



(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) 
1-0022608

(51)⁷ **C07K 16/00**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2014-00803 | (22) | 13.08.2012 | | |
| (86) | PCT/EP2012/065782 | 13.08.2012 | (87) | WO2013/024059 | 21.02.2013 |
| (30) | 61/524,488 | 17.08.2011 | US | | |
| | 1121226.3 | 12.12.2011 | GB | | |
| | 1121233.9 | 12.12.2011 | GB | | |
| | 1121236.2 | 12.12.2011 | GB | | |
| | PCT/EP2012/064632 | 25.07.2012 | EP | | |
| (45) | 25.12.2019 | 381 | (43) | 25.09.2014 | 318 |
| (73) | Glaxo Group Limited (GB) | | | | |
| | 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, United Kingdom | | | | |
| (72) | ASHMAN, Claire (GB), BIRCHLER, Mary (US), DE WILDT, Rudolf M T (NL),
HOLLAND, Claire (NL), LEWIS, Alan Peter (GB), MORLEY, Peter (GB),
SANDAL, Thomas (GB), STEWARD, Michael (GB) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD) | | | | |
-

(54) **VÙNG BIẾN ĐỔI GLOBULIN MIỄN DỊCH ĐƠN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VÙNG BIẾN ĐỔI NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất protein và peptit cải biến có ái lực gắn kết giảm với các kháng nguyên đã có. Các phân tử protein/peptit cải biến như vậy có thể bao gồm các đoạn bổ sung, đoạn nối hoặc các đoạn đánh dấu và/hoặc các sự thể đoạn axit amin ở đầu tận cùng C nhất định. Các phân tử protein/peptit cải biến này (bao gồm chất ngưng tụ và liên hợp của nó) có thể bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên, như kháng thể, mảnh kháng nguyên, và vùng biến đổi đơn, ví dụ vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch người (kháng thể), và cũng như vùng biến đổi đơn có nguồn gốc không phải từ người như lạc đà không bướu hoặc lạc đà, ví dụ VHH bao gồm Nanobody™ (ví dụ như được mô tả trong WO 94/04678 và WO 95/04079). Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng, chế phẩm, dược phẩm chứa phân tử được thể axit amin và/hoặc được kéo dài ở đầu tận cùng C cải biến như vậy và phương pháp bào chế và biểu hiện các phân tử này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất protein và peptit cải biến có ái lực gắn kết giảm với các kháng nguyên đã có. Các phân tử protein/peptit cải biến như vậy có thể bao gồm các đoạn bổ sung, đoạn nối hoặc các đuôi và/hoặc các sự thể đoạn axit amin ở đầu tận cùng C nhất định. Các phân tử protein/peptit cải biến này (bao gồm chất ngưng tụ và liên hợp của nó) có thể bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên, như kháng thể, mảnh kháng nguyên, và khu vực biến đổi đơn, ví dụ vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch người (kháng thể), và cũng như vùng biến đổi đơn có nguồn gốc không phải từ người như lạc đà không bướu hoặc lạc đà, ví dụ VHH bao gồm Nanobody™ (ví dụ như được mô tả trong WO 94/04678 và WO 95/04079). Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng, chế phẩm, dược phẩm chứa phân tử được thể axit amin và/hoặc được kéo dài ở đầu tận cùng C cải biến như vậy và phương pháp bào chế và biểu hiện các phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thể tự kháng có trong tự nhiên tồn tại ở người có thể gắn kết với protein, ví dụ, với globulin miễn dịch thể chủ hoặc các mảnh globulin miễn dịch, ví dụ yếu tố thấp khớp (gắn kết các epitop trong vùng Fc của các kháng thể), thể tự kháng kháng kiểu gen cá thể (genotyp) (gắn kết vùng biến đổi/CDR của kháng thể) và thể tự kháng kháng vùng bản lề (gắn kết vùng bản lề của vùng hằng định Ig trong các mảnh Fab).

Các thể tự kháng này có thể là một phần của nguồn đa dòng của thể tự kháng kháng globulin miễn dịch (Ig) đặc hiệu với epitop trong toàn bộ các phân tử Ig mà có ở cả người và động vật linh trưởng không phải là người. Ngoài thể tự kháng kháng IgG gắn kết với epitop trong vùng Fc nguyên vẹn (tức là, yếu tố thấp khớp (rheumatoid factor - RF)), sự có mặt của thể tự kháng kháng genotyp gắn kết với vùng CDR biến đổi của IgG, và kháng thể kháng vùng bản lề tương tác với epitop chưa biết rõ trong vùng bản lề ở đầu tận cùng C chứa các mảnh Fab hoặc F('Ab')₂ đã được quan sát thấy. Vai trò chức năng của các thể tự kháng kháng IgG khác nhau vẫn chưa được biết rõ. Yếu tố thấp khớp và thể tự kháng kháng vùng bản lề có liên quan đến một số tình trạng bệnh lý, như bệnh tự miễn và một số bệnh nhiễm trùng trong đó các kháng thể kháng genotyp có thể mang lại sự bảo vệ khỏi thể tự kháng trong một số bệnh tự miễn. Hơn

nữa, vai trò điều hòa miễn dịch của thể tự kháng kháng IgG, đã được công nhận trong khi các thể tự kháng này kiểm soát sự kích thích tế bào B tự phản ứng và điều hòa đáp ứng miễn dịch với các kháng nguyên ngoại lai. Kháng thể kháng vùng bản lề là thể tự kháng kháng IgG phản ứng với IgG được cắt mà không phải là IgG nguyên vẹn. Mức phổ biến cao của chúng trong quần thể người bình thường liên quan đến sự tiếp xúc trước đó với mảnh IgG, có khả năng là kết quả của sự tách IgG do proteaza vi khuẩn hoặc nội sinh.

Cũng như sự gắn kết với các protein nội sinh (có trong đối tượng chưa cải biến), các thể tự kháng cũng có thể gắn kết với protein hoặc peptit được sử dụng cho đối tượng được điều trị. Các kháng thể đã có gắn kết với các phân tử như protein và peptit điều trị, được sử dụng cho đối tượng có thể ảnh hưởng đến hiệu lực của chúng và có thể gây ra phản ứng khi sử dụng, sự quá mẫn, đáp ứng lâm sàng biến đổi ở các bệnh nhân được điều trị cũng như sinh khả dụng biến đổi bằng cách duy trì, thải trừ hoặc trung hòa phân tử. Tuy nhiên trong một số trường hợp, sự tồn tại của các kháng thể này có thể thấp hơn đáng kể trong quá trình điều trị bằng thuốc so với các trường hợp khác.

Thể tự kháng gắn kết protein và kháng thể điều trị có thể được tạo mới đáp ứng lại sự điều trị bằng thuốc (như sử dụng protein hoặc peptit trị liệu) được gọi chung là kháng thể kháng dược chất (ADA _ anti-drug antibody). Khi ADA được mô tả trong toàn bộ sáng chế, nó được gọi là các ADA đã có từ trước trừ phi được quy định khác.

Các kháng thể vùng VH và VL có nguồn gốc từ trình tự khung của người nguyên vẹn và mặc dù các dự đoán *in silico* mô tả tỷ lệ thấp đáng kể của peptit miễn dịch tiềm năng, có thể là các kháng thể vùng này có thể gây miễn dịch ở người, tức là chúng có thể gây ra các ADA, và chúng có thể gắn kết với các ADA đã có từ trước phụ thuộc vào cả các yếu tố độc lập với trình tự và phụ thuộc vào trình tự.

Tương tự, số lượng các dAb đơn có nguồn gốc từ chuỗi nặng Camelid (VHH) đang được nghiên cứu trên lâm sàng và trong khi không có báo cáo phản ứng quá mẫn hoặc phản ứng phụ qua trung gian miễn dịch nào, sự gắn kết với ADA đã có từ trước vẫn là một triển vọng.

Do đó, có thể thuận lợi nếu đề xuất các phân tử để điều trị bao gồm protein, hoặc peptit, ví dụ phân tử gắn kết kháng nguyên, có ái lực gắn kết giảm với ADA đã có từ trước khi sử dụng cho đối tượng, cụ thể là đối tượng là người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đã chứng minh như mô tả trong đây rằng trong huyết thanh của một số đối tượng người khỏe mạnh chưa mắc bệnh, các thể tự kháng kháng VH đã có từ trước được trình diện có thể gắn kết với cả kháng thể vùng VH và phân tử VHH, cũng như thể tự kháng kháng VL (ví dụ, V kappa (VK)) có thể gắn kết phân tử VL. ADA đã có từ trước gắn kết các dAb VH là tương tự như kháng thể kháng vùng bản lề trong đó chúng gắn kết các mảnh IgG nhưng không gắn kết các trình tự tương tự được tìm thấy *in situ* trên IgG nguyên vẹn.

Một thử nghiệm sinh học cụ thể được phát triển như mô tả trong đây và được công nhận để phát hiện kháng thể kháng được chất kháng dAb VH DOM1H-131-206 (trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO 1) ở người. Bảng 60 mẫu huyết thanh người hiến tặng khỏe mạnh được thử nghiệm về độ phản ứng ban đầu trong thử nghiệm này. Xác định rằng khoảng 45% mẫu huyết thanh từ các đối tượng này có kháng thể có thể phát hiện, có khả năng gắn kết với DOM1H-131-206. Độ phản ứng dường như đặc hiệu với epitop mới sinh, hoặc epitop, trong trình tự khung VH dAb, do đáp ứng là phản ứng chéo với các khung VH của dAb gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau, nhưng không phản ứng chéo với IgG người nguyên vẹn. Cũng quan sát thấy ADA đã có trước đó kháng dAb VL trong các mẫu huyết thanh từ người hiến tặng khỏe mạnh nhưng với mức độ thấp hơn VH.

Tiến hành phương pháp đột biến gen, các tác giả sáng chế xác định liệu sự biến đổi với khung VH có thể làm giảm sự gắn kết của các ADA đã có từ trước hay không. Sử dụng phương pháp này, các tác giả sáng chế đã vẽ bản đồ epitop đến đầu tận cùng đầu tận cùng C của khung dAb VH, và minh họa một số phương pháp có thể sử dụng để làm giảm hoặc loại bỏ sự gắn kết của các kháng thể đã có từ trước kháng phân tử VL, VH và VHH. Cụ thể, sáng chế đã chỉ ra rằng các cải biến mà thay đổi cấu hình ba chiều ở đầu tận cùng C của dAb, đặc biệt là đầu tận cùng C của gốc serin (tức là vị trí 113 Kabat) trong dAb VH và VHH là quan trọng. Ngoài ra, cấu hình ba chiều của đầu tận cùng C của dAb có thể được cải biến bằng cách bổ sung các gốc axit amin thêm

nữa (kéo dài ở đầu tận cùng C) và/hoặc bằng cách thế các gốc axit amin có ở một hoặc nhiều vị trí 14, 41, 108, 110 và 112 trong dAb VH.

Do đó, sáng chế đề xuất các phân tử cải biến có khả năng gắn kết giảm với ADA (đã có từ trước) so với phân tử không cải biến và thích hợp để sử dụng cho đối tượng, ví dụ, đối tượng là người để phòng bệnh hoặc chữa bệnh. Khả năng gắn kết giảm có nghĩa là phân tử này có ái lực giảm hoặc gắn kết giảm với ADA đã có trước đó. Các phân tử như vậy bao gồm protein, hoặc peptit, ví dụ, kháng nguyên gắn kết protein, ví dụ kháng thể, mảnh kháng nguyên, và vùng biến đổi đơn ví dụ vùng biến đổi đơn (VH hoặc VL) của globulin miễn dịch của người (kháng thể), và cũng như vùng biến đổi đơn có nguồn gốc từ nguồn không phải là người như lạc đà không bướu hoặc Camelid, ví dụ VHH Camelid bao gồm Nanobody™ (ví dụ được mô tả trong WO 94/04678 và WO 95/04079). Các phân tử này bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ: (a) đoạn thêm, đoạn kéo dài, đoạn xóa hoặc đuôi ở đầu tận cùng C, và/hoặc (b) một hoặc nhiều sự thế đoạn axit amin của vùng khung.

Ngoài ra, các phân tử cải biến được mô tả trong đây và được phẩm chứa các phân tử cải biến này có thể có profin an toàn hơn và ít tác dụng phụ hơn các phân tử không cải biến, ví dụ dAb không cải biến, không chứa đoạn kéo dài, đoạn bổ sung, đoạn xóa hoặc đuôi ở đầu C tận cùng và/hoặc các biến đổi khung khác, làm giảm sự gắn kết ADA đã có trước đó. Tương tự, việc sử dụng các phân tử cải biến được mô tả trong đây hoặc được phẩm chứa các phân tử cải biến này (có khả năng gắn kết giảm với ADA đã có trước đó) có thể gây ra tính sinh miễn dịch biến đổi và cũng có thể tạo ra hiệu lực cải thiện và profin an toàn được cải thiện và ví dụ có thể sử dụng thuận lợi với các liệu lặp lại cho bệnh nhân có thể sinh ra thể tự kháng kháng các phân tử không cải biến ví dụ dAb.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất:

vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb), chứa một hoặc nhiều đoạn cải biến được chọn từ: (a) đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C chứa đoạn axit amin kéo dài của từ một đến năm axit amin; hoặc (b) một hoặc nhiều sự thế đoạn axit amin của vùng khung trong đó ít nhất một đoạn thế là đoạn thế được chọn từ: đoạn thế P14A, P41A đoạn thế và đoạn thế L108A.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C chứa từ 1 đến 4 axit amin. Theo phương án khác, đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C này bao gồm axit amin là alanin, và có sự gắn kết giảm với các ADA đã có từ trước so với vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) không được cải biến.

Theo khía cạnh khác, đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C có thể là đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 15 axit amin, ví dụ từ 1 đến 8 axit amin hoặc 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 axit amin. Cụ thể, đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 8 axit amin, hoặc 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 axit amin chứa gốc alanin, ví dụ đoạn kéo dài alanin đơn, hoặc đoạn kéo dài AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP. Cụ thể, sáng chế đề xuất đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 5 axit amin hoặc đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 4 axit amin. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn được cải biến cũng có thể bao gồm đoạn axit amin xóa. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) có thể được chọn từ dAb của VH người, hoặc VL người hoặc VHH Camelid. Đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C có thể là ngưng tụ trực tiếp hoặc thể liên hợp với đầu tận cùng C của dAb.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) trong đó (i) dAb này là VH người hoặc VHH Camelid và đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng này bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ (a) A (b) AS, (c) AST (d) ASTK, (e) ASTKG (f) AAA hoặc (g) T; và trong đó (ii) dAb này là VL người (như V kappa) và đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng này bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ (a) AAA, (b) A (c) TV (d) T.

Sáng chế cũng đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) gắn kết đơn hóa trị với kháng nguyên đích, bao gồm:

- a) ba vùng xác định bổ thể (CDR – complementarity determining region) đặc hiệu với kháng nguyên đích; sao cho dAb gắn kết kháng nguyên với giá trị KD nằm trong khoảng từ 5 micromol đến 1 picomol
- b) bốn vùng khung (FW); và
- c) trình tự đầu tận cùng C gồm có trình tự VTVS(S)_nX hoặc VEIK_pR_qX; và tùy chọn
- d) một hoặc nhiều sự thế đoạn axit amin ở vị trí 14, 41, 108, 110, hoặc 112 so với trình tự khung gốc của người

trong đó:

n là số nguyên độc lập được chọn từ 0 hoặc 1;

p và q mỗi giá trị là 0 hoặc 1 sao cho khi p là 1 q có thể là 0 hoặc 1 và sao cho khi p là 0, thì q cũng là 0;

X có thể có hoặc không, và nếu có thì là đoạn axit amin kéo dài gồm 1 đến 8 gốc axit amin;

với điều kiện khác nữa là nếu không có X;

- i) n là 0 và/hoặc dAb kết thúc trong $VTVS(S)_n$ bao gồm một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin;
- ii) p và/hoặc q là 0, và/hoặc dAb kết thúc trong $VEIK_pR_qX$ bao gồm một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin này.

KD để chỉ hằng số phân ly cân bằng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ rằng trị số KD càng nhỏ thì sự gắn kết càng mạnh.

Theo một phương án của khía cạnh này, dAb gắn kết kháng nguyên với trị số KD nằm trong khoảng từ 10pM đến 50nM.

Theo một phương án của khía cạnh này, vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) có ái lực gắn kết và/hoặc ái lực với kháng thể kháng dược chất (ADA) thấp hơn dAb tương đương trong đó dAb tương đương này có trình tự giống như vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn, chỉ khác là không có X, n, p và q là 1 và không có sự thể đoạn axit amin.

Theo phương án tiếp theo, vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn là vùng trong đó trình tự đầu tận cùng C này gồm có trình tự VTVSSX.

Theo phương án khác, vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn là vùng trong đó trình tự đầu tận cùng C này gồm có trình tự VEIKRX.

Theo phương án tiếp theo, vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn có một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin được chọn từ nhóm gồm có: sự thể đoạn P14A, sự thể đoạn P41A, sự thể đoạn L108A, sự thể đoạn T110A và sự thể đoạn S112A.

Theo phương án, X có mặt, và là sự kéo dài gồm từ 1 đến 8 axit amin hoặc 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 axit amin, cụ thể đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 8 axit amin, hoặc

1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 axit amin chứa gốc alanin, ví dụ đoạn kéo dài alanin đơn, hoặc đoạn kéo dài AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP.

Theo phương án tiếp theo, dAb là dAb của VH, hoặc VL hoặc VHH Camelid.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất trình tự axit amin là trình tự axit amin bất kỳ của trình tự vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) không được cải biến được mô tả trong đây (ví dụ SEQ ID NO 1-6, 10-13) sau đó được cải biến để làm giảm sự gắn kết với các ADA như được mô tả ở đây, ví dụ trình tự vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn không được cải biến được mô tả trong đây được cải biến sao cho X là có mặt, và là đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 8 axit amin, cụ thể, đoạn kéo dài gồm từ 1 đến 8 axit amin bao gồm gốc alanin, ví dụ, đoạn kéo dài alanin đơn, hoặc đoạn kéo dài AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP và/hoặc vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn có một hoặc nhiều sự thế đoạn axit amin trong đó một hoặc nhiều sự thế đoạn axit amin được chọn từ nhóm gồm có sự thế đoạn P14A, sự thế đoạn P41A, sự thế đoạn L108A, sự thế đoạn T110A và sự thế đoạn S112A.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn là VH người hoặc VHH Camelid và đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ: (a) AS, (b) AST (c) ASTK, (d) ASTKG (e) AAA hoặc (f) T hoặc (g) ASTKGP, và/hoặc trong đó có sự khuyết đoạn axit amin từ dAb kết thúc trong VTVS(S)_n và sự khuyết đoạn này là sự khuyết đoạn –S.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn là VL người, ví dụ, V kappa, và trong đó đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng này bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ: (a) AAA (b) A (c) TV và (d) T, và/hoặc trong đó có sự khuyết đoạn axit amin từ dAb kết thúc trong VEIKR và sự khuyết đoạn này là sự khuyết đoạn –R.

Theo một phương án khác của sáng chế, khi trình tự đầu tận cùng C của VL dAb là VEIKRAAA hoặc VEIKRT, các cấu trúc gắn kết kháng nguyên bao gồm hai dAb được ngăn cách bởi vùng sợi Fc đơn của kháng thể, trong đó mỗi dAb có khả năng gắn kết với VEGF, được loại trừ.

Theo một khía cạnh, dAb cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như được mô tả ở đây (ví dụ, VH, VL như V kappa và VHH) có giá trị KD gắn kết với ADA là 150% giá trị KD hoặc hơn (ví dụ, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%,

550%, 600%, 650% hoặc hơn) của trình tự vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) tương đương không được cải biến. Sáng chế cũng đề xuất dAb cải biến như được mô tả ở đây có sự gắn kết với ADA giảm và có sự gắn kết giảm với ADA như được xác định bằng thử nghiệm khẳng định mô tả trong Ví dụ 2 và trong đó, dAb cải biến này có % ức chế tín hiệu trung bình nhỏ hơn 90%, chẳng hạn nhỏ hơn 80%, chẳng hạn nhỏ hơn 70%, chẳng hạn nhỏ hơn 60%, chẳng hạn nhỏ hơn 50%, chẳng hạn nhỏ hơn 40%, chẳng hạn nhỏ hơn 30%, chẳng hạn nhỏ hơn 20%, chẳng hạn nhỏ hơn 10%, so với dAb đối chứng có sự ức chế tín hiệu khoảng 98%-100%, dAb đối chứng này (không được cải biến) có trình tự giống hoặc tương tự nhưng không được cải biến để làm giảm sự gắn kết ADA.

Sáng chế cũng đề xuất vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch (dAb) theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp phòng ngừa các tác dụng phụ. Việc sử dụng này có thể có lợi ích cụ thể khi dAb là chất đối kháng của đích, ví dụ, đích được chọn từ TNF α , thụ thể TNF, thụ thể TNF 1 (TNFR1), VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, albumin, và TGF β R2. Theo một phương án, đối tượng đích là thụ thể, hoặc cụ thể, thụ thể là polyme hoặc thụ thể dime hóa khi hoạt hóa, ví dụ, thụ thể TNF. Theo phương án khác, dAb cải biến như được mô tả ở đây sao cho nó có sự gắn kết giảm với ADA được sử dụng trong chế độ điều trị mà gồm cả sự lặp lại liều dùng.

Sáng chế đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) trong đó đích là TNFR1, và là dAb được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được xác định là: (a) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16); (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 17); (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 18); (d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C là ASTKG (SEQ ID NO 19); và (e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C là ASTKG và đột biến axit amin khung P14A (SEQ ID NO 20). Sáng chế cũng đề xuất dAb (không được cải biến) được chọn từ trình tự mà có mức tương đồng 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được xác định là: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3) và còn bao gồm trình tự bất kỳ bao gồm, ví dụ,

đoạn cải biến bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết với ADA, ví dụ, đoạn kéo dài analin đơn tận cùng C.

dAb theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin dAb được mô tả ở đây hoặc là một phần của phân tử được mô tả ở đây (hoặc trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự dAb này), ví dụ dAb bất kỳ được mô tả trong ví dụ bất kỳ trong đây và ví dụ này bao gồm sự cải biến bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA như đoạn kéo dài analin ở đầu tận cùng C. Sáng chế cũng bao gồm phân tử bất kỳ được mô tả ở đây (chẳng hạn như trong các ví dụ) chứa trình tự dAb như được mô tả trên bao gồm cải biến bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA, phân tử này có thể ví dụ là trình tự bất kỳ trong số các dAb-Fc-dAb Vh-Vk trong Ví dụ 12, hoặc mAbdAb bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Do đó, sáng chế đề xuất dAb kháng IL13, ví dụ, dAb với trình tự axit amin mà giống đến 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được xác định là: (a) DOM10h-53-567 (SEQ ID NO 13) hoặc (b) DT04-H-033 (SEQ ID NO 12); và trình tự axit amin này còn bao gồm sự cải biến bất kỳ được mô tả ở đây mà làm giảm sự gắn kết với các ADA, ví dụ, đoạn kéo dài analin đơn tận cùng C.

Sáng chế cũng đề xuất dAb kháng TNFR1, ví dụ, dAb với trình tự axit amin giống đến 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là: DOM1h-574-208 (SEQ ID NO 10); và còn bao gồm sự cải biến bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết với ADA, ví dụ, đoạn kéo dài analin đơn tận cùng C.

Sáng chế cũng đề xuất thể dung hợp kháng TNFR1dAb-VL, ví dụ, với trình tự axit amin giống đến 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là: thể dung hợp DOM1h-574-208-VL (SEQ ID NO 11); và còn bao gồm cải biến bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết với ADA, ví dụ, đoạn kéo dài alanin đơn (hoặc ba alanin) có ở đầu tận cùng C của phân tử dung hợp.

Sáng chế cũng đề xuất mAbdAb là mAb kháng IL13: dAb IL-4 V kappa còn bao gồm sự cải biến bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết với ADA; ví dụ

mAbdAb có thể bao gồm trình tự chuỗi nặng với trình tự axit amin giống đến 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% so với trình tự axit amin được xác định là: mAb-VL ‘735 phân tử chuỗi nặng SEQ ID NO 30; và trình tự chuỗi nhẹ được xác định là ‘735 trình tự chuỗi nhẹ SEQ ID NO 31; và còn bao gồm cải biến bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết với ADA ví dụ đoạn kéo dài alanin đơn (hoặc ba analin).

Sáng chế cũng đề xuất mAbdAb là mAb kháng IL13: dAb IL-4 V kappa ký hiệu là mAb-VL 15014 được cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như được mô tả ở đây, trong đó mAbdAb bao gồm (a) trình tự chuỗi nặng-liên kết-V kappa với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 32; và (b) trình tự chuỗi nhẹ với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 33.

Sáng chế cũng đề xuất mAbdAb là mAb kháng IL13: dAb IL-4 V kappa ký hiệu là mAb-VL 15019 được cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như được mô tả ở đây, trong đó mAbdAb bao gồm (a) trình tự chuỗi nặng-liên kết-V kappa với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 34; và (b) trình tự chuỗi nhẹ với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 35.

Sáng chế cũng đề xuất mAbdAb là mAb kháng IL13: dAb IL-4 V kappa ký hiệu là mAb-VL 15020 được cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như được mô tả ở đây, trong đó mAbdAb bao gồm (a) trình tự chuỗi nặng-liên kết-V kappa với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 36; và (b) trình tự chuỗi nhẹ với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 37.

Sáng chế cũng đề xuất mAbdAb là mAb kháng IL13: dAb IL-4 V kappa ký hiệu là mAb-VL 15021 được cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như được mô tả ở đây, trong đó mAbdAb bao gồm (a) trình tự chuỗi nặng-liên kết-V kappa với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80%

với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 38; và (b) trình tự chuỗi nhẹ với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 39.

Sáng chế cũng đề xuất trình tự VHH với cải biến bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA, ví dụ VHH với trình tự axit amin giống 100%, 99,5%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được xác định là SEQ ID NO 7-9.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hóa dAb bất kỳ theo sáng chế, ví dụ, axit nucleic bất kỳ trong số các axit nucleic được mô tả ở đây ví dụ trình tự axit nucleic bất kỳ nêu trong Fig.9 (SEQ ID NO 21-23) hoặc Fig.10 (SEQ ID NO 24-29). Theo một phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic (SEQ ID NO 22) mã hóa dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C, vector chứa axit này (SEQ ID NO 22) và sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ, ví dụ, tế bào chủ E.coli, biểu hiện axit nucleic (SEQ ID NO 22), hoặc vector như Pave011 (từ Fujifilm Diosynth) biểu hiện SEQ ID NO 22. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C bao gồm bước duy trì tế bào chủ như E.coli chứa vector như Pave011 (hoặc axit nucleic) mã hóa axit nucleic (SEQ ID NO 22) trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện dAb kéo dài, bằng cách đó tạo ra polypeptit.

Các dAb theo sáng chế cũng có thể là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với các phân tử khác.

Theo các phương án khác của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, thay vì sử dụng “dAb” trong thể dung hợp theo sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng vùng chứa các CDR của dAb gắn kết đích của nó và vùng khung này bao gồm các sự cải biến như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với các ADA.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa dAb theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ theo sáng chế, ví dụ, kết hợp với (các) chất mang dược dụng hoặc tương thích sinh lý, (các) tá dược hoặc (các) chất pha loãng.

Sáng chế mô tả việc sử dụng dAb theo sáng chế để điều trị hoặc thuốc và sử dụng để điều trị hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ, dAb kháng TNFR1 với sự gắn

kết với ADA giảm, ví dụ dAb DOM1h-131-206 cải biến như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA (ví dụ với trình tự axit amin nêu trong Fig.8a-8e: SEQ ID NO 16-20).

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16) để sử dụng trong điều trị hoặc thuốc hoặc làm thuốc, ví dụ, để điều trị hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn viêm hoặc bệnh hoặc rối loạn phổi hoặc bệnh hô hấp như tổn thương phổi cấp tính (ALI - Acute lung injury) và hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS - Acute Respiratory Distress syndrome) và các biến chứng của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hóa dAb theo sáng chế có sự gắn kết với ADA giảm và vectơ và tế bào chủ bao gồm các axit nucleic này. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra dAb theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc biểu hiện vectơ mã hóa và axit nucleic trong tế bào chủ ví dụ tế bào chủ vi khuẩn như E.coli.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa dAb theo sáng chế có sự gắn kết với ADA giảm, ví dụ chế phẩm khí dung để phân phối thuốc tại phổi. Sáng chế cũng đề xuất thiết bị xông hít hoặc khí dung chứa dAb theo sáng chế, ví dụ dAb kháng TNFR1 bất kỳ, ví dụ, dAb kháng TNFR1 với trình tự axit amin nêu trong Fig.8a-8e: SEQ ID NO 16-20, ví dụ, dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài alanin ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dAb DOM1h-131-206 không được cải biến (SEQ ID NO1) hoặc dAb DOM1h-131-206 được cải biến theo cách bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết ADA, ví dụ, dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16), để điều trị bệnh viêm da, ví dụ, bệnh vẩy nến.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh vẩy nến ở người, phương pháp này bao gồm các bước a) xác định người mắc bệnh vẩy nến; và b) sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể vùng (ví dụ dAb DOM1h-131-206 không cải biến(SEQ ID NO1) hoặc dAb DOM1h-131-206 được cải biến theo cách bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA, ví dụ dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16) cho mảng vẩy nến trên người mắc bệnh vẩy nến; bằng cách đó bệnh vẩy nến được điều trị.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể vùng để sử dụng điều trị bệnh vẩy nến và cũng đề xuất chế độ liều sử dụng kháng thể vùng để điều trị bệnh vẩy nến. Kháng thể vùng có thể là dAb DOM1h-131-206 không cải biến (SEQ ID NO1) hoặc dAb DOM1h-131-206 được cải biến theo cách bất kỳ được mô tả ở đây làm giảm sự gắn kết ADA, ví dụ dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16).

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế cũng đề xuất mAb công cụ (ví dụ mAb công cụ như mô tả trong Ví dụ 19 và với trình tự axit amin được thể hiện ở Fig.6: SEQ ID NO 14 và 15). mAb công cụ được tạo ra bằng kỹ thuật kháng thể đơn dòng của chuột chuẩn tức là chuột được gây miễn dịch bằng DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO1), lách được thu lấy và dòng tế bào lai được tạo ra, các thể lai biểu hiện kháng thể sau đó được tách dòng và kháng thể tách thu được tách và sắp xếp tình tự bằng các kỹ thuật chuẩn. MAb công cụ là một mAb gắn kết với khung dAb VH và bằng cách đó làm giảm sự gắn kết của dAb VH với ADA. Do đó mAb công cụ dường như gắn kết với epitop nhỏ hơn trong vùng khung VH với VH kháng ADA người. Do đó, mAb công cụ có thể hữu dụng, ví dụ nó có thể sử dụng để thử nghiệm dAb cải biến (VH, VHH,) và để xác định các cải biến với dAb có ngăn cản hoặc làm giảm sự gắn kết của dAb với mAb công cụ. Các cải biến với dAb VH là phòng sự gắn kết với mAb công cụ sẽ ngăn cản hoặc làm giảm sự gắn kết của dAb VH với ADA. Do đó, sáng chế đề xuất dAb bất kỳ được cải biến (ví dụ, sự cải biến bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này) để ngăn chặn hoặc làm giảm sự gắn kết với mAb công cụ. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng mAb công cụ (ví dụ, mAb công cụ được mô tả trong Ví dụ 19 và với trình tự axit amin nêu trong Ví dụ 19 và cũng có trong Fig.6: SEQ ID NO 14 và 15) trong thử nghiệm để kiểm tra dAb ví dụ dAb cải biến (ví dụ (VH, VHH), ví dụ dAb trong số được mô tả ở đây, ví dụ dAb TNFR1 như các dAb được mô tả ở đây) và để xác định các chất có sự gắn kết giảm với ADA ví dụ. Theo một khía cạnh, dAb (ví dụ (VH, VHH) được cải biến để làm giảm sự gắn kết với mAb công cụ như được mô tả ở đây và có giá trị KD gắn kết với mAb công cụ 150% hoặc hơn (ví dụ 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650% hoặc hơn) trị số KD của trình tự dAb tương đương không cải biến. Sáng chế cũng đề xuất dAb bất kỳ được xác định bởi thử nghiệm sàng lọc.

Theo phương án tiếp theo, sáng chế mô tả việc sử dụng mAb công cụ (ví dụ mAb công cụ mô tả trong Ví dụ 19 và với trình tự axit amin nêu trong Fig.6: SEQ ID NO 14 và 15) trong phương pháp thử nghiệm để định lượng số lần dAb (ví dụ VH, VHH), có mặt trong mẫu mô hoặc mẫu huyết tương.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: thể hiện mật độ của kháng thể kháng được chất có sẵn trong huyết thanh của các đối tượng tham gia thử nghiệm là người khỏe mạnh

Fig.2: thể hiện trình tự axit amin của dAb kháng TNFR1 cải biến được xác định là (a) DOM 1H-131-206 (không được cải biến) (SEQ ID NO 1) (b) DOM 1H-131-511 (không được cải biến) (SEQ ID NO 2) (c) DOM 1H-131-202 (không được cải biến) (SEQ ID NO 3; và trình tự VHH được xác định là (d) ở dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết IL6R liên kết bởi GGGGSGGGGS với môđun gắn kết albumin huyết thanh người như mô tả trong WO2010100135 (SEQ ID NO 4), (e) là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết TNF liên kết với môđun gắn kết albumin huyết thanh người lần lượt liên kết với môđun gắn kết TNF, sử dụng GGGGSGGGGS làm trình tự liên kết như mô tả trong WO2010077422 (SEQ ID NO 5), (f) là dạng đặc hiệu đơn hóa trị hai bao gồm hai môđun giống nhau liên kết bởi đoạn liên kết Ala-Ala-Ala, mỗi môđun là dAb có thể gắn kết vùng A1 của yếu tố Von-Willebrand, như nêu trong WO2009115614A2 (SEQ ID NO 6), (g) dòng VHH2(d) là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết IL6R liên kết bởi GGGGSGGGGS với môđun gắn kết albumin huyết thanh người như mô tả trong WO2010100135 với đoạn kéo dài alanin (SEQ ID NO 7) (h) dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết TNF liên kết môđun gắn kết albumin huyết thanh người lần lượt liên kết với môđun gắn kết TNF, sử dụng GGGGSGGGGS làm đoạn liên kết như mô tả trong WO2010077422 với đoạn kéo dài alanin (SEQ ID NO 8) (i) dạng đặc hiệu đơn hóa trị hai bao gồm hai môđun giống nhau liên kết bởi đoạn liên kết Ala-Ala-Ala, mỗi môđun là dAb có thể gắn kết lĩnh vực A1 của yếu tố Von-Willebrand, như nêu trong WO2009115614A2 với đoạn kéo dài alanin (SEQ ID NO 9) (j) DOM 1H-574-208 (SEQ ID NO 10) (k) DOM 1H-574-208 – VL thể dung hợp (SEQ ID NO 11) (l) DT04-H-033 (SEQ ID NO 12); (m) Dom10h-53-567 (SEQ ID NO 13).

Fig.3: thể hiện cấu trúc tinh thể mẫu của DOM1H-131-206 với các gốc được đánh dấu gây ảnh hưởng lên sự gắn kết với ADA khi được gây đột biến. Thực hiện

việc mô hình hóa các gốc bề mặt và thể đột biến thu được được sàng lọc trong thử nghiệm ADA về sự gắn kết với ADA đã có từ trước (ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 2). Các gốc được đánh dấu là 14 và “đầu C tận cùng” được phát hiện là có ảnh hưởng mạnh lên sự gắn kết với ADA khi được gây đột biến, các gốc được đánh dấu là 112, 110, 108 và 41 được phát hiện thấy là ảnh hưởng trung bình đến sự gắn kết với ADA khi đột biến và các gốc được đánh dấu là 13, 11, 91, 43, 44, 83 và 84 được thấy là có ảnh hưởng yếu đến sự gắn kết với ADA khi được gây đột biến.

Fig.4: thể hiện sự loại bỏ gắn kết với ADA gây ra do sự thêm đoạn kéo dài gốc axit amin analin đơn vào các dòng VHH 2(d), 2(e) và 2(f).

Fig.5: thể hiện các mức gắn kết với các ADA và của các dAb VH hoặc các dAb V_L hoặc các phân tử chứa các dAb này.

Fig.6a và 6b: thể hiện trình tự axit amin của mAb công cụ (M2.3G10.1G06), Fig.6a thể hiện trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO 14); và Fig.6b thể hiện trình tự chuỗi nặng. Các CDR được gạch chân trong Fig.(SEQ ID NO 15).

Fig.7: thể hiện tín hiệu thử nghiệm cạnh tranh (trục x) với sự có mặt của các mẫu huyết thanh từ đối tượng với khoảng tín hiệu ADA kháng-VH có sẵn. Huyết thanh từ khoảng người cho với ADA kháng VH đã có từ trước cạnh tranh với mAb kháng VH M2.3G10.1G06 về sự gắn kết với DOM 1H-131-206 gây ra sự ức chế tín hiệu thử nghiệm cạnh tranh.

Fig.8: thể hiện trình tự axit amin của dAb TNFR1 cải biến được xác định là: (a) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn (SEQ ID NO 16); (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 17); (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 18); (d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG (SEQ ID NO 19); và (e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG và sự đột biến khung P14A (SEQ ID NO 20).

Fig.9: thể hiện trình tự axit nucleic của dAb TNFR1 (a) dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 21) (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 22) (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C của ASTKG (SEQ ID NO 23).

Fig.10: thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa (a) trình tự VHH có trình tự axit amin nêu trong Fig.2d (SEQ ID NO 24) (b) trình tự VHH có trình tự axit amin nêu trong Fig.2e (SEQ ID NO 25); (c) trình tự VHH có trình tự axit amin nêu trong Fig.2f (SEQ ID NO 26), (d) trình tự VHH là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết IL6R liên kết bởi GGGGSGGGS với môđun gắn kết albumin huyết thanh người với đoạn kéo dài chứa alanin đơn (SEQ ID NO 27), (e) trình tự VHH với trình tự axit amin thể hiện trong Fig.2e còn bao gồm chứa đoạn kéo dài chứa alanin đơn (SEQ ID NO 28), (f) trình tự VHH với trình tự axit amin thể hiện trong Fig.2f còn bao gồm đoạn kéo dài chứa alanin đơn (SEQ ID NO 29).

Fig.11: thể hiện trình tự axit amin của các dAb mAb:VL (IL-13mAb: phân tử dAb IL-4V kappa): (a) phân tử mAb-VL '735 (IL-13mAb: IL-4V kappa dAb) (SEQ ID NO 30 và 31), (b) mAb-VL 150154 (SEQ ID NO 32 và 33), (c) mAb-VL 15019 (SEQ ID NO 34 và 35), (d) mAb-VL 15020 (SEQ ID NO 36 và 37), (e) mAb-VL 15021 (SEQ ID NO 38 và 39).

Fig.12: thể hiện trình tự axit amin của (a) DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 40), (b) DMS30046: DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 41), (c) DMS30047 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C trừ R có đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 42), (d) DMS30048 (chứa đầu tận cùng C cải biến): dAb DOM15-26-597 N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C +A ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 43), (e) DMS30049 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết-VEPKSSDK) & DAb K-044-085 đầu tận cùng C +AAA ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 44), (f) DMS30050 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & DAb K-044-085 đầu tận cùng C +T ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 45), (g) DMS30051 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C trừ R có C tận cùng ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 46), (h) DMS30052 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +A ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 47), (i) DMS30053 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +AAA ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO

48), (j) DMS30054 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +T ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 49).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đã được mô tả trong bản mô tả này với sự tham khảo các phương án theo cách mà cho thể hiện phép bản mô tả rõ ràng và xúc tích. Cũng cần lưu ý rằng các phương án có thể được kết hợp hoặc được tách rời mà không trệtch khỏi phạm vi của sáng chế.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học sử dụng trong bản mô tả sáng chế này có nghĩa giống như hiểu biết thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, trong lĩnh vực nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, hóa học axit nucleic, kỹ thuật lai và sinh hóa). Các kỹ thuật chuẩn được sử dụng cho các phương pháp phân tử, di truyền và hóa sinh (xem, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. và Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và các phương pháp hóa học.

Ái lực là cường độ gắn kết của một phân tử, ví dụ, kháng nguyên gắn kết protein theo sáng chế, với phân tử khác, ví dụ, kháng nguyên đích của nó, ở một vị trí gắn kết riêng lẻ. Ái lực gắn kết của kháng nguyên gắn kết protein với đích của nó có thể được xác định bằng phương pháp cân bằng chuẩn (ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA _ enzyme-linked immunoabsorbent assay) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA _ radioimmunoassay)), hoặc các phương pháp động học (ví dụ, phân tích BIACORETM).

Thuật ngữ "epitop" như được sử dụng trong đây để chỉ phần của kháng nguyên được tiếp xúc với vùng gắn kết cụ thể của kháng nguyên gắn kết protein, ví dụ, dAb. Epitop có thể là thẳng hoặc có cấu hình/gián đoạn. Epitop cấu hình hoặc gián đoạn bao gồm các gốc axit amin bị ngăn cách bởi các trình tự khác, tức là, không nằm trong trình tự liên tục trong trình tự sơ cấp của kháng nguyên. Mặc dù các gốc có thể là từ các vùng khác nhau của chuỗi peptit, chúng ở gần nhau trong cấu trúc ba chiều của kháng nguyên. Trong trường hợp kháng nguyên đa phân tử, epitop cấu hình hoặc gián đoạn có thể bao gồm các gốc từ các chuỗi peptit khác nhau. Các gốc cụ thể nằm trong

epitop có thể được xác định qua chương trình mô hình hóa bằng máy tính hoặc thông qua các cấu trúc ba chiều thu được thông qua các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như tinh thể học tia X.

Thể liên hợp dAb để chỉ hợp chất bao gồm dAb mà một phân tử khác được liên hợp hóa học bằng liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị, tốt hơn là liên kết đồng hóa trị. Liên kết đồng hóa trị này có thể thông qua liên kết peptit hoặc các phương pháp khác như qua chuỗi bên cải biến. Sự liên kết không đồng hóa trị có thể là trực tiếp (ví dụ, tương tác tĩnh điện, tương tác kỵ nước) hoặc gián tiếp (ví dụ, thông qua các thành phần liên kết không đồng hóa trị (ví dụ, biotin và avidin), trong đó một thành phần là được liên kết đồng hóa trị với dược chất và thành phần gắn kết bổ thể là liên kết đồng hóa trị với dAbTM). Khi các thành phần gắn kết bổ trợ được sử dụng, một trong các thành phần gắn kết có thể được liên kết đồng hóa trị với dược chất trực tiếp hoặc thông qua gốc liên kết thích hợp, và thành phần gắn kết bổ thể có thể liên kết đồng hóa trị với dAbTM trực tiếp hoặc thông qua gốc nối thích hợp.

Như được sử dụng trong đây, thể dung hợp dAb để chỉ thể dung hợp protein bao gồm dAb và dược chất polypeptit. dAb và dược chất polypeptit có mặt dưới dạng các phần riêng biệt (các gốc) của chuỗi polypeptit đơn liên tục.

Như được sử dụng ở đây, "mảnh" khi sử dụng với polypeptit, là polypeptit có trình tự axit amin giống một phần nhưng không phải là toàn bộ trình tự axit amin của polypeptit nguyên vẹn có trong tự nhiên. Các mảnh có thể "đứng tự do" hoặc nằm trong polypeptit lớn hơn mà chúng tạo ra một phần của nó hoặc một vùng như vùng đơn liên tục trong polypeptit đơn lớn hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ mAbdAb để chỉ kháng thể đơn dòng liên kết với vùng gắn kết khác, cụ thể là vùng biến đổi đơn như kháng thể vùng. mAbdAb có ít nhất hai vị trí gắn kết kháng nguyên, ít nhất một vị trí trong đó là từ kháng thể vùng, và ít nhất một vị trí là từ vùng VH/VL cặp đôi. Các mAbdAb như vậy được mô tả ví dụ trong WO 2009/068649.

Như được sử dụng ở đây, "peptit" để chỉ khoảng 50 axit amin được nối với nhau qua liên kết peptit. Như được sử dụng ở đây, "polypeptit" hoặc "protein" để chỉ ít nhất khoảng 50 axit amin được nối với nhau bằng liên kết peptit. Polypeptit và protein thường bao gồm cấu trúc bậc ba và gấp thành các vùng chức năng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng sợi Fc đơn của kháng thể” để chỉ vùng chuỗi nặng Fc đơn của IgG, như IgG1, IgG2, IgG3, iGG4 hoặc IgG4PE, hoặc kháng thể IgA. Vùng chuỗi nặng Fc đơn có thể bao gồm một hoặc nhiều vùng cố định của kháng thể CH1, CH2 và CH3, ví dụ, tất cả ba vùng cố định của kháng thể hoặc chỉ vùng CH2 và CH3. Ngoài việc bao gồm một hoặc nhiều vùng cố định của kháng thể CH1, CH2 và CH3, vùng chuỗi nặng Fc đơn của kháng thể có thể còn bao gồm vùng bản lề của kháng thể (vùng này thường thấy nằm giữa vùng CH1 và CH2).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chức năng” mô tả polypeptit hoặc peptit có hoạt tính sinh học, như hoạt tính gắn kết đặc hiệu. Ví dụ, thuật ngữ “polypeptit chức năng” bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết kháng nguyên đích thông qua vị trí gắn kết kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, “phối tử đích” để chỉ phối tử mà được gắn kết chọn lọc hoặc đặc hiệu bởi polypeptit hoặc peptit. Ví dụ, khi polypeptit là kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, phối tử đích có thể là kháng nguyên hoặc epitop mong muốn bất kỳ. Sự gắn kết với kháng nguyên đích phụ thuộc vào polypeptit hoặc peptit có chức năng.

Như được sử dụng ở đây, kháng thể để chỉ IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE hoặc mảnh (như Fab, F(ab')₂, Fv, Fv liên kết disulfua, scFv, kháng thể đa đặc hiệu có cấu trúc hình đóng, scFv liên kết disulfua, kháng thể kép) hoặc có nguồn gốc từ loài bất kỳ tự nhiên sinh kháng thể, hoặc được tạo ra bởi kỹ thuật ADN tái tổ hợp; hoặc được tách từ huyết thanh, tế bào B, thể lai, thể chuyển nạp, nấm men hoặc vi khuẩn.

Thuật ngữ “vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch” để chỉ vùng biến đổi của kháng thể (VH, VHH, VL) gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoặc epitop độc lập của vùng hoặc vùng V khác. Vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có thể ở định dạng (ví dụ, đa phân tử đồng nhất hoặc đa phân tử khác loại) với vùng biến đổi khác hoặc vùng biến đổi khác tại đó không đòi hỏi các vùng hoặc vùng này gắn kết kháng nguyên bởi vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (tức là, khi đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết kháng nguyên độc lập với vùng biến đổi bổ sung). “Kháng thể vùng” hoặc “dAb” là giống như “vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch” là thuật ngữ được sử dụng ở đây. “Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn” là

giống như “vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch” là thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này. “Vùng biến đổi đơn của kháng thể” là giống như “vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch” là thuật ngữ được sử dụng trong đây. Theo một phương án, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch là vùng biến đổi người của kháng thể, nhưng cũng bao gồm vùng biến đổi đơn của kháng thể từ các loài khác như dAb loài gặm nhấm (ví dụ, như được bộc lộ trong WO 00/29004, nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), cá nhám và *VHH Camelid*. VHH Camelid là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch polypeptit có nguồn gốc từ các loài bao gồm lạc đà, lạc đà không bướu, lạc đà alpaca, lạc đà một bướu, và lạc đà rừng không bướu, tạo ra chuỗi nặng kháng thể trong tự nhiên không có chuỗi nhẹ. VHH có thể được cải biến phù hợp giống với người. Cũng nằm trong phạm vi sáng chế, dAb của người đã được cải biến sao cho không hoàn toàn giống người, ví dụ cải biến để làm giảm sự kết tụ, bao gồm sự đột biến của các gốc giống nhau là môtip Camelid.

Vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch không được cải biến (tức là dAb không được cải biến), ví dụ dAb gắn kết đích, bao gồm ba vùng xác định bổ thể (CDR) nằm trong cấu trúc khung. Trong đó, trong di truyền học của các chuỗi globulin miễn dịch trong tự nhiên, vùng V kết thúc ở điểm bắt đầu của CDR3, với phần còn lại của CDR3 được tạo ra bởi các vùng D và J (tạo ra thể dung hợp V-D-J), với mục đích của sáng chế, dAb bao gồm tất cả các CDR3 và kết thúc ở gốc 4 của khung ở đầu tận cùng C của nó. dAb VH kết thúc trong các gốc LVTVSS ở đầu tận cùng C của nó. dAb VHH kết thúc ở các gốc VTVSS ở đầu tận cùng C của nó. dAb VL kết thúc trong VEIKR ở đầu tận cùng C của nó.

“dAb cải biến” là dAb như được mô tả ở đây, tùy chọn có sự cải biến làm thay đổi cấu hình ba chiều của đầu tận cùng C của dAb. dAb cải biến bao gồm dAb chứa đoạn thêm ở đầu tận cùng C, đoạn kéo dài hoặc các đuôi và/hoặc một số sự thể đoạn axit amin nhất định như được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (hoặc phân tử bao gồm dAb, ví dụ, mAbdAb) như được mô tả trên có ái lực gắn kết và/hoặc ái lực thấp hơn (ví dụ, có giá trị KD gắn kết với ADA là 150% hoặc hơn (ví dụ 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650% hoặc cao hơn giá trị KD của trình tự tương đương) của kháng thể kháng được chất so với dAb tương đương (hoặc phân tử chứa dAb) mà dAb tương đương có cùng trình tự ngoại trừ việc không có X,

n, p và q là 1 và không có đột biến khung. Điều đó có nghĩa là dAb, ví dụ DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) sau đó được cải biến sao cho nó được nối dài để chứa X, ví dụ, đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C đơn, hoặc được cải biến để loại bỏ serin đầu tận cùng C, hoặc được cải biến bởi sự thế đoạn trong khung của một hoặc nhiều gốc 14, 41, 108, 110 và/hoặc 112 (hoặc cách kết hợp bất kỳ của các cách cải biến) gắn kết với kháng thể kháng dược chất (ADA) với ái lực gắn kết và/hoặc ái lực thấp hơn so với DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) không có cải biến bất kỳ. Điều này được xác định bằng cách cộng hưởng plasmon bề mặt ví dụ trên Biacore™ sử dụng kỹ thuật chuẩn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng giá trị KD càng thấp thì sự gắn kết càng mạnh.

Sáng chế cũng đề xuất dAb được cải biến như được mô tả ở đây để có sự gắn kết với ADA giảm và dAb mà có sự gắn kết giảm với ADA như xác định bởi thử nghiệm xác nhận như mô tả trong Ví dụ 2 và trong đó, dAb cải biến này có % ức chế tín hiệu trung bình nhỏ hơn 90%, ví dụ, nhỏ hơn 80%, ví dụ, nhỏ hơn 70%, ví dụ, nhỏ hơn 60%, ví dụ, nhỏ hơn 50%, ví dụ, nhỏ hơn 40%, ví dụ, nhỏ hơn 30%, ví dụ, nhỏ hơn 20%, ví dụ, nhỏ hơn 10%, so với dAb đối chứng có phần trăm ức chế tín hiệu khoảng 98%-100%, dAb đối chứng này (không được cải biến) có trình tự tương tự hoặc giống nhưng không được cải biến để làm giảm sự gắn kết ADA.

ADA đã có trước đó là ADA đã có ở đối tượng mà sử dụng dược chất này. ADA đã có trước đó có thể có ở đối tượng chưa mắc bệnh (tức là đối tượng chưa từng được sử dụng thuốc này trước đó).

“Vùng” là cấu trúc protein gấp nếp có cấu trúc bậc ba độc lập với phần còn lại của protein. Thông thường, các vùng này chịu trách nhiệm về các đặc tính chức năng riêng biệt của protein, và trong nhiều trường hợp có thể được bổ sung, loại hoặc được truyền đến protein mà không làm mất chức năng của phần còn lại của protein và/hoặc của vùng này. “Vùng biến đổi đơn của kháng thể” là vùng polypeptit gấp nếp chứa các trình tự đặc trưng của vùng biến đổi của kháng thể. Do đó, nó bao gồm vùng biến đổi của kháng thể cạnh tranh và vùng biến đổi cải biến, ví dụ, trong đó một hoặc nhiều đoạn vòng được thay thế bởi các trình tự không đặc trưng của vùng biến đổi của kháng thể, hoặc vùng biến đổi của kháng thể đã bị cắt cụt hoặc bao gồm đoạn nối đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C, cũng như các đoạn gấp nếp của vùng biến đổi giữ được ít nhất hoạt tính gắn kết và tính đặc hiệu của vùng có chiều dài nguyên vẹn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liều lượng” để chỉ lượng thể dung hợp hoặc thể liên hợp được sử dụng cho đối tượng ở một thời điểm (liều đơn vị), hoặc hai hoặc nhiều lần sử dụng với khoảng thời gian xác định. Ví dụ, liều lượng có thể để chỉ lượng thể dung hợp hoặc thể liên hợp sử dụng cho đối tượng trong khoảng thời gian một ngày (24 giờ) (liều hằng ngày), hai ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần hoặc một hoặc nhiều tháng (ví dụ, sử dụng đơn độc, hoặc hai hoặc nhiều lần dùng). Khoảng giãn liều có thể là khoảng thời gian bất kỳ mong muốn.

“Đơn trị” có nghĩa là sự gắn kết với với một epitop.

Thuật ngữ, “thời gian bán rã” để chỉ thời gian cần để nồng độ huyết thanh hoặc huyết tương của thể dung hợp hoặc thể liên hợp giảm xuống 50%, *in vivo*, ví dụ do sự phân hủy và/hoặc thanh thải hoặc cô lập bởi cơ chế tự nhiên. Chế phẩm theo sáng chế là ổn định *in vivo* và thời gian bán thải của chúng tăng do sự gắn kết với phân tử albumin huyết thanh ví dụ albumin huyết thanh người (HSA) chống lại sự phân hủy và/hoặc thanh thải hoặc tách riêng. Các phân tử albumin huyết thanh là protein có trong tự nhiên bản thân chúng có thời gian bán rã *in vivo* dài. Thời gian bán rã của phân tử tăng lên nếu hoạt tính chức năng của nó tiếp tục, *in vivo*, trong gl dài hơn so với phân tử tương tự mà không đặc hiệu với phân tử làm tăng gian bán thải này.

Như được sử dụng ở đây, “kích cỡ thủy động học” để chỉ kích cỡ biểu kiến của phân tử (ví dụ, phân tử protein, phối tử) tính trên thể dung hợp kép của phân tử thông qua dung dịch nước. Sự dung hợp kép, hoặc sự di chuyển của protein qua dung dịch có thể xảy ra để thu được kích cỡ biểu kiến của protein, trong đó cỡ này được đưa ra là “bán kính Stokes” hoặc “bán kính thủy động học” của hạt protein. “Kích cỡ thủy động học” của protein phụ thuộc vào cả khối lượng và hình dạng (cấu hình), sao cho hai protein có khối lượng phân tử giống nhau có cỡ thủy động học khác nhau dựa trên cấu hình tổng thể của protein.

Việc tính toán “độ đồng nhất” hoặc “độ tương đồng” “độ tương đương” giữa hai trình tự (các thuật ngữ này được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả) được thực hiện như sau. Trình tự được sắp xếp với mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trong một hoặc cả hai trình tự axit amin hoặc axit nucleic đầu tiên hoặc thứ hai để sắp xếp tối ưu và các trình tự không đồng nhất có thể bỏ qua với mục đích so sánh). Theo một phương án, chiều dài của trình tự đối chứng

sắp xếp với mục đích so sánh là ít nhất 30%, hoặc ít nhất 40%, hoặc ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, 80%, 90%, 100% chiều dài của trình tự đối chứng. Các gốc axit amin hoặc nucleotit ở các vị trí axit amin tương ứng hoặc các vị trí nucleotit sau đó được so sánh. Khi vị trí trên trình tự đầu tiên bị giữ bởi cùng gốc axit amin hoặc nucleotit là vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, sau đó các phân tử giống hệt ở vị trí này (như được sử dụng ở đây “độ tương đồng” axit amin hoặc axit nucleic là tương đương với “độ đồng nhất” axit amin hoặc axit nucleic). Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là một hàm của số vị trí giống nhau chung giữa các trình tự, được tính toán bởi số đoạn trống, và chiều dài của mỗi đoạn trống, các đoạn này cần được đưa vào để sắp xếp tối ưu hai trình tự này. Sắp xếp trình tự axit amin và nucleotit và độ tương đồng, độ tương đương hoặc độ đồng nhất, như được xác định ở đây có thể được thực hiện và xác định bởi thuật toán BLAST 2 Sequences, sử dụng các thông số mặc định (Tatusova, T. A. *et al.*, *FEMS Microbiol Lett*, 174:187-188 (1999)).

Sáng chế đề xuất axit nucleic tách và/hoặc tái tổ hợp mã hóa các được phẩm theo sáng chế được mô tả ở đây.

Axit nucleic nêu trong đây là “tách” là axit nucleic được phân tách từ nguyên liệu khác (ví dụ, axit nucleic khác như ADN hệ gen, ADN bổ trợ và/hoặc ARN) trong môi trường gốc của nó (ví dụ, trong tế bào hoặc trong hỗn hợp axit nucleic như thư viện). Axit nucleic tách có thể được phân tách là một phần của vectơ (ví dụ, plasmit).

Axit nucleic nêu trong đây là “tái tổ hợp” là axit nucleic được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp, bao gồm phương pháp dựa trên phương pháp tái tổ hợp nhân tạo, như tách dòng vào trong vectơ hoặc nhiễm sắc thể bằng, ví dụ, enzym giới hạn, tái tổ hợp tương đồng, virut và tương tự, và axit nucleic được điều chế bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR - polymerase chain reaction).

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp, ví dụ, của động vật có vú hoặc vi khuẩn, bao gồm (một hoặc nhiều) axit nucleic hoặc cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp bao gồm (các) axit nucleic mã hóa hợp chất theo sáng chế như được mô tả ở đây, ví dụ, dAb cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp bào chế hợp chất theo sáng chế như được mô tả ở đây, bao gồm bước duy trì tế bào chủ tái tổ hợp, ví dụ, động vật có vú hoặc vi khuẩn, theo sáng chế trong điều kiện thích

hợp để biểu hiện thể dung hợp polypeptit. Phương pháp này có thể bao gồm bước tách hoặc thu hồi thể dung hợp, nếu muốn.

Ví dụ, phân tử axit nucleic (tức là, một hoặc nhiều phân tử axit nucleic) mã hóa phân tử theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp để tạo ra tế bào chủ tái tổ hợp bằng phương pháp bất kỳ thích hợp với tế bào chủ được chọn (ví dụ, biến nạp, chuyển nạp, điện thấm, chuyển nhiễm), sao cho (các) phân tử axit nucleic được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố kiểm soát biểu hiện (ví dụ, trong vector, trong cấu trúc được tạo ra bởi các quy trình trong tế bào, kết hợp vào trong genom tế bào chủ). Tế bào chủ tái tổ hợp thu được có thể được duy trì trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện (ví dụ, trong sự có mặt của tác nhân gây cảm ứng, ở động vật thích hợp, trong môi trường nuôi cấy thích hợp với muối thích hợp, yếu tố tăng trưởng, kháng sinh, chất bổ sung dinh dưỡng, v.v.), bằng cách đó peptit hoặc polypeptit mã hóa được tạo ra. Nếu muốn, peptit hoặc polypeptit mã hóa có thể được tách hoặc thu hồi (ví dụ, từ động vật, tế bào chủ, môi trường, sữa). Quy trình này bao gồm sự biểu hiện tế bào chủ của động vật biến đổi gen (xem, ví dụ, WO 92/03918, GenPharm International).

Các phân tử theo sáng chế như được mô tả ở đây cũng có thể được đưa vào trong hệ biểu hiện *in vitro* thích hợp, ví dụ, bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng phương pháp thích hợp khác bất kỳ.

Như được mô tả và minh họa trong bản mô tả này, các phân tử theo sáng chế thường gắn kết với phối tử đích của chúng với ái lực cao.

Các phân tử theo sáng chế, ví dụ, dAb cải biến với sự gắn kết giảm với ADA, có thể được biểu hiện trong *E. coli* hoặc trong loài *Pichia* (ví dụ, *P. pastoris*). Theo một phương án, dAb được tiết ra trong *E. coli* hoặc trong loài *Pichia* (ví dụ, *P. pastoris*); hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú (ví dụ, CHO, hoặc tế bào HEK 293). Mặc dù, các phân tử này được mô tả ở đây có thể được tiết ra khi được biểu hiện trong tế bào *E. coli* hoặc ở loài *Pichia* hoặc động vật có vú, chúng có thể được tạo ra bằng phương pháp thích hợp bất kỳ như phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp sản xuất sinh học mà không dùng loài *E. coli* hoặc *Pichia*. Theo một phương án, axit nucleic mã hóa dAb theo sáng chế, ví dụ, dAb TNFR1 được mô tả ở đây, có thể được tách dòng vào vector biểu hiện thích hợp, ví dụ, Pave011 (từ Fujifilm Diosynth) và sau đó biểu hiện trong vector vi khuẩn như *E. coli*.

Theo một phương án sáng chế, dAb, ví dụ VH, VL hoặc VHH, có thể được cải biến để ngăn cản sự gắn kết với ADA sao cho sự điều biến bao gồm đoạn đánh dấu có mặt ở đầu tận cùng C. Đoạn đánh dấu này có thể có mặt là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với phân tử này. Đoạn đánh dấu có thể là đoạn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ các đoạn đánh dấu ái lực như các đoạn đánh dấu myc-, các đoạn đánh dấu FLAG, các đoạn đánh dấu his, được cải biến hóa học như PEG, hoặc vùng protein như kháng thể vùng Fc. Cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử theo sáng chế kéo dài bởi đoạn đánh dấu, được cải biến hóa học hoặc vùng protein để sử dụng theo phương pháp làm giảm tác dụng phụ như được xác định rõ hơn trong đây.

Theo phương án khác, sáng chế cũng đề xuất phân tử, ví dụ, dAb (như VH hoặc VL hoặc VHH) bao gồm khung cải biến làm giảm sự gắn kết của ADA đã có trước đó, ví dụ dAb (như VHH, VH hoặc VL) bao gồm sự thể đoạn axit amin ở vị trí bất kỳ 14, 41, 108, 110, hoặc 112. Ví dụ, các sự thể đoạn có thể là một hoặc nhiều cải biến được chọn từ: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, L108 Q, T110A và S112A.

Theo một khía cạnh của phương án này, dAb (ví dụ, VHH, VH hoặc VL) bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, T110A và S112A; và có thể còn bao gồm đoạn kéo dài, đoạn thêm, sự khuyết đoạn hoặc các đoạn đánh dấu ở đầu tận cùng C bất kỳ như được mô tả trên.

Theo một phương án, dAb (ví dụ, VHH, VH hoặc VL) bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ: P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A và S112A cũng bao gồm đoạn axit amin kéo dài ở đầu tận cùng C của dAb được chọn từ: (a) alanin, hoặc (b) trình tự axit amin bao gồm hoặc gồm có đoạn kéo dài được chọn từ: AS, AST, ASTK, ASTKG, hoặc ASTKGP. Ngoài ra, phân tử dAb được mô tả ở đây và dược phẩm bao gồm các phân tử này có thể hữu dụng trong phòng hoặc giảm tác dụng phụ. Sự gắn kết của kháng thể kháng được chất bởi dAb có thể dẫn đến việc hai dAb được đưa lại cùng nhau. Trong một số trường hợp, điều này có thể dẫn đến vấn đề về an toàn. Ví dụ, nếu đích của dAb là thụ thể hoặc đích đa phân tử, việc đưa cùng nhau hai dAb có thể đưa hai đích cùng nhau. Điều này dẫn đến những ảnh hưởng dược lý không mong muốn, ví dụ chủ vận hơn là đối kháng, ví dụ thông qua sự dime hóa thụ thể. Do đó, sáng chế đề xuất việc sử dụng các phân tử theo sáng chế trong phương pháp phòng ngừa tác dụng phụ. Sự phòng ngừa có nghĩa là việc sử dụng phân tử theo sáng chế để loại bỏ sự gắn kết ở mức cạnh tranh hoặc một phần sự gắn kết của kháng

thể kháng được chất đã có từ trước so với phân tử tương đương không được cải biến. Việc giảm gắn kết ADA dẫn tới sự giảm mức hiệu lực được lý không mong muốn. Do đó, phân tử theo sáng chế có thể có profin an toàn tăng cường và tác dụng phụ ít hơn so với các phân tử không được cải biến, ví dụ, dAb không được cải biến, phân tử này không bao gồm đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng, đoạn thêm, sự khuyết đoạn hoặc đoạn đánh dấu và/hoặc các biến đổi khung khác, làm giảm sự gắn kết với ADA đã có trước đó. Tương tự, việc sử dụng các phân tử cải biến được mô tả ở đây hoặc được phẩm chứa các phân tử cải biến này (có khả năng gắn kết giảm với ADA đã có trước đó) có thể dẫn đến tính sinh miễn dịch biến đổi, điều này là do khi các phân tử không được cải biến gắn kết với ADA, chúng tạo ra phức miễn dịch và sau đó các phức miễn dịch như vậy có thể tạo ra một đáp ứng miễn dịch. Ngoài việc sử dụng các phân tử cải biến được mô tả ở đây hoặc được phẩm chứa các phân tử cải biến này cũng có thể tạo ra hiệu lực cải thiện và profin an toàn được cải thiện và ví dụ có thể được sử dụng thuận lợi với liều lặp lại cho bệnh nhân có thể phát triển thể tự kháng kháng các phân tử không được cải biến. Ngoài ra, các phân tử dAb theo sáng chế có khả năng được sử dụng cho nhóm bệnh nhân không có nhu cầu thử nghiệm trước về chuẩn độ ADA để loại bỏ các đối tượng có nguy cơ có phản ứng bất lợi. Trong phạm vi sử dụng các phân tử để phòng ngừa tác dụng phụ, sáng chế đề xuất việc sử dụng vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn như xác định trong đây trong đó X được thay thế bởi Y, trong đó Y được chọn từ nhóm gồm có: đoạn đánh dấu như đoạn đánh dấu ái lực, đoạn đánh dấu myc, đoạn đánh dấu FLAG hoặc đoạn đánh dấu his, cải biến hóa học như nhóm PEG, hoặc protein, như phần Fc của kháng thể.

Sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc giảm tác dụng phụ trong chế độ điều trị bằng cách sử dụng các phân tử theo sáng chế, hoặc các phân tử theo sáng chế trong đó X được thay thế bởi Y như xác định trên. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cải biến phân tử như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA và làm giảm tác dụng phụ.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm các phân tử cải biến như được mô tả ở đây, ví dụ, chế phẩm bao gồm VHH, VH hoặc VL cải biến. Các được phẩm như vậy có thể bao gồm các phân tử cải biến là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với các phân tử khác, ví dụ protein, phân tử kháng thể hoặc mảnh kháng nguyên khác. Ví dụ, dAb có thể là dAb được định dạng (ví dụ, dAb có thể là thể dung hợp dAb-fc hoặc thể

liên hợp như mô tả trong ví dụ WO 2008/149148) hoặc nó có thể là mAbdAb (như mô tả trong WO 2009/068649) hoặc dAb có thể là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với protein hoặc polypeptit kéo dài thời gian bán rã ví dụ, dAb khác, ví dụ, dAb gắn kết với albumin huyết thanh (AlbudAb™) hoặc ví dụ, với polyetylen glycol PEG hoặc phân tử hoạt tính hoặc phân tử dược chất khác. Theo phương án này, (các) phân tử dược chất) khi là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với dAb (ví dụ, VHH, VH hoặc VL) có thể được liên kết với hoặc là đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C của dAb hoặc đầu tận N của dAb. Theo một phương án, một hoặc nhiều phân tử dược chất là thể dung hợp (hoặc thể liên hợp) ở đầu tận cùng N của dAb.

Theo một phương án, dAb theo sáng chế (và các phân tử bao gồm dAb như các mAbdAb cũng nằm trong phạm vi sáng chế) có khả năng gắn kết giảm với ADA gắn kết với phối tử đích với ái lực cao, ví dụ, chúng có trị số KD như đo bởi cộng hưởng plasmon bề mặt bằng Biacore™ trong vùng 5 micromol đến khoảng 1pM, ví dụ khoảng 500nM đến 10pM, ví dụ khoảng 200nM đến 10pM, ví dụ từ 50nM đến 10pM, ví dụ từ khoảng 10nM đến 10pM. Theo một phương án, phân tử này có trị số KD nằm trong khoảng từ 10nM đến 10-30pM, ví dụ, chúng có thể là dAb TNFR1 với sự gắn kết giảm với ADA và có trị số KD nằm trong khoảng từ 10-30pM, ví dụ khoảng 20pM.

Theo một phương án, các dAb theo sáng chế (và các phân tử bao gồm dAb như mAbdAb cũng nằm trong phạm vi sáng chế) có khả năng giảm sự gắn kết với các ADA có thể có mức biểu hiện ít nhất là 3%, ví dụ 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% của mức biểu hiện được thể hiện bởi dAb có trình tự axit amin giống hoặc tương tự không được cải biến như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA. Theo phương án tiếp theo, các phân tử theo sáng chế (ví dụ dAb và các phân tử bao gồm dAb như mAbdAb) có khả năng gắn kết giảm với ADA có thể có các mức biểu hiện ít nhất là 0,1g/lít.

Theo một phương án, dAb theo sáng chế (và các phân tử bao gồm dAb như mAbdAb cũng nằm trong phạm vi sáng chế) đã giảm khả năng gắn kết với ADA có giá trị KD gắn kết với kháng nguyên đích của chúng là cao hơn khoảng 50 lần (hoặc hơn) (tức là, dAb có hiệu lực kém 50 lần), ví dụ, cao hơn khoảng 40, khoảng 30 lần, khoảng 20 lần, khoảng 10 lần, khoảng 5 lần, cao hơn khoảng 4 lần so với trị số KD của dAb có trình tự axit amin giống hoặc tương tự không được cải biến như được mô tả ở

đây để giảm sự gắn kết ADA. Theo một phương án, dAb theo sáng chế (và các phân tử bao gồm dAb như mAbdAb cũng nằm trong phạm vi sáng chế) có khả năng giảm sự gắn kết các ADA có trị số KD với kháng nguyên đích của chúng về cơ bản giống (ví dụ, cao hơn khoảng 2 lần đến mức thấp hơn khoảng 2 lần) hoặc thấp hơn hơn 2 lần so với trị số KD của dAb có trình tự axit amin giống hoặc tương tự không được cải biến như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng, chế phẩm, dược phẩm bao gồm các phân tử kéo dài và/hoặc được cải biến đầu tận cùng C và cũng đề cập đến phương pháp sản xuất và biểu hiện các phân tử này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dAb (VH, VL, hoặc VHH) có các cải biến ở đầu tận cùng C như được mô tả trên và gắn kết với đích được chọn từ: TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, albumin, và TGF β R2.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dAb được mô tả hoặc bộc lộ trong tài liệu bất kỳ trong số sau đây: WO 2007/049017 (ví dụ, dAb kháng TNFR1 ký hiệu là 2H-131-511 hoặc dAb giống ít nhất 80% với nó (ví dụ, giống 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%), WO 2008/149144 (ví dụ, dAb kháng TNFR1 được chọn từ: 1h-131-201, 1h-131-202, 1h-131-203, 1h-131-204, 1h-131-205 hoặc dAb giống ít nhất 80% với nó (ví dụ, giống 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) và WO 2008/149148 (nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), ví dụ, dAb kháng TNFR1 bất kỳ trong đây; và dAb còn bao gồm ít nhất một trong các cải biến được mô tả ở đây để làm giảm ái lực gắn kết và/hoặc ái lực kháng ADA, ví dụ, các cải biến ở đầu tận cùng C bất kỳ như được mô tả trên và/hoặc sự thể đoạn axit amin và/hoặc sự khuyết đoạn bất kỳ như được mô tả trên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dAb không được cải biến được mô tả hoặc bộc lộ theo tài liệu bất kỳ trong số WO 2007/049017, WO 2008/149144, và WO 2008/149148 (ví dụ, trình tự dAb bất kỳ được mô tả ở đây), và dAb sau đó được cải biến để chứa một hoặc nhiều cải biến khung ví dụ được chọn từ: đột biến khung P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A và S112A và cũng có thể còn bao gồm các cải biến ở đầu tận cùng C bất kỳ được mô tả ở đây. Theo một ví dụ, dAb không được cải biến có thể là trình tự dAb kháng TNFR1 được mô tả hoặc bộc lộ theo tài liệu bất

kỳ trong số WO 2007/049017, WO 2008/149144, và WO 2008/149148. Theo một phương án, trình tự dAb không được cải biến kháng TNFR1 có thể là trình tự giống ít nhất 80% (ví dụ, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) với trình tự dAb được xác định hoặc là DOM1h-131-206 (được bộc lộ trong WO 2008/149148), DOM 1h-131-511 (được bộc lộ trong WO 2007/049017 và 2008/149144) và DOM 1h-131-202 (được bộc lộ trong WO 2008/149144).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dAb VEGF được mô tả hoặc bộc lộ trong WO 2008/149147, ví dụ, dAb ký hiệu là 15-26-593 (trình tự axit amin nêu trong Fig.5 của WO 2008/149147), (nội dung được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), và dAb còn bao gồm cải biến bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm ái lực gắn kết và/hoặc ái lực với ADA, ví dụ, các cải biến ở đầu tận cùng C bất kỳ như được mô tả trên và/hoặc sự thiếu đoạn axit amin và/hoặc sự khuyết đoạn bất kỳ như được mô tả trên.

Trình tự axit amin dAb không được cải biến là như sau:

(a) DOM 1H-131-206

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO 1)

(b) DOM 1H-131-511

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPVVGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO 2)

(c) DOM 1H-131-202

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO 3)

(d) Dòng VHH 2(d):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPGKGREL
 VAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA
 FITTESDYDLGRRYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP
 GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
 VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT
 VSS

(SEQ ID NO 4)

(e) Dòng VHH 2(e):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEW
 VSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
 ARSPSGFNRGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL
 SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT
 ISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
 GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAP
 GKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPED
 TAVYYCARSPSGFNRGQGLVTVSS

(SEQ ID NO 5)

(f) Dòng VHH 2(f)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGREL
 AAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLV
 QPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYY
 PDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGR
 VRTLPSYTFWGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO 6)

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dAb VHH cải biến được chọn từ các
 trình tự sau:

(a) Dòng VHH 2(d)+A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPGKGREL
 VAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA

FITTESDYDLGRRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP
GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS
VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT
VSSA

(SEQ ID NO 7)

(b) Dòng VHH 2(e)+A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEW
VSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
ARSPSGFNRGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL
SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFT
ISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAP
GKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED
TAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSA

(SEQ ID NO 8)

(c) Dòng VHH 2(f)+A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGREL
AAISRTGGSTYYPDSEVGRFTISRDNAKRMVYLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLV
QPGGSLRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYY
PDSEVGRFTISRDNAKRMVYLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGR
VRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA

(SEQ ID NO 9)

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dAb DOM1h-131-206 cải biến gắn kết với TNFR1 và được chọn từ trình tự axit amin sau:

(a) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSA

(SEQ ID NO 16)

- (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn và a Đoạn đột biến khung P14A:

EVQLLES GGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSA

(SEQ ID NO 17)

- (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn đột biến khung P14A:

EVQLLES GGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO 18)

- (d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS**ASTKG**

(SEQ ID NO 19)

- (e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG và đoạn đột biến khung P14A

EVQLLES GGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEW
VSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHC
ALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS**ASTKG**

(SEQ ID NO 20)

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hóa các phân tử được mô tả ở đây, ví dụ, axit nucleic mã hóa dAb kháng TNFR1 được mô tả trên. Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ, ví dụ, tế bào chủ không phải là phôi, ví dụ, tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình như E. coli hoặc tế bào chủ nấm men hoặc tế bào động vật có vú bao gồm các axit nucleic này.

Sáng chế còn đề xuất dAb có sự gắn kết giảm với ADA trong huyết thanh người (ví dụ, không gắn kết với ADA đã có trước đó trong huyết thanh người) và trong đó, epitop trên dAb mà ADA gắn kết vào được che giấu (tức là, epitop này không sẵn sàng để gắn kết với ADA như, ví dụ, nó được bao phủ hoặc che giấu bởi phân tử khác gây cản trở sự gắn kết hoặc cấu hình không gian của nó đã bị thay đổi để ngăn cản sự gắn kết). Epitop trên dAb có thể được che giấu bằng sự cải biến bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết ADA, ví dụ, bổ sung gốc hóa học vào đầu tận cùng C của dAb hoặc bằng sự thể đoạn khung, hoặc sự khuyết đoạn như được mô tả ở đây. Gốc hóa học được bổ sung vào đầu tận cùng C của dAb có thể là đoạn kéo dài (ví dụ, đoạn axit amin kéo dài) hoặc đoạn đánh dấu hoặc nó có thể là sự cải biến hóa học như pegyl hóa hoặc amit hóa. Sự cải biến với đầu tận cùng C có thể là cải biến hoặc thay đổi trực tiếp hoặc gián tiếp cấu hình của epitop trên dAb gắn kết với ADA, bằng cách đó làm giảm khả năng của dAb gắn kết với ADA.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong sẽ hiểu rằng, khi tạo ra phân tử như được mô tả ở đây, ví dụ, dAb, phụ thuộc vào dòng tế bào sử dụng và cụ thể là trình tự axit amin của phân tử, ví dụ dAb, các cải biến sau dịch mã có thể xảy ra. Ví dụ, việc này có thể bao gồm sự cắt một số trình tự dẫn đầu, việc bổ sung các gốc đường khác nhau trong các mẫu glycosyl hóa và phosphoryl hóa khác nhau, khử amit hóa, oxy hóa, liên kết disulfua xáo trộn, đồng phân hóa, cắt lysin ở đầu tận cùng C, và đóng vòng glutamin có đầu tận cùng N. Sáng chế bao gồm việc sử dụng các phân tử này, ví dụ dAb, được đưa vào, hoặc trải qua, một hoặc nhiều sự cải biến sau dịch mã. Do đó, dAb theo sáng chế bao gồm dAb đã trải qua sự cải biến sau dịch mã như mô tả như sau: glycosyl hóa kháng thể ở các vị trí bảo tồn trong vùng cố định của chúng được thấy là có hiệu quả rõ rệt trên chức năng kháng thể, cụ thể là chức năng hiệu ứng, xem ví dụ, Boyd et al. (1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318. Các biến thể glycosyl hóa của protein gắn kết kháng nguyên theo sáng chế trong đó một hoặc nhiều gốc carbohydrat được bổ sung, thay thế, loại bỏ hoặc được cải biến được dự tính trong sáng chế. Việc đưa motif asparagin-X-serin hoặc asparagin-X-threonin tạo ra vị trí tiềm năng để gắn các gốc cacbonhydrat bởi enzym và do đó có thể được sử dụng để điều khiển sự glycosyl hóa kháng thể. Trong Raju et al. (2001) *Biochemistry* 40: 8868-8876, sự sialy hóa tận cùng phân tử kết dính miễn dịch TNFR-IgG được tăng lên qua quy trình galactosyl hóa lại và/hoặc sialyl hóa lại bằng beta-1,4-galactosyltransferase

và/hoặc alpha, 2,3 sialyltransferaza. Sự tăng sialyl hóa tận cùng được cho là làm tăng thời gian bán rã của globulin miễn dịch. Kháng thể, thông thường với phần lớn glycoprotein, đặc trưng được tạo ra là hỗn hợp dạng glyco. Hỗn hợp này đặc biệt rõ ràng khi kháng thể được tạo ra trong tế bào có nhân điển hình, đặc biệt là tế bào động vật có vú. Một loạt các phương pháp đã được phát triển để sản xuất các dạng glyco đã xác định, xem Zhang et al. (2004) Science 303: 371; Sears et al. (2001) Science 291: 2344; Wacker et al. (2002) Science 298: 1790; Davis et al. (2002) Chem. Rev. 102: 579; Hang et al. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727. Kháng thể (ví dụ, của IgG isotyp, ví dụ, IgG1) như được mô tả ở đây có thể bao gồm một số lượng xác định (ví dụ, 7 hoặc ít hơn, ví dụ 5 hoặc ít hơn, như hai hoặc một) dạng glyco; phản ứng khử amit là một phản ứng xúc tác enzym chủ yếu chuyển hóa asparagin (N) thành axit iso-aspartic và axit aspartic (D) với tỷ lệ khoảng 3:1. Với mức độ thấp hơn nhiều, phản ứng khử amit có thể xảy ra với gốc glutamin theo cách tương tự. Việc khử amit trong CDR gây ra sự thay đổi điện tích của phân tử, nhưng không gây ra sự thay đổi về sự gắn kết kháng nguyên, cũng như không ảnh hưởng đến PK/PD; sự oxy hóa có thể xảy ra trong quá trình sản xuất và bảo quản (tức là, có các điều kiện oxy hóa) và gây ra cải biến đồng hóa trị protein, thúc đẩy hoặc trực tiếp bởi các loại oxy hoạt động hoặc gián tiếp bởi phản ứng với sản phẩm phụ thứ hai của sự mất cân bằng oxy hóa. Sự oxy hóa xảy ra về cơ bản là với gốc metionin, nhưng đôi khi có thể xảy ra ở gốc tryptophan và gốc xystein tự do; sự xáo trộn liên kết disulfua có thể xảy ra trong điều kiện sản xuất và bảo quản cơ bản. Trong một số trường hợp, liên kết disulfua có thể gãy hoặc tạo ra không chính xác, khiến cho các gốc xystein không cặp đôi được (-SH). Các sulfhydryl (-SH) tự do (không cặp đôi) có thể thúc đẩy sự xáo trộn; Sự đồng phân hóa đặc trưng xảy ra trong quá trình sản xuất, tinh chế, và bảo quản (ở độ pH axit) và thường xảy ra khi axit aspartic được chuyển hóa thành axit isoaspartic thông qua quá trình hóa học; glutamin tận cùng N trong chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có khả năng tạo ra pyroglutamat (pGlu). Đa phần sự hình thành pGlu xảy ra trong phản ứng sinh học điều chế, nhưng nó có thể được tạo ra mà không phải do enzym, phụ thuộc vào độ pH và nhiệt độ xử lý và các điều kiện bảo quản. Sự hình thành pGlu được coi là một trong những chu trình thoái hóa chính của mAb tái tổ hợp; sự cắt lysin có đầu tận cùng C là phản ứng enzym được xúc tác bởi carboxypeptidaza, và thường được quan sát thấy trong mAb tái tổ hợp. Các dạng thay đổi của quy trình này bao gồm sự loại lysin khỏi

một hoặc cả hai chuỗi nặng. Sự cắt lysin dường như không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và không có hiệu quả trên chức năng hiệu ứng mAb.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra phân tử theo sáng chế bao gồm đoạn axit amin kéo dài dưới dạng thể dung hợp trực tiếp, phương pháp này bao gồm bước duy trì tế bào chủ như được mô tả ở trên chứa axit nucleic và/hoặc cấu trúc tái tổ hợp mã hóa thể dung hợp theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện axit nucleic tái tổ hợp này, bằng cách đó tạo ra thể dung hợp.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm các phân tử cải biến theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất được phẩm theo sáng chế để sử dụng làm thuốc, ví dụ sử dụng để điều trị hoặc phòng, ví dụ bệnh hoặc tình trạng hoặc rối loạn và bao gồm sử dụng cho cá thể này lượng có hiệu quả điều trị của được phẩm theo sáng chế. Thông thường, các phân tử theo sáng chế sẽ được sử dụng ở dạng đã tinh chế cùng với chất mang được dụng hoặc tương thích sinh lý. Cụ thể, các chất mang có thể bao gồm dung dịch nước hoặc rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù, môi trường nước muối và/hoặc đệm bất kỳ. Tá dược lỏng dùng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer dextroza, dextroza và natri clorua và Ringer lactat. Tá dược tương thích sinh lý thích hợp, nếu cần thiết để duy trì phức polypeptit trong huyền phù, có thể được chọn từ các chất làm đặc như carboxymethylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, gelatin và alginat. Tá dược lỏng dùng trong tĩnh mạch bao gồm chất lỏng và chất đệm dinh dưỡng và chất đệm điện phân, như các chất đệm cơ bản là Ringer dextroza. Chất bảo quản và phụ gia khác, như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, tác nhân chelat hóa và khí trơ, cũng có thể có trong chế phẩm (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition). Nhiều chế phẩm thích hợp có thể được sử dụng bao gồm các chế phẩm giải phóng kéo dài.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị (phòng ngừa hoặc điều trị) cho bệnh nhân hoặc đối tượng có bệnh hoặc rối loạn, như được mô tả ở đây, và bao gồm cho đối tượng này sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu của được phẩm theo sáng chế.

Được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các phân tử hoặc các gốc khác, ví dụ, polypeptit, protein điều trị và/hoặc phân tử (ví dụ, protein khác (bao gồm kháng thể), peptit, hoặc được chất phân tử nhỏ.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm theo sáng chế bao gồm dAb VH hoặc VL kháng TNFR1 cải biến như được mô tả ở đây, ví dụ, dAb VH hoặc VL kháng TNFR1 được mô tả ở đây, hoặc các vùng VHH kháng TNFR1 cải biến như được mô tả ở đây, để sử dụng điều trị các bệnh viêm hoặc rối loạn, ví dụ bệnh vẩy nến, viêm khớp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm ruột (ví dụ) bệnh Crohn và bệnh viêm ruột kết mạn loét; hoặc ví dụ bệnh hoặc rối loạn đường hô hấp hoặc phổi, ví dụ, được chọn từ: bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, viêm phế quản mạn tính, viêm phế quản tắc nghẽn mạn tính và khí thũng, viêm phổi, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen, bệnh viêm phổi, bệnh viêm phổi quá mẫn, thâm nhiễm phổi với bạch cầu ưa eosin, bệnh phổi môi trường, bệnh viêm phổi, chứng giãn phế quản, xơ nang, bệnh kẽ phổi, bệnh cao huyết áp phổi nguyên phát, bệnh huyết khối tắc mạch, bệnh màng phổi, bệnh trung thất, bệnh cơ hoành, chứng giảm thông khí, chứng tăng thông khí, chứng ngưng thở khi ngủ, hội chứng suy hô hấp cấp, u trung biểu mô, sacôm, phản ứng thải ghép, bệnh thể chủ thải ghép, bệnh ung thư phổi, bệnh viêm mũi dị ứng, dị ứng, bệnh bụi amiăng, u nấm phổi *Aspergillus*, bệnh nấm *Aspergillus*, chứng giãn phế quản, viêm phế quản mạn, khí thũng, bệnh viêm phổi ưa eosin, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn, bệnh cúm, bệnh vi khuẩn myco không phải là lao, tràn dịch màng phổi, bệnh bụi phổi, nhiễm nấm pneumocytosis, bệnh viêm phổi, bệnh phổi do nấm *actinomyces*, bệnh tích protein mô phế nang phổi, bệnh than ở phổi, phù phổi, vật nghẽn mạch phổi, bệnh viêm phổi, mô bào huyết phổi X, cao huyết áp phổi, bệnh vi sinh vật *Nocardia* phổi, bệnh lao phổi, bệnh tắc tĩnh mạch phổi, bệnh phổi dạng thấp, bệnh sarcoid, và bệnh u hạt Wegener và tổn thương phổi cấp tính (ALI) và cũng như hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS) và các biến chứng của bệnh này như tổn thương thận cấp tính.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng được phẩm theo sáng chế chứa dAb kháng TNFR1 (VH, VL hoặc VHH) cải biến như được mô tả ở đây, để sản xuất thuốc điều trị bệnh hoặc rối loạn cụ thể bất kỳ được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng được phẩm bất kỳ được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị, chẩn đoán hoặc phòng ngừa bệnh viêm hoặc rối loạn bất kỳ hoặc bệnh hoặc rối loạn đường hô hấp hoặc phổi như được mô tả trên. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng được phẩm bất kỳ được mô tả ở đây để phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn viêm bất kỳ hoặc bệnh hoặc rối loạn đường hô hấp hoặc phổi được mô tả trên.

Chế phẩm chứa dAb kháng TNFR1 như được mô tả ở đây, ví dụ DOM 1H-131-206 với đoạn kéo dài analin ở đầu tận cùng C, có thể được sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh và được sử dụng ở dạng "liều điều trị hữu hiệu". Các lượng cần để đạt được liều này phụ thuộc vào mức độ trầm trọng của bệnh và trạng thái tổng thể của hệ miễn dịch của bệnh nhân, nhưng thường nằm trong khoảng từ 0,005 đến 5,0mg dAb trên mỗi kilogram thể trọng, với các liều 0,05 đến 2,0mg/kg/liều thường được sử dụng. Để phòng ngừa, có thể sử dụng các liều tương đương hoặc thấp hơn một chút, để phòng ngừa, ức chế hoặc làm chậm sự xuất hiện bệnh (ví dụ, để duy trì sự miễn nhiễm hoặc tình trạng không hoạt động, hoặc để phòng pha cấp tính). Các chuyên gia lâm sàng có thể xác định được khoảng giãn liều thích hợp để điều trị, ức chế hoặc phòng bệnh. Khi dAb kháng TNFR1 như được mô tả ở đây được sử dụng để điều trị, ức chế hoặc phòng bệnh viêm mạn tính, nó có thể được sử dụng đến bốn lần mỗi ngày, hai ngày mỗi tuần, một lần mỗi tuần, một lần mỗi hai tuần, một lần mỗi tháng, hoặc một lần mỗi hai tháng, với liều lượng, ví dụ, từ khoảng 10µg/kg đến 80mg/kg, từ khoảng 100µg/kg đến 80mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 80mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 70mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 60mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 50mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 40mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 30mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 20mg/kg, từ khoảng 1mg/kg đến 10mg/kg, từ khoảng 10µg/kg đến 10mg/kg, từ khoảng 10µg/kg đến 5mg/kg, từ khoảng 10µg/kg đến 2,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg, khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg hoặc khoảng 10mg/kg. Theo các phương án cụ thể, dAb kháng TNFR1 có thể được sử dụng để điều trị để điều trị, ức chế hoặc phòng ngừa bệnh viêm mạn tính một lần mỗi hai tuần hoặc một lần một tháng với liều khoảng 10µg/kg đến khoảng 10mg/kg (ví dụ, khoảng 10µg/kg, khoảng 100µg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 3mg/kg, khoảng 4mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 6mg/kg, khoảng 7mg/kg, khoảng 8mg/kg, khoảng 9mg/kg hoặc khoảng 10mg/kg.)

Việc điều trị hoặc trị liệu được thực hiện bằng cách sử dụng các dược phẩm được mô tả ở đây được coi là "có hiệu quả" nếu một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu bị suy giảm hoặc nhẹ bớt (ví dụ, ít nhất 10% hoặc ít nhất một điểm trong thang điểm đánh giá lâm sàng), tương ứng với các triệu chứng biểu hiện trước khi điều trị, hoặc tương ứng với các triệu chứng này ở đối tượng (người hoặc động vật) không

được điều trị bằng chế phẩm hoặc đối chứng thích hợp khác. Các triệu chứng rõ ràng sẽ thay đổi phụ thuộc vào tình trạng thực tế của bệnh hoặc rối loạn cần điều trị, nhưng có thể được đánh giá bởi kỹ thuật viên hoặc bác sỹ lâm sàng.

Tương tự, sự phòng bệnh được thực hiện bằng cách sử dụng được phẩm như được mô tả ở đây là “có hiệu quả” nếu sự khởi phát hoặc mức trầm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu được làm chậm lại, suy giảm hoặc biến mất so với các triệu chứng ở cá thể tương tự (người hoặc động vật) không được điều trị bằng chế phẩm này.

Các phân tử theo sáng chế còn có thể được định dạng để có kích cỡ thủy động học lớn hơn để kéo dài thời gian bán rã, ví dụ, bằng cách gắn với nhóm PEG, albumin huyết thanh, transferrin, thụ thể transferrin hoặc ít nhất phần gắn kết transferrin của nó, vùng kháng thể Fc, hoặc bằng cách liên hợp với kháng thể vùng. Ví dụ, dAb gắn kết albumin huyết thanh có thể được định dạng thành mảnh gắn kết kháng nguyên lớn hơn của kháng thể (ví dụ, được định dạng là Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm theo sáng chế chứa phối tử đặc hiệu kép hoặc phối tử đa đặc hiệu bao gồm dAb đầu tiên được cải biến theo sáng chế, ví dụ bằng đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng và/hoặc bằng đoạn đột biến khung P14A và dAb thứ hai có tính đặc hiệu giống hoặc khác với dAb đầu tiên và tùy chọn trong trường hợp phối tử đa đặc hiệu là dAb khác nữa. dAb thứ hai (hoặc dAb khác nữa) tùy chọn có thể gắn kết đích khác và có thể tùy chọn cũng bao gồm đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng và/hoặc đoạn đột biến khung P14A theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử và được phẩm theo sáng chế để phân phối qua đường ngoài tiêu hóa, ví dụ, qua đường tiêm dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch, xông hít, phân phối tại mũi, phân phối qua niêm mạc, đường miệng, phân phối đến đường GI của bệnh nhân, đường trực tràng hoặc phân phối qua mắt. Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng các phân tử và được phẩm theo sáng chế để sản xuất thuốc để phân phối qua đường tiêm dưới da, xông hít, phân phối trong tĩnh mạch, phân phối tại mũi, phân phối qua niêm mạc, đường miệng, phân phối đến đường GI của bệnh nhân, đường trực tràng, qua da hoặc phân phối qua mắt.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp phân phối thuốc cho bệnh nhân theo đường tiêm dưới da, phân phối tại phổi, phân phối trong tĩnh mạch, phân

phối tại mũi, phân phối qua niêm mạc, đường miệng, phân phối đến đường GI của bệnh nhân, trực tràng hoặc phân phối qua mắt, trong đó phương pháp này bao gồm sử dụng cho bệnh nhân lượng có hiệu quả điều trị của phân tử theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm dùng qua đường miệng, tiêm, hít, chế phẩm tạo sương chứa phân tử theo sáng chế.

Chế phẩm này có thể ở dạng viên nén, viên tròn, viên nang, chất lỏng hoặc sirô.

Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "cá thể" được xác định trong đây biểu hiện động vật như động vật có vú, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật linh trưởng (ví dụ, người), bò, cừu, dê, ngựa, chó, mèo, thỏ, chuột lang, chuột đồng, chuột nhắt hoặc các loài bò, cừu, ngựa, chó, mèo, gặm nhấm hoặc chuột khác.

Sáng chế cũng đề xuất kit dùng trong quá trình sử dụng các phân tử và chế phẩm theo sáng chế cho đối tượng (ví dụ, bệnh nhân là người), bao gồm phân tử và chế phẩm theo sáng chế, thiết bị phân phối thuốc và, tùy chọn, hướng dẫn sử dụng. Dược phẩm có thể được đưa ra ở dạng chế phẩm, như chế phẩm đông khô hoặc chế phẩm giải phóng chậm. Theo một số phương án, thiết bị phân phối thuốc được chọn từ nhóm gồm có xi lanh, máy xông hít, thiết bị sử dụng trong mũi hoặc mắt (ví dụ, mister, thuốc nhỏ mắt hoặc thuốc nhỏ mũi), và thiết bị tiêm ko cần kim.

Các phân tử và chế phẩm theo sáng chế có thể làm đông khi để bảo quản và hoàn nguyên trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng u. Phương pháp đông khô thích hợp bất kỳ (ví dụ, sấy phun, sấy đóng bánh) và/hoặc kỹ thuật hoàn nguyên có thể được sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rõ là sự đông khô và hoàn nguyên có thể dẫn đến sự biến đổi các mức tổn thất hoạt tính kháng thể và mức sử dụng cần phải được điều chỉnh để bù đắp lại tổn thất này. Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm dược phẩm đông khô (sấy đông lạnh) như được mô tả ở đây. Tốt hơn là, dược phẩm đông khô (sấy đông lạnh) tổn thất không quá khoảng 20%, hoặc không quá khoảng 25%, hoặc không quá khoảng 30%, hoặc không quá khoảng 35%, hoặc không quá khoảng 40%, hoặc không quá khoảng 45%, hoặc không quá khoảng 50% hoạt tính của nó (ví dụ, hoạt tính gắn kết với albumin huyết thanh) khi được hydrat hóa lại. Hoạt tính là lượng dược phẩm cần có để tạo ra hiệu quả của dược phẩm trước khi nó được làm đông khô. Hoạt tính của dược phẩm có thể được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ trước khi làm

đông khô, và hoạt tính này có thể được xác định bằng cách sử dụng cùng một phương pháp sau khi hydrat hóa lại để xác định lượng hoạt tính bị mất đi.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm giải phóng duy trì hoặc giải phóng chậm chứa phân tử theo sáng chế, chế phẩm giải phóng duy trì như vậy có thể bao gồm các phân tử theo sáng chế kết hợp với, ví dụ, axit hyaluronic, hạt vi cầu hoặc liposom và các chất mang, tá dược và/hoặc chất pha loãng được dụng hoặc tương thích sinh lý khác.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm phân tử theo sáng chế, và chất mang hoặc chất pha loãng, tá dược được dụng hoặc tương thích sinh lý.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dAb TNFR1 cải biến theo sáng chế có sự gắn kết giảm với ADA, ví dụ như dAb DOM1h-131-206 cải biến với cải biến như được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết với ADA. Ví dụ, sáng chế đề xuất dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16), ví dụ, là dược phẩm, ví dụ, sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn, ví dụ, điều trị bệnh hoặc rối loạn hô hấp như COPD, ALI hoặc ARDS. dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16) (hoặc dược phẩm bao gồm dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C) khi sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn hô hấp như COPD, ALI hoặc ARDS có thể được sử dụng cho đối tượng, ví dụ cho đối tượng là người, bằng cách tiêm (ví dụ, tiêm dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ) hoặc cách khác nó có thể được đưa đến cho đối tượng, ví dụ, cho đối tượng là người, bằng đường phổi, ví dụ, bằng cách khí dung bởi thiết bị khí dung chuẩn hoặc bằng cách xông hít, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị xông hít chuẩn. Sáng chế còn bao gồm chế phẩm giải phóng duy trì và/hoặc chế phẩm đông khô bao gồm dAb TNFR1 cải biến theo sáng chế có sự gắn kết với ADA giảm, như dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16). Sáng chế cũng đề xuất thiết bị phân phối, ví dụ, máy xông hoặc thiết bị khí dung bao gồm dAb TNFR1 cải biến theo sáng chế, như dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C của axit nucleic (SEQ ID NO 22).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dAb DOM1h-131-206 không được cải biến (SEQ ID NO 1) hoặc dAb DOM1h-131-206 được cải biến theo cách bất kỳ được mô tả ở đây để làm giảm sự gắn kết ADA, ví dụ dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16), để điều trị bệnh viêm da, ví

dụ, bệnh vẩy nến và sáng chế cũng đề xuất chế độ liều bất kỳ như mô tả sau đây để sử dụng kháng thể vùng để điều trị bệnh vẩy nến. Kháng thể vùng hữu dụng để điều trị bệnh vẩy nến chọn đích chọn lọc cùng vùng trong TNFR1 của người là phối tử TNF-alpha tự nhiên của người với thụ thể và là chất đối kháng cạnh tranh đặc hiệu của TNFR1, nhưng không phải là TNFR2, và ngăn cản sự gắn kết của TNF-alpha với TNFR1 và sự truyền tín hiệu của phối tử này qua TNFR1. Kháng thể vùng như vậy có thể bao gồm dAb kháng TNFR1 bất kỳ đã được cải biến để làm giảm sự gắn kết với ADA như bộc lộ ở đây. Cụ thể, kháng thể vùng có thể là kháng thể vùng của người như DOM1h-131-206 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, DOM1h-131-206 với alanin đầu tận cùng C có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc dAb DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1) sau đó được cải biến để làm giảm sự gắn kết ADA như được mô tả ở đây (tức là sự cải biến bất kỳ để làm giảm sự gắn kết với ADA) như bộc lộ trong đây. Kháng thể vùng có thể cung cấp trong ống thủy tinh chứa, ví dụ 100mg hoặc ví dụ 40mg chất đông khô chứa kháng thể vùng. Chất đông khô có thể bao gồm sucroza, glyxin, natri dihydro phosphat và polysorbate 80. Kháng thể vùng đông khô đầu tiên có thể được hoàn nguyên trong 5mL nước vô khuẩn và sau đó pha loãng trong nước vô khuẩn, hoặc chất pha loãng được dụng khác, để tạo ra được phẩm chứa 20mg/mL, 5mg/mL, và 1mg/mL kháng thể vùng.

Kháng thể vùng có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân là người được xác định mắc bệnh vẩy nến. Cụ thể, kháng thể vùng có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân là người được xác định là mắc bệnh vẩy nến kiểu mảng ổn định mức độ nhẹ, trung bình, hoặc nặng, mãn tính với một hoặc hai vùng mảng. Theo National Psoriasis Foundation, bệnh vẩy nến dạng mảng nhẹ gây nhiễm ít hơn 3% diện tích bề mặt cơ thể của người, bệnh vẩy nến dạng mảng trung bình gây nhiễm từ 3% và 10% diện tích bề mặt cơ thể của người và bệnh vẩy nến nặng gây nhiễm lớn hơn 10% diện tích bề mặt cơ thể của người. Xem, ví dụ, Krajacic, 6 (5) Supplement 6, Biotechnology Healthcare, December 2009 và National Psoriasis Foundation, About Psoriasis: Statistics. Để tham khảo, lòng bàn tay của bệnh nhân có thể được tính là khoảng 1% diện tích bề mặt cơ thể của người. Mức độ nặng của bệnh vẩy nến cũng có thể được xác định, cách khác, theo the Psoriasis Area và Severity Index thông qua việc sử dụng hệ thống xếp loại mô tả bởi Fredrickson, dựa trên bốn tiêu chí: mức độ đỏ, độ dày, mức độ vẩy và diện tích bề mặt nhiễm bệnh. Xem, ví dụ, Fredrickson, 157 Dermatologica

238 (1978). Các mảng vảy nến được điều trị có thể có độ dày thâm nhập có thể so sánh ít nhất là 200 μ m, như đánh giá bởi phép đo âm kế, khi kháng thể vùng được sử dụng đầu tiên. Bệnh nhân là người có thể là đối tượng nam giới hoặc nữ giới mắc bệnh vảy nến dạng mảng mạn tính với (các) mảng ổn định trên các đầu chi trên, đùi hoặc thân. Các bệnh nhân là người có thể ở độ tuổi từ khoảng 18 đến 70 tuổi. Bệnh nhân cũng có thể ở độ tuổi từ 14 đến 26 tuổi cũng như 14 tuổi hoặc lớn hơn.

Kháng thể vùng có thể được sử dụng cho bệnh nhân là người bằng cách tiêm vào mảng vảy nến. Cụ thể, 100 μ L được phẩm bao gồm 20mg/mL, 5mg/mL, hoặc 1mg/mL kháng thể vùng có thể được sử dụng bằng cách tiêm vào mảng vảy nến ở độ sâu được chọn đích là da và trên bề mặt da trong mảng này.

Kháng thể vùng có thể được sử dụng cho đối tượng người có mảng vảy nến theo quy trình điều trị trong đó 100 μ L được phẩm chứa 5mg/mL kháng thể vùng được tiêm vào mảng vảy nến một lần mỗi tuần trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Trong quy trình điều trị này, bệnh nhân sẽ được sử dụng được phẩm bốn lần và sẽ nhận 0,5mg kháng thể vùng trong mỗi lần sử dụng sao cho nhận được liều tổng cộng là 2mg kháng thể vùng trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Điều này có nghĩa là, ví dụ, trong quy trình điều trị kéo dài 28 ngày, bệnh nhân sẽ nhận lần tiêm đầu tiên 100 μ L chứa 0,5mg kháng thể vùng vào ngày thứ nhất, lần tiêm thứ hai vào ngày thứ tám, lần tiêm thứ ba vào ngày thứ 15, và lần tiêm thứ tư vào ngày thứ 21. Các liều kháng thể vùng (ví dụ, 100 μ L lần tiêm chứa 0,5mg kháng thể vùng) trong quy trình điều trị này được sử dụng trên một mg với mỗi bệnh nhân.

Kháng thể vùng cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân là người có mảng vảy nến theo quy trình điều trị trong đó 100 μ L được phẩm chứa 20mg/mL kháng thể vùng được tiêm vào trong mảng vảy nến một lần mỗi tuần trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Trong quy trình điều trị này, bệnh nhân sẽ được sử dụng được phẩm bốn lần và sẽ nhận 2mg kháng thể vùng trong mỗi lần sử dụng sao cho liều tổng cộng là 8mg kháng thể vùng trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Điều đó có nghĩa là, ví dụ, trong quy trình điều trị kéo dài 28 ngày, bệnh nhân sẽ nhận lần tiêm đầu tiên 100 μ L chứa 2mg kháng thể vùng vào ngày thứ nhất, lần tiêm thứ hai như vậy vào ngày thứ tám, lần tiêm thứ ba như vậy vào ngày 15, và lần tiêm thứ tư như vậy vào ngày 21. Các liều kháng thể vùng (ví dụ, tiêm 100 μ L chứa 2mg kháng thể vùng) trong quy trình điều trị được sử dụng trên một mg với mỗi bệnh nhân.

Kháng thể vùng cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân là người có mảng vảy nến theo quy trình điều trị trong đó 100 μ L được phẩm chứa 5mg/mL kháng thể vùng được tiêm vào trong mảng vảy nến hai lần một tuần trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Trong quy trình điều trị này, bệnh nhân sẽ được sử dụng được phẩm tám lần và sẽ nhận được 0,5mg kháng thể vùng trong mỗi lần dùng thuốc sao cho liều tổng cộng là 4mg kháng thể vùng trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Điều này có nghĩa là, ví dụ, trong quy trình điều trị kéo dài 28 ngày. Bệnh nhân sẽ nhận lần tiêm đầu tiên 100 μ L chứa 0,5mg kháng thể vùng vào ngày thứ nhất, lần tiêm thứ hai như vậy vào ngày thứ 4, lần tiêm thứ ba như vậy vào ngày thứ tám, lần tiêm thứ tư như vậy vào ngày 11, lần tiêm thứ 5 như vậy vào ngày 15, lần tiêm thứ sáu như vậy vào ngày thứ 18, lần tiêm thứ bảy như vậy vào ngày 21 và lần tiêm thứ tám như vậy vào ngày 21. Các liều kháng thể vùng (ví dụ, liều tiêm 100 μ L chứa 0,5mg kháng thể vùng) trong quy trình điều trị này được sử dụng trên một mg với mỗi bệnh nhân.

Kháng thể vùng cũng có thể được sử dụng cho bệnh nhân là người có mảng vảy nến theo quy trình điều trị trong đó 100 μ L được phẩm chứa 1mg/mL kháng thể vùng được tiêm vào trong mảng vảy nến một lần mỗi tuần trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Trong quy trình điều trị này, bệnh nhân sẽ được sử dụng được phẩm bốn lần và sẽ nhận được 0,1mg kháng thể vùng trong mỗi lần dùng thuốc sao cho liều tổng cộng là 0,4mg kháng thể vùng trong giai đoạn điều trị 28 ngày. Điều này có nghĩa là, ví dụ, trong quy trình điều trị kéo dài 28 ngày bệnh nhân sẽ nhận lần tiêm 100 μ L đầu tiên chứa 0,1mg kháng thể vùng vào ngày thứ nhất, lần tiêm thứ hai như vậy vào ngày thứ tám, lần tiêm thứ ba như vậy vào ngày 15, và lần tiêm thứ tư như vậy vào ngày 21. Các liều kháng thể vùng (ví dụ, tiêm 100 μ L chứa 0,1mg kháng thể vùng) trong quy trình điều trị này được sử dụng trên một mg với mỗi bệnh nhân.

WO 2008/149148 mô tả phương pháp thử nghiệm, phân tách và tạo ra dAb DOM1h-131-206 không được cải biến và các phương pháp này có thể áp dụng với dAb TNFR1 cải biến theo sáng chế có sự gắn kết giảm với ADA, ví dụ với dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16), và bộ lộ này (bao gồm phương pháp thử nghiệm, phân tách và tạo ra) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ngoài ra, sáng chế sáng chế cũng đề xuất các phương án từ 1 đến 36 như sau:

1. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) (ví dụ VH, VL hoặc VHH), ví dụ, gắn kết với đích, bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ:

(a) đoạn thêm, đoạn kéo dài hoặc đoạn đánh dấu ở đầu tận cùng C

(b) một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin của vùng khung trong đó ít nhất một sự thể đoạn là sự thể đoạn được chọn từ: sự thể đoạn P14A, sự thể đoạn P41A và sự thể đoạn L108A;

và có sự gắn kết giảm với ADA đã có từ trước so với vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) không được cải biến.

2. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 1 nêu trên, trong đó dAb này được chọn từ dAb VH hoặc VL người, hoặc VHH Camelid.
3. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 1 hoặc 2, bao gồm đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C của ít nhất một axit amin.
4. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 3, trong đó đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C bao gồm đoạn axit amin kéo dài gồm từ 1 axit amin đến khoảng 6 axit amin.
5. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 3 hoặc 4, trong đó đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C bao gồm axit amin là alanin.
6. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 5, trong đó đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C gồm có axit amin đơn là alanin.
7. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 5, trong đó đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng này bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ: (a) AS, (b) AST (c) ASTK, (d) ASTKG, hoặc (e) ASTKGP.
8. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 1-2, trong đó đầu tận cùng C có đoạn đánh dấu được chọn từ: đoạn đánh dấu ái lực, đoạn đánh dấu myc, đoạn đánh dấu FLAG, đoạn đánh dấu his, cải biến hóa học như PEG, hoặc vùng protein như vùng kháng thể Fc.
9. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 6, trong đó dAb là dAb VH và còn bao gồm sự thể đoạn của khung P14A.

10. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 7, trong đó dAb này là dAb VH và còn bao gồm sự thể đoạn của khung P14A.
11. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó nó gắn kết với đích trong đó đích này được chọn từ: TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, albumin, TGF β R2.
12. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 11, mà được chọn từ trình tự axit amin được xác định là: (a) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài của alanin đơn (SEQ ID NO 16) (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài của alanin đơn và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 17) (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 18) (d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG (SEQ ID NO 19) (e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 20).
13. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 11 hoặc 12, trong đó đích là TNFR1 và dAb không được cải biến được chọn từ trình tự axit amin giống 100%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với axit amin được xác định là: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3).
14. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó dAb là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với các phân tử khác.
15. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 14, trong đó dAb là thể dung hợp hoặc thể liên hợp với một hoặc nhiều phân tử khác được chọn từ: dAb khác nữa, protein hoặc polypeptit hoặc mảnh của nó ví dụ phân tử kéo dài thời gian bán rã hoặc phân tử hoạt động hoặc có tác dụng điều trị khác, phân tử PEG, kháng thể hoặc mảnh của nó ví dụ, vùng Fc.
16. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 15, trong đó dAb là phân tử mAbdAb.

17. Dược phẩm bao gồm vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên kết hợp với chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng hoặc sinh lý.
18. Dược phẩm theo mục 17, chứa hoạt chất hoặc dược chất khác nữa.
19. Dược phẩm theo mục 17 hoặc 18 chứa dAb kháng TNFR1.
20. Dược phẩm theo mục 19, chứa dAb kháng TNFR1 theo mục bất kỳ trong số các mục 12-13.
21. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục bất kỳ trong số các mục 1-16 hoặc dược phẩm mục bất kỳ trong số các mục 17-20, được sử dụng để làm thuốc.
22. Phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa ít nhất một bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh được chọn từ bệnh hoặc rối loạn viêm hoặc bệnh hoặc rối loạn phổi hoặc bệnh hô hấp bằng cách cho đối tượng sử dụng một lượng có hiệu quả phòng ngừa hoặc điều trị của dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục 19-20 hoặc dAb theo mục 11-13.
23. Phương pháp theo mục 22, trong đó ít nhất một bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh được chọn từ: bệnh vảy nến, viêm khớp, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm ruột (ví dụ) bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét; hoặc ví dụ bệnh hoặc rối loạn đường hô hấp hoặc phổi, ví dụ được chọn từ: bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, viêm phế quản mạn, viêm phế quản tắc nghẽn mạn tính và khí thũng, viêm phổi, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh hen, bệnh viêm phổi, bệnh viêm phổi quá mẫn, thâm nhiễm phổi bởi bạch cầu ưa eosin, bệnh phổi môi trường, bệnh viêm phổi, chứng giãn phế quản, xơ nang, bệnh kẽ phổi, bệnh cao huyết áp phổi nguyên phát, bệnh huyết khối tắc mạch, bệnh màng phổi, bệnh trung thất, bệnh cơ hoành, chứng giảm thông khí, chứng tăng thông khí, chứng ngưng thở khi ngủ, hội chứng suy hô hấp cấp, u trung biểu mô, sacôm, phản ứng thái ghép, bệnh thể chủ thái ghép, bệnh ung thư phổi, bệnh viêm mũi dị ứng, dị ứng, bệnh bụi amiăng, u nấm phổi Aspergillus, bệnh nấm Aspergillus, chứng giãn phế quản, viêm phế quản mạn, khí thũng, bệnh viêm phổi ưa eosin, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh phế cầu khuẩn xâm lấn, bệnh cúm, bệnh vi khuẩn myco không phải là lao, tràn dịch màng phổi, bệnh bụi phổi, nhiễm nấm

pneumocytosis, bệnh viêm phổi, bệnh phổi do nấm actinomyces, bệnh tích protein mô phế nang phổi, bệnh than ở phổi, phù phổi, vật nghẽn mạch phổi, bệnh viêm phổi, mô bào huyết phổi X, cao huyết áp phổi, bệnh vi sinh vật Nocardia phổi, bệnh lao phổi, bệnh tắc tĩnh mạch phổi, bệnh phổi dạng thấp, bệnh saccoit, và bệnh u hạt Wegener và tổn thương phổi cấp tính (ALI), và Hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS) và các biến chứng của chúng.

24. Phương pháp theo mục 23, trong đó bệnh nêu trên là ALI và dAb là dAb theo mục 13 hoặc được phẩm chứa dAb theo mục 13.
25. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22-24, trong đó được phẩm hoặc dAb nêu trên được phân phối cho đối tượng bằng đường tiêm dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ.
26. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 22-24, trong đó được phẩm hoặc dAb nêu trên được phân phối cho đối tượng qua đường dùng ngoài đường tiêu hóa, đường miệng, trực tràng, qua niêm mạc, mắt, phổi hoặc GI.
27. Chế phẩm tiêm được, dùng qua đường miệng, xông hít được hoặc xông hít được bao gồm được phẩm hoặc dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-20.
28. Chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-20.
29. Chế phẩm sấy đông lạnh bao gồm chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-20.
30. Thiết bị phân phối chứa được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-20.
31. Thiết bị phân phối chứa được phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-20, trong đó thiết bị này là máy khí dung hoặc máy xông.
32. Axit nucleic phân tách hoặc tái tổ hợp mã hóa dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-16.
33. Axit nucleic phân tách hoặc tái tổ hợp mã hóa dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 12-13.
34. Vector chứa axit nucleic theo mục 32 hoặc 33.

35. Tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo mục 32 hoặc 33 hoặc vector theo mục 34.

36. Phương pháp tạo ra polypeptit bao gồm dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-16, trong đó phương pháp này bao gồm duy trì tế bào chủ theo mục 35 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện axit nucleic hoặc vector nêu trên, bằng cách đó tạo ra polypeptit.

37. dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1-16, trong đó dAb này gắn kết với ADA với trị số KD là 150% hoặc hơn so với trị số KD của dAb không được cải biến (ví dụ 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650% hoặc lớn hơn).

Sáng chế cũng đề xuất các phương án 1b-25b sau đây:

1b. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) không gắn kết (hoặc hoặc gắn kết giảm) với ADA người đã có từ trước trong huyết thanh người, trong đó epitop trên dAb mà ADA này gắn kết bị che đi.

2b. dAb theo mục 1b nêu trên, có trị số KD gắn kết với ADA là 150% hoặc hơn (ví dụ 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650% hoặc lớn hơn) trị số KD của trình tự tương đương trong đó epitop không bị che.

3b. dAb theo mục 1b – 2b, trong đó epitop bị che bởi:

- a. sự bổ sung chất hóa học vào đầu tận cùng C; và/hoặc
- b. một hoặc nhiều sự thể đoạn của khung; và/hoặc
- c. một hoặc nhiều sự khuyết đoạn

4b. dAb theo mục 3b, trong đó chất hóa học bao gồm, một hoặc nhiều axit amin, đoạn đánh dấu có đầu tận cùng C, hoặc cải biến hóa học như pegyl hóa hoặc amit hóa.

5b. dAb theo mục 3b hoặc 4b trong đó (a), (b) và/hoặc (c) có tác động cấu hình trực tiếp trên epitop, tác động cấu hình gián tiếp trên epitop, và/hoặc cản trở về không gian lên epitop.

6b. dAb theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên, trong đó epitop này;

- d. trùng với gốc 113 theo đánh số Kabat ở đầu tận cùng C; và/hoặc

- e. trùng với gốc 14, 41, 108, 110, 112 và 113 theo đánh số Kabat; và/hoặc
 - f. bao gồm gốc theo đánh số Kabat 14, 41, 108, 110, 112 và 113 được bộc lộ ở bề mặt, và gốc khác bất kỳ nằm trong khoảng cách 5 ăngstrom với các vị trí này; và/hoặc
 - g. bao gồm khung số 4, và đoạn vòng giữa các chuỗi beta của khung số 1 và 2.
- 7b. dAb theo mục bất kỳ trong số các phương án nêu trên từ 1b-6b, bao gồm một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin ở các vị trí 14, 41, 108, 110, hoặc 112 theo đánh số Kabat so với trình tự khung gốc của người
- 8b. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) được cải biến cho giống với người là trình tự không phải của người ở một hoặc nhiều gốc sau: Gốc 14, 41, 108, 110 và/hoặc 112 theo đánh số Kabat.
- 9b. dAb theo mục 7b hoặc 8b, trong đó các gốc axit amin tại một hoặc nhiều vị trí nêu trên là gốc alanin.
- 10b. dAb theo mục bất kỳ trong số các mục 1b-9b nêu trên, trong đó sự che này đạt được bằng cách đưa đoạn axit amin kéo dài đến đầu tận cùng C của dAb.
- 11b. dAb theo mục 10b, trong đó đoạn kéo dài nêu trên là có từ 1 đến 8 axit amin.
- 12b. dAb theo mục 10b hoặc 11b, trong đó đoạn kéo dài nêu trên bao gồm gốc alanin.
- 13b. dAb theo mục 12b, trong đó đoạn kéo dài nêu trên gồm có gốc alanin đơn.
- 14b. dAb theo mục 12b, trong đó đoạn kéo dài nêu trên được chọn từ nhóm gồm có: AS, AST, ASTK, ASTKG, và ASTKGP.
- 15b. dAb theo mục bất kỳ trong số các mục 1b-14b, trong đó dAb này là dAb VH hoặc VL hoặc VHH.
- 16b. dAb theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1b-15b, trong đó đích mà dAb gắn vào là TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, albumin, và TGF β R2.

17b. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 16b, được chọn từ trình tự axit amin sau được xác định là: (a) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn (SEQ ID NO 16); (b) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài chứa alanin đơn và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 17) (c) dAb DOM1h-131-206 với đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 18); (d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG (SEQ ID NO 19); và (e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG và đoạn đột biến khung P14A (SEQ ID NO 20).

18b. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) theo mục 16b hoặc 17b, trong đó đích là TNFR1 và dAb không được cải biến được chọn từ trình tự giống 100%, 95%, 90%, 85% hoặc 80% với axit amin được xác định là: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3).

19b. Phương pháp che epitop trên vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb), epitop này gắn kết với ADA người đã có từ trước trong huyết thanh người, phương pháp này bao gồm bước cải biến epitop này.

20b. Phương pháp làm giảm sự gắn kết của vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) với ADA người đã có từ trước trong huyết thanh người, phương pháp này bao gồm che epitop trên dAb mà ADA gắn vào.

21b. Phương pháp theo mục 19b hoặc 20b, trong đó việc che nêu trên gây ra sự giảm gắn kết với ADA sao cho dAb chứa epitop được che có trị số KD bằng 150% hoặc hơn so với trị số KD của dAb trong đó epitop không được che.

22b. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục 19b – 21b, trong đó epitop được che bằng:

- h. thêm chất hóa học vào đầu tận cùng C; và/hoặc một
- i. hoặc nhiều sự thể đoạn của khung; và/hoặc
- j. một hoặc nhiều sự khuyết đoạn

23b. Phương pháp theo mục 22b, trong đó chất hóa học bao gồm, một hoặc nhiều axit amin, đoạn đánh dấu có đầu tận cùng C, hoặc cải biến hóa học như pegyl hóa hoặc amit hóa.

24b. Phương pháp theo mục 22b hoặc 23b, trong đó (a), (b) và/hoặc (c) có tác động cấu hình trực tiếp trên epitop, tác động cấu hình gián tiếp trên epitop, và/hoặc che về mặt không gian trên epitop.

25b. Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ 19b-24b nêu trên, trong đó epitop nêu trên;

- k. trùng với gốc 113 theo đánh số Kabat at đầu tận cùng C;
- l. trùng với gốc 14, 41, 108, 110, 112 và 113 theo đánh số Kabat; và/hoặc
- m. bao gồm gốc theo đánh số Kabat 14, 41, 108, 110, 112 và 113, được bộc lộ ở bề mặt và bất kỳ gốc khác nằm trong khoảng 5 ăngstrom của bề mặt này; và/hoặc
- n. bao gồm khung số 4, và các vòng nằm giữa các chuỗi beta của khung số 1 và 2.

Sáng chế còn đề xuất các phương án 1c-15c sau đây:

1c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn VHH được làm tương thích với người mà giữ được một hoặc nhiều gốc mầm của lạc đà ở gốc 14 và/hoặc 108 theo đánh số Kabat.

2c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 1c nêu trên, có trị số KD gắn kết với ADA người trong huyết thanh người bằng 150% hoặc hơn (ví dụ 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650% hoặc hơn) trị số KD của trình tự tương đương, trong đó các gốc 14 và/hoặc 108 đã làm tương thích với người.

3c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 1c hoặc 2c, trong đó một hoặc nhiều axit amin đầu tận cùng C đã được loại bỏ.

4c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 3c, trong đó một axit amin đầu tận cùng C đã được loại bỏ.

5c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 1c hoặc 2c, bao gồm đoạn thêm, đoạn kéo dài hoặc đoạn đánh dấu ở đầu tận cùng C.

6c Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 5c, trong đó đoạn thêm, đoạn kéo dài hoặc đoạn đánh dấu được chọn từ nhóm gồm có: một hoặc nhiều

đoạn axit amin kéo dài, đoạn đánh dấu có đầu tận cùng C, hoặc cải biến hóa học như pegyl hóa hoặc amit hóa.

7c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 5c hoặc 6c, trong đó đoạn kéo dài gồm có từ 1 đến 8 axit amin.

8c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 7c, trong đó đoạn kéo dài bao gồm gốc alanin.

9c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 8c, trong đó đoạn kéo dài nêu trên gồm có gốc alanin đơn.

10c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục 8c, trong đó đoạn kéo dài được chọn từ nhóm gồm có: AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP, ASTKA, ASTKAP và ASTKAPS.

11c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo mục bất kỳ trong số các phương án từ 1c-10c nêu trên, còn bao gồm các gốc không phải của người tại một hoặc nhiều gốc sau: gốc 41, 110 và/hoặc 112 theo đánh số Kabat.

12c. Vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó đích mà dAb gắn vào là TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, albumin, và TGF β R2.

13c. Phương pháp biến đổi cho giống với của người vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn Camelid VHH, phương pháp này bao gồm việc giữ một hoặc nhiều lạp đà gốc mằm ở gốc 14 và/hoặc 108 theo đánh số Kabat.

14c. Phương pháp làm giảm sự gắn kết của vùng biến đổi của globulin miễn dịch đơn (dAb) VHH Camelid với ADA đã có trước đó, bao gồm việc giữ gốc mằm lạp đà tại gốc 14 và/hoặc 108 theo đánh số Kabat.

15c. Phương pháp theo mục 13c hoặc 14c, trong đó việc giữ lại này gây giảm gắn kết với ADA sao cho VHH bao gồm các gốc Camelid ở vị trí 14 và/hoặc 108 có trị số KD gắn kết với ADA người trong huyết thanh người bằng 150% hoặc hơn so với trị số KD của VHH với trình tự tương đương, trong đó ba gốc này đã được cải biến cho giống với người.

Lưu ý rằng thuật ngữ dAb như được sử dụng ở đây là nhãn hiệu đã được đăng ký bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tần suất đối tượng khỏe mạnh có ADA đã có trước đó kháng dAb ký hiệu là DOM1H-131-206

Quy trình thử nghiệm ADA DOM1H-131-206 (VH)

DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) được biotinyl hóa với tỷ lệ kích thích phân tử biotin là 8:1. Sau khi đánh dấu, DOM1H-131-206 biotinyl hóa (SEQ ID NO 1) được trao đổi đệm và bảo quản trong chế phẩm đệm chứa natri phosphat 14mM, sucroza 8,4%, glyxin 0,35%, polysorbate 80 0,014% ở độ pH 7,4.

DOM1H-131-206 được đánh dấu rutheni với tỷ lệ kích thích phân tử Sulfo-Tag là 5:1. Sau khi đánh dấu, DOM1H-131-206 được đánh dấu Sulfo-TAG được trao đổi đệm và bảo quản trong chế phẩm đệm chứa natri phosphat 14mM, sucroza 8,4%, glyxin 0,35%, polysorbate 80 0,014% ở độ pH = 7,4.

Thử nghiệm kháng thể kháng được chất (ADA) mà một thử nghiệm bắc cầu thực hiện trên nền kỹ thuật MSD™ ECL (điện quang hóa học). Kỹ thuật MSD™ (có từ Meso scale Discovery, Matyland, USA) sử dụng chelat rutheni kim loại làm chất đánh dấu ECL kết nối với các điện cực carbon đặt trong các lỗ của đĩa vi chuẩn được bao bằng streptavidin. Sulfo-Tag™ đã gắn kết sử dụng trong thử nghiệm này sẽ sinh ra tín hiệu quang hóa được khởi động khi áp dụng điện thế bởi thiết bị này (Meso Scale Discovery Sector™ Imager 6000). Tín hiệu huỳnh quang thu được được đo theo đơn vị ECL™. Cường độ của tín hiệu này tỷ lệ trực tiếp với lượng kháng thể phát hiện được trong mẫu. Các mẫu đối chứng âm tính (huyết thanh người bình thường; NHS) và mẫu đối chứng dương tính (PC; kháng thể genotyp kháng DOM1H-131-206 chuột được cấy trong huyết thanh người bình thường) (QCs) được chạy trên mỗi đĩa thử nghiệm.

Tóm tắt quy trình thử nghiệm được mô tả sau đây:

1. Đĩa MSD™ streptavidin được phong bế bởi Casein phong bế 150μL/lỗ trong PBS (1%) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ. Chất phong bế được loại bỏ mà không cần rửa.

2. Sau khi ủ trước 1 giờ, hỗn hợp đồng nhất chứa 0,1µg/mL DOM1H-131-206 biotinyl hóa (được chất), DOM1H-131-206 rutenyl hóa 0,1µg/mL (“Sulfo-Tag”TM) (được chất), và 2% mẫu huyết thanh trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS) được chuyển đến đĩa MSDTM và ủ trong 1 giờ ± 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.
3. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng PBST.
4. 150µL/lỗ chất đệm để đọc kết quả được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Trong khi xác nhận thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu, mô hình 60 các mẫu huyết thanh của người cho khỏe mạnh được thử nghiệm làm độ phản ứng ban đầu trong thử nghiệm. Xác định rằng khoảng 45% mẫu huyết thanh từ các đối tượng này có thể tự kháng phản ứng với VH có thể phát hiện được, hầu hết là IgG isotyp, có khả năng gắn kết với DOM1H-131-206 (các kết quả nêu trong Fig.1).

DOM1H-131-206 tự do không được đánh dấu cạnh tranh về gắn kết ADA trong thử nghiệm này khiến cho cường độ tín hiệu giảm đi (% ức chế tín hiệu cao). ‘Thử nghiệm xác nhận’ này được sử dụng để xác định xem các phiên bản cải biến của DOM1H-131-206 và phân tử trên cơ sở kháng thể khác có thể cạnh tranh với DOM1H-131-206 để gắn kết với ADA hay không.

Ví dụ 2: Sự thể đoạn axit amin kháng khung VH của DOM1h-131-206

DOM1H-131-206 tự do, không được đánh dấu cạnh tranh để gắn kết ADA và khiến cho cường độ tín hiệu giảm đi trong thử nghiệm DOM1H-131-206 ADA như được mô tả trên. ‘Thử nghiệm xác nhận’ này do đó được sử dụng để xác định xem liệu các nguyên liệu thử nghiệm, ví dụ, DOM1H-131-206, các phiên bản cải biến của DOM1H-131-206, hoặc các phân tử trên cơ sở kháng thể khác (‘nguyên liệu thử nghiệm’), có thể ức chế sự gắn kết ADA với DOM1H-131-206 hay không.

Để nghiên cứu xem sự gắn kết với ADA với khung VH có thể giảm đi hay không, một số sự thể đoạn axit amin và các sự cải biến khác được đưa vào khung của DOM1h-131-206 bằng kỹ thuật đột biến gen tại vị trí chuẩn.

Các phân tử với sự thể đoạn (nguyên liệu thử nghiệm) được thử nghiệm bằng phương pháp sau đây (thử nghiệm xác nhận):

Quy trình thử nghiệm xác nhận DOM1H-131-206 (có thể được sử dụng để thử nghiệm dAb VH về sự gắn kết ADA):

1. 10µg/mL DOM1H-131-206 hoặc nguyên liệu thử nghiệm khác như dAb cải biến, được ủ trước trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở RT với 4% huyết thanh người dương tính với ADA trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS).
2. Đĩa MSD™ streptavidin được phong bế bởi casein phong bế 150µL/lỗ trong PBS (1%) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ. Chất phong bế được loại bỏ mà không cần rửa.
3. Trong đĩa thử nghiệm vi chuẩn, mẫu chứa mẫu huyết thanh người dương tính với ADA và nguyên liệu thử nghiệm 10µg/mL như dAb cải biến được bổ sung vào hỗn hợp đồng nhất của DOM1H-131-206 biotinyl hóa (SEQ ID NO 1) (dược chất) và DOM1H-131-206 rutenyl hóa ("Sulfo-Tag"™) (SEQ ID NO 1) (dược chất) trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS) sao cho nồng độ cuối cùng là 2% huyết thanh người dương tính với ADA, 0,1µg/mL DOM1H-131-206 biotinyl hóa (SEQ ID NO 1) (dược chất) và 0,1µg/mL DOM1H-131-206 rutenyl hóa ("Sulfo-Tag"™) (SEQ ID NO 1) (dược chất) và ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.
4. Sau 1 giờ ủ, các mẫu thử nghiệm được chuyển đến đĩa MSD đã phong bế, và đĩa này được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng.
5. Sau đó, đĩa MSD™ được rửa 3 lần bằng PBST
6. Chất đệm để đọc kết quả 150µL/lỗ được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Đối với mỗi thử nghiệm với dòng mẹ khác nhau (kết quả được thể hiện trong bảng 1), các mẫu huyết thanh người từ 10 đối tượng dương tính với ADA được thử nghiệm trong thử nghiệm xác nhận trên (trong Ví dụ 2): Kết quả được thể hiện trong bảng 1b là cả % ức chế tín hiệu trung bình (tổng thể) và cũng như % đối tượng có sự gắn kết ADA. % ức chế tín hiệu càng cao, hợp chất cải biến có khả năng gắn kết với ADA càng thấp. % ức chế tín hiệu giảm khoảng 40,5% thể hiện sự gắn kết ADA không đáng kể.

Sử dụng thử nghiệm xác nhận, xác định rằng sự thể đoạn axit amin ở các vị trí sau làm giảm đáng kể trình tự ADA đã có trước đó gắn kết với DOM1H-131-206

trong khi vẫn giữ hiệu lực gắn kết của kháng nguyên tức là gắn kết với TNFR1 như xác định bởi quy trình thử nghiệm ái lực TNFR1 thể hiện trong Ví dụ 5c (kết quả được thể hiện trong Bảng 1): P14A, P41A, L108Q.

Ví dụ 3: Đoạn axit amin kéo dài kháng khung VH của DOM1H-131-206

Để xác định liệu sự cải biến ở đầu tận cùng C của khung VH có thể làm giảm sự gắn kết ADA hay không, một số cải biến ở đầu tận cùng C được thực hiện với các khung bằng kỹ thuật đột biến gen tại vị trí chuẩn. Các phân tử với sự thể đoạn (nguyên liệu thử nghiệm) được thử nghiệm bằng ‘thử nghiệm xác nhận’ như được mô tả ở trên trong ví dụ 2) và kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Đoạn kéo dài của DOM1H-131-206 đầu tận cùng C hoặc các phân tử thử nghiệm khác cũng làm giảm đáng kể trình tự ADA đã có trước đó (bảng 1, bảng 2). Kết quả được thể hiện trong bảng 2 cũng thu được bằng ‘thử nghiệm xác nhận’ như được mô tả ở trên trong ví dụ 2. Thử nghiệm này được lấy làm ví dụ bởi đoạn nối A, AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP, AAA, và tất cả các đoạn kéo dài hơn được thử nghiệm. Các dòng VHH không được cải biến cho giống với người có mức gắn kết với ADA chung thấp hơn.

Bảng 1: Đánh giá sự gắn kết ADA với thể đột biến DOM1H-131-206

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	% ức chế tín hiệu trung bình trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình – của 10 đối tượng)	% đối tượng có sự gắn kết ADA (10 đối tượng)
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	99,47	100
DOM 1H-131-206	Q13A	99,21	100
DOM 1H-131-206	P14A	58,32	100
DOM 1H-131-206	P41A	87,35	100
DOM 1H-131-206	K43A	99,51	100
DOM 1H-131-206	G44E	99,47	100
DOM 1H-131-206	R83A	99,32	100
DOM 1H-131-206	H91S	99,38	100
DOM 1H-131-206	L108Q	90,92	100
DOM 1H-131-206	P14A,G44E	61,61	100
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	99,11	100
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	50,23	60

DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	91,29	100
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	96,13	100
DOM 1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	15,74	0
DOM 1H-131-206	AS ở đầu tận cùng C	16,28	0
DOM 1H-131-206	AST ở đầu tận cùng C	26,41	50
DOM 1H-131-206	ASTK ở đầu tận cùng C	19,60	40
DOM 1H-131-206	ASTKG ở đầu tận cùng C	28,27	40
DOM 1H-131-206	ASTKGP ở đầu tận cùng C	42,63	60

% ức chế = gắn kết ADA (% ức chế tín hiệu khi protein đưa ra bị cạnh tranh trong thử nghiệm liên kết ADA (thử nghiệm xác nhận)).

Bảng 2: Đánh giá sự gắn kết ADA của phân tử VHH và kháng thể vùng VH với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	% ức chế tín hiệu trung bình trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình – của 10 đối tượng)	% đối tượng có sự gắn kết ADA (10 đối tượng)
Pascolizumab-DT04-H-033	Không được cải biến	99,48	100
Pascolizumab-DT04-H-033	AAA ở đầu tận cùng C	3,46	0
Pascolizumab-DT04-H-033	C AST ở đầu tận cùng	3,44	0
Pascolizumab-DT04-H-033	AS ở đầu tận cùng C	4,12	0
Pascolizumab-DT04-H-033	A ở đầu tận cùng C	7,46	0
DOM1h-574-208	Không được cải biến	94,13	100
thể dung hợp DOM1h-574-208 - VL	dAb VL ở đầu tận cùng C	4,43	0
DT04-H-033	AAA ở đầu tận cùng C	10,98	0
DT04-H-033	AST ở đầu tận cùng C	14,00	0
DT04-H-033	AS ở đầu tận cùng C	8,26	0

DT04-H-033	A ở đầu tận cùng C	12,48	0
DT04-H-033	FLAG ở đầu tận cùng C (trình tự peptit gồm 6 axit amin)	12,80	0
VHH dòng 2 - 40842 (IL6R)	Không được cải biến	18,66	20
VHH dòng 7 - 40842 (IL6R)	Không được cải biến	21,96	20
VHH dòng 3 - 40955 (RANKL-Camelid)	Không được cải biến	23,68	20
VHH dòng 8 - 41015 (RANKL-Camelid)	Không được cải biến	20,08	20
VHH dòng 9 - 41016 (RANKL-được cải biến cho giống với người)	Không được cải biến	88,45	100

% ức chế = gắn kết ADA (% ức chế tín hiệu khi protein đưa ra bị cạnh tranh trong thử nghiệm liên kết ADA).

Trình tự của đoạn đánh dấu FLAG có thể tìm thấy trong Nature Biotechnology 1988, Vol 16, trang 1204-1210.

Chú ý rằng thu được 40% ức chế tín hiệu (trung bình) (hoặc nhỏ hơn 40% ức chế tín hiệu) là thể hiện sự gắn kết ADA không đáng kể.

Ví dụ 4: Kết hợp sự thể đoạn axit amin và đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C kháng khung VH của DOM1H-131-206

Để xác định xem sự kết hợp của sự thể đoạn axit amin và sự cải biến ở đầu tận cùng C của khung VH có thể làm giảm sự gắn kết ADA hay không, một số các cải biến ở đầu tận cùng C và/hoặc sự thể đoạn axit amin được thực hiện với các khung bằng kỹ thuật đột biến gen tại vị trí chuẩn. Các phân tử với sự thể đoạn được thử nghiệm bằng ‘thử nghiệm xác nhận’ đã được mô tả trong Ví dụ 2). Kết quả được thể hiện trong Bảng 3:

Bảng 3:

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	% ức chế tín hiệu trung bình trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình - của 10 đối tượng)	% đối tượng có sự gắn kết ADA (10 đối tượng)
DOM 1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	1,12	0

DOM 1H-131-206	ASTKG ở đầu tận cùng C	1,77	0
DOM 1H-131-206	A P14A + ở đầu tận cùng C	8,76	0
DOM 1H-131-206	ASTKG P14A + ở đầu tận cùng C	11,93	0
DOM 1H-131-206	AST ở đầu tận cùng C	34,96	20
DOM 1H-131-206	sự khuyết đoạn S ở đầu tận cùng C (ΔS)	44,67	40
DOM 1H-131-206	P14E	47,22	60
DOM 1H-131-206	P14K	46,70	50
DOM 1H-131-206	P14Q	52,87	60
DOM 1H-131-206	P14T	68,86	100
DOM 1H-131-206	L11A	97,96	100
DOM 1H-131-206	A84T	90,96	100
DOM 1H-131-206	L108A	94,30	100
DOM 1H-131-206	T110A	78,84	100
DOM 1H-131-206	S112A	77,11	80
DOM 1H-131-206	P14K + A ở đầu tận cùng C	29,13	10
DOM 1H-131-206	P14K + ASTKG ở đầu tận cùng C	25,01	10
DOM 1H-131-206	P14Q + A ở đầu tận cùng C	29,66	20
DOM 1H-131-206	P14Q + ASTKG ở đầu tận cùng C	21,76	10
DOM 1H-131-206	P14T + A ở đầu tận cùng C	32,97	20
DOM 1H-131-206	P14T + ASTKG ở đầu tận cùng C	17,19	0

Ví dụ 5a và 5b: Ái lực của DOM1H-131-206 đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C

Các nghiên cứu tiếp theo được thực hiện để xác định liệu cải biến với DOM1H-131-206 làm giảm sự gắn kết của ADA đã có trước đó có gây ra thay đổi bất kỳ với ái lực của dAb này đối với đích của nó, TNFR1 người hay không.

Ví dụ 5a: Đánh giá sự gắn kết với TNFR1 của thể đột biến DOM1H-131-206 bằng ELISA

Khả năng của các biến thể cải biến của DOM 1H-131-206 (dAb thử nghiệm) gắn kết với TNFR1 người được xác định bởi ELISA. Quan sát rằng đột biến khung và các cải biến ở đầu tận cùng C được thể hiện là làm giảm sự gắn kết ADA đã có trước

đó thường có sự gắn kết với TNFR1 có thể so sánh được so với dAb DOM1h-131-206 gốc. Ngoại trừ là DOM1H-131-206 với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C của ASTKGP, có trị số EC50 gắn kết TNFR1 thấp hơn khoảng 5 lần so với dAb DOM1H-131-206 gốc.

Quy trình thử nghiệm gắn kết ELISA TNFR1:

1. TNFR1-Fc tái tổ hợp người (R&D Systems) được bổ sung vào đĩa ELISA 96 lỗ ở nồng độ cuối là 0,1µg/mL trong dung dịch đệm carbonat-bicarbonat độ pH=9,4 (Pierce).
2. Sau khi ủ qua đêm ở 4°C, TNFR1:Fc dư được loại bỏ bằng cách rửa 3 lần bằng đệm rửa (dung dịch đệm rửa – 0,1% Tween-20/PBS) và ba lần bằng PBS.
3. Các đĩa được phong bế bằng BSA 1% trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ phong bế bằng cách rửa như trên và sau đó các mẫu dAb thử nghiệm pha loãng trong chất pha loãng của thử nghiệm (BSA 0,1% + Tween-20 0,05%/PBS) được bổ sung vào đĩa và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.
4. Sau khi rửa như trên, Ig đa dòng thô kháng người (đặc hiệu Vh) ở nồng độ pha loãng 1:1000 trong chất pha loãng của thử nghiệm được bổ sung vào và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.
5. Sau khi rửa như trên, thể liên hợp kháng thể chuột kháng thể HRP được bổ sung vào ở nồng độ pha loãng 1:10,000 trong chất pha loãng của thử nghiệm và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.
6. Sau khi rửa như trên, 100uL cơ chất SureBlue TMB được bổ sung vào mỗi lỗ. Khi màu xanh tăng vừa đủ, phản ứng enzym được dừng lại bằng 100µL HCl 1M và đĩa được đọc ở 450nm.
7. Đường cong đáp ứng liều với mỗi dAb thử nghiệm được điều chế bằng cách vẽ đồ thị nồng độ với giá trị hấp thụ. Các trị số EC50 của dAb gắn kết với TNFR1 được xác định bằng thuật toán Graphpad.

Bảng 4a: Đánh giá sự gắn kết với TNFR1 của thể đột biến DOM1H-131-206

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	EC50 trung bình gắn kết TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	1,99
DOM 1H-131-206	Q13A	1,75
DOM 1H-131-206	P14A	1,22
DOM 1H-131-206	P41A	0,59
DOM 1H-131-206	K43A	0,67
DOM 1H-131-206	G44E	0,86
DOM 1H-131-206	R83A	0,76
DOM 1H-131-206	H91S	0,96
DOM 1H-131-206	L108Q	0,85
DOM 1H-131-206	P14A,G44E	2,03
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	3,50
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	0,75
DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	1,64
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	1,99
DOM 1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	1,21
DOM 1H-131-206	ASTK ở đầu tận cùng C	1,59
DOM 1H-131-206	ASTKG ở đầu tận cùng C	1,11
DOM 1H-131-206	ASTKGP ở đầu tận cùng C	11,89

Bảng 4b: Đánh giá sự gắn kết với TNFR1 của thể đột biến DOM1H-131-206

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	EC50 trung bình của gắn kết TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	0,67
DOM 1H-131-206	P14A + ở đầu tận cùng C A	0,57
DOM 1H-131-206	P14A + ASTKG ở đầu tận cùng C	1,47
DOM 1H-131-206	AST ở đầu tận cùng C	1,99

DOM 1H-131-206	sự khuyết đoạn S ở đầu tận cùng C (ΔS)	0,50
DOM 1H-131-206	P14E	0,64
DOM 1H-131-206	P14K	0,72
DOM 1H-131-206	P14Q	0,91
DOM 1H-131-206	P14T	0,77
DOM 1H-131-206	L11A	0,51
DOM 1H-131-206	A84T	0,79
DOM 1H-131-206	L108A	0,70
DOM 1H-131-206	T110A	0,29
DOM 1H-131-206	S112A	1,19
DOM 1H-131-206	P14K + A ở đầu tận cùng C	0,46
DOM 1H-131-206	P14K + ASTKG ở đầu tận cùng C	0,48
DOM 1H-131-206	P14Q + A ở đầu tận cùng C	0,46
DOM 1H-131-206	P14Q + ASTKG ở đầu tận cùng C	1,10
DOM 1H-131-206	P14T + A ở đầu tận cùng C	0,66
DOM 1H-131-206	P14T + ASTKG ở đầu tận cùng C	0,72

Bảng 4c: Đánh giá sự gắn kết với TNFR1 của thể đột biến DOM1H-131-206

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	EC50 trung bình của sự gắn kết TNFR1 (nM)
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	1,97
DOM 1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	2,71
DOM 1H-131-206	P14A + A ở đầu tận cùng C	2,22
DOM 1H-131-206	ASTKG ở đầu tận cùng C	1,90
DOM 1H-131-206	P14A + ASTKG ở đầu tận cùng C	4,64

Ví dụ 4b: Quy trình thử nghiệm ái lực TNFR1 bằng Biacore™

Ái lực của dAb DOM1h-131-206 cải biến với đầu tận cùng C A đoạn kéo dài được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng Biacore™ T100. kháng thể kháng IgG người được bất động lên cảm biến CM4, và TNFR1:Fc người được bắt

giữ trên bề mặt này ở mức độ khoảng 60 đơn vị tương ứng. Nguyên liệu thử nghiệm pha loãng trong đệm đến nồng độ cuối cùng là 25nM đến 0,024nM (trong khoảng pha loãng 4 lần) được tiêm lên trên TNFR1:Fc. Đường cong gắn kết tạo ra được tham chiếu hai lần bằng đường cong nguyên liệu thử nghiệm 0nM, và số liệu được khớp với mô hình gắn kết 1:1 để tạo ra số liệu động học. Sự gắn kết của nguyên liệu thử nghiệm với TNFR1 khi đầu chỏ được xác định theo cách tương tự. Số liệu gắn kết động học được thể hiện trong Bảng 4d dưới đây.

Kết luận, động học gắn kết của TNFR1dAb cải biến (tức là với đoạn bổ sung A ở đầu tận cùng C) và TNFR1dAb không được cải biến là tương tự nhau.

Bảng 4d:

	DOM1H-131-206 điều biến	Động học gắn kết		
		Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹) (x 10 ⁶)	Kd (s ⁻¹) (x 10 ⁻⁴)	KD (M) (x 10 ⁻¹¹)
TNFR1 người	Đầu tận cùng C A	9,02	2,29	2,53
	Không được cải biến	9,94	1,42	1,43
TNFR1 khi đầu chỏ	Không được cải biến	10,10	1,51	1,50
	A ở đầu tận cùng C	9,60	1,89	1,97

(không tính được sai số với các số liệu trên)

Ví dụ 6: Động học của đoạn kéo dài đầu tận cùng C của DOM1H-131-206

Các nghiên cứu được thực hiện để xác định liệu sự cải biến với DOM1H-131-206 làm giảm sự gắn kết của ADA đã có trước đó gây ra thay đổi bất kỳ với động học của dAb này hay không.

Quy trình động học

Sự biểu hiện toàn thân của DOM 1H-131-206 và DOM 1H-131-206 với đoạn kéo dài anilin ở đầu tận cùng C được xác định ở khi đầu chỏ. Các nhóm riêng biệt gồm 5 khi đầu chỏ được dùng nguyên liệu thử nghiệm bằng cách truyền 30 phút trong tĩnh mạch. Các mẫu huyết tương được lấy khi 48 giờ sau khi dùng thuốc và các mức của hai nguyên liệu thử nghiệm xác định được bởi thử nghiệm miễn dịch. Ngắn gọn, kháng thể biotinyl hóa đặc hiệu với nguyên liệu thử nghiệm được bổ sung vào đĩa vi

chuẩn 96 lỗ được bao bởi streptavidin, sau đó các mẫu huyết tương của khi được bổ sung vào. TNFR1:Fc người được đánh dấu digoxigenin được bổ sung vào, sau đó kháng thể kháng digoxigenin liên hợp với peroxidaza cây cải ngựa được bổ sung vào. Cuối cùng, cơ chất TMB (từ R+D systems) được bổ sung vào và lượng nguyên liệu thử nghiệm xác định bởi cách tính ngược tín hiệu đo màu từ đường cong chuẩn của nguyên liệu thử nghiệm.

Quan sát thấy không có sự thay đổi đáng kể (>2 lần) các thông số tiếp xúc toàn thân trung bình theo giới tính khi DOM-1H131-206 được so sánh với DOM-1H131-206 +A ở khi đầu chó sau khi truyền tĩnh mạch. Kết luận là sự cải biến DOM1H-131-206 bằng cách thêm đoạn kéo dài đầu ở tận cùng C (+A) không gây ảnh hưởng đến được động học của dAb (thể hiện trong Bảng 5).

Bảng 5: Dược động học của thể đột biến DOM1H-131-206 sau một liều tĩnh mạch đơn ở khi đầu chó

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	Thời gian bán rã trong huyết tương- $\pm$ độ lệch chuẩn	Độ thanh thải (mL/phút/kg)	Thể tích phân bố $\pm$ độ lệch chuẩn
DOM 1H-131-206	Không được cải biến	$2,80 \pm 0,32$	$1,48 \pm 0,21$	$0,25 \pm 0,05$
DOM 1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	$2,57 \pm 0,64$	$2,31 \pm 0,49$	$0,34 \pm 0,04$

Ví dụ 7a: Biểu hiện biến thể DOM1H-131-206

Để xác định rằng liệu sự cải biến khung VH làm giảm sự gắn kết ADA đã có trước đó có ảnh hưởng lên sự biểu hiện của dAb kháng TNFR1 hay không, hiệu suất của các biến thể cải biến của dAb DOM1H 131-206 kháng TNFR1 được so sánh với dòng cha mẹ sau khi phát triển trong bình lên men 1 lít. dAb thử nghiệm được sát nhập với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C (+A hoặc +ASTKG), có hoặc không có sự thể đoạn của khung (P14A). dAb thử nghiệm được biểu hiện trong cùng chủng *E. Coli*, sử dụng cùng vectơ bất kỳ vi khuẩn (pave011 (Avecia)) làm DOM1H 131-206 không được cải biến (SEQ ID NO 1). Ở quy mô nhỏ, mức biểu hiện (1L), hiệu suất toàn phần của dAb với đoạn nối ở đầu tận cùng C +A hoặc +ASTKG là giống với dòng cha mẹ không được cải biến. Hiệu suất của dAb với sự thể đoạn P14A và đoạn kéo dài ở đầu tận

cùng C (+A hoặc +ASTKG) là giảm so với dòng cha mẹ không được cải biến (Bảng 6a).

Quy trình biểu hiện

Giai đoạn ‘mồi’ (mở rộng cấy) được hoàn thành bằng cách ủ bình lắc 100ml bằng ống thủy tinh chứa tế bào *E. Coli* biểu hiện cấu trúc dAb trong vector biểu hiện vi khuẩn.

Sau khoảng 10 giờ phát triển, bình cấy giống được sử dụng để chủng thùng lên men 1L. Quy trình sản xuất này được thực hiện gồm 3 giai đoạn, theo mẻ, theo mẻ có bổ sung nguồn carbon và cảm ứng. Pha mẻ đầu tiên kéo dài trong khoảng 13 giờ trong thời gian này việc nuôi cấy được phát triển theo hàm mũ ở 37°C (bước giảm nhiệt độ đến 30°C trong 4 giờ cuối cùng) cho đến khi nguồn cacbon sơ cấp, glyxerol, được tiêu hết. Khi tiêu hết glyxerol, sự cấy trong oxy hòa tan (DO) diễn ra và bắt đầu bổ sung nguồn dinh dưỡng (giai đoạn theo mẻ có bổ sung nguồn carbon). Khoảng 5 giờ sau khi bắt đầu bổ sung dinh dưỡng (ở mức OD₆₀₀ là 75), môi trường nuôi cấy được gây cảm ứng bằng IPTG (giai đoạn cảm ứng) và trong pha này của quy trình, sản phẩm được sinh ra và giải phóng vào môi trường. Mẻ này được dừng lại khoảng 48 giờ sau khi gây cảm ứng và lượng dAb trong dịch nổi trên bề mặt được định lượng bằng HPLC.

Bảng 6a: Sự biểu hiện của các độ chuẩn của biến thể DOM1H-131-206

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	Chuẩn độ dịch nổi trên bề mặt hu hoạch được (g/L)
DOM1H-131-206	Không được cải biến	2,71
DOM1H-131-206	A ở đầu tận cùng C	3,15
DOM1H-131-206	ASTKG ở đầu tận cùng C	2,22
DOM1H-131-206	P14A + A ở đầu tận cùng C	0,29
DOM1H-131-206	P14A + ASTKG ở đầu tận cùng C	0,18

Kết luận từ thí nghiệm này như sau:

1) Thể đột biến DOM1H-131-206 +A, DOM1H-131-206 +ASTKG và kiểu đại thể hiện sự biểu hiện dAb rất tốt.

Chuẩn độ cao nhất là khoảng 3000mg/L.

2) Thẻ đột biến DOM1H-131-206 P14 +A, và DOM1H-131-206 p14 +ASTKG không thể biểu hiện dAb trong quy trình này.

3) Nói chung, DOM1H-131-206 +A và DOM1H-131-206+ASTKG là có thể so sánh với kiểu đại về mức biểu hiện dAb //////////////////////////////////

Ví dụ 7b: Độ ổn định của DOM1H-131-206 với alanin ở đầu tận cùng C

Độ ổn định của đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C của DOM 1H-131-206 +A được xác định trong người huyết thanh, dịch treo mô đồng thể phổi hoặc dịch treo mô đồng thể gan được được bằng thử nghiệm miễn dịch hợp lệ đối với DOM 1H-131-206 (mô tả sau đây) phát hiện DOM 1H-131-206 nhưng tương tác chéo rất yếu với DOM 1H-131-206+A. Điều này là do thực tế là việc phát hiện kháng thể M2.3G10.1G06 gắn kết mạnh với DOM 1H-131-206 nhưng yếu với DOM 1H-131-206 +A. Định dạng thử nghiệm này sử dụng TNFR1:Fc người làm chất phản ứng bắt giữ và do đó, được xem là đặc hiệu với dAb chức năng, nguyên vẹn.

Đã quan sát thấy huyết tương được cấy 2 μ g/mL DOM 1H-131-206 +A cho kết quả đọc là ~6,4ng/mL trong thử nghiệm này, trong khi đệm được cấy 2 μ g/mL GSK2862277 cho kết quả đọc là 11,3ng/mL. Do đó, độ phản ứng chéo của DOM 1H-131-206 +A trong thử nghiệm DOM 1H-131-206 được đánh giá nằm trong khoảng từ 0,25-0,5%.

Để nghiên cứu sự đảo nghịch, máu toàn phần của người, người dịch treo mô đồng thể phổi (10mg protein/ml), hoặc người dịch treo mô đồng thể gan (10mg protein/ml) được cấy 1 μ g/ml hoặc DOM 1H-131-206, DOM 1H-131-206 +A hoặc đệm (không bổ sung được chất). Sau khi ủ trong hoặc 0, 3 giờ, 6 giờ hoặc 24 giờ, huyết tương/dịch nổi trên bề mặt được thu lấy bằng cách ly tâm và lấy mẫu lạnh trước khi thử nghiệm DOM 1H-131-206 bằng thử nghiệm miễn dịch hợp lệ (khoảng hoạt động từ 0,1 đến 10ng/ml).

Qua 24 giờ, không có bằng chứng về sự đảo nghịch của DOM 1H-131-206 +A thành DOM 1H-131-206 trong cả chất nền, điều này được chứng minh bằng sự tăng tín hiệu trong thử nghiệm miễn dịch (do sự hình thành DOM 1H-131-206). Điều này gợi ý rằng alanin ở đầu tận cùng C khác nữa là có xu hướng tách thủy phân protein nhanh chóng.

Quy trình thử nghiệm miễn dịch hợp lệ DOM 11H-131-206

mAb kháng VH biotinyll hóa (M2.3G10.1G06) được pha loãng trong đệm thử nghiệm (Tris 10mM, NaCl 150mM, BSA 0,1%, Tween20 0,1%, độ pH =7,5) và 100μL sử dụng ở nồng độ cuối cùng là 10ng/ml vào mỗi lỗ của đĩa được bao Neutravidin (Pierce). Đĩa này được đậy kín và ủ trong 1 giờ ở 37°C.

Đĩa vi chuẩn được rửa 5 lần bằng 300μL đệm rửa (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5) bằng máy rửa đĩa.

100μL chất chuẩn trong mỗi lỗ, và các mẫu được pha loãng trong chất nền được bổ sung vào và đĩa được đậy kín và ủ cùng với điều kiện lắc đều trong khoảng 2 giờ ở 37°C.

Đĩa vi chuẩn được rửa 5 lần bằng 300μL đệm rửa.

100μL hTNFR1:Fc đánh dấu digoxigenin trong mỗi lỗ (1:40,000) được bổ sung vào và đĩa được đậy kín và ủ cùng với điều kiện lắc đều trong khoảng 2 giờ ở 37°C.

Đĩa vi chuẩn được rửa 5 lần bằng 300μL đệm rửa.

100μL kháng thể kháng digoxigenin chuột được đánh dấu HRP trong mỗi lỗ (Abcam)(1:20,000) được bổ sung vào và dung dịch, được đậy kín bằng băng dán dính vô khuẩn, và đĩa được đậy kín và ủ cùng với điều kiện lắc đều trong khoảng 2 giờ ở 37°C.

Đĩa vi chuẩn được rửa 5 lần bằng 300μL đệm rửa.

100μL chất TMB trong mỗi lỗ cơ (Thermo) được bổ sung vào và đĩa được ủ cùng với điều kiện lắc đều trong khoảng 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.

100μL dung dịch ngừng cơ chất TMB (Sigma) được bổ sung vào trong mỗi lỗ, và độ hấp thụ ở 450nm với mỗi lỗ được đọc bằng máy đọc đĩa. Đường cong chuẩn được hiệu chỉnh phù hợp với thuật toán bốn thông số logistic gia trọng 1/x sử dụng SMS2000 và các mẫu chưa biết được nội suy từ đường cong.

Ví dụ 7c: Khả năng của DOM1H-131-206 với đoạn kéo dài analin ở đầu tận cùng C (+A) để ức chế sự truyền tín hiệu TNFR1:

Tín hiệu $\text{TNF}\alpha$ thông qua con đường $\text{NF}\kappa\text{B}$ gây tiết ra các xytokin khác nhau bao gồm IL-8. Trong các tế bào không được kích thích, IL-8 mRNA bị phân hủy nhanh chóng. Tuy nhiên, trong sự có mặt của $\text{TNF}\alpha$, sự hoạt hóa con đường $\text{NF}\kappa\text{B}$ dẫn đến sự ổn định IL-8 mRNA. Sự ổn định này gây ra sự tăng mRNA và góp phần thúc đẩy sự tiết IL-8. Do đó, trong thử nghiệm này, sự thúc đẩy IL-8 tiết là để xác định việc thêm đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C có ảnh hưởng đến khả năng của DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A (tức là đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C) ức chế sự truyền tín hiệu TNFR1 hay không. Các nghiên cứu được tiến hành ở dòng tế bào người và khỉ *Cynomolgus*, và cũng như trong máu toàn phần người và khỉ *Cynomolgus*. So sánh trị số IC_{50} chỉ ra rằng đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C của DOM1H-131-206 which sự gắn kết ADA đã có trước đó giảm đi không ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng của DOM1H-131-206 để ức chế sự truyền tín hiệu qua TNFR1 ở tế bào người hoặc khỉ *Cynomolgus* (Bảng 6b).

Quy trình xác định IL-8 gây cảm ứng $\text{TNF}\alpha$ trong nguyên bào sợi phổi của người

Khả năng của DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A ngăn cản $\text{TNF}\alpha$ người gắn kết với TNFR1 người và ức chế sự tiết IL-8 được xác định bằng tế bào nguyên bào sợi phổi MRC-5 của (ATCC). Tế bào MRC-5 được ủ với các mẫu thử nghiệm trong một giờ sau đó $\text{TNF}\alpha$ (220pg/ml) được bổ sung vào. Sau khi ủ ở 37°C và 5% CO_2 trong 24 giờ, dịch nổi trên bề mặt được thu lấy và bảo quản ở -20°C cho đến khi thử nghiệm MSD™ với IL-8 được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với các mẫu nuôi cấy mô. Dịch nổi trên bề mặt được pha loãng 1/12 trong chất pha loãng Calibrator của nhà cung cấp trước khi thử nghiệm. Việc hiệu chỉnh đường cong được thực hiện trong thuật toán GraphPad để xác định trị số IC_{50} .

Quy trình xác định sự ức chế IL-8 gây cảm ứng $\text{TNF}\alpha$ trong tế bào A549

Tế bào A549 được cấy vào trong các đĩa 96 lỗ ở mật độ 2×10^4 tế bào/lỗ và được ủ qua đêm ở 37°C và 5% CO_2 để nhập dòng. Các tế bào sau đó được ủ trong một giờ trong sự có mặt của DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A ở các nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 0,01nM-1000nM. Mỗi nồng độ được thử nghiệm trong các lỗ đúp. Sau khi ủ ở 37°C và 5% CO_2 trong 24 giờ, dịch nổi trên bề mặt được thu lấy và bảo quản ở -20°C cho đến khi thử nghiệm MSD™ với IL-8 được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với các mẫu nuôi cấy mô. Dịch nổi trên bề mặt được

pha loãng 1 phần 5 trong chất pha loãng Calibrator được cung cấp trước thử nghiệm. Hiệu chỉnh đường cong và trị số IC_{50} được tính toán bằng XLFit.

Quy trình xác định sự ức chế IL-8 gây cảm ứng $TNF\alpha$ trong tế bào CYNOM-K1

Tế bào CYNOM-K1 được ủ trong một giờ trong sự có mặt của DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A ở các nồng độ khác nhau bắt đầu từ 100nM. Sau đó kích thích bằng $TNF\alpha$ ở nồng độ cuối cùng là 1ng/ml. Sau khi ủ ở 37°C và 5% CO_2 trong 24 giờ, dịch nổi trên bề mặt được thu hoạch và bảo quản ở -20°C cho đến khi MSD™ với IL-8 được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất về mẫu nuôi cấy mô. Dịch nổi trên bề mặt được pha loãng 1 phần 12 trong chất pha loãng Calibrator được cung cấp trước thử nghiệm. Tiến hành hiệu chỉnh đường cong trong thuật toán GraphPad để xác định trị số IC_{50} .

Quy trình xác định sự ức chế IL-8 gây cảm ứng $TNF\alpha$ trong máu toàn phần của người

Máu từ người cho khỏe mạnh (với sự cho phép thích hợp với UK Human Tissue Act) được thu tập trung vào natri heparin. Môi trường thử nghiệm được điều chế bằng cách bổ sung BSA 1% vào môi trường RPMI-1640 (không có đồ phenol). DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A và dAb giả V_H được pha loãng trong đĩa 96 lỗ trong môi trường thử nghiệm sao cho nồng độ cuối cùng sau khi bổ sung máu sẽ là 800nM, và pha loãng dần 1 phần 2 xuống nồng độ 0,01nM. 130μl máu được bổ sung trong mỗi lỗ và các đĩa được ủ trong một giờ (37°C, 5% CO_2) để cho gắn kết với $TNFR1$. Các mẫu máu sau đó được kích thích bằng 10μl $TNF\alpha$ pha loãng trong môi trường thử nghiệm sao cho nồng độ cuối cùng là 10ng/ml. Mỗi điều kiện được thử nghiệm thành hai bản. Sau khi ủ tiếp trong 24 giờ (37°C, 5% CO_2), 110μl PBS được bổ sung trong mỗi lỗ để làm tăng thể tích của mẫu, sau đó được lắc trên máy lắc đĩa trong 10 phút ở tốc độ 500 vòng/phút và ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút. Huyết tương được chuyển vào đĩa mới và bảo quản ở -80°C cho đến khi thử nghiệm IL-8 MSD™ được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với mẫu huyết thanh và huyết tương. Hiệu chỉnh đường cong và trị số IC_{50} được tính toán bằng XLFit.

Quy trình xác định sự ức chế IL-8 kích thích bởi LPS trong máu toàn phần từ khỉ *Cynomolgus*

12ml máu từ 4 khỉ đầu chó được thu lấy từ natri heparin. Môi trường thử nghiệm được điều chế bằng cách bổ sung BSA 1% vào môi trường RPMI-1640 (không có đồ phenol). DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206+A và dAb giả V_H được pha loãng trong đĩa 96 lỗ trong môi trường thử nghiệm đến nồng độ cuối cùng 15X. Mỗi nồng độ được thử nghiệm thành 3 bản. 130 μ l máu được bổ sung vào trong mỗi lỗ và các đĩa được ủ trong 1 giờ (37°C, 5% CO₂) trước khi kích thích bằng 10 μ l LPS pha loãng trong môi trường thử nghiệm sao cho nồng độ cuối cùng là 94ng/ml. Sau đó, các đĩa được ủ thêm trong 24 giờ (37°C, 5% CO₂). Sau khi ủ, 110 μ l PBS được bổ sung trong mỗi lỗ để làm tăng thể tích của mẫu, sau đó được lắc trên máy lắc đĩa trong 10 phút ở tốc độ 500 vòng/phút và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 5 phút. Huyết tương được chuyển vào đĩa mới và bảo quản ở -80°C cho đến khi IL-8 được đo bằng thử nghiệm MSD™ với IL-8 người được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất với các mẫu huyết thanh và huyết tương. Huyết tương không được pha loãng trong thử nghiệm. Hiệu chỉnh đường cong và trị số IC₅₀ được tính toán bằng XLFit.

Bảng 6b: Tóm tắt hiệu lực của DOM1H-131-206 so với DOM1H-131-206 +A trong thử nghiệm trên tế bào người và khỉ:

	IC ₅₀ (nM) $\pm$ Độ lệch chuẩn	
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206+A
Nguyên bào sợi phổi của người MRC5 (n=3)	4,8 $\pm$ 2,4	3,5 $\pm$ 2,5
A549 biểu mô phổi của người (n=2)	1,0 $\pm$ 0,23	1,0 $\pm$ 0,28
Nguyên bào sợi da CYNOMK1 của khỉ <i>Cynomolgus</i> (n=2)	4,8 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,7
Máu toàn phần của người (n=3-5)	1,6 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,3
Máu toàn phần của khỉ <i>Cynomolgus</i> (n=3)	0,5 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3

Ví dụ 7d: Sử dụng kháng thể vùng DOM1h-131-206 để điều trị bệnh vảy nến

Trong các nghiên cứu này, kháng thể vùng DOM1h-131-206 (có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1) được sử dụng cũng như gen trực giao loài gặm nhấm của kháng thể vùng này. Số liệu thu được với các phân tử này được sử dụng để lựa chọn liều và quy trình điều trị được mô tả ở đây để sử dụng cho điều trị bệnh vẩy nến, và mảng vẩy nến, ở bệnh nhân là người được sử dụng hoặc DOM1h-131-206 (có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1), hoặc phân tử cố định ADA DOM1h-131-206 với alanin tận cùng (có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16), hoặc phân tử cố định ADA DOM1h131206 bao gồm phân tử cố định ADA (tức là cải biến bất kỳ để làm giảm sự gắn kết của dAb với ADA) như bộc lộ trong đây.

Ví dụ, dược động học có nguồn gốc từ nghiên cứu *in vivo* với khi đầu chó thể hiện kháng thể vùng DOM1h-131-206 (với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1) để có độ thanh thải huyết tương là 2,4 mL/phút/kg, gần với tỷ lệ lọc của cầu thận (GFR) ở khi và cho thời gian bán rã khoảng 3 giờ. Thể tích phân phối của kháng thể vùng là 0,26 L/kg, là gần bằng với thể tích ngoài mạch và gợi ý về sự phân bố bên ngoài ngăn trung tâm/huyết tương. Khi kháng thể vùng DOM1h-131-206 được sử dụng cho ngăn ngoại mạch (ví dụ khi xông hít vào phổi), chỉ có sự thay đổi nhỏ trong thời gian bán rã thải trừ phản ánh động học hạn chế tốc độ hấp thu.

Hơn nữa, sau khi dùng trong da dAb kháng TNFR1 trực giao của loài gặm nhấm (“Dom1m-15-12”) cho chuột, quan sát thấy độ trễ hấp thu kéo dài hơn. Điều này có thể là do sự khác biệt lớn hơn giữa GFR và độ thanh thải tốc độ hấp thu sau khi dùng thuốc qua đường trong da. Tốc độ thải trừ quan sát được cuối cùng ở huyết tương chuột là khoảng 40 phút là dài hơn so với đường trong tĩnh mạch (khoảng 20 phút). Tốc độ thải trừ chậm hơn (K_e) được thấy trong huyết tương sau khi dùng thuốc trong tĩnh mạch được xác thực bởi giá trị PK mô da thể hiện tốc độ thải trừ cuối cùng là 5-7 giờ (K_e là 0,1-0,14 h⁻¹), mặc dù một phần liều dẫn đến tốc độ thải trừ kéo dài một cách rõ ràng được đánh giá là nhỏ (0,5 %). Tốc độ hấp thu qua da (K_a) vào trong huyết tương được xác định từ nghiên cứu trên chuột bằng cách dùng trong da dAb trực giao loài gặm nhấm và tương đối nhanh ($K_a=4,1$ h⁻¹) khiến cho T_{max} quan sát được xấp xỉ 1 giờ sau khi dùng thuốc. Ước tính rằng 10% kháng thể vùng được giữ lại trong ngăn da ở chuột cống với tốc độ thải trừ giả định từ da tương tự với chuột chuột nhắt. Do đó, dường như sau khi tiêm qua da, kháng thể vùng DOM1h-131-206 phân bố vào các mô được phân bố mạch trong da (ví dụ, da) tại đó nó được chiết nhanh chóng vào huyết

tương và được thải trừ bằng cách lọc qua thận. Pha phân bố và hấp thu đầu tiên qua các mô da được thể hiện trong thời gian chậm hấp thu trước khi tiếp xúc với huyết tương là đo được. Với các khác biệt về giải phẫu giữa da loài gặm nhấm và người, tốc độ hấp thu ở người được hy vọng là lâu hơn, lần lượt sẽ dẫn đến sự tiếp xúc với huyết tương của kháng thể vùng DOM1h-131-206 là thấp hơn/không đo được. Điều này có nghĩa là dự đoán về sự tiếp xúc với huyết tương người sẽ dựa trên quan sát từ các nghiên cứu trên loài gặm nhấm và do đó là ước lượng có tính dè dặt về mức độ tiếp xúc với huyết tương ở người.

Kháng thể vùng DOM1h-131-206 (có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1) cũng được dùng cho người cho khỏe mạnh qua đường truyền trong tĩnh mạch (lên đến khoảng thời gian 3 giờ) lên đến 2mg/kg và trong thử nghiệm đang diễn ra qua đường xông hít ở người cho khỏe mạnh. Các thông số dược động học thu được thường là rất thống nhất với số liệu tiền lâm sàng ở khi đầu chó. Sau khi sử dụng trong tĩnh mạch, độ thanh thải nằm trong khoảng từ 0,6-1,5 mL/phút/kg (GFR ở người khoảng 1,8mL/phút/kg) với thời gian bán rã thải trừ thu được là 5 giờ. Thể tích phân bố, khoảng 0,3L/kg, là tương tự với thể tích ngoại mạch. Sự phân bố nhanh của kháng thể vùng DOM1h-131-206 vào gian ngoại mạch được khẳng định qua phương pháp đo thể tích dịch rửa phế nang (dịch kẽ biểu mô phổi) sau khi sử dụng IV. Mức dịch ngoại mạch xấp xỉ 4-14 % của mức huyết tương đo được ở thời điểm 5 giờ bắt đầu từ khi sử dụng sau khi truyền 3 giờ.

Các dự đoán về hiệu lực ở người được ước lượng về độ tiếp xúc quan sát thấy và dự tính trong ngăn da và số liệu của dòng tế bào người *in vitro*. Khoảng IC₅₀ (8-40 ng/mL) trong các hệ *in vitro* (thay đổi độ phức tạp và kiểu tế bào) đã được sử dụng làm mức tối thiểu của đích trong ngăn da và việc lựa chọn thuận tiện liều kháng thể vùng và quy trình điều trị để điều trị bệnh vẩy nến, và mảng vẩy nến, ở bệnh nhân là người mô tả trong đây. Ví dụ, liều bắt đầu là 0,5mg được chọn để đạt được độ tiếp xúc huyết tương, giả định sự tiếp xúc toàn thân trường hợp thấp nhất, thấp hơn giá trị đạt được trong nghiên cứu FTIH trong tĩnh mạch là chủ vận, được quan sát thấy ở đối tượng dương tính với ADA. Ở liều bắt đầu đầu tiên này, hy vọng rằng sự truyền tín hiệu qua TNFR1 được ức chế trong vùng riêng biệt quanh vị trí tiêm (diện tích bề mặt < 2 cm²) đến mức ≥ 90 % ngay lập tức sau khi dùng thuốc. Việc ức chế TNFR1 theo thời gian là phụ thuộc vào lượng dược chất được phân phối, giữ lại và sau đó được thải

trừ từ ngăn da. Giả sử tối thiểu, (10 % mức giữ trong da và K_e 0,1-0,14 h⁻¹ như ở chuột), hy vọng là các mức này sẽ được duy trì $\geq IC_{50}$ (trong vùng tiêm/thử nghiệm) với tối thiểu là 3 ngày sau khi tiêm trong da 0,5mg kháng thể vùng DOM1h-131-206.

Để lựa chọn các liều kháng thể vùng và quy trình điều trị, dự đoán về mức tiếp xúc huyết tương người sau khi dùng qua da kháng thể vùng DOM1h-131-206 được thực hiện. Các dự đoán này giả định độ tiếp xúc có thể tối đa sẽ đạt được với tiêm qua da. Số liệu nồng độ huyết tương người-thời gian từ kháng thể vùng DOM1h-131-206 sử dụng trong tĩnh mạch được sử dụng trong mô hình PK da ở người với tốc độ hấp thu bị cố định (đo được từ giai đoạn hấp thu qua da loài gặm nhấm) và sinh khả dụng là 100 %. Profin nồng độ-thời gian huyết tương người với các liều vùng tối đa và quy trình điều trị mô tả trong đây (2mg mỗi tuần + 0,5mg mỗi hai tuần) sau đó được thử nghiệm. Nồng độ huyết tương đỉnh dự đoán thấy được đạt T_{max} nhanh chóng trong vòng 30 phút sau khi dùng thuốc, và các mức giảm nhanh chóng đến mức dưới thử nghiệm huyết tương đang thực hiện thấp hơn giới hạn định lượng (0,1 ng/mL) trong vòng 24 giờ. Hy vọng không có sự tích lũy trên các liều lặp lại trong huyết tương thậm chí bằng dự đoán mức tiếp xúc có thể tối đa. Tuy nhiên, dự đoán này là mức tiếp xúc huyết tương có thể cao nhất và là mức tiếp xúc có thể thấp hơn đáng kể so với dự đoán và thậm chí thấp đến mức mức huyết tương có thể không đo được. Bằng các mức ức chế đích (dựa trên thử nghiệm tế bào *in vitro*), dự đoán là mức IC_{90} (ngay lập tức sau liều) hoặc IC_{50} (mức thấp) trong da trong quy trình điều trị mô tả trong đây sẽ lần lượt nằm trong khoảng từ 30-80 ng/mL hoặc 8-40 n/mL.

Dựa trên thông tin trên, mức tiếp xúc huyết tương (C_{max} và AUC) với liều đầu tiên, liều hằng ngày tối đa và liều tích lũy, trong 28 ngày, được thể hiện trong Bảng 6b sau đây cùng với giới hạn an toàn so với độ an toàn tiền lâm sàng.

Bảng 6b:

Liều đầu tiên – 0,5mg mỗi tuần		Hệ số an toàn ¹
C_{max}	ng/mL	933
$AUC_{(0-48h)}$	ng.giờ/mL	2137
$AUC_{(0-28d)}$	ng.giờ/mL	537
Liều tối đa - 2mg mỗi tuần + 0,5mg mỗi 2 tuần		
C_{max}	ng/mL	187
$AUC_{(0-48h)}$	ng.giờ/mL	427
$AUC_{(0-7d)}$	ng.giờ/mL	356

AUC _(0-28d)	ng·giờ/mL	89
------------------------	-----------	----

Trong 14 ngày, liều lặp lại, phòng thí nghiệm khỉ *Cynomologus* tiến hành nghiên cứu độc tính ở khỉ đực (20mg/kg/ngày) dựa trên mức tiếp xúc trung bình của giống đực (ngày 1,4 và 14) ($C_{\max}$ và AUC_(0-24h) lần lượt là 48,5 ug/mL và 249 ug·giờ/mL).

Cuối cùng, thông tin nêu trên từ các nghiên cứu *in vitro*, nghiên cứu *in vivo* và phân tích liên quan được sử dụng để lựa chọn các liều kháng thể vùng và quy trình điều trị hữu dụng để điều trị bệnh vẩy nến ở bệnh nhân là người.

Sử dụng kháng thể vùng theo quy trình điều trị như bộc lộ trong đây là hữu dụng trong điều trị bệnh vẩy nến. Hiệu lực của kháng thể vùng để điều trị bệnh vẩy nến, như trong một quy trình điều trị cụ thể, có thể được khẳng định hoặc bằng phép đo mảng vẩy nến bằng âm kế và/hoặc đánh giá lâm sàng.

Âm kế, phương pháp đo dựa trên siêu âm tần số cao có thể được thực hiện bằng âm kế tần số cao 20 MHz (DUB USB, Taberna pro Medicum, Lueneburg). Bản quét-A hàng loạt có thể được tạo thành và thể hiện trên màn hình là một phần của da. Độ phân giải biên khoảng 200µm và độ phân giải trục 80µm là có thể và được ưu tiên. Sự phụ thuộc vào mô hình echo, các thành phần của biểu bì, da và mô dưới da được thể hiện và việc đo chính xác độ dày của da là có thể. Chất rỉ ra trong bệnh vẩy nến bị viêm ở vị trí mảng vẩy nến được nhìn thấy là dải echo lucent có thể xác định rõ ràng dưới the entrance echo. Độ dày của dải echo lucent bệnh vẩy nến có thể được xác định và ghi chép trước khi sử dụng kháng thể vùng và sau khi sử dụng kháng thể vùng. Độ dày có thể được đo theo µm. Sự giảm độ dày của dải vẩy nến phát âm thanh sau khi sử dụng kháng thể vùng chứng minh rằng việc sử dụng kháng thể vùng, như theo quy trình điều trị được bộc lộ trong đây, là có hiệu quả trong điều trị bệnh vẩy nến, và mảng vẩy nến, ở bệnh nhân là người. Xem ví dụ, Bangha et al., 9 Skin Pharmacol. 298 (1996).

Đánh giá lâm sàng có thể được thực hiện bằng bảng điểm 5 điểm số xác định bằng cách so sánh trên lâm sàng mảng vẩy nến được điều trị trong đó tiêm kháng thể vùng với ít nhất một mảng không được điều trị gần mảng vẩy nến được xử lý. Theo so sánh này, điểm số đánh giá lâm sàng sau đây được gán (điểm số đánh giá lâm sàng là 0 theo quy định trước khi sử dụng lần đầu tiên kháng thể vùng):

-1 = nặng hơn

0 = không thay đổi (không ảnh hưởng)

1 = cải thiện ít

2 = cải thiện rõ rệt nhưng không lành vết thương hoàn toàn

3 = làm lành vết thương hoàn toàn

Do đó, dựa trên điều này, điểm số đánh giá lâm sàng tăng lên sau khi sử dụng kháng thể vùng theo quy trình điều trị như bộc lộ trong đây chỉ ra hiệu lực trong điều trị bệnh vảy nến, và mảng vảy nến, ở bệnh nhân là người.

Ví dụ 8: Đoạn kéo dài analin đơn liên kết với các dòng VHH.

Quan sát ADA gắn kết với VHH bằng thử nghiệm xác nhận sử dụng trong Ví dụ 2 (đối với DOM1H-131-206). Nhằm khẳng định rằng sự ức chế tương tự với sự gắn kết ADA sẽ đạt được bằng cách cải biến trình tự VHH, ba dòng VHH với trình tự axit amin như nêu trong Fig.2 (d), (e) và (f) được thử nghiệm:

Dòng VHH2(d) là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết IL6R liên kết bởi GGGGSGGGS kháng môđun gắn kết albumin huyết thanh người như mô tả trong WO2010100135. (trình tự axit amin nêu trong Fig.2 d: SEQ ID NO 4)

Dòng VHH2(e) là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết TNF liên kết với môđun gắn kết albumin huyết thanh người lần lượt gắn kết với môđun gắn kết TNF, sử dụng GGGGSGGGS là đoạn liên kết như mô tả trong WO2010077422. (trình tự axit amin được nêu trong Fig.2 e: SEQ ID NO 5)

Dòng VHH2(f) là định dạng đặc hiệu đơn hóa trị hai bao gồm hai môđun giống nhau gắn kết bởi đoạn liên kết Ala-Ala-Ala, mỗi môđun là dAb có thể gắn kết vùng A1 của yếu tố Von-Willebrand, như nêu trong WO2009115614A2. (trình tự axit amin được nêu trong Fig.2 f: SEQ ID NO 6)

Tất cả ba dòng trên được cải biến bằng cách bổ sung alanin đầu tận cùng C vào gốc serin cuối cùng, và các dòng cải biến và không được cải biến được so sánh bằng thử nghiệm trong Ví dụ 2. Như được thấy trong Bảng 7 và Fig.4 sau đây, các kết quả chỉ ra rằng đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C bằng gốc axit amin alanin đơn làm giảm sự gắn kết ADA.

Bảng 7:

Mẫu	VHH2(d)	VHH2(d) +A	VHH2(e)	VHH2(e) +A	VHH2(f)	VHH2(f) +A
% ức chế trung bình	93,23	18,86	94,93	16,95	94,15	17,46

Ví dụ 9: Tần suất đối tượng khỏe mạnh với ADA đã có trước đó kháng các phân tử cơ bản là dAb V_H và V_L

Quy trình thử nghiệm ADA

Tương tự như quy trình mô tả trong Ví dụ 1 đối với DOM1H-131-206, các phân tử thử nghiệm (DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1H-131-206 + đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16), mAb-VH (SEQ ID NO), trình tự peptit-VL, VH-VL (SEQ ID NO 11), phân tử '735 (SEQ ID NO 30 và 31), được biotinyl hóa, trao đổi đệm và bảo quản trong đệm chế phẩm. Các phân tử thử nghiệm này cũng được đánh dấu rutheni và sau đó trao đổi đệm và bảo quản trong đệm chế phẩm.

Kháng thể kháng được chất (ADA) với mỗi phân tử là thử nghiệm liên kết thực hiện trên nền tảng kỹ thuật MSD™ ECL (điện quang hóa học) như mô tả ở trên. Tóm tắt về quy trình thử nghiệm sử dụng trong thí nghiệm này được mô tả sau đây:

1. Đĩa MSD™ streptavidin được phong bế bởi casein phong bế 150μL/lỗ trong PBS (1%) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ. Chất phong bế được loại bỏ mà không cần rửa.
2. Sau khi ủ trước 1 giờ, hỗn hợp đồng nhất chứa phân tử thử nghiệm biotinyl hóa 0,1μg/mL, 0,1μg/mL phân tử thử nghiệm rutenyl hóa ("Sulfo-Tag"™), và 2% mẫu huyết thanh trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% Casein trong PBS) được chuyển vào đĩa MSD™ và ủ trong 1 giờ ± 5 phút ở RT.
3. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng PBST.
4. Bổ sung chất đệm để đọc kết quả 150μL/lỗ và đĩa được đọc.

Thời gian ủ và các nồng độ trên được sử dụng với các phân tử DOM1H-131-206.

Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các nồng độ chính xác và thời gian ủ sẽ được tối ưu hóa, ví dụ DOM1H-131-206 (và các

phiên bản cải biến) có thể là các nồng độ và thời gian ủ hơi khác như so với, ví dụ DOM10H-53-567 hoặc trình tự peptit-VL.

Bảng 100 mẫu huyết thanh của người cho khỏe mạnh được thử nghiệm về độ phản ứng trong thử nghiệm này. Kháng thể đã có từ trước (ADA) kháng chuỗi nhẹ (VL) biến đổi, khung cũng được phát hiện trong các mẫu huyết thanh người bình thường, mặc dù ở tần suất và cường độ thấp hơn được quan sát trước đó kháng vùng V_H và V_{HH} (xem Fig.4). Các kết quả nêu trong Fig.5 trong đó trục Y thể hiện các mức gắn kết với ADA và dAb VH có tỷ lệ gắn kết ADA cao nhất.

Kết luận: kết quả nêu trong Fig.5 thể hiện mức ADA đã có từ trước gắn kết với DOM 1H-131-206 và hiệu quả bổ sung đoạn kéo dài ở đầu C tận cùng lên sự gắn kết của DOM 1H -131-206 cải biến với ADA. Cũng quan sát thấy từ Fig.5 rằng ADA đã có từ trước gắn kết với dAb VH khi nó ngưng tụ với mAb (mAb-VH). Fig.5 cũng thể hiện rằng có ADA đã có từ trước gắn kết với dAb V kappa (Vk) (VL) và ví dụ thể hiện bao gồm peptit:VL, thể dung hợp VH-VL và thể dung hợp mAb-VL.

Ví dụ 10: Đoạn axit amin kéo dài nối với khung VL

Do kháng thể đã có từ trước kháng khung VL (VK) cũng được tìm thấy trong các mẫu huyết thanh người bình thường mặc dù thường thấy ở mức thấp với khung VH (xem Fig.5), người ta xác định liệu sự cải biến ở vùng đầu tận cùng C của VK dAb có thể làm giảm sự gắn kết với ADA đã có trước đó, như đã được chứng minh với các phân tử chứa VH hay không.

Dựa trên phân tử mAb:đoạn liên kết: V_L (ký hiệu là ‘735 – phân tử này là “mAbdAb” – nó là dAb IL-13mAb:đoạn liên kết:IL-4 (v Kappa)), một dãy phân tử mAb:đoạn liên kết: V_L thử nghiệm được tạo ra bằng kỹ thuật đột biến gen tại điểm chuẩn, và nó chứa trình tự dAb VL, nhưng có các cải biến ở đầu tận cùng C khác nhau với dAb VL. Các nguyên liệu thử nghiệm này ký hiệu là ‘15014’, ‘15019’, ‘15020’ và ‘15021’ được thiết kế để có đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C (+AAA, +T hoặc +TV), hoặc để có sự khuyết đoạn ở đầu tận cùng C (-R) (trình bày trong Bảng 8).

Nguyên liệu thử nghiệm được thử nghiệm bằng cách sử dụng ‘thử nghiệm xác nhận’ như mô tả dưới đây, tương tự như được mô tả ở trên đối với dAb VH. Việc thử nghiệm hợp chất được thực hiện bằng cách đánh giá khả năng của các hợp chất riêng lẻ cạnh tranh với hợp chất thử nghiệm cụ thể được đánh dấu về sự gắn kết với kháng

thể đã có từ trước. Sự giảm hiệu lực bất kỳ trong tín hiệu thử nghiệm được ghi chép lại là % ức chế. Mức % ức chế cao hơn điểm cắt để xác nhận đã định trước đó của thử nghiệm cụ thể này gợi ý rằng hợp chất thử nghiệm cạnh tranh với hợp chất cụ thể của thử nghiệm về sự gắn kết với kháng thể kháng VK, và do đó có thể có chung (các) epitop với hợp chất thử nghiệm cụ thể.

Quy trình thử nghiệm xác nhận ADA '735 sử dụng để đánh giá tần suất ADA đã có trước đó kháng V kappa:

1. Trong đĩa thử nghiệm vi chuẩn, 2% mẫu huyết thanh dương tính với ADA trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS) được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở RT với nồng độ cuối cùng là 10 μ g/mL 'nguyên liệu thử nghiệm 735 hoặc nguyên liệu thử nghiệm khác như dAb cải biến.
2. Sau khi ủ trước 1 giờ, hỗn hợp đồng nhất chứa 0,05 μ g/mL nguyên liệu '735 biotinyl hóa và 0,05 μ g/mL nguyên liệu '735 rutenyl hóa ("Sulfo-Tag" TM), trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS) được bổ sung vào đĩa thử nghiệm và ủ qua đêm ở RT.
3. Sau khi ủ, đĩa MSD sau đó được rửa 3 lần bằng PBST, các mẫu thử nghiệm được chuyển đến đĩa MSD, và đĩa này được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút trong bóng tối ở RT.
4. Sau đó, đĩa MSDTM được rửa 3 lần bằng PBST
5. 150 μ L/lỗ chất đệm để đọc kết quả được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Kết quả của các thử nghiệm hợp chất được nêu trình bày Bảng 8. Tất cả các cải biến ở đầu tận cùng C thử nghiệm (+AAA, +T, +TV và -R) thể hiện sự ức chế giảm trong 'thử nghiệm xác nhận 735. Điều này gợi ý rằng các cải biến ở đầu tận cùng C với dAb VL loại bỏ sự gắn kết với kháng thể đã có từ trước (ADA) theo cách tương tự như dAb VH.

Bảng 8: Đánh giá sự gắn kết với ADA của thể đột biến mAb:VL '735

Dòng	Cải biến trình tự (thực hiện ở thành phần dAb của phân tử mAbdAb)	% ức chế trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình từ 7 người cho)	% đối tượng có sự gắn kết ADA
'735	Không được cải biến	74,92	100

15014	+AAA	-4,40	14,29
15019	+T	12,88	14,29
15020	+TV	8,53	0
15021	-R	20,08	0

Ví dụ 11: Đoạn axit amin kéo dài nối với khung VH của DOM10H-53-567 (dAb kháng IL-13)

Do các cải biến ở đầu tận cùng C ở dAb VH kháng TNFR1 DOM 1H-131-206 làm giảm sự gắn kết ADA đã có trước đó, các nhà sáng chế sẽ xác định liệu cải biến ở đầu tận cùng C có thể làm giảm sự gắn kết ADA với phân tử VH khác hay không. Các cải biến ở đầu tận cùng C được thực hiện với khung VH của DOM10H-53-567 bằng kỹ thuật đột biến gen tại vị trí chuẩn. Các phân tử có sự thể đoạn (nguyên liệu thử nghiệm) được thử nghiệm bằng ‘thử nghiệm xác nhận’ như mô tả ở trên.

Đoạn kéo dài của đầu tận cùng C của DOM10H-53-567 cũng làm giảm đáng kể sự gắn kết với ADA đã có trước đó (kết quả thể hiện dưới đây trong Bảng 9). Điều này được minh họa bằng đoạn nối A, AS, AST, ASTK, ASTKG và ASTKG. Các cải biến này không gây ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng của dòng DOM10H-53-567 gắn kết và ức chế kháng nguyên đích IL-13 của nó được khẳng định bởi thử nghiệm hoạt tính dAb IL-13 mô tả sau đây và kết quả được thể hiện trong Bảng 9b.

Bảng 9a: Đánh giá sự gắn kết với ADA của thể đột biến DOM10H-53-567

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	% ức chế trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình từ 10 đối tượng cho)	% đối tượng có sự gắn kết ADA
DOM 10H-53-567	Không được cải biến	95,06	100
DOM 10H-53-567	A ở đầu tận cùng C	12,84	10
DOM 10H-53-567	AS ở đầu tận cùng C	14,79	10
DOM 10H-53-567	AST ở đầu tận cùng C	29,02	20
DOM 10H-53-567	ASTK ở đầu tận cùng C	27,67	20
DOM 10H-53-567	ASTKG ở đầu tận cùng C	13,39	10

Quy trình thử nghiệm hoạt tính dAb IL-13:

Thử nghiệm sinh học được sử dụng để đánh giá khả năng của biến thể của phân tử DOM10H-53-567 để ức chế sự sinh ra phosphatase kiềm kích thích bởi IL-13 tái tổ hợp người trong tế bào HEKBlue-STAT6 *in vitro*. Tế bào HEK-STAT6 (Invivogen) (tế bào biểu hiện phosphatase kiềm phôi được tiết ra (SEAP - secreted embryonic alkaline phosphatase) trong các điều kiện kiểm soát của gen khởi đầu phụ thuộc STAT6) được cho lên đĩa 96 lỗ. IL-13 người ở nồng độ 3ng/mL và dãy nồng độ pha loãng chứa phân tử DOM1-H-53-567 được cân bằng trước trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó bổ sung vào các tế bào trong 24 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, nồng độ dịch nổi trên bề mặt chứa SEAP tạo ra bởi tế bào là kết quả của sự kích thích IL-13, được xác định bằng cách bổ sung Quanti-Blue (Invivogen) và thu được kết quả mật độ quang ở 640nm. Trị số IC50 được tính toán từ đường cong đáp ứng liều bằng thuật toán Graphpad.

Bảng 9b: Đánh giá hoạt tính của thể đột biến DOM10H-53-567

Dòng gốc	Cải biến trình tự	Trị số IC50 (nM) trung bình về sự ức chế SEAP do IL-13 (giá trị trung bình giữa 2 và 4 thử nghiệm)
DOM 10H-53-567	Không được cải biến	0,56
DOM 10H-53-567	A ở đầu tận cùng C	0,59
DOM 10H-53-567	AS ở đầu tận cùng C	0,56
DOM 10H-53-567	AST ở đầu tận cùng C	0,68
DOM 10H-53-567	ASTK ở đầu tận cùng C	0,75
DOM 10H-53-567	ASTKG ở đầu tận cùng C	0,40

Đoạn kéo dài của đầu tận cùng C của DOM10H-53-567 làm giảm sự gắn kết với ADA đã có trước đó mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến khả năng gắn kết của dAb DOM10H-53-567 và ức chế kháng nguyên đích của chúng (IL-13 người).

Ví dụ 12a: Tách dòng phân tử dAb-Fc-dAb VH/Vk kháng-VEGF có đầu tận cùng C được cải biến

dAb-Fc-dAb Vh-Vk với cải biến thực hiện ở đầu tận cùng C của phần dAb Vk: DMS30047-30054 được thực hiện bằng cách tạo ra trình tự variant dAb Vk biến đổi

bởi PCR và sau đó, bằng cách tách dòng lại vào trong DMS30045 (SEQ ID NO 40) và DMS30046 (SEQ ID NO 41), lần lượt để tạo ra vectơ biểu hiện động vật có vú được cải biến. Từ DMS30045: (i) gốc arginin ở đầu tận cùng C được loại đi để tạo ra DMS30047 (DMS30037 -R), (ii) analin ở đầu tận cùng C được bổ sung vào để tạo ra DMS30048 (là DMS30037 + A) (SEQ ID NO 43), (iii) ba analin đầu tận cùng C được bổ sung vào để tạo ra DMS30049 (DMS30037 + AAA) (SEQ ID NO 44), và threonin đầu tận cùng C được thêm vào để tạo ra DMS30050 (DMS30037 + T) (SEQ ID NO 45). Từ DMS30046 (SEQ ID NO 41): (i) gốc arginin đầu tận cùng C được loại để tạo ra DMS30051 (DMS30038 -R) (SEQ ID NO 46), (ii) alanin đầu tận cùng C được bổ sung vào để tạo ra DMS30052 ((DMS30038 + A) (SEQ ID NO 47), (iii) ba alanin đầu tận cùng C được bổ sung vào để tạo ra DMS30053 (DMS30038 + AAA) (SEQ ID NO 48), và threonin đầu tận cùng C được bổ sung vào để tạo ra DMS30054 (DMS30038 + T) (SEQ ID NO 43).

Mô tả các phân tử trên như sau:

DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4), DMS30046: DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4), DMS30047 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 ở đầu tận cùng C trừ R có C tận cùng ((TGLDSP)x4), DMS30048 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C + A ((TGLDSP)x4), DMS30049 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C +AAA ((TGLDSP)x4), DMS30050 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DOM15-26-597 dAb N-(đoạn liên kết - VEPKSSDK) & dAb K-044-085 đầu tận cùng C +T ((TGLDSP)x4), DMS30051 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 ở đầu tận cùng C trừ R có C tận cùng ((TGLDSP)x4), DMS30052 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +A ((TGLDSP)x4), DMS30053 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +AAA ((TGLDSP)x4), DMS30054 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576 với dAb K-044-085 đầu tận cùng C +T ((TGLDSP)x4) (trình tự axit amin của phân tử như nêu trong Fig.12 và SEQ ID NO 40-49).

Ví dụ 12B: Cải biến vào vùng đầu tận cùng C của phân tử dạng quả tạ dAb V_K VEGF là DMS30037 và DMS30038 có sự gắn kết giảm với kháng thể đã có từ trước

Quy trình thử nghiệm xác nhận ADA V kappa được sử dụng để định lượng tần suất của ADA đã có trước đó kháng V kappa:

1. Trong đĩa thử nghiệm vi chuẩn, 10% mẫu huyết thanh dương tính với ADA trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS) được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở RT với nồng độ cuối cùng của nguyên liệu thử nghiệm là 10 μ g/mL như dAb cải biến.
2. Sau khi ủ trước 1 giờ, huyết thanh/nguyên liệu thử nghiệm dương tính với ADA được bổ sung vào đĩa thử nghiệm với hỗn hợp đồng nhất chứa dAb V kappa biotinyl hóa (không được cải biến) và dAb V kappa rutenyl hóa (“Sulfo-Tag”TM) (không được cải biến) với nồng độ cuối cùng là khoảng 0,025 μ g/mL dAb biotinyl hóa, dAb rutenyl hóa khoảng 0,0125 μ g/mL (“Sulfo-Tag”TM), và 5% huyết thanh dương tính với ADA trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% casein trong PBS). Đĩa này được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở RT.
3. Đĩa MSDTM streptavidin được phong bế bởi 150 μ L/lỗ casein phong bế trong PBS (1%) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ. Chất phong bế được loại bỏ mà không cần rửa.
4. Sau 1 giờ ủ trước đó, hỗn hợp đồng nhất được bổ sung vào đĩa thử nghiệm streptavidin MSDTM và ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở RT.
5. Sau 1 giờ ủ, sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng PBST, các mẫu thử nghiệm được chuyển đến đĩa MSD, và đĩa này được ủ trong 1 giờ $\pm$ 5 phút trong bóng tối ở RT.
6. Sau đó, đĩa MSDTM được rửa 3 lần bằng PBST
7. 150 μ L/lỗ chất đệm để đọc kết quả được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng nồng độ và thời gian ủ chính xác trong thử nghiệm xác nhận này sẽ được tối ưu hóa, ví dụ 1H-131-206 (và các phiên bản cải biến) có thể có nồng độ và thời gian ủ hơi chênh lệch so với DOM10H-53-567.

Các kết quả của thử nghiệm nghiên cứu được trình bày trong Bảng 9B dưới đây. Tất cả các cải biến ở đầu tận cùng C thử nghiệm trên dAb V kappa (+T, +A, +AAA và -R) thể hiện sự ức chế giảm đi trong thử nghiệm xác nhận '697 trên. Điều này gợi ý rằng các cải biến ở đầu tận cùng C với các dAb V kappa này làm giảm sự gắn kết của kháng thể đã có từ trước (ADA) theo cách tương tự với dAb VH.

Bảng 9b: Đánh giá sự gắn kết với ADA của thể đột biến DMS3007 và DMS3008

Dòng cha mẹ	Cải biến trình tự	% ức chế tín hiệu trung bình trong thử nghiệm xác nhận (giá trị trung bình – của 6 đối tượng)	% đối tượng có sự gắn kết ADA (giá trị trung bình – của 6 đối tượng)
DMS30037	Không được cải biến	60,46	100
DMS30050	Đoạn thêm T ở đầu tận cùng C	20,97	16,67
DMS30048	Đoạn thêm A ở đầu tận cùng C	12,86	16,67
DMS30049	Đoạn thêm ở đầu tận cùng C AAA	8,36	16,67
DMS30047	sự khuyết đoạn -R ở đầu tận cùng C	6,17	16,67
DMS30038	Không được cải biến	70,65	100
DMS30054	Đoạn thêm T ở đầu tận cùng C	14,66	16,67
DMS30051	Sự khuyết đoạn -R ở đầu tận cùng C -R	-5,91	16,67

Ví dụ 13 – Biểu hiện phân tử dAb-Fc-dAb VH/Vk kháng-VEGF với đầu tận cùng C được cải biến (DMS30047-30054)

Plasmid biểu hiện mã hóa phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF tương ứng được mô tả trên trong Ví dụ 12a được chuyển nạp tạm thời vào trong tế bào HEK293 6E và biểu hiện ở quy mô 500ml để tạo ra phân tử mảnh kháng nguyên bằng phương pháp mô tả dưới đây trong ví dụ này. Thường sẽ đạt được mức biểu hiện >30mg/L dịch nổi trên bề mặt.

Trình tự dAb được tách dòng lên trên đầu N hoặc C tận cùng của Fc di truyền của isotyp IgG1 người trong vector biểu hiện của động vật có vú. dAb này được liên kết với Fc bằng đoạn liên kết: đoạn liên kết tận cùng N hoặc là AAAS, hoặc TVAAPS

và đoạn liên kết có đầu tận cùng C hoặc là ((GS(TVAAPSGS)x3), hoặc là vùng Albumin 3.

Ví dụ 14: Tinh chế phân tử dAb-Fc-dAb VH/Vk kháng-VEGF có đầu tận cùng C được cải biến

Các phân tử dAb-Fc-dAb được tinh chế theo ái lực từ dịch nổi trên bề mặt, như được mô tả đối với các Ví dụ trên.

Ví dụ 15: Phân tích phân tử bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC-Size-Exclusion Chromatography) phân tử dAb-Fc-dAb Vh/Vk kháng-VEGF với đầu tận cùng C được cải biến

Sau đó, độ nguyên vẹn phân tử, tính đồng nhất và % tinh khiết của phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF đã được tinh chế bằng SDS-PAGE và sắc ký loại trừ kích thước phân tích (SEC). Protein này do đó được khẳng định là protein đích tinh khiết >95% bằng SDS-PAGE và SEC trước khi phân tích tiếp bằng thử nghiệm sinh học.

Ví dụ 16: Sự gắn kết của phân tử dAb-Fc-dAb Vh/Vk kháng-VEGF có đầu tận cùng C cải biến với VEGF trên Biacore.

Ái lực gắn kết của một số phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF, (với các cải biến nhỏ ở đầu tận cùng C), với VEGF₁₆₅ được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng Biacore T100. Protein A được bất động trên chip C1 bằng cách kết hợp amin sơ cấp và bề mặt này sau đó được sử dụng để bắt giữ cấu trúc kháng-VEGF. VEGF₁₆₅ người tái tổ hợp (nguồn ‘tiêu chuẩn cơ sở’ từ chuyển nạp tạm thời tế bào HEK293) được sử dụng làm chất phân tích ở nồng độ 32nM đến 0,03125nM trong dãy nồng độ pha loãng dần 4 lần. Tất cả các đường cong gắn kết được tham chiếu hai lần với mức tiêm chất đệm (tức là 0nM) và số liệu được khớp đến mô hình 1:1 vốn có là T100. Tiến hành khôi phục bằng 50mM NaOH. Tiến hành chạy ở 37°C, sử dụng HBS-EP làm dung dịch đệm chạy. Số liệu thu được được thể hiện trong Bảng 10A, 10B & 10C. Từ số liệu trong Bảng 10A, tính năng của DMS30037 và một số biến thể được cải biến ở đầu tận cùng C: DMS30037+A (DMS30048), DMS30037+AAA (DMS30049), và DMS30037+T (DMS30050) (xem Ví dụ 12a về chi tiết cụ thể hơn của các phân tử này) dường như có thể so sánh trên Biacore và các cải biến ở đầu tận cùng C dường như không ảnh hưởng đến hiệu lực so với phân tử gốc.

Bộ số liệu khác nữa được thể hiện trong Bảng 10B, trong đó the performance of both DMS30037 và DMS30038 được so sánh với các biến thể được cải biến ở đầu tận cùng C: DMS30037-R, (được ký hiệu là +R (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050) và DMS30038-R, (được ký hiệu là +R (DMS30051) và Bevacizumab (Avastin) trong Biacore. Trong bảng số liệu này, một lần nữa tính năng của tất cả các phân tử này dường như có thể so sánh trên Biacore và các cải biến ở đầu tận cùng C dường như không làm giảm hiệu lực so với hợp chất gốc. Số liệu có ý nghĩa không thể thu được ngoài việc quan sát đường cong của Avastin. Bộ số liệu khác nữa được thể hiện trong Bảng 10C, trong đó các phân tử DMS30037 và DMS30038 được so sánh với các biến thể được cải biến ở đầu tận cùng C: DMS30037-R, (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050), DMS30038-R, (DMS30051) và DMS30038+T (DMS30054) và Bevacizumab (Avastin). Một lần nữa, tính năng của tất cả các phân tử dAb-Fc-dAb dường như có thể so sánh trên Biacore và các cải biến ở đầu tận cùng C dường như là không làm giảm hiệu lực so với phân tử gốc. Trong bộ số liệu này, xem Bảng 10C, số liệu Bevacizumab (Avastin) có thể không được đo thích hợp do tốc độ phân ly quá nhỏ.

Bảng 10A: Sự gắn kết của phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF: DMS30037 có các cải biến ở đầu tận cùng C với VEGF₁₆₅ và so sánh với DMS30037.

Phối tử	K_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_D (M)
DMS30037	8.18E+06	4.34E-05	5.30E-12
DMS30037+A	8.25E+06	5.21E-05	6.32E-12
DMS30037+AAA	7.74E+06	5.37E-05	6.94E-12
DMS30037+T	8.03E+06	4.21E-05	5.24E-12

Bảng 10B: Sự gắn kết của phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF: DMS30037 và DMS30038 có các cải biến ở đầu tận cùng C với VEGF₁₆₅ và so sánh với dAb-Fc-dAb gốc và Bevacizumab(Avastin).

Phối tử	$K_a (M^{-1} s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	KD (M)
DMS30037	1.04E+07	4.39E-05	4.22E-12
DMS30037+R	1.07E+07	4.22E-05	3.94E-12
DMS30037+T	1.10E+07	4.27E-05	3.90E-12
DMS30038	1.03E+07	4.79E-05	4.64E-12
DMS30038+R	1.23E+07	5.31E-05	4.31E-12
avastin	8.39E+05	Out of range	Out of range

Bảng 10C: Sự gắn kết của phân tử dAb-Fc-dAb kháng VEGF: DMS30037 và DMS30038 có các cải biến ở đầu tận cùng C với VEGF₁₆₅ và so sánh với dAb-Fc-dAb gốc và Bevacizumab(Avastin).

Phối tử	k_a	k_d	KD
DMS30037	5.60E+06	1.46E-04	2.61E-11
DMS30037 + T	5.38E+06	1.42E-04	2.64E-11
DMS30037 – R	6.97E+06	1.55E-04	2.22E-11
DMS30038	5.69E+06	1.55E-04	2.73E-11
DMS30038 – R	5.90E+06	1.58E-04	2.68E-11
DMS30038 + T	8.28E+06	1.22E-04	1.47E-11
Avastin	1.24E+06	Out of range	Out of range

Ví dụ 17: Thử nghiệm gắn kết thụ thể VEGF R2 của phân tử dAb-Fc-dAb Vh/Vk kháng VEGF với đầu tận cùng C cải biến

Hiệu lực của phân tử dAb-Fc-dAb Vh/Vk kháng-VEGF dựa trên DMS30037 và DMS30038, nhưng có các cải biến ở đầu tận cùng C, được so sánh cả với phân tử kiểu đại và Bevacizumab (Avastin), trong thụ thể VEGF 2, (R2), thử nghiệm gắn kết sử dụng phương pháp có điều chỉnh, tức là không ủ trước, như mô tả sau đây trong ví dụ này. Số liệu được thể hiện trong Bảng 11A, tất cả các phân tử dAb-Fc-dAb thử nghiệm: DMS30037, DMS30037+T (DMS30050), DMS30037-R (DMS30047), DMS30038, DMS30038-R (DMS30051), dường như là có hiệu lực có thể so sánh được và hiệu lực cao hơn đáng kể so với Bevacizumab (Avastin), Bảng 11A. Có ít biến đổi trong phần trăm ức chế tối đa thu được bởi phân tử này trong thử nghiệm này

với tất cả các phân tử khác đạt được phần trăm ức chế tối đa >93-98%, (số liệu không được thể hiện).

Thu được số liệu rộng hơn nữa so sánh dAb-Fc-dAbs: DMS30038, DMS30038+T, (DMS30050) và DMS30038-R, (DMS30051) với Bevacizumab (Avastin), trong cùng định dạng thử nghiệm, số liệu này được thể hiện trong Bảng 11B. Từ số liệu này, DMS30038 và biến thể ở đầu tận cùng C của nó, (Bảng 11B), có cùng hiệu lực theo đánh giá bởi trị số EC50 trong thử nghiệm RBA và dường như có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với Bevacizumab (Avastin) theo chỉ số này. Có ít biến đổi trong phần trăm ức chế tối đa thu được bởi phân tử này trong thử nghiệm này với tất cả các phân tử khác đạt được phần trăm ức chế tối đa >94%, (số liệu không được thể hiện).

Thử nghiệm gắn kết thụ thể VEGF R2: Hiệu lực được phân tích trong thử nghiệm gắn kết thụ thể VEGF so với hiệu lực của Bevacizumab (Avastin). Thử nghiệm này định lượng sự gắn kết của VEGF165 với hoặc VEGF R1 hoặc VEGF R2 và khả năng của hợp chất thử nghiệm ức chế sự tương tác này. Đĩa 96 lỗ gắn kết chuẩn MSD (L11XA-3) được bao bằng VEGF R1 0,25µg/ml (R&D Systems 321-FL) hoặc VEGF R2 (R&D 357-KD) trong đệm bicarbonat (50µl/lỗ), được đậy bằng nắp đậy đĩa và ủ qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, đĩa MSD được rửa 3 lần 300µl/lỗ bằng Tris đệm rửa và chấm lên trên một miếng mô để loại bỏ đệm rửa khỏi các lỗ. Sau đó, đĩa MSD được phong bế bằng BSA 3% trong PBS (250µl/lỗ) và lắc trong điều kiện ủ (750 RPM) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa MSD được rửa lại trước khi bổ sung dung dịch đặc 2x chứa phân tử kháng VEGF (25µl/lỗ) và ủ với điều kiện lắc (750 RPM) ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút trước khi bổ sung dung dịch đặc 2x rhVEGF, 25µl/lỗ, R&D Systems (293-VE/CF, tạo ra trong tế bào côn trùng bởi Baculovirus) hoặc nguồn GSK ‘điều kiện tiêu chuẩn’ của VEGF (tạo ra từ tế bào động vật có vú HEK293, số liệu sau đó không được thể hiện ngoại trừ Bảng 3A). Phân tử kháng-VEGF và VEGF được pha chế bằng BSA 0,1% trong PBS. Thử nghiệm ban đầu được tiến hành với bước, trong đó phân tử kháng-VEGF được ủ trước với VEGF. Việc ủ trước được thực hiện bằng cách bổ sung một thể tích tương đương dung dịch đặc 2x chứa phân tử kháng VEGF với thể tích tương đương của dịch cô đặc 2x chứa VEGF (R&D, 293-VE/CF) trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Nồng độ VEGF cuối cùng sử dụng là 10ng/ml. Cũng không có đối chứng VEGF và VEGF đơn độc. Đĩa

MSD được ủ trong điều kiện lắc (750 RPM) ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ sau đó nó được rửa lại trước khi bổ sung tác nhân phát hiện (50 μ L/lỗ, kháng thể biotinyl hóa kháng VEGF người – R&D Systems BAF293) ở 0,25 μ g/ml trong BSA 1% trong PBS và ủ trong điều kiện lắc (750 RPM) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa MSD được rửa lại trước khi bổ sung streptavidin sulfo-TAG (50 μ L/lỗ, MSD R32AD-1) ở nồng độ 2 μ g/ml trong BSA 1% trong PBS và ủ trong điều kiện lắc (750 RPM) ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Trước khi định lượng điện quang hóa học trong bộ thu ảnh MSD Sector 6000, đĩa MSD được rửa và 150 μ L/lỗ chất đệm để đọc kết quả T (MSD R92TC-1) 2x được bổ sung vào. Việc tính toán hệ số hiệu chỉnh đường cong và EC₅₀ được thực hiện bằng thuật toán GraphPad. Khả năng của phân tử kháng VEGF thử nghiệm và Bevacizumab (Avastin) để ức chế sự gắn kết của VEGF với VEGFR1 và VEGFR2 được xác định như mô tả.

Phương pháp có điều chỉnh: Thử nghiệm thứ hai được thực hiện bằng cách mà tác nhân kháng VEGF và VEGF không được ủ trước trước khi bổ sung vào đĩa MSD được bao bằng thụ thể VEGF. Thử nghiệm này được tiến hành và chỉ sử dụng nguồn VEGF từ R&D Systems, (293-VE/CF). Khả năng của phân tử kháng VEGF và Bevacizumab (Avastin) để ức chế sự gắn kết của VEGF với VEGFR1 và VEGFR2 được xác định như mô tả trên nhưng không có bước ủ trước.

Bảng 11A: Trị số EC₅₀ của dAb-Fc-dAb kháng VEGF có các cải biến ở đầu tận cùng C so với Bevacizumab (Avastin) trong thử nghiệm gắn kết thụ thể VEGFR2:

Tính toán hệ số hiệu chỉnh đường cong và EC₅₀ được thực hiện bằng thuật toán GraphPad.

VEGFR2 RBA	EC ₅₀ (g/mL)	EC ₅₀ (pM)
Avastin	1.21E-07	806
DMS30337	2.99E-09	28
DMS30337 +T	2.98E	28
DMS30337 –R	2.66E-09	25
DMS30338	3.37E-09	32
DMS30338 - R	3.84-09	37

Bảng 11B: Trị số EC₅₀ của dAb-Fc-dAb kháng VEGF có các cải biến ở đầu tận cùng C so với Bevacizumab (Avastin) trong thử nghiệm gắn kết thụ thể VEGFR2:

Tính toán hệ số hiệu chỉnh đường cong và EC₅₀ được thực hiện bằng thuật toán GraphPad.

VEGFR2 RBA	EC50 (g/mL)	EC50 (pM)
Avastin	3.4E-07	2266
DMS30338	5.28E-09	50
DMS30338 +T	4.31E-09	41
DMS30338 - R	4.53E-09	43

Ví dụ 18 – Thử nghiệm tăng sinh tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của người (HUVEC):
Ức chế bằng phân tử dAb-Fc-dAb Vh/Vk kháng-VEGF chứa các cải biến ở đầu tận cùng C:

Khả năng của phân tử dAb-Fc-dAb dựa trên DMS30037 và DMS30038 nhưng có các cải biến ở đầu tận cùng C: DMS30037-R (DMS30047) & DMS30037+T (DMS30050), DMS30038-R (DMS30051) & DMS30038+T (DMS30054) để ức chế sự tăng sinh của tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của người được so sánh với Bevacizumab (Avastin) bằng phương pháp mô tả dưới đây với các the following deviations (i) rather than leaving the outer wells free of cells, toàn bộ đĩa 96 lỗ được sử dụng và (ii) số liệu được phân tích bằng thuật toán GraphPad bằng hệ số hiệu chỉnh đường cong Sigmodial, hệ số góc biến thiên cf hồi quy không tuyến tính (hệ số góc biến thiên). Hợp chất thử nghiệm được đánh giá độc lập trên các đĩa riêng biệt so với phân tử so sánh, Bevacizumab (Avastin); thử nghiệm được tiến hành trong ít nhất ba lần riêng biệt, với toàn bộ số liệu lập được trên mỗi phân tử Bevacizumab (Avastin): 15; DMS30037: 7; DMS30038: 8; DMS30037-R (DMS30047): 3; DMS30037+T (DMS30050): 4; DMS30038-R (DMS30051): 4 & DMS30038+T (DMS30054): 4, (số liệu không được thể hiện). Sự tập trung này là dựa trên phân tích cả mức ức chế tối đa và trị số EC50 tương đối trong thử nghiệm này thu được bằng một số phân tử so với Bevacizumab (Avastin).

Số liệu được phân tích bằng thuật toán GraphPad bằng hệ số hiệu chỉnh đường cong Sigmodial, hệ số góc biến thiên cf hồi quy không tuyến tính (hệ số góc biến thiên). Hệ số hiệu chỉnh đường cong riêng biệt được hiệu chỉnh đối với mỗi phân tử và ở mỗi ngày. Do một số sự hiệu chỉnh kém, quyết định rằng đưa các điều kiện ràng buộc với đường cong này trong đó không quan sát thấy đoạn bằng ở nồng độ thấp. Một đĩa bị loại trừ khỏi phân tích do sự khớp với đường cong thấp mặc dù đã có hệ số ràng buộc. Hệ số ràng buộc này sẽ tương đương với điểm trung bình ở nồng độ thấp nhất. Số liệu được lựa chọn thủ công dù mức tối thiểu có được ràng buộc hay không, và hệ số hiệu chỉnh đường cong và các thông số được tự cập nhật dựa trên tiêu chuẩn

chọn lựa này. Đánh giá trị số cực đại của đường cong và độ lệch chuẩn được phân tích bằng phân tích mô hình hỗn hợp có trọng số về phương sai, sử dụng $1/(\text{độ lệch chuẩn})^2$, $[SE]^2$, là hệ số trọng lượng. Phân tích này được điều chỉnh về độ biến thiên giữa các đĩa và các ngày bằng hàm tác động ngẫu nhiên. Từ phân tích này, các giá trị trung bình dự đoán được đánh giá và so sánh ngược lại với Avastin (đối chứng) (See Bảng 12A). Sau đó thực hiện phân tích tương tự trên tỷ lệ $\log_{10}$ của IC₅₀, và kết quả biến nạp ngược. Từ đó, thu được đánh giá về giá trị trung bình hình học và so sánh được thực hiện ngược lại với Avastin ở dạng tỷ lệ với Avastin (đối chứng) tức là tỷ lệ 0,5 biểu thị độ giảm 50% so với Avastin (Xem Bảng 12B).

Thử nghiệm tăng sinh tế bào nội mô dây rốn của người (HUVEC):

Các phân tử kháng-VEGF được thử nghiệm về khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người so với khả năng của Bevacizumab (Avastin). Thử nghiệm này định lượng mức tăng sinh tế bào nội mô gây ra do nồng độ đã xác định của VEGF₁₆₅ và khả năng của chất đối kháng VEGF phong bế tác dụng này. HUVEC được cấy ở mật độ 5000 tế bào trong mỗi lỗ trong các đĩa được bao gelatin 96 lỗ, để các lỗ bên ngoài không có tế bào, và ủ trong vài giờ để cho kết dính. Các phân tử thử nghiệm được thử nghiệm ở nồng độ đẳng mol (tốt đa $3,33 \times 10^{-8} \text{M}$) với dung dịch pha loãng dần 2 lần, mỗi nồng độ 3 bản lặp. VEGF₁₆₅ được chuẩn bị trong môi trường cơ bản để đạt được nồng độ cuối cùng 75ng/ml. Môi trường được loại bỏ thủ công khỏi các đơn lớp tế bào và 50μl môi trường cơ bản được bổ sung vào để ngăn cản tế bào khỏi bị khô. 25μl môi trường chứa VEGF₁₆₅ và 25μl môi trường cơ bản hoặc môi trường chứa kháng thể thử nghiệm được bổ sung cho thích hợp. Các tế bào được ủ trong 72 giờ, sau khoảng thời gian này tổng số tế bào được xác định bằng Cell Titre Glo. Việc xử lý của HUVEC với VEGF₁₆₅ gây ra sự tăng lên đã dự đoán về tổng số tế bào sau 72 giờ, so với tế bào không được xử lý với VEGF₁₆₅ (số liệu không được thể hiện). Sự tăng lên do VEGF này được hiểu là thể hiện hiệu quả tích lũy của VEGF lên cả sự tăng sinh HUVEC và ngăn chặn sự chết tế bào HUVEC. Các hợp chất thử nghiệm được đánh giá độc lập trên các đĩa riêng biệt so với các hợp chất so sánh, Bevacizumab (Avastin).

Bảng 12A: Giá trị trung bình hình học dự đoán của phần trăm ức chế tối đa của dAb-Fc-dAb kháng VEGF được cải biến ở đầu tận cùng C với khoảng tin cậy 95% (CI) so với hợp chất gốc và Bevacizumab (Avastin) trong thử nghiệm HUVEC:

Giá trị trung bình dự đoán của % ức chế tối đa

mAb	Dự tính	Thấp	Cao
		95% CI	95% CI
Avastin	71,0316	61,6741	80,3891
DMS30037	85,4759	74,9164	96,0354
DMS30037+T	89,9852	78,2698	101,70
DMS30037-R	82,2693	69,9929	94,5457
DMS30038	73,5602	63,7180	83,4023
DMS30038+T	79,0343	67,1904	90,8782
DMS30038-R	77,6519	65,5487	89,7550

Từ phân tích này, các phân tử DMS30037, DMS30037+T và DMS30037-R dường như gây ra mức ức chế tối đa cao nhất trong thử nghiệm HUVEC và chúng thể hiện vượt trên nhóm Avastin, khoảng tin cậy không trùng với đối chứng zero do đó số liệu là có ý nghĩa thống kê so với Avastin, số liệu không được thể hiện (xem Bảng 12A).

Bảng 12B: Giá trị trung bình hình học của trị số IC₅₀ với dAb-Fc-dAb kháng VEGF được cải biến ở đầu tận cùng C với khoảng tin cậy 95% (CI) so với hợp chất gốc và Bevacizumab (Avastin) trong thử nghiệm HUVEC:

Giá trị trung bình hình học của IC₅₀

mAb	Dự tính	Thấp	Cao
		95% CI	95% CI
Avastin	3,829E-9	3,119E-9	4,7E-9
DMS30037	1,903E-9	1,473E-9	2,46E-9
DMS30037-FT	2,332E-9	1,758E-9	3,092E-9
DMS30037-R	7,365E-9	2,06E-10	2,639E-7
DMS30038	2,163E-9	1,723E-9	2,715E-9
DMS30038+T	2,649E-9	1,877E-9	3,738E-9
DMS30038-R	2,234E-9	1,699E-9	2,936E-9

Một phân tích tương tự về giá trị trung bình hình học của trị số IC₅₀ với khoảng tin cậy 95%, (CI), chỉ ra rằng hầu hết tất cả các phân tử dAb-Fc-dAb DMS30037, DMS30037+T, DMS30038, DMS30038+T và DMS30038-R có trị số IC₅₀ thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với Avastin, số liệu không được thể hiện (xem Bảng 18B). Số liệu này được lập từ DMS30037-R là có tính biến thiên cao với số n thấp hơn (3).

Tổng quát, số liệu này gợi ý rằng các cải biến ở đầu tận cùng C với cả dAb-Fc-dAb: DMS30037 & DMS30038 có giá trị IC₅₀ rất giống nhau và mức ức chế tối đa trong thử nghiệm HUVEC với các phân tử gốc và dường như là có hiệu lực, so với Bevacizumab (Avastin), cả hai về phần trăm ức chế tối đa và IC₅₀ thấp hơn, (xem Bảng 12A và 12B).

Ví dụ 19 (mAb công cụ): Sử dụng mAb kháng VH để xác định epitop để gắn kết của ADA kháng VH đã có từ trước:

Kháng thể đơn dòng (mAb kháng VH M2.3G10.1G06) gắn kết với khung VH của DOM1H-131-206 và được xác định là mAb này có sự gắn kết giảm mạnh với DOM1H-131-206 +A; do đó kháng thể này dường như gắn kết với epitop tương tự với ADA kháng VH đã có từ trước người.

Trình tự CDR của mAb kháng VH M2.3G10.1G06: Trình tự CDR của mAb kháng VH M2.3G10.1G06 được khuếch đại và sắp xếp trình tự từ dòng tế bào lai. Trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mAb M2.3G10.1G06 được nêu trong [trình tự axit amin được nêu trong Fig.6a và 6b]. Trình tự được tách dòng vào vector biểu hiện IgG1 mAb người và chuyển nạp vào tế bào động vật có vú để biểu hiện mAb xác định. Kháng thể thu được được tinh chế từ dịch nổi trên bề mặt tế bào và thử nghiệm khả năng gắn kết của nó với khung dAb VH.

Tính đặc hiệu của mAb kháng VH M2.3G10.1G06: Tính đặc hiệu của mAb M2.3G10.1G06 về sự gắn kết với khung dAb VH (có hoặc không có sự cải biến loại bỏ sự gắn kết ADA đã có trước đó) được xác định bằng cách đo sự gắn kết của mAb M2.3G10.1G06 trong thử nghiệm gắn kết TNFR1:dAb thực hiện trên nền MSD™ (xem Ví dụ 1 về chi tiết của nền MSD™). Thử nghiệm gắn kết TNFR1:dAb được nêu cụ thể sau đây. Chứng minh là mAb kháng VH được rutenyl hóa M2.3G10.1G06 có sự

gắn kết giảm với khung VH lên đến 85% khi đầu tận cùng C được cải biến bởi đoạn kéo dài với alanin (từ 1 đến 15% gốc gắn kết) (kết quả được thể hiện trong Bảng 13).

Sự cạnh tranh giữa ADA kháng VH đã có từ trước và mAb M2.3G10.1G06: Để xác nhận rằng mAb kháng VH M2.3G10.1G06 gắn kết cùng epitop như ADA kháng VH đã có từ trước huyết thanh, thử nghiệm cạnh tranh được tiến hành. Xác định rằng huyết thanh từ một loạt những người cho có ADA kháng VH đã có từ trước có thể cạnh tranh với mAb kháng VH M2.3G10.1G06 về gắn kết với DOM1H-131-206 (số liệu nêu trong Fig.7). Kết luận là ADA kháng VH đã có từ trước người và mAb kháng VH M2.3G10.1G06 có chung epitop trùng trên khung VH.

Cải biến với dAb VH sẽ làm gián đoạn epitop cho sự gắn kết ADA đã có trước đó có thể được dựa đoán dựa trên sự gắn kết của mAb kháng VH M2.3G10.1G06. Do đó, sự gắn kết của mAb kháng VH M2.3G10.1G06 có thể được sử dụng để thử nghiệm sự cải biến dẫn đến việc giảm gắn kết ADA đã có trước đó.

Phương pháp sử dụng:

Quy trình thử nghiệm gắn kết TNFR1:dAb

1. TNFR1:Fc được bắt giữ lên trên đĩa MSD siêu gắn kết qua đêm ở 4°C. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng đệm rửa MSD/TRIS.
2. Đĩa này được phong bế bởi BSA 3% trong PBS trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng đệm rửa MSD/TRIS.
3. Bổ sung các nồng độ pha loãng dần của dAb thử nghiệm (DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) hoặc DOM 1H-131-206 với đoạn kéo dài alanin đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16)) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng đệm rửa MSD/TRIS.
4. mAb được rutenyl hóa M2.3G10.1G06 ở nồng độ cuối cùng là 1µg/ml được bổ sung vào trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng đệm rửa MSD/TRIS.
5. Chất đệm để đọc kết quả 150µL/lỗ được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Quy trình thử nghiệm cạnh tranh của ADA kháng VH đã có từ trước và mAb M2.3G10.1G06

1. Phân tử thử nghiệm được biotinyl hóa 0,2 μ g/mL (dAb) là DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) và mẫu huyết thanh 20% trong chất pha loãng của thử nghiệm (1% Casein trong PBS) được ủ trong đĩa thử nghiệm đáy tròn trong 1 giờ $\pm$ 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.
2. mAb kháng VH rutenyl hóa M2.3G10.1G06 ở nồng độ cuối cùng là 0,5 μ g/mL được bổ sung vào trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.
3. Đĩa MSD™ streptavidin được phong bế bởi 150 μ L/lỗ casein phong bế trong PBS (1%) ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ.
4. Các mẫu được chuyển đến đĩa streptavidin MSD™ và ủ ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1-2 giờ.
5. Sau đó, đĩa MSD được rửa 3 lần bằng PBST.
6. Chất đệm để đọc kết quả 150 μ L/lỗ được bổ sung vào và đĩa được đọc.

Bảng 13: Sự gắn kết chênh lệch của mAb kháng VH với DOM1H-131-206 hoặc DOM1H-131-206 được cải biến bằng đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C

Nồng độ dAb thử nghiệm (pg/mL)	Tín hiệu thử nghiệm gắn kết Trị số ECL trung bình $\pm$ SD		Độ gắn kết tương đối với DOM1H131-206 + Đầu tận cùng C A (%)
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206 + Đầu tận cùng C A	
270000	1168024 $\pm$ 3643	81489 $\pm$ 4537	7
90000	1078743 $\pm$ 17931	66020 $\pm$ 3207	6
30000	377493 $\pm$ 9653	11300 $\pm$ 266	3
10000	108173 $\pm$ 3413	1507 $\pm$ 69	1
3333	34479 $\pm$ 1397	743 $\pm$ 14	2
1111	12026 $\pm$ 243	847 $\pm$ 226	7
370	4387 $\pm$ 41	669 $\pm$ 13	15
0	623 $\pm$ 2	621 $\pm$ 5	

mAb này gắn kết khung của dAb VH, ví dụ DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), nhưng sự gắn kết bị giảm mạnh ở dAb với biến đổi đầu tận cùng C +A, ví dụ DOM 1H-131-206 với đoạn kéo dài alanin ở đầu tận cùng C (SEQ ID NO 16). Trình tự chuỗi H & L đã được xác định từ thể lai được lưu trữ ở Biocat. Chỉ có một trình tự LC nhưng hai trình tự HC: một trình tự chức năng (xem sau đây) và một trình tự không chức năng bao gồm codon dừng và xê dịch khung.

Sự biểu hiện của mAb và sự xác nhận sự gắn kết ngược nhau giữa hai phân tử trên dựa trên trình tự chức năng dự tính dưới đây sẽ cho phép xác nhận rằng có trình tự mAb chính xác để điền vào. Con đường mà cấu trúc pTT5 được ráp lại có nghĩa là chỉ khi trình tự không in nghiêng là từ thể lai, trình tự nghiêng là khảm từ vectơ pTT, nó được tách dòng vào trong đó (điều này không đòi hỏi với thử nghiệm gắn kết).

Chuỗi nhẹ

DIVMTQSQKFMSPTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS
NRYTGVDP
 RFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCQQYGSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
 VFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Chuỗi nặng

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTESYMHWVKQSHGKSLEWIGVI
SPYNGGTSY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCTRRGIIYDPSWFAYW
 GQGTLVTVS
 AAKTTPPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQS
 SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Vùng biến đổi ở vùng bình thường.

CDR gạch chân/in đậm

Trình tự khảm của Fc được in nghiêng.

Fc là IgG1 người.

Trình tự của mAb công cụ được nêu trong Fig.6 (SEQ ID NO 14 và 15).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb), mà được chọn từ nhóm bao gồm: dAb VH của người mà gắn kết với TNFR1 và có trình tự axit amin của DOM1h-131-206 dAb, và còn bao gồm:

đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C mà bao gồm đoạn axit amin kéo dài được chọn từ: (a) A (b) AS, (c) AST (d) ASTK, (e) ASTKG, (f) AAA; và làm giảm sự gắn kết với các ADA đã có từ trước so với vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb) không được cải biến của nó.

2. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn theo điểm 1, mà trong đó vùng biến đổi globulin này có giá trị KD nằm trong khoảng từ 10pM đến 50nM.

3. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng biến đổi globulin này còn bao gồm một hoặc nhiều sự thể đoạn axit amin được chọn từ nhóm bao gồm sự thể đoạn P14A, sự thể đoạn P41A, sự thể đoạn L108A, sự thể đoạn T110A và sự thể đoạn S112A.

4. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb) theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vùng biến đổi globulin này được chọn từ các trình tự axit amin bất kỳ được xác định sau đây: (a) DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài của alanin đơn ở đầu tận cùng C như được quy định trong SEQ ID NO 16; (b) DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài của alanin đơn ở đầu tận cùng C và đoạn đột biến khung P14A như được quy định trong SEQ ID NO 17; (c) DOM1h-131-206 dAb với đoạn đột biến khung P14A như được quy định trong SEQ ID NO 18; (d) DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG như được quy định trong SEQ ID NO 19; và (e) DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài ở đầu tận cùng C ASTKG và đoạn đột biến khung P14A như được quy định trong SEQ ID NO 20.

5. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb) theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dAb ở dạng dung hợp hoặc thể liên hợp với các phần tử hỗ trợ.

6. Vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb) theo điểm 4, trong đó dAb này chất đối kháng của đích của nó.

7. Dược phẩm chứa vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn (dAb) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 kết hợp với chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dụng hoặc tương thích sinh lý.
8. Dược phẩm tiêm được, dùng qua đường miệng, có thể xông hít, có thể khí dung, giải phóng duy trì hoặc được làm đông khô chứa dược phẩm theo điểm 7 hoặc dAb theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
9. Thiết bị phân phối chứa dược phẩm theo điểm 7 hoặc dAb theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
10. Thiết bị phân phối chứa dược phẩm theo điểm 7 hoặc dAb theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thiết bị này là máy khí dung hoặc máy xông hít.
11. Axit nucleic phân lập hoặc tái tổ hợp mã hóa dAb theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
12. Axit nucleic phân lập hoặc tái tổ hợp theo điểm 11, với trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO 22 và mã hóa DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài của alanin đơn.
13. Vector chứa axit nucleic theo điểm 11 hoặc 12.
14. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 11 hoặc 12, hoặc vector theo điểm 13.
15. Phương pháp sản xuất polypeptit chứa dAb theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phương pháp này bao gồm bước duy trì tế bào chủ theo điểm 14, dưới các điều kiện phù hợp để biểu hiện axit nucleic theo điểm 11 hoặc 12 hoặc vector theo điểm 13, qua đó tạo ra polypeptit.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó polypeptit là dAb mà có trình tự axit amin được xác định là DOM1h-131-206 với đoạn kéo dài của alanin đơn ở đầu tận cùng C như được quy định trong SEQ ID NO 16 và bao gồm bước duy trì các tế bào chủ E. coli dưới các điều kiện phù hợp để biểu hiện vector pave011 mà biểu hiện axit nucleic của SEQ ID NO 22.

Fig.1: Tần suất của các kháng thể kháng thuốc có sẵn trong huyết thành của các đối tượng khỏe mạnh

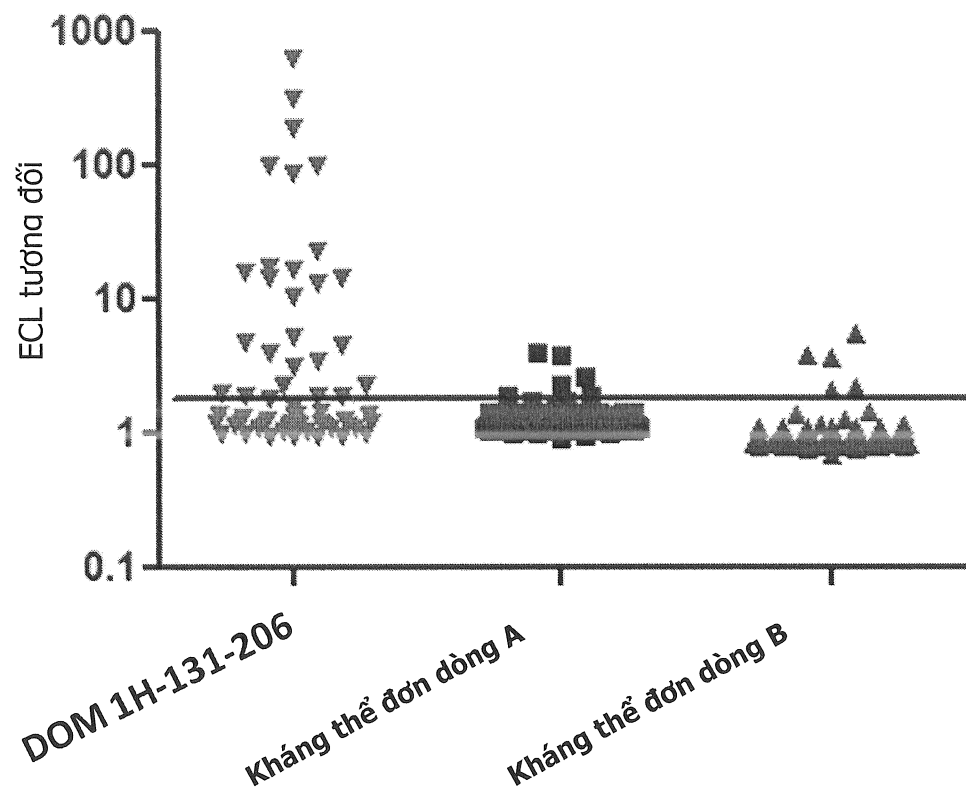


Fig.2: Trình tự axit amin của:

- (a) dAb không cải biến DOM 1H-131-206 (kháng TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS **(SEQ ID NO 1)**

- (b) dAb không cải biến DOM 1H-131-511 (kháng TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPVGQDPFYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS **(SEQ ID NO 2)**

- (c) dAb không cải biến DOM 1H-131-202 (kháng TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGQGTLLTVSS **(SEQ ID NO 3)**

- (d) Dòng VHH2(d) là định dạng đặc hiệu kép, có môđun gắn kết IL6R liên kết bởi GGGGSGGGGS với môđun gắn kết albumin huyết thanh người được mô tả trong WO2010100135:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWVRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTI
SRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN
AKTTLVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSS

(SEQ ID NO 4)

- (e) Dòng VHH2(e) là định dạng đặc hiệu kép, có phân tử gắn kết TNF liên kết bởi phân tử gắn kết albumin huyết thanh lần lượt liên kết với phân tử gắn kết TNF, sử dụng GGGGSGGGGS làm trình tự nối như mô tả trong WO2010077422:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL
VQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTTL
YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA
ASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPED
TAVYYCARSPSGFNRGQGTLLTVSS

(SEQ ID NO 5)

Fig.2 (tiếp):

- (f) Dòng VHH2(f) là định dạng đơn đặc hiệu hóa trị hai chứa hai phân tử giống nhau gắn kết với trình tự nối Ala-Ala-Ala, mỗi mô đun là dAb có thể gắn kết khu vực A1 của yếu tố Von-Willebrand, như nêu trong WO2009115614:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRF
TISRDN AKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQL
VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISR
DN AKRMVYLQMNSLR AEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO 6)

- (g) Dòng VHH2(d) là định dạng đặc hiệu kép, có mô đun gắn kết IL6R gắn kết bởi GGGGSGGGGS với mô đun gắn kết albumin huyết thanh người như mô tả trong WO2010100135 với đoạn kéo dài alanin:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVA GIISGGSTSYADSVKGRFTI
SRDN AKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN
AKTTL YLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSA

(SEQ ID NO 7)

- (h) Dòng VHH2(e) là định dạng đặc hiệu kép, có mô đun gắn kết TNF gắn kết với mô đun gắn kết albumin huyết thanh người lần lượt gắn kết với mô đun gắn kết TNF, sử dụng GGGGSGGGGS làm trình tự nối như mô tả trong WO2010077422 với đoạn kéo dài alanin:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGR
FTISRDN AKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCARSPSGFNRGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL
VQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTL
YLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA
ASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLR PED
TAVYYCARSPSGFNRGQGT LTVTVSSA

(SEQ ID NO 8)

- (i) Dòng VHH2(f) là định dạng đơn đặc hiệu hóa trị hai chứa hai mô đun giống nhau liên kết bởi trình tự nối Ala-Ala-Ala, mỗi mô đun là dAb có thể gắn kết khu vực A1 của yếu tố Von-Willebrand, như trình bày trong WO2009115614 với đoạn kéo dài alanin:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRF
 TISRDNARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAAEVQL
 VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISR
 DNAARMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA
(SEQ ID NO 9)

Fig.2 (tiếp):

(j) DOM 1H-574-208

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGR
 FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWVPFEYWGQGT LTVTVSS
(SEQ ID NO 10)

(k) thể dung hợp DOM 1H-574-208-VL:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGR
 FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWVPFEYWGQGT LTVTVSSASTDIQMTQSPSSL SA
 SVGDRVITICRASRP IGTTL SWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDF
 ATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO 11)

(l) DT04-H-033 (dAb IL-13 gốc):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYGM A WVRQAPGKGLEWVSTISYNGLYTYYADSVKGRT
 ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYEY SPESDFDYWGQGT LTVTVSS
(SEQ ID NO 12)

(m) DOM10H-53-567

GVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFAWYD MGWVRQAPGKGLEWVSSIDWHGEVTYYADSVKG
 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAE DEPGYDYWGQGT LTVTVSS
(SEQ ID NO 13)

Fig.3:

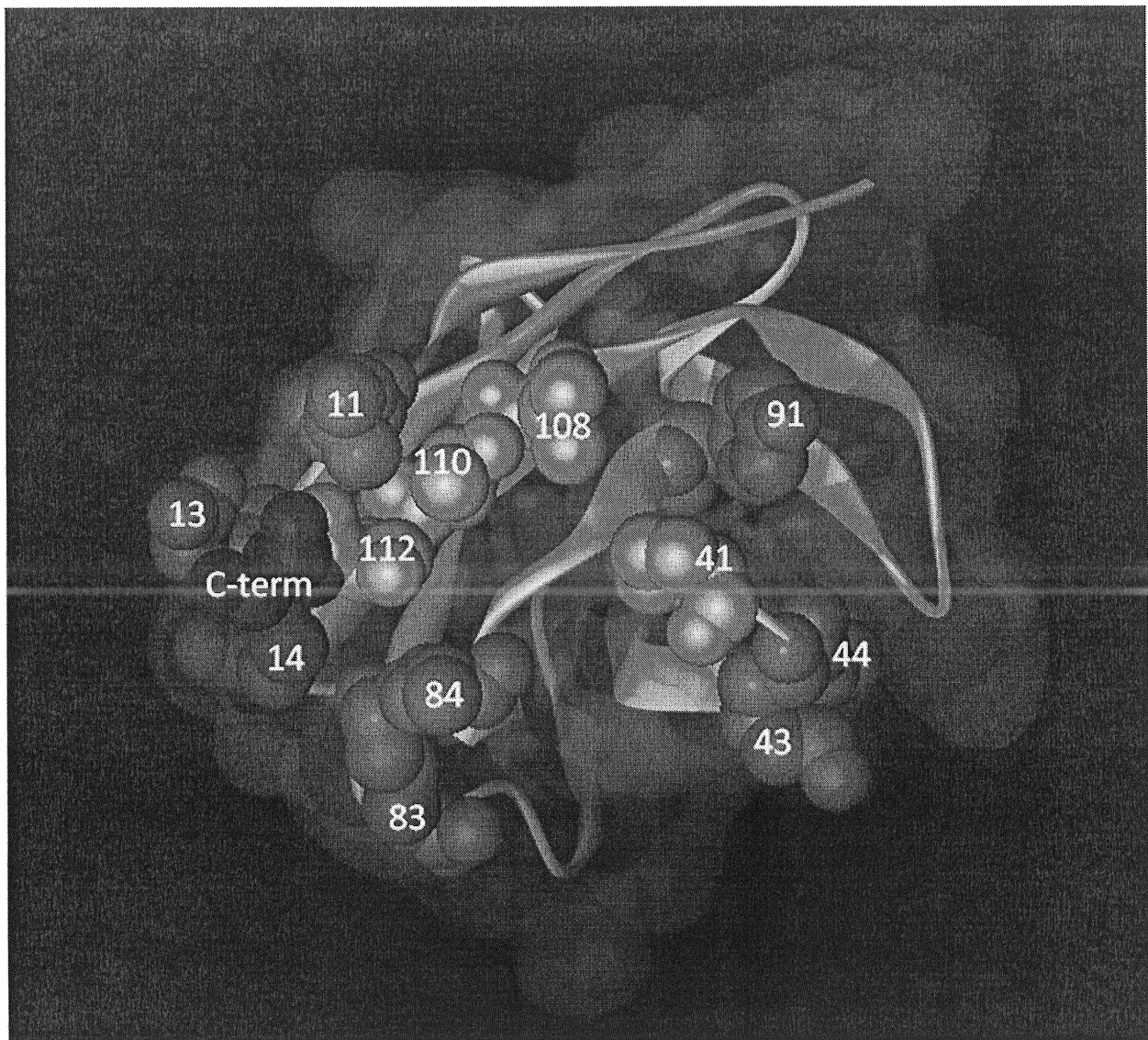


Fig.4: Ảnh hưởng của các đoạn kéo dài đơn alanin lên các dòng VHH

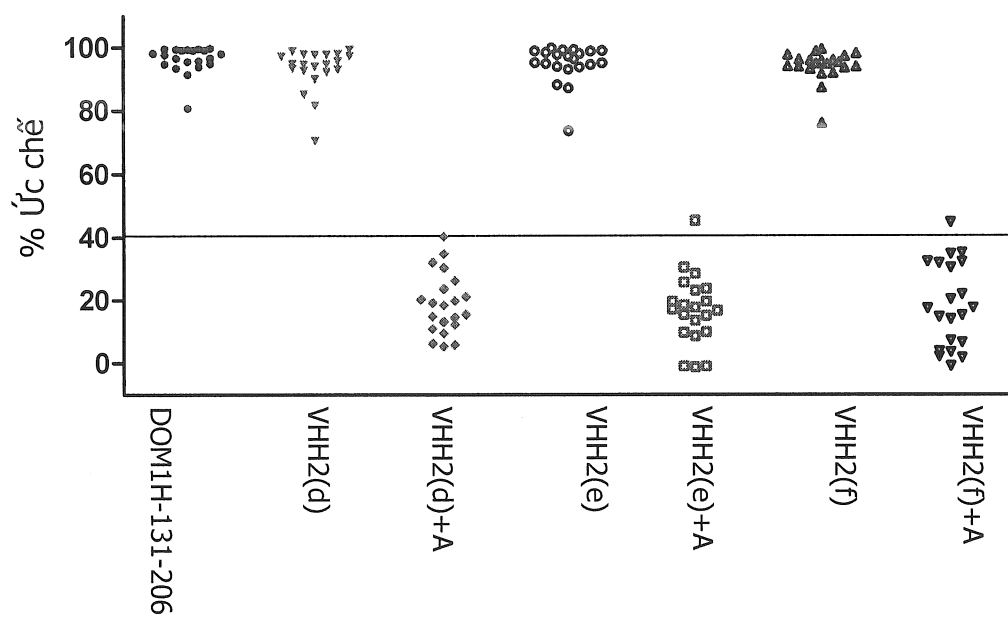


Fig.5: Tỷ lệ gắn kết với các ADA: Dom131-206 dưới đây liên quan đến Dom1h-131-206 dAb

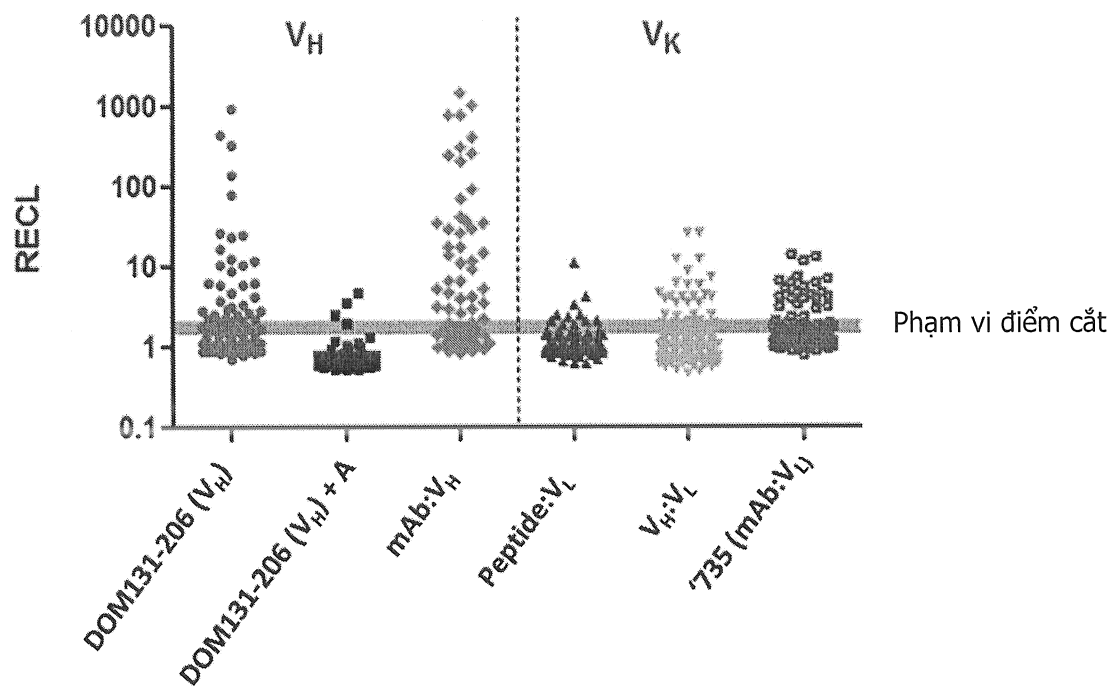


Fig.6a và Fig.6b: Trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của mAb kháng VH M2.3G10.1G06 (vùng CDR được gạch chân):

(a) Chuỗi nhẹ

DIVMTQSQKFMSPTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTL
TINNMQSEDLADYFCQQYGSYPLTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO 14)

(b) Chuỗi nặng

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTESYMHVVKQSHGKSLEWIGVISPYNGGTSYNQKFKDKATLTVD
KSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCTRRGIYYDPSWFAYWGQGLTVSA

(SEQ ID NO 15)

Fig.7: Sự cạnh tranh giữa kháng VH ADA có sẵn và mAb M2.3G10.1G06

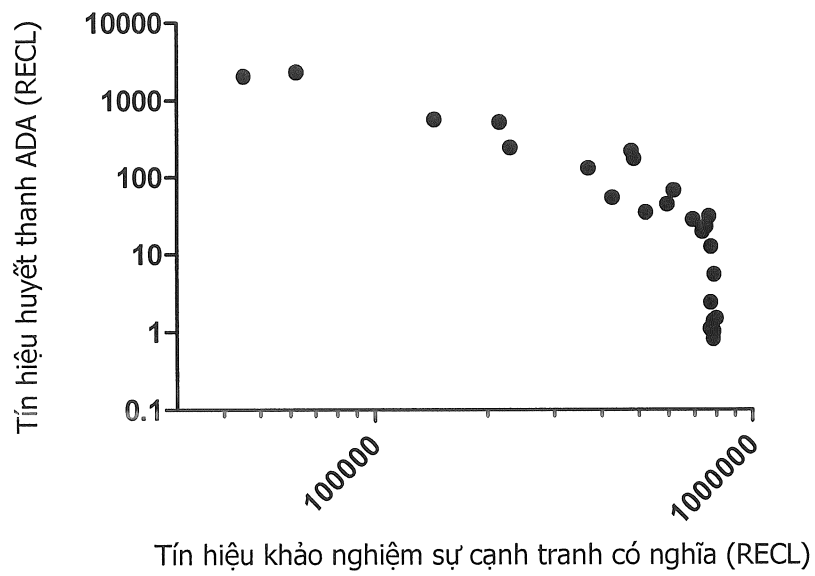


Fig.8: Thể hiện trình tự axit amin của dAb kháng TNFR1 cải biến:

(a) dAb DOM1h-131-206 có đoạn kéo dài alanin đơn:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSA
(SEQ ID NO 16)

(b) DOM1h-131-206 dAb với đoạn kéo dài alanin đơn và đoạn đột biến khung P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSA
(SEQ ID NO 17)

(c) dAb DOM1h-131-206 có đột biến khung P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO 18)

(d) dAb DOM1h-131-206 với đoạn nối dài ở đầu tận cùng C ASTKG

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSASTKG
(SEQ ID NO 19)

(e) dAb DOM1h-131-206 với đoạn nối dài ở đầu tận cùng C ASTKG và đột biến khung P14A

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSASTKG
(SEQ ID NO 20)

Fig.9: thể hiện trình tự axit amin của dAb TNFR1

(a) DOM1h-131-206 dAb

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCGGC
 ATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTGCGCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 AAGCCACATTCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTAAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGT
 GATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTGT
 GCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAAGCAGC

(SEQ ID NO 21)

(b) Dom1h-131-206 với đoạn kéo dài alanin đơn

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCGGC
 ATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTGCGCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 AAGCCACATTCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTAAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGT
 GATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTGT
 GCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAAGCAGCGC
 G

(SEQ ID NO 22)

(c) Dom1h-131-206 với đoạn kéo dài đầu tận cùng ASTKG

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCTGCGCCTGTCCTGTGCGGC
 ATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTGCGCAAGCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 AAGCCACATTCTCCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGCGGATTCCGTAAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGT
 GATAACTCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTGT
 GCGCTGCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAAGCAGCGC
 GTCTACCAAAGGT

(SEQ ID NO 23)

Fig.10: thể hiện trình tự axit amin của phân tử VHH:

(a) VHH kháng IL6

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGCAGC
 GTCTGGTAGCGTTTTCAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGT
 TGC GG GTATCATTTCTGGCGGTAGCACTTCTACGCGGACTCCGTTAAAGGTCGTTTCACCATCAGCCGCGA
 CAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGCGC
 GTTCATCACCACCGAATCTGACTACGACCTGGGTCGTCGTTATTGGGGTCAGGGTACTCTGGTAACCGTATC
 CTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCCGAAGTACAGCTGGTGGAACTCTGGCGGTGGTCTGGTACAGC
 CGGGTAACTCTCTGCGTCTGTCTTGTCGGGCTTCTGGTTTACCTTCTCCAGCTTCGGTATGTCTTGGGTTT
 GTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGGAATGGGTGTCTAGCATCTCTGGCAGCGGTTCTGATACCTGTACGCTG
 ACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACTATCTCCCGCGACAACGCGAAAAACCACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCT
 GCGTCCGGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGTGGTAGCCTGTCCCGTTCTTCTCAGGGTACCCT
 GGTTACTGTGAGCTCT

(SEQ ID NO 24)

(b) VHH alpha kháng TNF

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGCAGC
 TTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTGGATGTATTGGGTTCTGTCAGGCGCCGGGTAAAGGTCGGAATGGGT
 GTCTGAAATCAACACCAACGGCTGATACCAAATACCCGGACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACCATCTCCCGC
 GACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGT
 GCGCGTTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACTCTGGTTACCGTAAGCTCTGGTGGTGGTGGATCC
 GCGGTGGTTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTAACTCTCTGCGTCT
 GTCTTGTCGGGCTTCTGGCTTACCTTCTCTCTTTCGGTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGG
 CCTGGAATGGGTTTCTCTATCTCTGGTAGCGGTTCTGACACCCTGTACGCTGACTCTGTTAAAGGCCGCTT
 CACCATCTCCCGTGACAACGCGAAAAACCACCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGCGTCCGGAAGATACCGC
 TGTATACTACTGCACCATCGGTGGCTCTCTGTCTCGTTCTTCTCAGGGTACCCTGGTTACCGTATCTAGCGG
 TGGTGGTGGATCCGGTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTACGCCGGGTG
 GTTCTCTGCGTCTGTCTTGTCAGCGTCTGGCTTACCTTACGCGATTACTGGATGTACTGGGTTCTGTCAGG
 CACCGGGTAAAGGTCGGAATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGTCTGATACCAAATACCCGGACAGCG
 TGAAAGGTCGTTTCACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTC
 CGGAAGACACTGCGGTTTATTACTGCGCACGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACCCTGGTTA
 CTGTATCTCT

(SEQ ID NO 25)

(c) VHH kháng Willebrand Von

GAGGTACAGCTGGTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCGCAGC
 TTCTGGCCGTACCTTCAGCTACAACCCGATGGGTTGGTTCCGTGAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGT
 TGC GG CGATCTCTCGTACCGGTGGCTCTACCTACTATCCGGACTCCGTGGAAGGTCGTTTCACCATCTCCCG
 CGACAACGCGAAACGTATGGTATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCGGTTTACTATTG
 TGCTGCAGCGGGTGTTCTGTGCTGAAGACGGTCGTGTTCTGTACCCTGCCGTCCGAATACACCTTCTGGGGTCA
 GGGTACCCAGGTTACCGTTTCTTCTGCAGCGGCGGAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTAC
 AGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCTGCGTCTGGTCGCACCTTCTCTACAACCCGATGGGTTGGT
 TCCGTGAGGCACCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGTAGCGGCAATCTCTCGCACTGGTGGCTCTACCTACTACC
 CGGACTCTGTTGAAGGCCGCTTACCATCTCTCGTGACAACGCGAAACGTATGGTGTACCTGCAGATGAACT
 CCCTGCGTGCGGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGCAGCTGGTGTTCGTGCAGAAGACGGTCGTGTT
 CGTACCCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTCAGGGTACCCAGGTAACCGTATCTTCT

(SEQ ID NO 26)

Fig.10 (tiếp):

(d) VHH kháng IL6 với đoạn kéo dài alanin đơn

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGC
 GCAGCGTCTGGTAGCGTTTTCAAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGAA
 CTGGTTGCGGGTATCATTTCTGGCGGTAGCACTTCCTACGCGGACTCCGTTAAAGGTCGTTTCACCATCAGC
 CGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTAT
 TGCGCGTTTCATCACCACCGAATCTGACTACGACCTGGGTCGTCTGTTATTGGGGTCAGGGTACTCTGGTAACC
 GTATCCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTTCGAAAGTACAGCTGGTGAATCTGGCGGTGGTCTGGT
 ACAGCCGGGTAACCTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGTTTCACCTTCTCCAGCTTCGGTATGTCTTG
 GGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTAGCATCTCTGGCAGCGGTTCTGATACCCTGTA
 CGCTGACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACTATCTCCCGCGACAACGCGAAAAACCACCCTGTACCTGCAGATGAA
 CTCTCTGCGTCCGGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGTGGTAGCCTGTCCCGTTCTTCTCAGGG
 TACCCTGGTTACTGTGAGCTCTGCG
(SEQ ID NO 27)

(e) VHH alpha kháng TNF với đoạn kéo dài alanin đơn

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGC
 GCAGCTTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTGGATGTATTGGGTTCTGTCAGGCGCCGGGTAAAGGTCGTGAA
 TGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGCCTGATCACCAAATACCCGGACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACCATC
 TCCCGCGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTAC
 TATTGTGCGCGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACTCTGGTTACCGTAAGCTCTGGTGGTGGT
 GGATCCGGCGGTGGTTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTAACTCTCT
 GCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGCTTACCTTCTCCTTTTCGGTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGG
 TAAAGGCCTGGAATGGGTTTCTCTATCTCTGGTAGCGGTTCTGACACCCTGTACGCTGACTCTGTTAAAGG
 CCGCTTACCATCTCCCGTGACAACGCGAAAAACCACCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGCGTCCGGAAGAT
 ACCGCTGTATACTACTGCACCATCGGTGGCTCTCTGTCTCGTTCTTCTCAGGGTACCCTGGTTACCGTATCTA
 GCGGTGGTGGTGGATCCGGTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTACGCCG
 GGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGTGACGCTCTGGCTTACCTTACGCGATTACTGGATGTACTGGGTTCTG
 CAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGTCTGATCACCAAATACCCGGAC
 AGCGTGAAAGGTCGTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTG
 CGTCCGGAAGACACTGCGGTTTATTACTGCGCACGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACCCTG
 GTTACTGTATCCTCTGCG
(SEQ ID NO 28)

(f) VHH kháng Willebrand Von với đoạn kéo dài alanin đơn

GAGGTACAGCTGGTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGCAGC
 TTCTGGCCGTACCTTCAGCTACAACCCGATGGGTTGGTTCGCTCAGGCTCCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGT
 TGCGGCGATCTCTCGTACCGGTGGCTCTACCTACTATCCGGACTCCGTGGAAGGTCGTTTCACCATCTCCCG
 CGACAACGCGAAACGTATGGTATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCGGTTTACTATTG
 TGCTGCAGCGGGTGTTCGTGCTGAAGACGGTCGTGTTCTGACCCTGCCGTCCGAATACACCTTCTGGGGTCA
 GGGTACCCAGGTTACCGTTTCTTCTGCAGCGGCGGAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTAC
 AGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCGTCTGGTGCACCTTCTCCTACAACCCGATGGGTTGGT
 TCCGTACAGGCACCGGGTAAAGGTCGTGAACTGGTAGCGGCAATCTCTCGCACTGGTGGCTCTACCTACTACC
 CGGACTCTGTTGAAGGCCGCTTACCATCTCTCGTGACAACGCGAAACGTATGGTGTACCTGCAGATGAACT
 CCCTGCGTGCGGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGCAGCTGGTGTTCGTGCAGAAGACGGTCTGTGTT
 CGTACCCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTCAGGGTACCCAGGTAACCGTATCTTCTGCG
(SEQ ID NO 29)

Fig.11: trình tự axit amin của dAb mAb:VL

(a) phân tử mAb-VL '735 (dAb IL-13mAb: IL-4V κ):

(i) Trình tự chuỗi nặng của phân tử '735

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFYIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITA
 DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSIYDDYHVDDYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKL
 LIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY
 CQQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

(SEQ ID NO 30)

(ii) Trình tự chuỗi nhẹ phân tử '735

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSGVPDRFSGSGSGTDF
 TLKISRVEADDVGIYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 31)

(b) mAb-VL 15014

(i) Trình tự chuỗi nặng phân tử 15014

QVTLRSEGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRLTISKD
 TSRNQVVLMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKGSTVAAPSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKVEIKRAAA

(SEQ ID NO 32)

(ii) Trình tự chuỗi nhẹ phân tử 15014

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTDF
 TFTISLQPEDIAATYYCQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 33)

Fig.11 (tiếp):

(c)) mAb-VL 15019

(i) Trình tự chuỗi nặng (thành phần mAb được gạch chân, trình tự nối được in nghiêng, thành phần dAb VL sau trình tự nối được in đậm)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP~~SLKSRLTISKD~~
TSRNQVVLMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVS~~VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL~~
VKGFYPSDI~~AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL~~
SLSPGK *GSTVAAPST***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWAS**
SLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKVEIKRT

(SEQ ID NO 34)

(ii) trình tự chuỗi L của mAb-VL 15019

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV~~DYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLES~~GIPSRFSGSGSGTDFT
 TFTISSLQPED~~IATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ~~
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 35)

(d)) mAb-VL 15020

(i) Trình tự chuỗi nặng (thành phần mAb được gạch chân, trình tự nối được in nghiêng, thành phần dAb VL sau trình tự nối được in đậm):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP~~SLKSRLTISKD~~
TSRNQVVLMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVS~~VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL~~
VKGFYPSDI~~AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL~~
SLSPGK *GSTVAAPST***DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWAS**
SLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKVEIKRTV

(SEQ ID NO 36)

Fig.11 (tiếp):

(d ii) trình tự chuỗi L của mAb-VL 15020

DIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTDF
TFTISLQPEDIAITYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 37)

(e) mAb-VL 15021

(i) Trình tự chuỗi nặng (thành phần mAb được gạch chân, trình tự nối được in nghiêng, thành phần dAb VL sau trình tự nối được in đậm):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP~~SLKSRLTISKD~~
TSRNQVVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK *GSTVAAPS* **7DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWAS**
SLQGGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO 38)

(ii) trình tự chuỗi L của mAb-VL 15021

DIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTDF
TFTISLQPEDIAITYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 39)

Fig.12: trình tự axit amin của phân tử Vh-Vk dAb-fc-dAb

(a) DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu C tận cùng K-044-085 ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLLTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRV
ITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQ
GTKVEIKR

(SEQ ID NO 40)

(b) DMS30046: DMS1576 với dAb đầu tận cùng C K-044-085 ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLLTVSSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRAS
QWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGKVEI
KR

(SEQ ID NO 41)

(c) DMS30047 (chứa đầu tận cùng C) : dAb DOM15-26-597 N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C K-044-085 trừ R ở đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISR
DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLLTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYP
HTFGQGKVEIK

(SEQ ID NO 42)

Fig.12 (tiếp):

(d) DMS30048 (chứa đầu tận cùng C cải biến): dAb DOM15-26-597 N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C K-044-085 + A ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYP
HTFGQGTKVEIKRA

(SEQ ID NO 43)

(e) DMS30049 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): dAb DOM15-26-597 N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C K-044-085 +AAA ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYP
HTFGQGTKVEIKRAAA

(SEQ ID NO 44)

(f) DMS30050 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): dAb DOM15-26-597 N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C K-044-085 +T ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLTVSSVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYP
HTFGQGTKVEIKRT

(SEQ ID NO 45)

Fig.12 (tiếp):

(g) DMS30051 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): DMS1576 với dAb tận cùng C K-044-085 trừ R đầu tận cùng C ((TGLDSP) $\times$ 4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVT
ITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMYYPHTFGQ
GTKVEIK

(SEQ ID NO 46)

(h) DMS30052 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): DMS1576 với dAb đầu tận cùng C K-044-085 +A ((TGLDSP) $\times$ 4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVT
ITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMYYPHTFGQ
GTKVEIKRA

(SEQ ID NO 47)

(i) DMS30053 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): DMS1576 với dAb đầu tận cùng C K-044-085 +AAA ((TGLDSP) $\times$ 4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGQTLVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVT
ITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQMYYPHTFGQ
GTKVEIKRAAA

(SEQ ID NO 48)

Fig.12 (tiếp):

(j) DMS30054 (chứa đầu tận cùng C biến đổi): DMS1576 với dAb đầu tận cùng C K-044-085 +T
((TGLDSP)×4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSNTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGGTLTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDSPTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRV
ITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQ
GTKVEIKRT

(SEQ ID NO 49)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Glaxo Group Limited
 Morley, Peter
 Lewis, Alan
 Sandal, Thomas
 Ashman, Claire
 Steward, Michael
 De Wildt, Rudolf
 Holland, Claire
 Birchler, Mary

<120> vùng biến đổi globulin miễn dịch đơn và dược phẩm chứa vùng biến đổi này

<130> PB64743wo

<150> US 61/524,488

<151> 2011-08-17

<150> GB 1121226.3

<151> 2011-12-12

<150> GB 1121233.9

<151> 2011-12-12

<150> GB 1121236.2

<151> 2011-12-12

<150> PCT/EP2012/064632

<151> 2012-07-25

<160> 49

<170> FastSEQ đối với Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dAb không cải biến DOM 1H-131-206 (kháng TNFR1)

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dAb không cải biến DOM 1H-131-511 (kháng TNFR1)

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Val Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dAb không cải biến DOM 1H-131-202 (kháng TNFR1)

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VHH2

<400> 4

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

<210> 5

<211> 363

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH2

<400> 5

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 Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser

```

          165          170          175
Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
          180          185          190
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
          195          200          205
Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
          210          215          220
Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225          230          235          240
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
          245          250          255
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
          260          265          270
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
          275          280          285
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
          290          295          300
Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305          310          315          320
Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
          325          330          335
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
          340          345          350
Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          355          360

```

<210> 6
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VHH2

```

<400> 6
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 Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
          20          25          30
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
          35          40          45
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
          50          55          60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val 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 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
          100          105          110
Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125
Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          130          135          140
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145          150          155          160
Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
          165          170          175
Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
          180          185          190
Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
          195          200          205
Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210          215          220

```

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser

<210> 7
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VHH2

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
 290 295 300
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 340 345 350
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360

<210> 8
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VHH2

<400> 8
 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
 290 295 300
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 340 345 350
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360

<210> 9
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH2

<400> 9

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 Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val 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 Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
 145 150 155 160
 Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
 165 170 175
 Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
 180 185 190
 Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
 195 200 205
 Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ala
 260

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dom 1h-574-208

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Thẻ dung hợp Dom 1h-574-208-VL

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 180 185 190
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

<210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DT04-H-033 (dAb IL-13 gốc)

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Tyr Asn Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Tyr Glu Tyr Ser Pro Glu Ser Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dom 10h-53-567

<400> 13
 Gly Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ala Trp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Trp His Gly Glu Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ala Glu Asp Glu Pro Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb kháng VH M2.3G10.1G06

<400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Pro Thr Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mAb kháng VH M2.3G10.1G06

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 17

```

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

```

```

      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
              85              90              95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
              100              105              110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
              115              120

```

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

```

<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
              20              25              30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
              85              90              95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
              100              105              110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
              115

```

<210> 19
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

```

<400> 19
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
              20              25              30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
              85              90              95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
              100              105              110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
              115              120

```

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120

<210> 21
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 21
 gaagtacaac tgctggagag cgggtggcggc ctggttcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
 tcctgtgcgg catctggttt caccttcgca cacgaaacga tgggtgtgggt tcgccaagct 120
 ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga ccatttctat 180
 gcggattccg ttaagggctg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
 aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggg cagggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 22
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dom1h-131-206

<400> 22
 gaagtacaac tgctggagag cgggtggcggc ctggttcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
 tcctgtgcgg catctggttt caccttcgca cacgaaacga tgggtgtgggt tcgccaagct 120
 ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga ccatttctat 180
 gcggattccg ttaagggctg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
 aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggg cagggtactc tggtcaccgt aagcagcgcg 360

<210> 23
 <211> 372
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dom1h-131-206

<400> 23

```
gaagtacaac tgetggagag cgggtggcggc ctggttcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
tcctgtgcgg catctgggtt caccctcgca cacgaaacga tgggtgtgggt tcgccaagct 120
ccgggcaaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
gcggattccg ttaagggtcg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgcgaggat actgcgtgt accattgtgc gctgctgcct 300
aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggg cagggtactc tggtcaccgt aagcagcgcg 360
tctaccaaag gt 372
```

<210> 24

<211> 735

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH kháng IL6

<400> 24

```
gaagtgcagc tgggtgaatc tggcgggtgt ctggttcagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgccagc cgtctggtag cgttttcaaa atcaacgtga tggcgtggta tcgtcaggct 120
ccgggtaaag gtcgtgaact ggttgccgggt atcatttctg gcggtagcac ttctacgcg 180
gactccgtta aaggtcggtt caccatcagc cgcgacaacg cgaaaaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgtcc ggaagatacc gcggtttact attgcgcgtt catcaccacc 300
gaatctgact acgacctggg tctgcgttat tggggtcagg gtactctggt aaccgtatcc 360
tctggtgggt gtggttctgg tgggtggtcc gaagtacagc tgggtggaatc tggcgggtgg 420
ctggttacagc cgggtaaactc tctgcgtctg tcttggtcgg cttctggttt caccctctcc 480
agcttcggta tgtcttgggt tcgtcaggca cgggttaaag gtctggaatg ggtgtctagc 540
atctctggca gcggttctga taccctgtac gctgactccg tgaaaggtcg tttcactatc 600
tcccgcgaca acgcgaaaac caccctgtac ctgcagatga actctctgcg tccggaagac 660
accgctgttt actactgcac catcgggtgt agcctgtccc gttcttctca ggggtaccctg 720
gttactgtga gctct 735
```

<210> 25

<211> 1089

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH alpha kháng TNF

<400> 25

```
gaagtgcagc tggtagaatc tggcgggtgt ctggttacagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgccagc cttctggctt caccctctcc gactactgga tgtattgggt tcgtcaggcg 120
ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctgaa atcaacacca acggcctgat caccaaatac 180
ccggaactcc tgaaaggtcg tttcaccatc tcccgcgaca acgcgaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actctctgcg tccggaagat accgcggtt actattgtgc gcgttctccg 300
tctggtttca accgtggtca gggtactctg gttaccgtaa gctctggtgg tgggtggatcc 360
ggcgggtggt ctgaagttca gctggttgaa agcgggtggt gtctggtaca gccgggtaac 420
tctctgcgtc tgtcttgtgc ggcttctggc ttcaccttct cctctttcgg tatgtcttgg 480
gttcgtcagg caccgggtaa aggcctggaa tgggtttcct ctatctctgg tagcggttct 540
gacacctgt acgtgactc tgttaaaggc cgcttcacca tctcccgtga caacgcgaaa 600
accacctgt atctgcagat gaactccctg cgtccggaag ataccgctgt atactactgc 660
accatcgggt gctctctgtc tegtcttct cagggtaccc tggttaccgt atctagcgg 720
ggtggtggat ccggtggcgg tagcgaagtt cagctggttg aatctggcgg tgggtctggt 780
cagccgggtg gttctctgcg tctgtcttgt gcagcgtctg gcttcacctt cagegattac 840
tggatgtact ggtttcgtca ggcaccgggt aaaggtctgg aatgggtgtc tgaaatcaac 900
accaacgggtc tgatcaccaa ataccggac agcgtgaaa gtcgtttcac catcagccgt 960
gacaacgcga aaaacaccct gtacctgcag atgaactctc tgcgtccgga agacactgcg 1020
gtttattact gcgcacgttc tccgtctggt ttcaaccgtg gtcagggtac cctggttact 1080
```

gtatcctct

1089

<210> 26

<211> 777

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH kháng Von Willebrand

<400> 26

```

gaggtacagc tgggtgaaag cgggtggtggt ctggttcagc cgggtggttc tctgcgtctg 60
tcttgccgag cttctggccg taccttcagc tacaaccgga tgggttggtt ccgtcagggt 120
ccgggtaaag gtctggaact ggttgccgag atctctcgta ccgggtggtc tacctactat 180
ccggactccg tggaaggctg ttccaccatc tcccgcgaca acgcgaaacg tatggtatac 240
ctgcagatga acagcctgcg cgctgaagac accgcggttt actattgtgc tgcagcgggt 300
gttcgtgctg aagacggtcg tgttcgtacc ctgcgcgtccg aatacacctt ctgggggtcag 360
ggtaccacag ttaccgtttc ttctgcagcg gcggaagtgc agctggttga atctggcggg 420
ggtctggtac agccgggtgg ttctctgcgt ctgtcttgtg ctgcgtctgg tcgcaccttc 480
tcctacaacc cgatgggttg gttccgtcag gcaccgggta aaggctcgtg actggtagcg 540
gcaatctctc gcactggttg ctctacctac taccgggact ctgttgaagg ccgcttcacc 600
atctctcgtg acaacgcgaa acgtatggtg tacctgcaga tgaactccct gcgtgcggaa 660
gacaccgcag tttattactg cgcgcgagct ggtgttcgtg cagaagacgg tcgtgttcgt 720
accctgccga gcgaatacac cttctggggg caggggtaccc aggtaaccgt atcttct 777

```

<210> 27

<211> 738

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH kháng IL6

<400> 27

```

gaagtgcagc tgggtgaatc tggcgggtggt ctggttcagc cgggtggttc tctgcgtctg 60
tcttgccgag cgtctggtag cgttttcaaa atcaacgtga tggcgtggta tcgtcagggt 120
ccgggtaaag gtctggaact ggttgccggt atcatttctg gcggtagcac ttctacgcg 180
gactccgtta aaggctggtt caccatcagc cgcgacaacg cgaaaaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgtcc ggaagatacc gcggtttact attgcgcgtt catcaccacc 300
gaatctgact acgacctggg tcgtcgttat tggggtcagg gtactctggt aaccgtatcc 360
tctgggtggt gtggttctgg tgggtggttc gaagtacagc tgggtggaatc tggcgggtgg 420
ctggtacagc cgggtaactc tctgcgtctg tcttgtgcg cttctggttt caccttctcc 480
agcttcggta tgtcttgggt tcgtcaggca ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctagc 540
atctctggca gcggttctga taccctgtac gctgactccg tgaaaggctg tttcactatc 600
tcccgcgaca acgcgaaac caccctgtac ctgcagatga actctctgcg tccggaagac 660
accgctgttt actactgcac catcggtggt agcctgtccc gttcttctca ggggtaccctg 720
gttactgtga gctctgcg 738

```

<210> 28

<211> 1092

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH alpha kháng TNF

<400> 28

```

gaagtgcagc tggtagaatc tggcgggtggt ctggtacagc cgggtggttc tctgcgtctg 60
tcttgccgag cttctggctt caccttctcc gactactgga tgtattgggt tcgtcaggcg 120
ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctgaa atcaaacacca acggcctgat caccaaatac 180
ccggactccg tgaaaggctg ttccaccatc tcccgcgaca acgcgaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actctctgcg tccggaagat accgcggttt actattgtgc gcgttctccg 300
tctggtttca accgtggtca ggtactctg gttaccgtaa gctctggtgg tgggtgatcc 360
ggcgggtggt ctgaagttca gctggttgaa agcgtggtg gtctggtaca gccgggtaac 420

```

```

tctctgcgtc tgtcttgtgc ggcttctggc ttcaccttct cctctttcgg tatgtcttgg 480
gttcgtcagg caccgggtaa aggcctggaa tgggtttcct ctatctctgg tagcggttct 540
gacaccctgt acgtctgactc tgttaaaggc cgttcacca tctcccgta caacgcgaaa 600
accaccctgt atctgcagat gaactccctg cgtccggaag ataccgctgt atactactgc 660
accatcggtg gctctctgtc tctgtcttct caggttaccg tggttaccgt atctagcgg 720
ggtggtggat ccggtggcgg tagcgaagtt cagctggttg aatctggcgg tggctcgggt 780
cagccgggtg gttctctgcg tctgtcttgt gcagcgtctg gcttcacctt cagcgattac 840
tggatgtact gggttcgtca ggcaccgggt aaaggtctgg aatgggtgtc tgaatcaac 900
accaacggtc tgatcaccaa ataccggac agcgtgaaag gtcgtttcac catcagccgt 960
gacaacgcga aaaacaccct gtacctgcag atgaactctc tgcgtccgga agacactgcg 1020
gtttattact gcgcacgttc tccgtctggt tcaaccgtg gtcaggttac cctggttact 1080
gtatcctctg cg 1092

```

<210> 29

<211> 780

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VHH kháng Von Willebrand

<400> 29

```

gaggtacagc tgggtgaaag ccggtggtgt ctggttcagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgccgag cttctggccg taccttcagc tacaaccga tgggttggtt ccgtcaggct 120
ccgggtgaaag gtcgtgaact ggttcggcgg atctctcgta ccggtggctc tacctactat 180
ccggactccg tggaaggctg ttccaccatc tcccgcgaca acgcgaaacg tatggtatac 240
ctgcagatga acagcctgcg cgtgaagac accgcggttt actattgtgc tgcagcgggt 300
gttcgtgctg aagacggctg tgttcgtacc ctgccgtccg aatacacctt ctggggtcag 360
ggtaccocag ttaccgtttc ttctgcagcg gcggaagtgc agctggttga atctggcgg 420
ggtctggtac agccgggtgg ttctctgcgt ctgtctgtg ctgcgtctgg tcgcaccttc 480
tcctacaacc cgtggtgttg gttccgtcag gcaccgggta aaggtcgtga actggtagcg 540
gcaatctctc gactggtgg ctctacctac taccggact ctgttgaagg ccgcttcacc 600
atctctcgtg acaacgcgaa acgtatggtg tacctgcaga tgaactccct gcgtgcggaa 660
gacaccgcag tttattactg cgcggcagct ggtgttcgtg cagaagacgg tgcgtgtcgt 720
accctgccga gcgaatacac cttctggggg caggttaccg aggtaacctg atcttctgcg 780

```

<210> 30

<211> 581

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử mAb-VL '735 (IL-13mAb: IL-4V kappa dAb)
Phân tử '735

<400> 30

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Tyr Ile Lys Asp Thr
20          25          30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Thr Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Ser Ile Tyr Asp Asp Tyr His Val Asp Asp Tyr Tyr Ala Met
100         105         110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115         120         125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

```

130		135		140
Gly Gly Thr Ala Ala	Leu Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro	Glu	
145	150	155	160	
Pro Val Thr Val Ser	Trp Asn Ser Gly Ala	Leu Thr Ser Gly	Val His	
	165	170	175	
Thr Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser Ser	Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser	
	180	185	190	
Val Val Thr Val Pro	Ser Ser Ser Leu	Gly Thr Gln Thr	Tyr Ile Cys	
	195	200	205	
Asn Val Asn His Lys	Pro Ser Asn Thr	Lys Val Asp Lys	Lys Val Glu	
	210	215	220	
Pro Lys Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys	Pro Ala Pro	
225	230	235	240	
Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys	
	245	250	255	
Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys	Val Val Val	
	260	265	270	
Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp	Tyr Val Asp	
	275	280	285	
Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr	
	290	295	300	
Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu	His Gln Asp	
305	310	315	320	
Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn	Lys Ala Leu	
	325	330	335	
Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly	Gln Pro Arg	
	340	345	350	
Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp Glu	Leu Thr Lys	
	355	360	365	
Asn Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp	
	370	375	380	
Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys	
385	390	395	400	
Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe	Leu Tyr Ser	
	405	410	415	
Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser	
	420	425	430	
Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr	Gln Lys Ser	
	435	440	445	
Leu Ser Leu Ser Pro	Gly Lys Gly Ser	Thr Val Ala Ala	Pro Ser Gly	
	450	455	460	
Ser Thr Val Ala Ala	Pro Ser Gly Ser	Asp Ile Gln Met	Thr Gln Ser	
465	470	475	480	
Pro Ser Ser Leu Ser	Ala Ser Val Gly	Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys	
	485	490	495	
Arg Ala Ser Arg Pro	Ile Ser Asp Trp	Leu His Trp Tyr	Gln Gln Lys	
	500	505	510	
Pro Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile	Ala Trp Ala Ser	Ser Ser Leu	Gln
	515	520	525	
Gly Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe	
	530	535	540	
Thr Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr	
545	550	555	560	
Cys Gln Gln Glu Gly	Trp Gly Pro Pro	Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys	
	565	570	575	
Val Glu Ile Lys Arg				
	580			

<210> 31

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử 735

<400> 31

```

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

```

<210> 32

<211> 571

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 15014

<400> 32

```

Gln 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 Thr Ser
          20           25           30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
          50           55           60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65           70           75           80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85           90           95
Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
          100          105          110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          115          120          125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
          130          135          140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145          150          155          160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

```

```

165              170              175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180              185              190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195              200              205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210              215              220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225              230              235              240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245              250              255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260              265              270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275              280              285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290              295              300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305              310              315              320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325              330              335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340              345              350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355              360              365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370              375              380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385              390              395              400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405              410              415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420              425              430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435              440              445
Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met
450              455              460
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
465              470              475              480
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr
485              490              495
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
500              505              510
Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
515              520              525
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
530              535              540
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
545              550              555              560
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
565              570

```

<210> 33

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 15014

<400> 33

```

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

```

```

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

```

<210> 34
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb-VL 15019

```

<400> 34
Gln 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 Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
      65      70      75      80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
      100      105      110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115      120      125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
      130      135      140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
      145      150      155      160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165      170      175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
      180      185      190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
      195      200      205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

```

```

      210              215              220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225              230              235              240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
      245              250              255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
      260              265              270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
      275              280              285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      290              295              300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305              310              315              320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
      325              330              335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
      340              345              350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
      355              360              365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      370              375              380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385              390              395              400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405              410              415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420              425              430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      435              440              445
Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met
      450              455              460
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
465              470              475              480
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr
      485              490              495
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
      500              505              510
Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
      515              520              525
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
      530              535              540
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
545              550              555              560
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
      565

```

<210> 35

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mAb-VL 15019

<400> 35

```

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

```

```

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

```

<210> 36
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb-VL 15020

```

<400> 36
Gln 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 Thr Ser
          20          25          30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
          65          70          75          80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85          90          95
Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
          100          105          110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          115          120          125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
          130          135          140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145          150          155          160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
          165          170          175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
          180          185          190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
          195          200          205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
          210          215          220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225          230          235          240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
          245          250          255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

```

```

      260      265      270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
      275      280      285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      290      295      300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305      310      315      320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
      325      330      335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
      340      345      350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
      355      360      365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      370      375      380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385      390      395      400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405      410      415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420      425      430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      435      440      445
Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met
      450      455      460
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
465      470      475      480
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr
      485      490      495
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
      500      505      510
Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
      515      520      525
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
      530      535      540
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
545      550      555      560
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
      565      570

```

<210> 37
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb-VL 15020

```

<400> 37
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
      20      25      30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
      65      70      75      80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
      85      90      95
Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100      105      110

```

```

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      115              120              125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      130              135              140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145              150              155              160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      165              170              175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      180              185              190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
      195              200              205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210              215

```

```

<210> 38
<211> 530
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> mAb-VL 15021

```

```

<400> 38
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile
1      5      10      15
Tyr Trp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu
      20      25      30
Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr
      35      40      45
Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Glu
      50      55      60
Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
      65      70      75      80
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
      85      90      95
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
      100      105      110
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
      115      120      125
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
      130      135      140
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
      145      150      155      160
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
      165      170      175
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
      180      185      190
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
      195      200      205
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
      210      215      220
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
      225      230      235      240
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
      245      250      255
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
      260      265      270
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
      275      280      285
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
      290      295      300
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

```

```

305          310          315          320
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          325          330          335
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
          340          345          350
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
          355          360          365
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          370          375          380
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
385          390          395          400
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser
          405          410          415
Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
          420          425          430
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
          435          440          445
Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          450          455          460
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly
465          470          475          480
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
          485          490          495
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          500          505          510
Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
          515          520          525
Ile Lys
          530

```

<210> 39
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb-VL 15021

```

<400> 39
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
          20          25          30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          35          40          45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
          50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65          70          75          80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85          90          95
Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105          110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
          115          120          125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
          130          135          140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145          150          155          160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
          165          170          175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
          180          185          190

```

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 40
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(trình tự nối VEPKSSDK) &
 dAb K-044-085 đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4)

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Leu Val 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 Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 115 120 125
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 165 170 175
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380

```

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
385                      390                      395                      400
Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
                      405                      410                      415
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
                      420                      425                      430
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                      435                      440                      445
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
                      450                      455                      460
Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
465                      470                      475                      480
Arg

```

```

<210> 41
<211> 475
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> DMS30046: DMS1576 với dAb đầu tận cùng C K-044-085
      ((TGLDSP)x4)

```

```

<400> 41
Glu Val Gln Leu Leu Val 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 Lys Ala Tyr
                      20                      25                      30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                      35                      40                      45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                      85                      90                      95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                      100                     105                     110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                      115                     120                     125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130                     135                     140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145                     150                     155                     160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                      165                     170                     175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                      180                     185                     190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195                     200                     205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210                     215                     220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225                     230                     235                     240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                      245                     250                     255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260                     265                     270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275                     280                     285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290                     295                     300

```

```

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

```

<210> 42

<211> 480

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30047 (chứa đầu tận cùng C cải biến):

DOM15-26-597 dAb N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C
K-044-085 trừ R đầu tận cùng C ((TGLDSP)x4)

<400> 42

```

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

```

```

225          230          235          240
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          245          250          255
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          260          265          270
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          275          280          285
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
          290          295          300
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
305          310          315          320
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          325          330          335
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
          340          345          350
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
          355          360          365
Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
          370          375          380
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
385          390          395          400
Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
          405          410          415
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
          420          425          430
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          435          440          445
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
          450          455          460
Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
465          470          475          480

```

<210> 43

<211> 482

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30048 (chứa đầu tận cùng C cải biến):

DOM15-26-597 dAb N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C
K-044-085 + A ((TGLDSP)x4

<400> 43

```

Glu Val Gln Leu Leu Val 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 Lys Ala Tyr
          20          25          30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
          115          120          125
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
          130          135          140
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
145          150          155          160

```

```

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      165      170      175
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      180      185      190
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      195      200      205
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
      210      215      220
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      225      230      235      240
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      245      250      255
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      260      265      270
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      275      280      285
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
      290      295      300
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      305      310      315      320
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      325      330      335
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
      340      345      350
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
      355      360      365
Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
      370      375      380
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
      385      390      395      400
Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
      405      410      415
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
      420      425      430
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      435      440      445
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
      450      455      460
Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      465      470      475      480
Arg Ala

```

<210> 44

<211> 484

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30049 (chứa đầu tận cùng C cải biến):
dAb DOM15-26-597 N-(VEPKSSDK linker) & dAb đầu tận cùng C
K-044-085 +AAA ((TGLDSP)x4)

<400> 44

```

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

```

```

65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
          115          120          125
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
          130          135          140
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
145          150          155          160
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
          165          170          175
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
          180          185          190
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
          195          200          205
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
          210          215          220
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
225          230          235          240
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          245          250          255
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          260          265          270
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          275          280          285
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
          290          295          300
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
305          310          315          320
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          325          330          335
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
          340          345          350
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
          355          360          365
Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
          370          375          380
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
385          390          395          400
Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
          405          410          415
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
          420          425          430
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          435          440          445
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
          450          455          460
Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
465          470          475          480
Arg Ala Ala Ala

```

<210> 45

<211> 482

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30050 (chứa đầu tận cùng C cải biến):

DOM15-26-597 dAb N-(trình tự nối VEPKSSDK) & dAb đầu tận cùng C
K-044-085 +T ((TGLDSP)x4)

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Val 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 Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 115 120 125
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 165 170 175
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 385 390 395 400
 Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 405 410 415
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 450 455 460
 Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470 475 480
 Arg Thr

<210> 46
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30051 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576
 với dAb đầu tận cùng C K-044-085 trừ R đầu tận cùng C
 ((TGLDSP)x4)

<400> 46

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Val	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	Lys	Ala	Tyr
			20					25					30		
Pro	Met	Met	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Glu	Ile	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Lys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
		115					120					125			
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
	130					135					140				
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
145					150					155					160
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			165						170					175	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
			180					185					190		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
	195						200					205			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
225					230					235					240
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			245						250					255	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
			260					265					270		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
	275						280					285			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
	290					295					300				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
305					310					315					320
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			325						330					335	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Leu
			340					345					350		
Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp
	355						360					365			
Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp
	370					375					380				
Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Trp	Ile	Gly	Pro	Glu	Leu
385					390					395					400
Lys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr

```

              405              410              415
His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
              420              425              430
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
              435              440              445
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
              450              455              460
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
465              470

```

```

<210> 47
<211> 476
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> DMS30052 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576
      với dAb đầu tận cùng C K-044-085 +A ((TGLDSP)x4)

```

```

<400> 47
Glu Val Gln Leu Leu Val 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 Lys Ala Tyr
              20              25              30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
              100              105              110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
              115              120              125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130              135              140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145              150              155              160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
              165              170              175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
              180              185              190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195              200              205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210              215              220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225              230              235              240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
              245              250              255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
              260              265              270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275              280              285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290              295              300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305              310              315              320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
              325              330              335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu

```

```

          340          345          350
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp
          355          360          365
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
          370          375          380
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu
385          390          395          400
Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
          405          410          415
His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          420          425          430
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
          435          440          445
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
          450          455          460
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala
465          470          475

```

<210> 48

<211> 478

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30053 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576
với đầu tận cùng C K-044-085 dAb +AAA ((TGLDSP)x4)

<400> 48

```

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

```

```

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

```

<210> 49

<211> 476

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DMS30054 (chứa đầu tận cùng C cải biến): DMS1576
với dAb đầu tận cùng C K-044-085 +T ((TGLDSP)x4)

<400> 49

```

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

```

210	215	220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
225	230	235
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		240
	245	250
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		255
	260	265
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		270
	275	280
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		285
	290	295
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		300
305	310	315
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		320
	325	330
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu		335
	340	345
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp		350
	355	360
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp		365
	370	375
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu		380
385	390	395
Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		400
	405	410
His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		415
	420	425
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		430
	435	440
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr		445
	450	455
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		460
465	470	475