISGSDGWASYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYNSPFASWGQGLTVTVSS
	h1A11.B5 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:192	YFPMS
	h1A11.B5 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:192	SISGSDGWASYRDSVKG

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
	h1A11.B5 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:192	GYNSPFAS
193	h1A11.E12 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRYF PMAWVRQAPGKGLEWVATISGSDEWPNYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYNSPFAFWGQGTLVTVSS
	H1A11.E12 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:193	YFPMA
	h1A11.E12 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:193	TISGSDEWPNYRDSVKG
	h1A11.E12 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:193	GYNSPFAF
194	h1A11.G3 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRYF PMSWVRQAPGKGLEWVASISGSDGWASYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYNSPFAYWGQGTLVTVSS
	h1A11.G3 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:194	YFPMS
	h1A11.G3 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:194	SISGSDGWASYRDSVKG
	h1A11.G3 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:194	GYNSPFAY
195	h1A11.F5 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRHF PMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDAWPSYRDSV KGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGYNSPFAYWGQGTLVTVSS
	h1A11.F5 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:195	HFPMA
	h1A11.F5 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:195	TISSSDAWPSYRDSVKG

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
	h1A11.F5 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:195	GYNSPFAY
196	h1A11.H2 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNFPMSWVRQAPGKGLEWVASISSSDSWATIGDSVKGRFTISRADNKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYNSPFAFWGQGTTLTVSS
	h1A11.H2 VH	CDR-H1	Các gốc từ 31-35 của SEQ ID NO:196	NFPMS
	h1A11.H2 VH	CDR-H2	Các gốc từ 50-66 của SEQ ID NO:196	SISSSDSWATIGDSVKG
	h1A11.H2 VH	CDR-H3	Các gốc từ 99-107 của SEQ ID NO:196	GYNSPFAF

Bảng 21. Trình tự VL của các dòng vô tính 1A11.1 trưởng thành về ái lực được làm tương thích với người

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
197	h1A11VL.1 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11VL.1 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:197	RASEDIYSNLA
	h1A11VL.1 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:197	DTNNLAD
	h1A11VL.1 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:197	QQYNNYPPT
198	h1A11.A2 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYINLAWYQQKPGKSPKLLIFDTNDLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDYVPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A2 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:198	RASQDIYINLA

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
	h1A11.A2 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:198	DTNDLAD
	h1A11.A2 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89 - 97 của SEQ ID NO:198	QQYDYVPPT
199	h1A11.A12 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYY NLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSSLADGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDW YPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A12 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:199	RASQDIYYNLA
	h1A11.A12 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:199	DTSSLAD
	h1A11.A12 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89 - 97 của SEQ ID NO:199	QQYDWYPPT
200	h1A11.A7 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYY NLAWYQQKPGKAPKLLIFDTSDLADGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYDY YPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A7 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:200	RASQDIYINLA
	h1A11.A7 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:200	DTSDLAD
	h1A11.A7 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89 - 97 của SEQ ID NO:200	QQYDYYPPT
201	h1A11.B4 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIYY NLAWYQQKPGKAPKLLIFDTNILADGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDY VPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.B4 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:201	RASQDIYYNLA
	h1A11.B4 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:201	DTNILAD
	h1A11.B4 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89 - 97 của SEQ ID NO:201	QQYDYVPPT

SEQ ID NO:	Vùng protein			Trình tự
				123456789012345678901234567890
202	h1A11.B5 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIWN NLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSYLADGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDW YPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.B5 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:202	RASQDIWNNLA
	h1A11.B5 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:202	DTSYLAD
	h1A11.B5 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89-97 của SEQ ID NO:202	QQYDWYPPT
203	h1A11.E12 VL			DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEIYR NLAWYQQKPGKSPKLLIFDTSVLADGVPSRF SGSGSGTDSLTLTISSLQPEDFATYYCQQYTY YPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.E12 VL	CDR-L1	Các gốc từ 24-34 của SEQ ID NO:203	RASQEIYRNLA
	h1A11.E12 VL	CDR-L2	Các gốc từ 50-56 của SEQ ID NO:203	DTSVLAD
	h1A11.E12 VL	CDR-L3	Các gốc từ 89 - 97 của SEQ ID NO:203	QQYTYYPPT

Bảng 22. Tổng kết các dòng vô tính chuyển h1A11.1 trưởng thành về ái lực

Tên dòng vô tính	VH	VL
h1A11.A6	h1A11.A6 VH	h1A11VL.1
h1A11.C6	h1A11.C6 VH	h1A11VL.1
h1A11.A11	h1A11.A11 VH	h1A11VL.1
h1A11.A8	h1A11.A8 VH	h1A11VL.1
h1A11.B4	h1A11VH.1	h1A11.B4 VL
h1A11.A7	h1A11VH.1	h1A11.A7 VL
h1A11.A12	h1A11VH.1	h1A11.A12 VL
h1A11.A2	h1A11VH.1	h1A11.A2 VL

h1A11.B5	h1A11.B5 VH	h1A11.B5 VL
h1A11.E12	h1A11.E12 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.G3	h1A11.G3 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.F5	h1A11.F5 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.H2	h1A11.H2 VH	h1A11.E12 VL

Bảng 23. Các axit amin được quan sát trong quá trình lựa chọn để trưởng thành về mặt ái lực của h1A11.1 trong các vùng khung (các FR) và mỗi CDR trong các CDR của các vùng VH (SEQ ID NO:204) và VL (SEQ ID NO:205)

SEQ ID NO:204

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTYRDSVKG**
RYY S S G SSASIG
NH T A AFDN
GS EWST
KA D PA
T F D
L Q
C

RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGY**YN**SPFAYWGQGLTVSS
SL D DF
S

SEQ ID NO:205

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDI**YS**NLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLAD
TQE WN S F NS
T EI D
DT Q
NR T
M V
G E

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQYNNYPPT**FGQGTKLEIK
S F SDWV P
TY
YI
F
P

Các dòng vô tính trưởng thành về ái lực hu1A11.1 (Bảng 22) được biểu hiện, tinh chế, và hơn nữa được mô tả đặc điểm *in vitro*. Ái lực liên kết kháng nguyên của chúng

được xác định bằng kỹ thuật Biacore như được mô tả trong Ví dụ 1.1, và được trình bày trong các bảng 24 và 25 (bên dưới). Hoạt tính liên kết của chúng với DLL4 liên kết tế bào và ức chế hoạt động của Notch bị gây ra bởi DLL4 liên kết tế bào hơn nữa được kiểm tra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Các ví dụ 1.3 và 1.6, và được tổng kết trong Bảng 26 (bên dưới).

Bảng 24. Các động học Biacore của kháng thể 1A11.1 được làm tương thích với người trưởng thành về ái lực liên kết với DLL4 của người và khỉ cynomolgus

Dòng vô tính	Các thông số động học trên Biacore					
	DLL4 của người			DLL4 Cyno		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
h1A11.A6	1,82 x 10 ⁺⁵	6,62 x 10 ⁻⁶	3,6 x 10 ⁻¹¹	1,71 x 10 ⁺⁵	2,10 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.C6	1,78 x 10 ⁺⁵	7,18 x 10 ⁻⁶	4,0 x 10 ⁻¹¹	1,71 x 10 ⁺⁵	3,12 x 10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-G3	1,09 x 10 ⁺⁵	9,39 x 10 ⁻⁶	8,7 x 10 ⁻¹¹	9,90 x 10 ⁺⁴	1,73 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-F5	1,31 x 10 ⁺⁵	9,82 x 10 ⁻⁶	7,5 x 10 ⁻¹¹	1,18 x 10 ⁺⁵	2,00 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.A8	1,74 x 10 ⁺⁵	1,08 x 10 ⁻⁵	6,2 x 10 ⁻¹¹	1,60 x 10 ⁺⁵	2,40 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.A11	1,83 x 10 ⁺⁵	2,66 x 10 ⁻⁵	1,5 x 10 ⁻¹⁰	1,70 x 10 ⁺⁵	3,35 x 10 ⁻⁵	2,0 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-E12	1,49 x 10 ⁺⁵	3,26 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻¹⁰	1,37 x 10 ⁺⁵	3,84 x 10 ⁻⁵	2,8 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-H2	1,43 x 10 ⁺⁵	3,85 x 10 ⁻⁵	2,7 x 10 ⁻¹⁰	1,31 x 10 ⁺⁵	4,60 x 10 ⁻⁵	3,5 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-B5	1,30 x 10 ⁺⁵	1,34 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻⁹	1,17 x 10 ⁺⁵	1,78 x 10 ⁻⁴	1,5 x 10 ⁻⁹
h1A11.A2	1,42 x 10 ⁺⁵	4,21 x 10 ⁻⁴	3,0 x 10 ⁻⁹	1,34 x 10 ⁺⁵	5,27 x 10 ⁻⁴	3,9 x 10 ⁻⁹
h1A11-B4	1,57 x 10 ⁺⁵	8,23 x 10 ⁻⁴	5,2 x 10 ⁻⁹	1,43 x 10 ⁺⁵	9,90 x 10 ⁻⁴	6,9 x 10 ⁻⁹
h1A11.A7	1,70 x 10 ⁺⁵	9,73 x 10 ⁻⁴	5,7 x 10 ⁻⁹	1,58 x 10 ⁺⁵	1,24 x 10 ⁻³	7,8 x 10 ⁻⁹
h1A11.A12	1,73 x 10 ⁺⁵	1,32 x 10 ⁻³	7,6 x 10 ⁻⁹	1,58 x 10 ⁺⁵	1,62 x 10 ⁻³	1,0 x 10 ⁻⁸
h1A11.1	1,58 x 10 ⁺⁵	2,12 x 10 ⁻³	1,3 x 10 ⁻⁸	1,44 x 10 ⁺⁵	2,55 x 10 ⁻³	1,8 x 10 ⁻⁸

Bảng 25. Các thông số động học Biacore của kháng thể 1A11.1 được làm tương thích với người trưởng thành về ái lực liên kết với DLL4 chuột và chuột cống

Dòng vô tính	Các thông số động học trên Biacore					
	DLL4 chuột			DLL4 chuột cống		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
h1A11.A6	$1,98 \times 10^{+5}$	$3,12 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-10}$	$1,29 \times 10^{+5}$	$7,72 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-9}$
h1A11.C6	$2,03 \times 10^{+5}$	$2,34 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-10}$	$1,69 \times 10^{+5}$	$3,05 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-8}$
h1A11-G3	$1,17 \times 10^{+5}$	$4,04 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-10}$	$1,18 \times 10^{+5}$	$1,01 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-9}$
h1A11-F5	$1,43 \times 10^{+5}$	$3,97 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-10}$	$1,16 \times 10^{+5}$	$6,79 \times 10^{-4}$	$5,8 \times 10^{-9}$
h1A11.A8	$1,87 \times 10^{+5}$	$3,27 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-10}$	$1,39 \times 10^{+5}$	$6,50 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-8}$
h1A11.A11	$1,98 \times 10^{+5}$	$3,54 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-10}$	$1,16 \times 10^{+5}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$8,8 \times 10^{-9}$
h1A11-E12	$1,56 \times 10^{+5}$	$5,44 \times 10^{-5}$	$3,5 \times 10^{-10}$	$1,08 \times 10^{+5}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-9}$
h1A11-H2	$1,54 \times 10^{+5}$	$5,07 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-10}$	$1,78 \times 10^{+5}$	$2,83 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-8}$
h1A11-B5	$1,45 \times 10^{+5}$	$1,66 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-9}$	$9,82 \times 10^{+4}$	$3,97 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-7}$
h1A11.A2	$1,81 \times 10^{+5}$	$9,04 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-9}$	NB	NB	NB
h1A11-B4	$4,79 \times 10^{+5}$	$2,51 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-9}$	NB	NB	NB
h1A11.A7	liên kết kém		$1,3 \times 10^{-8}$	NB	NB	NB
h1A11.A12	liên kết kém		$1,6 \times 10^{-8}$	NB	NB	NB
h1A11.1	$1,56 \times 10^{+5}$	$4,98 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-8}$	NB	NB	NB

NB = không quan sát thấy liên kết

Bảng 26. Hoạt tính *in vitro* DLL4 liên kết tế bào của kháng thể 1A11.1 được làm tương thích với người trưởng thành về ái lực

	Liên kết trực tiếp với các tế bào DLL4, FACS (nM)		Sự ức chế hoạt động của Notch qua các tế bào DLL4, thử nghiệm chất thông báo Notch (nM)	
	DLL4 người	DLL4 chuột	DLL4 người	DLL4 chuột
h1A11.A6	2,227	0,636	0,746	1,168
h1A11.C6	2,452	0,517	0,894	1,188

h1A11-G3	3,592	1,397	1,845	2,353
h1A11-F5	1,171	0,460	0,484	0,649
h1A11.A8	3,160	0,744	1,331	1,247
h1A11.A11	2,480	0,500	0,904	1,175
h1A11-E12	0,996	1,615	0,208	0,266
h1A11-H2	1,977	0,420	0,856	0,586
h1A11.A2	2,375	0,634	3,681	0,854
h1A11-B4	2,145	0,665	3,280	1,079
h1A11.A7	2,174	0,625	2,920	1,788
h1A11.A12	1,768	0,568	1,662	0,832

Ví dụ 9. Tính chất tương đương phân tử và hóa lý của kháng thể lai chuột

Sự đồng dạng của kháng thể đơn dòng đặc hiệu với DLL4 được xác định bằng phổ khối như được mô tả bên dưới.

Phân tích phổ khối của h1A11.1

Trọng lượng phân tử chuỗi nhẹ 23,501 Dalton được làm tương xứng tốt với giá trị lý thuyết. Các trọng lượng phân tử chuỗi nặng được làm tương xứng tốt với giá trị lý thuyết. Các trọng lượng phân tử quan sát được là 50,190 Dalton; 50,352 Dalton; và 50,514 Dalton, với sự khác biệt tương ứng là 162 Dalton như là kết quả của sự glycosyl hóa khác nhau.

Phân tích phổ khối của h38H12.11

Trọng lượng phân tử chuỗi nhẹ 23,408 Dalton được làm tương xứng tốt với giá trị lý thuyết. Các trọng lượng phân tử chuỗi nặng được làm tương xứng tốt với giá trị lý thuyết. Các trọng lượng phân tử quan sát được là 50,368 Dalton; 50,530 Dalton; và 50,692 Dalton; với sự khác biệt tương ứng là 162 Dalton như là kết quả của sự glycosyl hóa khác nhau.

Độ tan của kháng thể được ước tính bằng sự kết tủa polyetylen glycol (PEG) 3000. Chúng cũng được xác định trực tiếp, nghĩa là, độ hòa tan thực, bằng việc cô đặc kháng thể trong dung dịch và/hoặc dung dịch đệm cụ thể với các máy lọc ly tâm Amicon và sau đó được quan sát sự kết tủa bất kỳ ở 25°C và 5°C. Độ hòa tan được suy ra bằng vòng gần cực tím (UV-CD) và phép đo nhiệt lượng quét vi sai (DSC). Độ ổn định để làm lạnh và tan đông lạnh và ở các nhiệt độ gia tốc (độ ổn định gia tốc) được đánh giá bằng sắc

ký loại trừ kích cỡ (SEC). Chi tiết của các kỹ thuật được mô tả trong Ví dụ 1.7, và các kết quả được mô tả bên dưới.

Kết quả sàng lọc độ hòa tan thực của 1A11

Đối với hàng loạt dòng vô tính 1A11, bao gồm hu1A11.1, hu1A11.3, hu1A11.9, hu1A11.11, và 1A11 tái tổ hợp, 2 mg của mỗi dòng được cô đặc bằng máy lọc ly tâm Amicon đến trên 60 mg/ml. Không quan sát thấy sự kết tủa hoặc đám mây nào ở 25°C hoặc sau khi bảo quản trong 1 ngày ở 5°C. Các nồng độ của mỗi dòng là 63 mg/ml cho 1A11.1, 76 mg/ml cho 1A11.3, 63 mg/ml cho 1A11.9, 69 mg/ml cho 1A11.11, và 76 mg/ml cho 1A11 khảm.

Ví dụ 10. Tạo nhóm epitop kháng thể kháng DLL4 bằng kỹ thuật Biacore

Tạo nhóm epitop được thực hiện bằng việc sử dụng thiết bị Biacore 2000, 3000, và T100. Kháng thể đang quan tâm được cố định trực tiếp trên bề mặt chip CM5 qua việc ghép đôi amin. Tế bào chảy cùng với IgG không liên quan được cố định tương tự được dùng như bề mặt chứng. Đầu tiên, kháng thể đơn dòng được cố định (các mAb) được cho liên kết với kháng nguyên tái tổ hợp (ở các nồng độ ít nhất 200 nM) trong 120 giây ở tốc độ 50 μ l/phút. Sau đó, một kháng thể khác được tiêm ở nồng độ 50 μ l/ml trong 120-240 giây để theo dõi khả năng liên kết với kháng nguyên của nó mà thực sự được liên kết với các mAb cố định. Sự thiếu vắng đáp ứng liên kết khác trên biểu đồ cảm biến tạo ra sự chồng lên nhau trong các epitop của hai mAb (một được cố định trên bề mặt và một được đưa vào pha lỏng). Định hướng của thử nghiệm sau đó được chuyển theo cách mà kháng thể ở pha lỏng được cố định và *ngược lại*. Các cặp mAb mà không cho kháng thể khác liên kết theo cả hai hướng của thử nghiệm được tạo nhóm như sự chồng lên nhau thực sự trong các thử nghiệm này. Việc tạo nhóm thu được của các mAb với các epitop chồng lên nhau được trình bày trong Bảng 27, bên dưới.

Bảng 27. Nhóm epitop kháng thể kháng DLL4 bằng kỹ thuật BIACore

Kháng thể được cố định	Tiêm lần thứ nhất	Tiêm lần thứ hai						
		huDLL4	38H12	15D6	13E4	1A11	14G1	14A11
38H12	+	—	+	+	+	+	+	+
15D6	+	+	—	—	—	—	—	
13E4	+	+	—	—	—	+	—	
1A11	+	+	—	—	—	—	—	

14G1	+	+	+	+	+	-	-	-
14A11	+	+	-	-	-	-	-	

"+" chỉ ra là có liên kết; "-" chỉ ra không có liên kết

Ví dụ 11. Hoạt tính của kháng thể DLL4 trong thử nghiệm mọc tế bào màng *in vitro*.

Thử nghiệm này nhằm các hạt gel fibrin được thực hiện để kiểm tra hoạt tính tạo thành mạch *in vitro* của HUVEC (passage 2-3, Lonza) như được mô tả (Nakatsu, M. N. et al. 2003 *Microvasc. Res.* 66, 102–112). Tóm lại, dung dịch fibrinogen được hoàn nguyên trong aprotinin (4 đơn vị/ml) và thrombin (50 đơn vị/ml). Các hạt Cytodex 3 (Amersham Pharmacia Biotech) được bao bằng 350–400 HUVEC trên một hạt trong thời gian qua đêm. Khoảng 20 hạt được bao HUVEC được ấn vào cục fibrin trong một giếng của đĩa nuôi cấy mô 96-giếng. Môi trường có điều kiện có nguồn gốc từ nguyên bào sợi người bình thường (NHLF, Lonza) ở sự hợp lưu 80% được mạ trên đỉnh của gel. Kháng thể DLL4 và kháng thể chứng KLH ở nồng độ 15 µg/ml được thêm vào giếng. Ở ngày thứ 10 và 12, các ảnh được chụp bằng kính hiển vi đảo ngược và máy quay phim Nikon CCD. Bảng 28 tổng kết hoạt tính của một số kháng thể DLL4 sự nảy mầm tế bào màng trong *in vitro*. (Nakatsu et al., "Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1," *Microvasc. Res.* 66, 102–112 (2003)).

Bảng 28. Hoạt tính của kháng thể DLL4 kích thích sự nảy mầm tế bào màng trong

Kháng thể thử nghiệm	Kích thích sự nảy mầm HUVEC
mAb chuột 38H12	Có
mAb chuột 1A11	Có
h1A11.1	Có
mAb chuột 40B10	Không quan sát thấy
mAb chuột 32C7	Không quan sát thấy

Ví dụ 12. Đánh giá PK của động vật gặm nhấm của kháng thể có nguồn gốc từ tế bào lai

Để đánh giá các tính chất động học của kháng thể kháng DLL4, chuột SCID màu be (n=3 cho một kháng thể) được dùng một liều kháng thể duy nhất trong màng bụng

(IP) ở nồng độ 1, 5, 10, hoặc 30 mg/kg, phụ thuộc vào phản ứng chéo của kháng thể với DLL4 chuột. Các mẫu huyết thanh theo chiều dọc (5 µl của máu toàn phần được pha loãng với tỷ lệ 1:50 trong dung dịch đệm HBS-EP+ trên một thời điểm) được thu từ mỗi động vật trong 21 ngày. Các nồng độ huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng bộ Biacore đặc hiệu DLL4. Tóm lại, DLL4 của người được cố định với chip cảm biến và các mẫu được tiêm vào tế bào chảy ở tốc độ 5 µl trong một phút trong 5 phút với các mức liên kết thu được được đo và so với các chuẩn. Các profil theo thời gian của nồng độ huyết thanh được sử dụng để ước tính các thông số dược động học C_{max} (nồng độ huyết thanh đỉnh), CL (sự thanh thải), và $t_{1/2}$ (thời gian bán thải của kháng thể), được tổng kết trong Bảng 29, bên dưới.

Bảng 29. Các thông số dược động học của kháng thể kháng DLL4 trong chuột SCID màu be sau khi dùng liều IP duy nhất

Kháng thể	Liều (mg/kg)	C_{max} (µg/mL)	CL (mL/hr/kg)	$t_{1/2}$ (d)
mAb chuột 38H12	5	30,2	0,3	20-29
h1A11.1	30	163	0,44	11,3
h1A11.1	10	49,9	0,50	9,9
h1A11.1	5	11,0	1,78	6,3
h1A11.1	1	3,1	2,16	4,4

Ví dụ 13. Sử dụng kháng thể DLL4 để ức chế sự tăng trưởng khối u in vivo

Tác dụng của kháng thể kháng DLL4 trên sự tăng trưởng khối u được đánh giá trên khối u dưới da ghép Calu-6 được cấy vào chuột SCID màu be. Tóm lại, 2×10^6 tế bào được tiêm dưới da vào hông sau phải của chuột cái SCID màu be. Khối u được tạo thành trong 14-18 ngày, ở điểm mà thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đo compa điện tử. Kích thước khối u được tính bằng cách sử dụng công thức: $L \times W^2/2$. Chuột được phân chia thành các nhóm điều trị ($n = 10$ trong một nhóm) sao cho mỗi nhóm động vật có thể tích khối u trung bình tương đương trước khi bắt đầu sử dụng kháng thể (thông thường là từ 180 đến 250 mm³). Các động vật sau đó được cho dùng kháng thể kháng DLL4 trong màng bụng hai lần một tuần trong hai tuần (tổng số 4 liều) hoặc hàng tuần trong bốn tuần (tổng số 4 liều). Thể tích khối u được đo bằng số trung bình của hai lần trong mootjtuaanf trong khoảng thời gian thử nghiệm cho đến

khi thể tích khối u trung bình trong mỗi nhóm đạt được điểm cuối $\geq 2,000 \text{ mm}^3$. Các kết quả được trình bày trong Bảng 30, bên dưới.

Bảng 30. Hiệu lực của kháng thể kháng DLL4 trong mô hình cấy ghép dưới da ung thư phổi tế bào không nhỏ người Calu-6

Dùng điều trị	Liều lượng, đường dùng, chế độ dùng	%T/C ^a	%ILS ^b
mAb chuột 1A11	30 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	37**	89**
mAb chuột 1A11	10 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	47**	39**
mAb chuột 1A11	5 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	43**	57**
mAb chuột 14A11	10 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	37**	57**
mAb chuột 40B10	30 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	29**	89**
mAb chuột 32C7	30 mg/kg, trong màng bụng, 2X/tuần 2 lần	65*	28*
khảm 14A11	10 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	32**	114**
khảm 15D6	10 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	47**	57**
khảm 40B10	10 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	43**	73**
khảm 32C7	10 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	71*	18*
h1A11.1	10 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	34**	75**
h1A11.1	5 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	31**	80**
h1A11.1	1 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	43**	36**
h1A11.1	0,5 mg/kg, trong màng bụng, q7dX4	62**	25*

^a %T/C = thể tích khối u trung bình của nhóm điều trị/thể tích khối u của nhóm làm chứng x 100. Giá trị P (như được chỉ ra bằng dấu hoa thị) có nguồn gốc từ thử nghiệm T Student so sánh nhóm điều trị với nhóm chứng không điều trị. Dựa vào các thông số đo ngày 25/26/27.

^b %ILS = $(T - C)/C \times 100$, trong đó T = thời gian giữa đến thời gian cuối của nhóm điều trị và C = thời gian giữa đến thời gian cuối của nhóm chứng không điều trị. Giá trị P (như được chỉ ra bằng dấu hoa thị) có nguồn gốc từ so sánh theo nhóm log Kaplan Meier của nhóm điều trị so với nhóm chứng không điều trị. Dựa vào điểm cuối 2000 mm^3 .

*p < 0,05; **p < 0,001.

Tài liệu viện dẫn

Nội dung của tất cả các tài liệu được viện dẫn (bao gồm các tài liệu kỹ thuật, patent, đơn yêu cầu cấp patent, và website) mà có thể được viện dẫn trong suốt đơn sáng chế này chỉ được đưa vào đây trọn vẹn cho mục đích bất kỳ, như là các tài liệu tham khảo được viện dẫn ở đây.

Các nội dung tương đương

Sáng chế có thể được đưa ra trong các dạng cụ thể khác mà không đi trệch khỏi nội dung hoặc các đặc tính thiết yếu của sáng chế. Các phương án được nêu ở trên do đó được xem như tất cả chỉ để minh họa hơn là giới hạn sáng chế được mô tả theo sáng chế. Phạm vi của sáng chế do đó được chỉ ra bằng yêu cầu bảo hộ kèm theo hơn là phần mô tả nêu ở trên, và tất cả các thay đổi xuất phát từ nghĩa và phạm vi của những nội dung tương đương với yêu cầu bảo hộ do đó dự định được bao gồm ở đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein liên kết chứa vùng liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với DLL4, trong đó vùng liên kết kháng nguyên này chứa tập hợp bao gồm sáu trình tự vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR): CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó:

(a) CDR-H1 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 31-35 của SEQ ID NO:171 (CDR-H1 VH.1 1A11);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:172 (CDR-H1 VH.1a 1A11);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:173 (CDR-H1 VH.1b 1A11);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:174 (CDR-H1 VH.2a 1A11);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:187 (CDR-H1 h1A11VH.1);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:188 (CDR-H1 h1A11.A6);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:189 (CDR-H1 h1A11.A8);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:190 (CDR-H1 h1A11.C6);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:191 (CDR-H1 h1A11.A11);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:192 (CDR-H1 h1A11.B5);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:193 (CDR-H1 h1A11.E12);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:194 (CDR-H1 h1A11.G3);
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:195 (CDR-H1 h1A11.F5); và
 các gốc 31-35 của SEQ ID NO:196 (CDR-H1 h1A11.H2);

(b) CDR-H2 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 50-66 của SEQ ID NO:171 (CDR-H2 VH.1 1A11);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:172 (CDR-H2 VH.1a 1A11);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:173 (CDR-H2 VH.1b 1A11);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:174 (CDR-H2 VH.2a 1A11);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:187 (CDR-H2 h1A11VH.1);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:188 (CDR-H2 h1A11.A6);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:189 (CDR-H2 h1A11.A8);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:190 (CDR-H2 h1A11.C6);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:191 (CDR-H2 h1A11.A11);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:192 (CDR-H2 h1A11.B5);

các gốc 50-66 của SEQ ID NO:193 (CDR-H2 h1A11.E12);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:194 (CDR-H2 h1A11.G3);
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:195 (CDR-H2 h1A11.F5); và
 các gốc 50-66 của SEQ ID NO:196 (CDR-H2 h1A11.H2);

(c) CDR-H3 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 99-107 của SEQ ID NO:171 (CDR-H3 VH.1 1A11);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:172 (CDR-H3 VH.1a 1A11);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:173 (CDR-H3 VH.1b 1A11);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:174 (CDR-H3 VH.2a 1A11);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:187 (CDR-H3 h1A11VH.1);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:188 (CDR-H3 h1A11.A6);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:189 (CDR-H3 h1A11.A8);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:190 (CDR-H3 h1A11.C6);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:191 (CDR-H3 h1A11.A11);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:192 (CDR-H3 h1A11.B5);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:193 (CDR-H3 h1A11.E12);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:194 (CDR-H3 h1A11.G3);
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:195 (CDR-H3 h1A11.F5); và
 các gốc 99-107 của SEQ ID NO:196 (CDR-H3 h1A11.H2);

(d) CDR-L1 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 24-34 của SEQ ID NO:175 (CDR-L1 VL.1 1A11);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:176 (CDR-L1 VL.1a 1A11);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:177 (CDR-L1 VL.1b 1A11);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:178 (CDR-L1 VL.2a 1A11);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:197 (CDR-L1 h1A11VL.1);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:198 (CDR-L1 h1A11.A2);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:199 (CDR-L1 h1A11.A12);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:200 (CDR-L1 h1A11.A7);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:201 (CDR-L1 h1A11.B4);
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:202 (CDR-L1 h1A11.B5); và
 các gốc 24-34 của SEQ ID NO:203 (CDR-L1 h1A11.E12);

(e) CDR-L2 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 50-56 của SEQ ID NO:175 (CDR-L2 VL.1 1A11);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:176 (CDR-L2 VL.1a 1A11);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:177 (CDR-L2 VL.1b 1A11);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:178 (CDR-L2 VL.2a 1A11);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:197 (CDR-L2 h1A11VL.1);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:198 (CDR-L2 h1A11.A2);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:199 (CDR-L2 h1A11.A12);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:200 (CDR-L2 h1A11.A7);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:201 (CDR-L2 h1A11.B4);
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:202 (CDR-L2 h1A11.B5); và
 các gốc 50-56 của SEQ ID NO:203 (CDR-L2 h1A11.E12);

và

(f) CDR-L3 được chọn từ nhóm bao gồm:

các gốc 89-97 của SEQ ID NO:175 (CDR-L3 VL.1 1A11);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:176 (CDR-L3 VL.1a 1A11);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:177 (CDR-L3 VL.1b 1A11);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:178 (CDR-L3 VL.2a 1A11);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:197 (CDR-L3 h1A11VL.1);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:198 (CDR-L3 h1A11.A2);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:199 (CDR-L3 h1A11.A12);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:200 (CDR-L3 h1A11.A7);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:201 (CDR-L3 h1A11.B4);
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:202 (CDR-L3 h1A11.B5); và
 các gốc 89-97 của SEQ ID NO:203 (CDR-L3 h1A11.E12).

2. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này chứa tập hợp CDR bao gồm ba CDR được chọn từ nhóm bao gồm các tập hợp CDR vùng biến đổi bao gồm:

tập hợp VH 1A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:159;
 CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:159; và
 CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:159;

tập hợp VL 1A11 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:160;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:160; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:160;

tập hợp VH.1 1A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:171;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:171; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:171;

tập hợp VH.1a 1A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:172;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:172; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:172;

tập hợp VH.1b 1A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:173;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:173; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:173;

tập hợp VH.2a 1A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:174;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:174; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:174;

tập hợp VL.1 1A11 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:175;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:175; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:175;

tập hợp VL.1a 1A11 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:176;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:176; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:176;

tập hợp VL.1b 1A11 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:177;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:177; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:177;

tập hợp VL.2a 1A11 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:178;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:178; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:178;

tập hợp VH h1A11.VH.1 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:187;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:187; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:187;

tập hợp VH h1A11.A6 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:188;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:188; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:188;

tập hợp VH h1A11.A8 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:189;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:189; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:189;

tập hợp VH h1A11.C6 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:190;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:190; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:190;

tập hợp VH h1A11.A11 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:191;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:191; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:191;

tập hợp VH h1A11.B5 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:192;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:192; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:192;

tập hợp VH h1A11.E12 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:193;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:193; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:193;

tập hợp VH h1A11.G3 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:194;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:194; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:194;

tập hợp VH h1A11.F5 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:195;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:195; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:195;

tập hợp VH h1A11.H2 CDR bao gồm:

CDR-H1: các gốc 31-35 của SEQ ID NO:196;

CDR-H2: các gốc 50-66 của SEQ ID NO:196; và

CDR-H3: các gốc 99-107 của SEQ ID NO:196;

tập hợp VL h1A11.VL.1 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:197;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:197; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:197;

tập hợp VL h1A11.A2 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:198;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:198; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:198;

tập hợp VL h1A11.A12 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:199;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:199; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:199;

tập hợp VL h1A11.A7 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:200;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:200; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:200;

tập hợp VL h1A11.B4 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:201;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:201; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:201;

tập hợp VL h1A11.B5 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:202;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:202; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:202;

và

tập hợp VL h1A11.E12 CDR bao gồm:

CDR-L1: các gốc 24-34 của SEQ ID NO:203;

CDR-L2: các gốc 50-56 của SEQ ID NO:203; và

CDR-L3: các gốc 89-97 của SEQ ID NO:203.

3. Protein liên kết theo điểm 2, trong đó protein này chứa ít nhất hai tập hợp CDR vùng biến đổi.

4. Protein liên kết theo điểm 3, trong đó ít nhất hai tập hợp CDR vùng biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm:

tập hợp VH 1A11 CDR và tập hợp VL 1A11 CDR;

tập hợp VH.1 1A11 CDR và tập hợp VL.1 1A11 CDR;

tập hợp VH.1 1A11 CDR và tập hợp VL.1a 1A11 CDR;

tập hợp VH.1 1A11 CDR và tập hợp VL.1b 1A11 CDR;

tập hợp VH.1 1A11 CDR và tập hợp VL.2a 1A11 CDR;

tập hợp VH.1a 1A11 CDR và tập hợp VL.1 1A11 CDR;

tập hợp VH.1a 1A11 CDR và tập hợp VL.1a 1A11 CDR;

tập hợp VH.1a 1A11 CDR và tập hợp VL.1b 1A11 CDR;

tập hợp VH.1a 1A11 CDR và tập hợp VL.2a 1A11 CDR;

tập hợp VH.1b 1A11 CDR và tập hợp VL.1 1A11 CDR;

tập hợp VH.1b 1A11 CDR và tập hợp VL.1a 1A11 CDR;

tập hợp VH.1b 1A11 CDR và tập hợp VL.1b 1A11 CDR;

tập hợp VH.1b 1A11 CDR và tập hợp VL.2a 1A11 CDR;

tập hợp VH.2a 1A11 CDR và tập hợp VL.1 1A11 CDR;

tập hợp VH.2a 1A11 CDR và tập hợp VL.1a 1A11 CDR;

tập hợp VH.2a 1A11 CDR và tập hợp VL.1b 1A11 CDR;

tập hợp VH.2a 1A11 CDR và tập hợp VL.2a 1A11 CDR;

tập hợp VH h1A11.A6 CDR và tập hợp VL h1A11 VL.1 CDR;

tập hợp VH h1A11.C6 CDR và tập hợp VL h1A11 VL.1 CDR;

tập hợp VH h1A11.A11 CDR và tập hợp VL h1A11 VL.1 CDR;

tập hợp VH h1A11.A8 CDR và tập hợp VL h1A11 VL.1 CDR;

tập hợp VH h1A11 VH.1 CDR và tập hợp VL h1A11 VL.1 CDR;
 tập hợp VH h1A11 VH.1 CDR và tập hợp VL h1A11.B4 CDR;
 tập hợp VH h1A11 VH.1 CDR và tập hợp VL h1A11.A7 CDR;
 tập hợp VH h1A11 VH.1 CDR và tập hợp VL h1A11.A12 CDR;
 tập hợp VH h1A11 VH.1 CDR và tập hợp VL h1A11.A2 CDR;
 tập hợp VH h1A11.B5 CDR và tập hợp VL h1A11.B5 CDR;
 tập hợp VH h1A11.E12 CDR và tập hợp VL h1A11.E12 CDR;
 tập hợp VH h1A11.G3 CDR và tập hợp VL h1A11.E12 CDR;
 tập hợp VH h1A11.F5 CDR và tập hợp VL h1A11.E12 CDR; và
 tập hợp VH h1A11.H2 CDR và tập hợp VL h1A11.E12 CDR.

5. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein này còn chứa thêm trình tự khung nhận của người.

6. Protein liên kết theo điểm 5, trong đó trình tự khung nhận của người chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6-34 và SEQ ID NO: 35-98.

7. Protein liên kết theo điểm 5, trong đó protein liên kết này chứa ít nhất một trình tự khung nhận được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) khung chuỗi nặng-1 (H-FR1): E-V-Q-L-V-E-S-G-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-X30 (SEQ ID NO:143), trong đó X30 là S, R hoặc G;

(b) khung chuỗi nặng-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (SEQ ID NO:144);

(c) khung chuỗi nặng-3 (H-FR3): R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X11-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X31-R (SEQ ID NO:145), trong đó:

X11 là N hoặc S; và

X31 là A hoặc S;

(d) khung chuỗi nặng-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (SEQ ID NO:146);

(e) khung chuỗi nhẹ-1 (L-FR1): D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (SEQ ID NO:147);

(f) khung chuỗi nhẹ-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X9-P-K-L-L-I-X15 (SEQ ID NO:148), trong đó:

X9 là A hoặc S; và

X15 là F hoặc Y;

(g) khung chuỗi nhẹ-3 (L-FR3): G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X15-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (SEQ ID NO:149), trong đó:

X15 là F hoặc S; và

(h) khung chuỗi nhẹ-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (SEQ ID NO:150).

8. Protein liên kết theo điểm 2, trong đó vùng liên kết kháng nguyên chứa các trình tự vùng biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO: 159 và SEQ ID NO: 160;

SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO: 175;

SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO: 176;

SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO: 177;

SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO: 178;

SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO: 175;

SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO: 176;

SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO: 177;

SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO: 178;

SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 175;

SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 176;

SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 177;

SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO: 178;

SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO: 175;

SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO: 176;

SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO: 177;

SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO: 178;

SEQ ID NO: 188 và SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 190 và SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 191 và SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 189 và SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO: 201;

SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO: 200;
 SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO: 199;
 SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO: 198;
 SEQ ID NO: 192 và SEQ ID NO: 202;
 SEQ ID NO: 193 và SEQ ID NO: 203;
 SEQ ID NO: 194 và SEQ ID NO: 203;
 SEQ ID NO: 195 và SEQ ID NO: 203; và
 SEQ ID NO: 196 và SEQ ID NO: 203.

9. Protein liên kết theo điểm 5, trong đó trình tự khung của protein liên kết này chứa ít nhất một sự thay thế axit amin so với vùng khung nhận dòng mầm của người ở gốc chính được chọn từ nhóm bao gồm:

gốc liên kết với CDR;
 gốc ở vị trí glycosyl hóa;
 gốc hiếm;
 gốc có khả năng tương tác với DLL4 của người;
 gốc có khả năng tương tác với CDR;
 gốc chuẩn;
 gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ;
 gốc trong vùng Vernier; và
 gốc trong vùng chồng lấn giữa CDR1 chuỗi nặng biến đổi theo định nghĩa Chothia và khung chuỗi nặng đầu tiên theo định nghĩa Kabat.

10. Protein liên kết theo điểm 5, trong đó khung nhận của người bao gồm ít nhất một sự thay thế axit amin vùng khung, trong đó trình tự axit amin của khung có mức độ tương đồng về mặt trình tự ít nhất 65% so với trình tự khung nhận dòng mầm của người và chứa ít nhất 70 gốc axit amin tương đồng với khung nhận dòng mầm của người.

11. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó vùng liên kết kháng nguyên chứa các trình tự vùng biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO: 159 và SEQ ID NO:160;
 SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO:175;
 SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO:176;
 SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO:177;

SEQ ID NO: 171 và SEQ ID NO:178;
 SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO:175;
 SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO:176;
 SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO:177;
 SEQ ID NO: 172 và SEQ ID NO:178;
 SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO:175;
 SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO:176;
 SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO:177;
 SEQ ID NO: 173 và SEQ ID NO:178;
 SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO:175;
 SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO:176;
 SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO:177;
 SEQ ID NO: 174 và SEQ ID NO:178; và
 SEQ ID NO: 187 và SEQ ID NO:197.

12. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng ngăn chặn sự tương tác của DLL4 với protein Notch.

13. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng ngăn chặn sự tương tác của DLL4 với protein Notch này được chọn từ nhóm bao gồm Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4 và tổ hợp của chúng.

14. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng điều hòa chức năng sinh học của DLL4.

15. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng trung hòa chức năng sinh học của DLL4.

16. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng ức chế hoạt tính VEGFR2, hoạt tính VEGFR1 hoặc cả hai.

17. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng làm giảm khả năng liên kết của DLL4 với thụ thể của nó.

18. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có khả năng ức chế sự tạo mạch bình thường.

19. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết có hằng số tốc độ kết hợp (K_{on}) với DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm: ít nhất khoảng $10^2 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^3 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^4 M^{-1}s^{-1}$; ít nhất khoảng $10^5 M^{-1}s^{-1}$; và ít nhất khoảng $10^6 M^{-1}s^{-1}$, như đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

20. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có hằng số tốc độ phân ly (K_{off}) với DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm: cao nhất khoảng $10^{-3} s^{-1}$; cao nhất khoảng $10^{-4} s^{-1}$; cao nhất khoảng $10^{-5} s^{-1}$; và cao nhất khoảng $10^{-6} s^{-1}$, như đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

21. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này có hằng số phân ly (K_D) với DLL4 được chọn từ nhóm bao gồm: cao nhất khoảng $10^{-7} M$; cao nhất khoảng $10^{-8} M$; cao nhất khoảng $10^{-9} M$; cao nhất khoảng $10^{-10} M$; cao nhất khoảng $10^{-11} M$; cao nhất khoảng $10^{-12} M$; và cao nhất khoảng $10^{-13} M$.

22. Cấu trúc protein liên kết chứa protein liên kết theo điểm 1, trong đó cấu trúc protein liên kết này còn chứa thêm polypeptit liên kết hoặc vùng bảo toàn của globulin miễn dịch.

23. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó protein liên kết này được chọn từ nhóm bao gồm:

phân tử globulin miễn dịch,

kháng thể đơn dòng,

kháng thể khảm,

kháng thể ghép CDR,

Fab,

Fab',

F(ab')₂,

Fv,

Fv được liên kết disulfua,

scFv,

kháng thể vùng đơn,

diabody,

kháng thể đa đặc hiệu,

kháng thể đặc hiệu kép,

protein liên kết globulin miễn dịch vùng biến đổi kép (DVD-Ig), và kháng thể có hai vị trí liên kết đặc hiệu.

24. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó cấu trúc protein liên kết này chứa vùng bảo toàn globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm:

vùng bảo toàn IgM của người,
vùng bảo toàn IgG1 của người,
vùng bảo toàn IgG2 của người,
vùng bảo toàn IgG3 của người,
vùng bảo toàn IgG4 của người,
vùng bảo toàn IgE của người, và
vùng bảo toàn IgA của người.

25. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó cấu trúc protein liên kết này chứa vùng bảo toàn globulin miễn dịch có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 và tổ hợp của chúng.

26. Thẻ liên hợp protein liên kết chứa cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó thẻ liên hợp protein liên kết này còn chứa thêm tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm: tác nhân tạo ảnh, tác nhân điều trị, tác nhân độc tế bào và phân tử gắn kết miễn dịch.

27. Thẻ liên hợp protein liên kết theo điểm 26, trong đó tác nhân là tác nhân tạo ảnh được chọn từ nhóm bao gồm chất đánh dấu phóng xạ, enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu có từ tính và biotin.

28. Thẻ liên hợp protein liên kết theo điểm 26, trong đó tác nhân tạo ảnh là chất đánh dấu phóng xạ được chọn từ nhóm bao gồm: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho và ^{153}Sm .

29. Thẻ liên hợp protein liên kết theo điểm 26, trong đó tác nhân là tác nhân điều trị hoặc tác nhân độc tế bào được chọn từ nhóm bao gồm: chất chống chuyển hóa, tác nhân alkyl hóa, chất kháng sinh, yếu tố sinh trưởng, xytokin, tác nhân chống tạo mạch, chất chống phân bào, anthraxyclin, độc tố và tác nhân gây chết tế bào theo chương trình.

30. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó protein liên kết có mô hình glycosyl hóa của người.

31. Thể liên hợp protein liên kết theo điểm 26, trong đó protein liên kết có mô hình glycosyl hóa của người.
32. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này tồn tại dưới dạng tinh thể.
33. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 22, trong đó cấu trúc protein liên kết này tồn tại dưới dạng tinh thể.
34. Thể liên hợp protein liên kết theo điểm 26, trong đó cấu trúc protein liên kết tồn tại dưới dạng tinh thể.
35. Protein liên kết theo điểm 32, trong đó tinh thể là tinh thể được giải phóng có kiểm soát không chứa chất mang.
36. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 33, trong đó tinh thể là tinh thể được giải phóng có kiểm soát không chứa chất mang.
37. Thể liên hợp protein liên kết theo điểm 34, trong đó tinh thể là tinh thể được giải phóng có kiểm soát không chứa chất mang.
38. Protein liên kết theo điểm 32, trong đó tinh thể protein liên kết có thời gian bán thải *in vivo* lớn hơn so với protein liên kết tương ứng dạng hòa tan.
39. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 33, trong đó tinh thể cấu trúc protein liên kết có thời gian bán thải *in vivo* lớn hơn so với cấu trúc protein liên kết tương ứng dạng hòa tan.
40. Thể liên hợp protein liên kết theo điểm 34, trong đó tinh thể của thể liên hợp protein liên kết có thời gian bán thải *in vivo* lớn hơn so với thể liên hợp protein liên kết tương ứng dạng hòa tan.
41. Protein liên kết theo điểm 32, trong đó tinh thể protein liên kết giữ được hoạt tính sinh học của dạng phi tinh thể của protein liên kết.
42. Cấu trúc protein liên kết theo điểm 33, trong đó tinh thể cấu trúc protein liên kết giữ được hoạt tính sinh học của dạng phi tinh thể của cấu trúc protein liên kết.
43. Thể liên hợp protein liên kết theo điểm 34, trong đó thể liên hợp protein liên kết giữ được hoạt tính sinh học của dạng phi tinh thể của thể liên hợp protein liên kết.
44. Axit nucleic phân lập mã hóa trình tự axit amin của protein liên kết theo điểm 1.
45. Vector chứa axit nucleic phân lập theo điểm 44.

46. Vector theo điểm 45, trong đó vector này được chọn từ nhóm bao gồm: pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV và pBJ.

47. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 45.

48. Tế bào chủ theo điểm 47, trong đó tế bào chủ này là tế bào chưa có nhân thực.

49. Tế bào chủ theo điểm 48, trong đó tế bào chủ này là tế bào *Escherichia coli*.

50. Tế bào chủ theo điểm 47, trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân thực.

51. Tế bào chủ theo điểm 50, trong đó tế bào nhân thực được chọn từ nhóm bao gồm: tế bào sinh vật nguyên sinh, tế bào động vật, tế bào thực vật và tế bào nấm.

52. Tế bào chủ theo điểm 51, trong đó tế bào nhân thực là tế bào động vật được chọn từ nhóm bao gồm: tế bào động vật có vú, tế bào chim và tế bào côn trùng.

53. Tế bào chủ theo điểm 52, trong đó tế bào động vật có vú là tế bào CHO.

54. Tế bào chủ theo điểm 52, trong đó tế bào động vật có vú là tế bào COS.

55. Tế bào chủ theo điểm 51, trong đó tế bào nấm là tế bào *Saccharomyces cerevisiae*.

56. Tế bào chủ theo điểm 52, trong đó tế bào côn trùng là tế bào Sf9.

57. Phương pháp sản xuất protein liên kết mà liên kết với DLL4 của người, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 47 trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để tạo ra protein liên kết mà liên kết với DLL4 của người.

58. Protein liên kết được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 57.

59. Chế phẩm để giải phóng protein liên kết, trong đó chế phẩm này chứa:

(a) dạng bào chế, trong đó dạng bào chế này chứa protein liên kết dạng tinh thể theo điểm 32 và thành phần khác; và

(b) ít nhất một chất mang loại polyme.

60. Chế phẩm theo điểm 59, trong đó chất mang loại polyme là polyme được chọn từ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: poly(axit acrylic), poly(xyanoacrylat), poly(axit amin), poly (anhydrit), poly(depsipeptit), poly(este), poly(axit lactic), poly(axit lactic-co-glycolic) hoặc PLGA, poly(b-hydroxybutyrat), poly(caprolacton), poly(dioxanon), poly(etylen glycol), poly((hydroxypropyl)metacrylamit), poly[(organo)phosphazen], poly(ortho este), poly(rượu vinylic), poly(vinylpyrrolidon), copolyme anhydrit maleic - alkyl

vinyl ete, rượu đa chức pluronic, albumin, alginat, xenluloza và các dẫn xuất xenluloza, collagen, fibrin, gelatin, axit hyaluronic, oligosacarit, glycaminoglycan, polysacarit được sulfat hóa, hỗn hợp và các copolyme của chúng.

61. Chế phẩm theo điểm 59, trong đó thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm albumin, sacaroza, trehaloza, lactitol, gelatin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, metoxypolyetylen glycol và polyetylen glycol.

62. Dược phẩm chứa protein liên kết theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

63. Dược phẩm theo điểm 62, trong đó dược phẩm này còn chứa thêm ít nhất một tác nhân bổ sung để điều trị rối loạn trong đó hoạt tính của DLL4 là bất lợi.

64. Dược phẩm theo điểm 63, trong đó tác nhân bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm: tác nhân điều trị; tác nhân tạo ảnh; tác nhân chống ung thư; tác nhân hóa trị liệu; chất ức chế tạo mạch; kháng thể kháng VEGF; kháng thể kháng EGFR; kháng thể kháng cMet; kháng thể kháng ErbB3; kháng thể kháng HER2; kháng thể kháng CD20; aflibercept; chất ức chế kinaza; chất chẹn phân tử đồng kích thích; kháng thể kháng B7.2; CTLA4-Ig; chất chẹn phân tử gắn kết; kháng thể kháng E selectin; kháng thể kháng L selectin; kháng thể kháng xytokin hoặc mảnh chức năng của nó; kháng thể kháng IL-18; kháng thể kháng TNF; kháng thể kháng IL-6; methotrexat; corticosteroid; cyclosporin; rapamycin; FK506; tác nhân alkyl hóa ADN; xisplatin; carboplatin; tác nhân kháng tubulin; paclitaxel; docetaxel; doxorubicin; gemcitabin; gemzar; anthraxyclin; adriamycin; chất ức chế topoisomerasa I; chất ức chế topoisomerasa II; 5-fluorouraxil (5-FU); leucovorin; irinotecan; chất ức chế thụ thể tyrosin kinaza, chất ức chế sự chết tế bào theo chương trình; chất ức chế Bcl2/Bclx; erlotinib, gefitinib, chất ức chế COX-2, celecoxib, cyclosporin; rapamycin; nhãn phát hiện được hoặc phân tử thông báo; chất đối kháng TNF; chất chống thấp khớp; chất giãn cơ; thuốc ngủ; thuốc giảm đau; thuốc gây mê; thuốc an thần; chất gây mê cục bộ; chất chẹn thần kinh cơ; chất kháng vi sinh vật; thuốc trị bệnh vẩy nến; corticosteroid; steroid đồng hóa; erythropoietin; chất tạo miễn dịch; globulin miễn dịch; chất ức chế miễn dịch; hormon tăng trưởng; thuốc thay thế hormon; thuốc phóng xạ; thuốc chống trầm cảm; thuốc chống loạn thần; thuốc kích thích; thuốc chữa hen; chất chủ vận beta; steroid xông; epinephrin; chất tương tự epinephrin của nó; xytokin; và chất đối vận xytokin.

65. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết này là kháng thể.

66. Protein liên kết theo điểm 65, trong đó kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, globulin miễn dịch bậc bốn có chiều dài đầy đủ, phân tử IgG, phân tử IgG1, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể trưởng thành về ái lực.

67. Protein liên kết theo điểm 66, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

68. Protein liên kết theo điểm 8, trong đó hai vùng biến đổi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

SEQ ID NO:188 và SEQ ID NO:197,
SEQ ID NO:190 và SEQ ID NO:197, và
SEQ ID NO:191 và SEQ ID NO:197.

69. Protein liên kết chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà cùng nhau tạo ra vị trí liên kết chức năng cho DLL4, trong đó các vùng biến đổi này chứa các CDR 1-3 nêu trong SEQ ID NO:187 và các CDR 1-3 nêu trong SEQ ID NO:197.

70. Protein liên kết theo điểm 69, trong đó các vùng biến đổi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:197.

71. Protein liên kết theo điểm 1, trong đó protein liên kết là protein liên kết globulin miễn dịch vùng biến đổi kép (DVD-Ig).

72. Protein liên kết DVD-Ig chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà cùng nhau tạo ra vị trí liên kết chức năng cho DLL4, trong đó các vùng biến đổi chứa các CDR 1-3 nêu trong SEQ ID NO:187 và các CDR 1-3 nêu trong SEQ ID NO:197.

73. Protein liên kết DVD-Ig theo điểm 72, trong đó các vùng biến đổi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:187 và SEQ ID NO:197.

74. Protein liên kết theo điểm 69, trong đó protein liên kết này là kháng thể.

75. Protein liên kết theo điểm 70, trong đó protein liên kết này là kháng thể.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> PROTEIN LIÊN KẾT VỚI DLL4, KHÁNG THỂ CHỨA PROTEIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN LIÊN KẾT NÀY

<130> 10920WOO1

<140>

<141>

<150> 61/309,494

<151> 2010-03-02

<160> 206

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	

Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu
			20					25					30		

Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg
		35					40					45			

Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His
	50					55					60				

Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser
65					70					75					80

Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser
				85					90					95	

Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro
			100					105					110		

Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp
		115					120					125			

Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala
	130					135					140				

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

Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser
				165					170					175	

Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn
			180					185					190		

Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys		
	195						200					205					
Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser		
	210					215					220						
Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu		
225					230					235					240		
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His		
			245						250					255			
Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys		
			260					265					270				
Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys		
	275						280					285					
Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly		
	290					295					300						
Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp		
305					310					315					320		
Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly		
				325					330					335			
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro		
			340					345					350				
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp		
	355						360					365					
Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala		
	370					375					380						
Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu		
385					390					395					400		
Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln		
				405					410					415			
Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe		
			420					425					430				
Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro		
		435					440					445					
Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys		
	450					455					460						
Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser		
465					470					475					480		
Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr		
				485					490					495			
Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe		
			500				505						510				

Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525
 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540
 Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575
 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590
 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605
 Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 615 620
 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
 625 630 635 640
 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 650 655
 Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670
 Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 2

<211> 2058

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg 60
 cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag 120
 cgcggcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggct gccggacttt cttccgcgtc 180
 tgccttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc 240
 acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcg 300

aacctctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta ccttctcgct catcatcgaa	360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc	420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actgggttatt ggatgagcaa	480
accagcaccc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat	540
ggagacaact gctcccgct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc	600
cagccagatg gcaacttgtc ctgcctgccc ggttggactg gggaatattg ccaacagcct	660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc	720
tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc	780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggctgttt	840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactccccat gcaagaatgg ggcaacgtgc	900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac	960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aacctctgtc gcaatggagg cagctgtaag	1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcatttgtgaa	1080
cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg ggggtcctg ccgggagcgc	1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt ccccccaact tcaccggctc caactgcgag	1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagtg cctgaaccga	1260
ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac	1320
gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgcgcc cacgggtggca cttgccatga cctggagaat	1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc	1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccttgcctc aacagggcca cctgctacac cgacctctcc	1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc	1560

gtgggcttgc cgcccagctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg 1620
 ctgctgggtac tgctgggcat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg 1680
 gacgacggca gcaggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
 cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtgga ctgtggcctg 1800
 gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg 1860
 cccctggggc gggggaccat gccaggaaag tttccccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
 aaggcgccac tgcggttaca cagtgaaaag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
 cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatattcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
 attgccacgg aggtataa 2058

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 4

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1

5

10

15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20

25

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35

40

45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50

55

60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65

70

75

80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115

120

125

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

130

135

140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145

150

155

160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165

170

175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 6

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Axit amin bất kỳ

<400> 7

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(9)

<223> Axit amin bất kỳ

<400> 8

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 9

Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Axit amin bất kỳ

<400> 10

Trp Gly Xaa Gly

1

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 21
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 39
 <211> 30
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

<210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 51
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 55
 <211> 30
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

21403

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

<210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 61
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 63
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 65

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

<210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 69
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln
 1 5 10 15
 Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 75

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

<210> 76
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 77
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 81

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1

5

10

15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys

20

25

30

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

20

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

21403

<400> 87

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 91

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1

5

10

<210> 95

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 99

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

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

20

<210> 100

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 101
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 103
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 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
 20

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105

21403

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 107
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 108
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 109
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 111

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 113

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 1 5 10

<210> 115
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr
 1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 117
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 117
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 118
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 1 5 10

<210> 119
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 121
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
 20 25 30

<210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 1 5 10

<210> 123
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 124
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 125
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 125

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr
 1 5 10 15

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

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 127

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr
 1 5 10 15

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

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

1

5

10

<210> 131

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 133

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr

1

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1

5

10

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 137
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 137
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
 20 25 30

<210> 138
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 138
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 139
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 139
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys
 20

<210> 140
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 141

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 143

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polyepetit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser, Arg hoặc Gly

<400> 143

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa
20 25 30

<210> 144

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

$\langle 400 \rangle$ 144

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 145

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

 $\langle 220 \rangle$

<221> MOD RES

$\langle 222 \rangle$ (11) .. (11)

<223> Asn hoặc Ser

<220>

<221> MOD RES

 $\langle 222 \rangle \quad (31) \dots (31)$

<223> Ala hoặc Ser

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Arg
20 25 30

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 146

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 147

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 147

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
			20			

<210> 148

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Ala hoặc Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Phe hoặc Tyr

<400> 148

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Xaa	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Xaa
1				5					10					15

<210> 149

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Phe hoặc Ser

<400> 149

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Xaa	Thr
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 150

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5				10	

<210> 151

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asn, His hoặc Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala hoặc Ser

<400> 151

Xaa	Phe	Pro	Met	Xaa
1			5	

<210> 152

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Thr hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser hoặc Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gly, Ala, Asp, Ser hoặc Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr hoặc Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Thr, Pro hoặc Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr, Ser, Thr hoặc Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Tyr hoặc Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Arg hoặc Gly

<400> 152
 Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Tyr, Phe hoặc Ser

<400> 153
 Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Xaa
 1 5

<210> 154
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Glu hoặc Gln

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Asp hoặc Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Tyr hoặc Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ser, Ile, Tyr, Asn hoặc Arg

<400> 154
 Arg Ala Ser Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

<223> Asn, Asp, Ser, Ile, Tyr hoặc Val

<400> 155

Asp Thr Xaa Xaa Leu Ala Asp

1

5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Asn, Asp hoặc Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Asn, Tyr hoặc Trp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Tyr hoặc Val

<400> 156

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Pro Thr

1

5

<210> 157

<211> 118

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 157

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

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

20

25

30

Gly Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Gln Trp Val

35

40

45

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr His Cys

85

90

95

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val

21403

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 158
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 158
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Thr Ile Ser Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Ser Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Asn Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Met Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 159
<211> 118
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 159
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe
20 25 30
Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 160
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 160
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Ser Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 161
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 161
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
 65 70 75 80

21403

Val Tyr Val Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Ala Pro Trp Arg Asp Ser Tyr Ala His Val Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 162

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 162

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

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

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

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

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

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

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

<210> 163

<211> 116

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 163

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Val
 20 25 30

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

21403

35	40	45
Ala Thr Ile Thr Asn Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Ser Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Thr Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	85	90
Thr Arg Val Gly Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val		
	100	105
Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 164
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 164
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Asp Asp Ile Tyr Asn Gly
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Pro
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 165
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 165
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Asp Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Asn Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Ser Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Glu Gly Asn Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Val Lys Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 166
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 166
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Val Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ile
 20 25 30
 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Thr Tyr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Gly Ser Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 167
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 167
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
 20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Thr Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Val

35

40

45

Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

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

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

Ala Lys Ser Ile Leu Leu Gly Ser Thr Cys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 168

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 168

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Ser Val Ser Ser Pro Met
20 25 30

Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys
35 40 45

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

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

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

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

<210> 169

<211> 121

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 169

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

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

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

<210> 170
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 170
 Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Ser Leu Ser Ser Pro Met
 20 25 30
 Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Gln Pro Arg
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asp Pro
 65 70 75 80
 Val Glu Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Trp Ser
 85 90 95
 Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 171
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 171
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

21403

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

<210> 172

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 172

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 173

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polyepetit tổng hợp

<400> 173

```

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 174

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
polypeptide

<400> 174

```

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 175
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 175

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 176
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 176

```

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

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

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

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

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

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

```

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

<210> 177

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 177

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

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

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

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

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

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

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

<210> 178

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 178

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

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

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

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

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

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

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

<210> 179

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polyepetit tổng hợp

<400> 179

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 180

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 181

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 181

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 182

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 182

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

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

Gly Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

21403

35	40	45
Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys		
	85	90
Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105
Met Val Thr Val Ser Ser		
	115	

<210> 183
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 183
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Asn Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 184
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 184
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

<210> 185

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 185

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

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 186

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

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

<210> 187

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 187

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 188

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 188

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

<210> 189

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 189

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

<210> 190
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 190
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe
 20 25 30
 Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Gly Trp Pro Thr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 191
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 191
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg His Phe
 20 25 30
 Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Asp Trp Pro Asn Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 192

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 192

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 193

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 193

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Ser Asp Glu Trp Pro Asn Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 194

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 194

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 195

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 195

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg His Phe

21403

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

<210> 196
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 196
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Phe
20 25 30
Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Ser Ser Asp Ser Trp Ala Thr Ile Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 197
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 197

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

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

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

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

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

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

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

<210> 198

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 198

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

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

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

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

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

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

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

<210> 199

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 199

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

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

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

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

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

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

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

<210> 200

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 200

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

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

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

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

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

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

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

<210> 201

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 201

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

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

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

Phe Asp Thr Asn Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 202

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 202

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

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

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

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

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

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

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

<210> 203

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 203

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

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

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

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

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

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

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

<210> 204

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser, Arg, Asn, Gly, Lys, Thr hoặc Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Tyr, His, Ser hoặc Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Phe hoặc Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (35)..(35)

<223> Ala, Ser hoặc Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(50)

<223> Thr, Ser hoặc Ala

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (53)..(53)
<223> Ser hoặc Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (56)..(56)
<223> Gly, Ser, Ala, Glu, Asp, Phe, Gln hoặc Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (57)..(57)
<223> Thr, Ser, Phe hoặc Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (58)..(58)
<223> Thr, Ala, Asp, Ser hoặc Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (59)..(59)
<223> Tyr, Ser, Asn, Thr, Ala hoặc Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (60)..(60)
<223> Tyr hoặc Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (61)..(61)
<223> Arg hoặc Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (77)..(77)
<223> Asn hoặc Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (78)..(78)
<223> Ser hoặc Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (89)..(89)
<223> Glu hoặc Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (106)..(106)
<223> Ala hoặc Asp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (107)..(107)
<223> Tyr, Phe hoặc Ser

```

<400> 204

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

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

Ala Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Xaa Xaa Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 205

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Ser hoặc Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Glu hoặc Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asp, Glu hoặc Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Tyr, Trp, Glu, Asp hoặc Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Ser, Asn, Ile, Thr, Arg, Met hoặc Gly

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Ala hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (49)..(49)
 <223> Tyr hoặc Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (53)..(53)
 <223> Asn, Ser, Asp, Gln, Thr, Val hoặc Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (71)..(71)
 <223> Phe hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (87)..(87)
 <223> Tyr hoặc Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (91)..(91)
 <223> Tyr hoặc Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (92)..(92)
 <223> Asn, Asp, Thr hoặc Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (93)..(93)
 <223> Asn, Trp, Tyr, Ile, Phe hoặc Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (94)..(94)
 <223> Tyr hoặc Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (97)..(97)
 <223> Thr hoặc Pro

<400> 205
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn
 20 25 30

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

Xaa Asp Thr Asn Xaa Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

21403

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Pro
85 90 95

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

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: 6xHis tag tổng hợp

<400> 206

His His His His His His
1 5