



(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) 
1-0022972

(51)⁷ **C07K 16/22, A61K 39/395, C07K 19/00,** (13) **B**
16/46, 14/00

(21) 1-2011-01179

(22) 07.10.2009

(86) PCT/EP2009/007182 07.10.2009

(87) WO2010/040508 15.04.2010

(30) 08017607.6 08.10.2008 EP

08021834.0 16.12.2008 EP

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.09.2011 282

(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
124 Grenzacherstrasse CH-4070 Basel Switzerland

(72) BAEHNER, Monika (DE), BRINKMANN, ULRICH (DE), GEORGES, Guy (BE),
GRIEP, Remko, Albert (NL), IMHOF-JUNG, Sabine (DE), KAVLIE, Anita (NO),
KETTENBERGER, Hubert (DE), KLEIN, Christian (DE), REGULA, Joerg, Thomas
(DE), SCHAEFER, Wolfgang (DE), SCHANZER, Juergen, Michael (DE),
SCHEUER, Werner (DE), SEEBER, Stefan (DE), THOMAS, Markus (DE)

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) **KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG VEGF/KHÁNG ANG-2 VÀ PHƯƠNG
PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng nhân tố sinh trưởng nội
mô mạch người (VEGF) và người và kháng angiopoietin-2 người (ANG-2), các
phương pháp để tạo ra kháng thể, dược phẩm chứa kháng thể và việc sử dụng
kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF/VEGF-A) và kháng angiopoietin-2 người (ANG-2), các phương pháp để tạo ra kháng thể, dược phẩm chứa kháng thể và việc sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự hình thành mạch là nguyên nhân gây ra nhiều rối loạn khác nhau bao gồm các khối u rắn, các rối loạn tạo mạch mới trong mắt như các bệnh võng mạc tăng sinh hoặc thoái hoá điểm vàng liên quan đến độ tuổi (AMD), chứng viêm đa khớp dạng thấp, và bệnh vẩy nến (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; và Garner, A., Vascular diseases, in: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., và Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710). Đối với trường hợp là các khối u rắn, quá trình tạo mạch mới cho phép các tế bào khối đạt được lợi thế phát triển và tính tự động tăng sinh so với các tế bào bình thường. Vì vậy, mối liên quan được thấy giữa mật độ các vi mạch trong các phần u và sự sống sót của bệnh nhân bệnh ung thư vú cũng như nhiều loại u khác nhau (Weidner, N., et al., N Engl J Med. 324 (1991) 1-8; Horak, E.R., et al., Lancet 340 (1992) 1120-1124; và Macchiarini, P., et al., Lancet 340 (1992) 145-146).

Các kháng thể VEGF và kháng VEGF

Nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF/VEGF-A) (SEQ ID No: 105) được mô tả, ví dụ trong tài liệu Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 and Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24. VEGF tham gia vào việc điều chỉnh quá trình hình thành mạch và quá trình tạo mạch mới bình thường và bất thường liên quan đến các khối u và các rối loạn trong mắt (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; và Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-

1039). VEGF là glycoprotein homodime được phân lập từ một vài nguồn. VEGF thể hiện hoạt tính gây phân bào đặc hiệu cao đối với các tế bào nội mô. VEGF có các chức năng điều chỉnh quan trọng với quá trình hình các mạch máu mới trong quá trình tạo mạch phôi và với quá trình hình thành mạch trong cuộc sống người trưởng thành (Carmeliet, P., et al., *Nature*, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., *Nature*, 380 (1996) 439-442; xem trong tài liệu Ferrara and Davis-Smyth, *Endocrine Rev.*, 18 (1997) 4-25. Ý nghĩa vai trò của VEGF được chứng minh trong các nghiên cứu chứng tỏ rằng quá trình làm bất hoạt alen VEGF đơn tạo ra tính gây chết phôi do sự phát triển giảm sút của hệ mạch (Carmeliet, P., et al., *Nature*, 380 (1996) 435-439; Ferrara, N., et al., *Nature*, 380 (1996) 439-442. Ngoài ra VEGF có hoạt tính hấp dẫn hoá học mạnh đối với các bạch cầu đơn nhân to, có thể kích thích chất hoạt hoá plasminogen và chất ức chế hoạt hoá plasminogen trong các tế bào nội mô, và có thể còn kích thích tính thấm thấu vi mạch. Do hoạt tính sau cùng, đôi khi nó được đề cập tới như nhân tố thấm thấu mạch (VPF). Quá trình phân lập và các đặc tính của VEGF được xem lại; xem tài liệu Ferrara, N., et al., *J. Cellular Biochem.*, 47 (1991) 211-218 and Connolly, *J. Cellular Biochem.*, 47 (1991) 219-223. Việc tách intron ARN thông tin khác của gen VEGF đơn tạo ra năm isoform của VEGF. alternative

Các kháng thể làm trung hoà kháng VEGF ức chế sự phát triển của nhiều loại dòng tế bào khối u người ở chuột (Kim, I., et al., *Nature* 362 (1993) 841-844; Warren, S.R., et al., *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., *Bệnh ung thư Res.* 56 (1996) 4032-4039; và Melnyk, O., et al., *Bệnh ung thư Res.* 56 (1996) 921-924). WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900 và WO 00/35956 đề cập tới các kháng thể kháng VEGF. Bevacizumab kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người (được bán dưới tên thương mại Avastin®) là kháng thể kháng VEGF được sử dụng để điều trị khối u WO 98/45331).

Ranibizumab (tên thương mại Lucentis®) là phần kháng thể đơn dòng thu được từ cùng kháng thể chuột gốc như bevacizumab (Avastin). Nó nhỏ hơn nhiều phân tử gốc và có ái lực hoàn thiện để tạo ra gắn kết mạnh hơn với VEGF-A (WO 98/45331). Nó có tác dụng chống hình thành mạch mà đã được chấp thuận để điều trị dạng “ướt” của chứng thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi tác (ARMD), một dạng thông

thường của chứng suy giảm thị lực liên quan đến tuổi tác. Kháng thể kháng VEGF khác, ví dụ HuMab G6-31 được mô tả, ví dụ trong US 2007/0141065.

Các kháng thể ANG-2 và kháng ANG-2

Angiopoietin-2 người (ANG-2) (theo cách khác được viết tắt là ANGPT2 hoặc ANG2) (SEQ ID No:106) được mô tả trong tài liệu Maisonpierre, P.C., et al, Science 277 (1997) 55-60 and Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Các angiopoietin-1 và -2 (ANG-1 (SEQ ID No: 107) và ANG-2 (SEQ ID No: 106)) được phát hiện như là các phối tử đối với các Tie, một họ của các tyrosin kinaza được biểu hiện một cách chọn lọc trong nội mô mạch Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48. Hiện nay có bốn thành viên chính thức của họ angiopoietin. Angiopoietin-3 và -4 (Ang-3 và Ang-4) có thể là các đối tác phân kỳ rộng của locus gen tương tự ở chuột nhắt và người Kim, I., et al., FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28. ANG-1 và ANG-2 có thể được bắt đầu nhận dạng trong các thử nghiệm nuôi cấy mô như chất chủ vận và chất đối kháng tương ứng (xem đối với ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; và đối với ANG-2: Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55- 60) Tất cả các angiopoietin gắn kết chủ yếu với Tie2, và cả Ang-1 và -2 gắn kết với Tie2 với ái lực là 3 nM (Kd). Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60. Ang-1 được chứng minh là hỗ trợ sự sống của EC và thúc đẩy tính toàn vẹn nội mô, Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; Kwak, H.J., et al., FEBS Lett 448 (1999) 249-53; Suri, C., et al., Science 282 (1998) 468-71; Thurston, G., et al., Science 286 (1999) 251 1-14; Thurston, G., et al., Nat. Med. 6 (2000) 460-63, trong khi ANG-2 có tác dụng ngược lại và thúc đẩy việc làm mất ổn định của mạch máu và sự thoái hoá khi không có các nhân tố sống sót VEGF hoặc nhân tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60. Tuy nhiên nhiều nghiên cứu về chức năng của ANG-2 đã gợi ý nhiều trạng thái phức hợp hơn. ANG-2 có thể là chất điều biến phức hợp sự tái tạo hình mạch mà có vai trò với cả quá trình nhú mạch và suy thoái mạch. Hỗ trợ vai trò này của ANG-2, các phân tích biểu hiện chứng tỏ rằng ANG-2 bị kích thích nhanh, cùng với VEGF, trong các sắp đặt nhú tạo mạch người trưởng thành, trong khi ANG-2 được kích thích khi không có mặt VEGF trong các sắp đặt suy thoái mạch. Holash, J., et al., Science 284 (1999) 1994-98; Holash, J., et al., Oncogene 18 (1999) 5356-62.

Phù hợp với vai trò phụ thuộc ngữ cảnh, ANG-2 gắn kết đặc hiệu với cùng thụ thể đặc hiệu nội mô. Tie-2, được hoạt hoá bởi Ang-1, nhưng có các tác dụng phụ thuộc ngữ cảnh đối với quá trình hoạt hoá của nó. Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60.

Các thử nghiệm hình thành mạch máu cũng chứng tỏ rằng cả ANG-1 và ANG-2 có các tác dụng tương tự, tác động hợp lực với VEGF để thúc đẩy sự phát triển của các mạch máu mới. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Khả năng là có đáp ứng nội mô phụ thuộc liều được tăng thêm theo sự quan sát như thể *in vitro* với nồng độ cao, ANG-2 có thể cùng là tiền tạo mạch. Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52. Với nồng độ cao, ANG-2 hoạt động như nhân tố sống sót gây chết tế bào đối với các tế bào nội mô trong quá trình gây chết làm mất huyết thanh nhờ hoạt hoá Tie2 bằng PI-3 Kinase và đường Akt. Kim, I., et al., Oncogene 19 (2000) 4549-52.

Các thử nghiệm *in vitro* khác gợi ý rằng trong quá trình tiếp xúc duy trì liên tục, các tác động của ANG-2 có thể dịch chuyển tăng dần từ tác động của chất đối kháng thành chất chủ vận Tie2, và tại các điểm thời gian muộn, nó có thể liên quan trực tiếp đến quá trình hình thành ống mạch và làm ổn định mạch mới. Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. Ngoài ra, nếu các EC được nuôi cấy bằng keo tơ huyết, quá trình hoạt hoá Tie2 bằng ANG-2 cũng được quan sát, có thể gợi ý rằng hoạt động của ANG-2 có thể phụ thuộc vào tình trạng biệt hoá EC. Teichert-Kuliszewska, K., et al., Cardiovasc. Res. 49 (2001) 659-70. Trong vi mạch EC nuôi cấy trong gel collagen ba chiều, ANG-2 có thể cũng kích thích quá trình hoạt hoá Tie2 và thúc đẩy quá trình hình thành các cấu trúc tương tự mao dẫn. Mochizuki, Y., et al., J. Cell. Sci. 115 (2002) 175-83. Việc sử dụng dịch đồng nuôi cấy dạng cầu 3-D như kiểu trưởng thành mạch *in vitro* chứng tỏ rằng việc tiếp xúc trực tiếp giữa các EC và các tế bào trung mô loại bỏ trạng thái đáp ứng với VEGF, trong khi sự có mặt của VEGF và ANG-2 kích thích như mạch. Korff, T., et al., Faseb J. 15 (2001) 447-57. Etoh, T.H. et al. chứng tỏ rằng các EC biểu hiện chủ yếu Tie2, quá trình biểu hiện MMP-1, MMP-9 và u-PA được điều chỉnh tăng rõ rệt bởi ANG-2 với sự có mặt của VEGF. Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53. Với kiểu màng đồng tử, Lobov, I.B. et al. thể hiện rằng ANG-2 sự có mặt của VEGF nội sinh làm tăng nhanh đường kính mao dẫn, sửa đổi phiên bản, quá trình tăng sinh và di trú của các tế bào nội

mô, và kích thích như các mạch máu mới. Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10. Trái lại, ANG-2 thúc đẩy sự tử vong tế bào và sự thoái triển mạch mà không có VEGF nội sinh. Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10. Tương tự, với kiểu khối u *in vivo*, Vajkoczy, P., et al. biểu thị rằng các thể kết tụ đa bào kích thích sự phát triển mạch bằng sự nhú tạo mạch qua biểu hiện đồng thời VEGFR-2 và ANG-2 qua vật chủ và khối u nội mô. Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85. Kiểu này chứng tỏ rằng hệ vi mạch ổn định của các khối u sinh trưởng khác biệt bởi sự sửa đổi liên tục, thường được cho là được tạo ra bởi sự biểu hiện của VEGF và ANG-2. Vajkoczy, P., et al., J Clin. Invest. 09 (2002) 777-85.

Các thử nghiệm Tie-2 và Angiopoietin-1 ở chuột được gây mê thể hiện các phenotyp tương tự và gợi ý rằng quá trình phosphoryl hoá Tie-2 kích thích bởi Angiopoietin-1 tạo ra sự sửa đổi và ổn định mạch phát triển, thúc đẩy sự trưởng thành mạch máu trong quá trình hình thành mạch và duy trì sự dính bám tế bào hỗ trợ tế bào nội mô (Dumont, J., et al., Genes & Development, 8 (1994) 1897-1909; Sato, T.N., Nature, 376 (1995) 70-74; (Thurston, G., et al., Nature Medicine: 6 (2000) 460-463). Vai trò của angiopoietin-1 được cho là được bảo toàn ở người trưởng thành, trong đó nó được biểu hiện một cách rộng rãi và cơ bản (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., Exp Neurology, 159:391-400 (1999)). Trái lại, biểu hiện angiopoietin-2 về cơ bản giới hạn ở các điểm sửa đổi mạch trong đó nó được cho là để phong bế chức năng làm ổn định cơ bản hoặc làm trưởng thành của angiopoietin-1, cho phép các mạch trở lại, và vẫn giữ ở trạng thái dẻo mà có thể đáp ứng nhiều hơn với các tín hiệu như (Hanahan, D., 1997; Holash, J., et al., Orzcogerze 18 (199) 5356-62; Maisonpierre, P.C., 1997). Các nghiên cứu về biểu hiện Angiopoietin-2 trong quá trình hình thành mạch bệnh lý đã phát hiện ra nhiều kiểu u có biểu hiện Angiopoietin-2 trong mạch (Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60). Các nghiên cứu chức gợi ý rằng Angiopoietin-2 có liên quan đến sự hình thành mạch khối u và có liên quan đến sự biểu hiện quá mức Angiopoietin-2 có sự phát triển khối u tăng ở kiểu mô ghép khác loài chuột (Ahmad, S.A., et al., Cancer Res., 61 (2001) 1255-1259). Các nghiên cứu khác liên quan đến sự biểu hiện quá mức Angiopoietin-2 có tình trạng siêu mạch khối u (Etoh, T., et al., Bệnh ung thư Res. 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 124-29).

Trong những năm gần đây, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 và/hoặc Tie-2 được đề xuất như các đích điều trị chống ung thư có thể chấp nhận. Ví dụ US 6,166,185, US 5,650,490 và US 5,814,464 đề xuất các kháng thể thụ thể và phối tử kháng Tie-2. Các thử nghiệm sử dụng Tie-2 hoà tan được đề xuất để làm giảm số lượng và kích cỡ các khối u ở loài gặm nhấm (Lin, 1997; Lin 1998). Siemester, G., et al. Siemester, G., et al., *Cancer Res.* 59 (1999) 3185-91 tạo ra các dòng tế bào u hắc sắc tố người biểu hiện miền ngoại bào của Tie-2, được tiêm vào chuột trụi và đã thông báo Tie-2 hoà tan gây ra sự ức chế đáng kể quá trình phát triển khối u và sự hình thành mạch khối u. Căn cứ vào cả Angiopoietin-1 và Angiopoietin-2 gắn kết với Tie-2, không rõ ràng từ các thử nghiệm đó là liệu Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 hoặc Tie-2 có là đích hấp dẫn để làm liệu pháp chống ung thư không. Tuy nhiên, liệu pháp chống Angiopoietin-2 hữu hiệu được cho là có tác dụng điều trị các bệnh như bệnh ung thư, trong đó quá trình tiến triển phụ thuộc vào sự hình thành mạch khác thường trong đó việc phong bế quá trình có thể phòng ngừa bệnh sớm (Follunan, J., *Nature Medicine.* 1 (1995) 27-31).

Ngoài ra một số nhóm đề cập đến việc sử dụng các kháng thể và các peptit gắn kết với Angiopoietin-2. Xem, ví dụ US 6 166,185 và US 2003/10124129. WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 03/057134 hoặc US 2006/0122370.

Thử nghiệm về hiệu quả biểu hiện cục bộ của Angiopoietin-2 đã chứng tỏ rằng việc kháng tín hiệu Angiopoietin-1/Tie-2 làm lỏng cấu trúc mạch chặt nhờ đó các EC tiếp xúc với các tín hiệu hoạt hoá từ các tác nhân gây kích thích hình thành mạch, ví dụ VEGF (Hanahan, D., *Science*, 277 (1997) 48-50). Tác dụng tiền tạo mạch này thu được từ sự ức chế Angiopoietin-1 biểu thị rằng liệu pháp kháng Angiopoietin-1 sẽ không là phương pháp điều trị bệnh ung thư hữu hiệu.

ANG-2 được biểu hiện trong quá trình phát triển tại các điểm trong đó việc sửa đổi mạch máu xuất hiện. Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60. Ở các cá thể trưởng thành, biểu hiện ANG-2 bị giới hạn ở các điểm sửa đổi mạch cũng như ở các khối u được tạo mạch ở mức độ cao, bao gồm u thần kinh đệm, Osada, H., et al., *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 305-09; Koga, K., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 6248-54, caxinom tế bào gan, Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45, caxinom dạ dày, Etoh, T., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 2145-53; Lee, J.H., et al., *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 355-61, khối u tuyến giáp, Bunone, G., et al., *Am J Pathol* 155 (1999) 1967-76

bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, Wong, M.P., et al., Lung Cancer 29 (2000) 11-22, và bệnh ung thư ruột kết, Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43, và tuyến tiền liệt Wurmbach, J.H., et al., Anticancer Res. 20 (2000) 5217-20. Một số tế bào khối u được thấy biểu hiện ANG-2. Ví dụ, Tanaka, S., et al., J. Clin. Invest. 103 (1999) 341-45 phát hiện ANG-2 ARN thông tin ở 10 trong số 12 mẫu caxinom tế bào gan người (HCC). Nhóm Ellis đề xuất rằng ANG-2 được biểu hiện khắp nơi ở biểu mô khối u. Ahmad, S.A., et al., Cancer 92 (2001) 1138-43. Các nhà nghiên cứu khác đề xuất các phát hiện tương tự. Chen, L., et al., J. Tongji Med. Univ. 21 (2001) 228-35. Bằng cách phát hiện các mức ANG-2 ARN thông tin trong các mẫu bệnh ung thư vú người lưu trữ Sfiligoi, C., et al., Int. J. Cancer 103 (2003) 466-74 liên quan đặc biệt đến sự xâm nhập hạch bạch huyết, thời gian không mắc bệnh ngán và sự sống sót toàn diện kém. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29 xem xét lại toàn bộ 236 bệnh nhân bị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) ở giai đoạn bệnh lý I đến IIIA tương ứng. Nhờ sử dụng hoá học miễn dịch, các tác giả đã phát hiện ra rằng 16,9% bệnh nhân NSCLC là ANG-2 dương tính. Mật độ vi mạch đối với khối u ANG-2 dương tính cao hơn đáng kể so với mật độ vi mạch của khối u âm tính ANG-2. Hiệu quả tạo mạch của ANG-2 chỉ được thấy khi biểu hiện VEGF cao. Ngoài ra, biểu hiện dương tính của ANG-2 là nhân tố quan trọng để dự đoán sự sống sót sau phẫu thuật kém. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Tuy nhiên, các tác giả đã nhận thấy không có liên quan đáng kể nào giữa biểu hiện Ang-1 và mật độ vi mạch. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Các kết quả đó gợi ý rằng ANG-2 là chất chỉ thị các bệnh nhân bị một vài kiểu bệnh ung thư có tiên lượng bệnh xấu.

Mới đây, nhờ sử dụng kiểu chuột được gây mê bằng ANG-2, nhóm Yancopoulos đề xuất rằng ANG-2 cần thiết cho sự hình thành mạch sau khi trẻ sinh. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23. Chúng chúng tỏ rằng sự thoái triển của hệ mạch pha lê đã lập trình thử nghiệm trong mắt không xuất hiện ở chuột gây mê bằng ANG-2 và các mạch máu võng mạc của chúng không thể mọc lên từ động mạch chính võng mạc. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23. Các tác giả cũng phát hiện ra việc làm đứt đoạn ANG-2 tạo ra các sai hỏng sâu ở kiểu và chức năng của hệ mạch bạch huyết. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (200) 411-23. Việc tách di truyền bằng Ang-1 sửa chữa mạch bạch huyết, nhưng không tác động đến các sai hỏng hình thành mạch. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23.

Peters và các cộng sự đề xuất rằng Tie2 hoà tan, khi phân phát hoặc như protein tái tổ hợp hoặc trong vector biểu hiện virut, ức chế sự phát triển caxinom vú chuột và u hắc sắc tố ở các kiểu chuột nhất. Lin, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 8829-34; Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78. Các mật độ mạch ở các mô khối u do được điều trị rất giảm. Ngoài ra, Tie2 hoà tan phong bế sự hình thành mạch ở màng sừng chuột được kích thích bởi môi trường có điều kiện tế bào khối u. Lin, P., et al., J. Clin. Invest. 100 (1997) 2072-78. Ngoài ra, Isner và các cộng sự chứng minh rằng việc bổ sung ANG-2 vào VEGF kích thích tình trạng mạch mới có chu vi lớn hơn và dài hơn kích thích chỉ riêng VEGF. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Thụ thể Tie2 hoà tan dư ngăn chặn sự điều biến quá trình tạo mạch mới do VEGF gây ra nhờ ANG-2. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59 (1999) 3185-91 cho thấy rằng với các mô ghép khác loài ở chuột trụi mà sự biểu hiện quá mức của các miền gắn kết phối tử ngoại bào của hoặc Flt-1 hoặc Tie2 trong các mô ghép khác loài tạo ra sự ức chế đáng kể quá trình không thể bù bằng loại khác, gợi ý rằng quá trình thụ thể VEGF và quá trình Tie2 phải được coi là hai thể kháng đặc hiệu độc lập cần thiết đối với quá trình hình thành mạch *in vivo*. Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91. Điều này được chứng minh bằng nhiều công bố mới đây của White, R., R., et al., , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5028-33. Trong nghiên cứu của họ, chứng minh được rằng aptamer ARN kháng nucleaza gắn kết đặc hiệu và ức chế quá trình tạo mạch mới đã được ức chế đáng kể bằng ANG-2 được kích thích bởi bFGF ở kiểu hình thành mạch vi bao màng sừng chuột.

Các kháng thể đặc hiệu kép

Rất nhiều định dạng kháng thể tái tổ hợp đã được phát triển trong thời gian vừa qua, ví dụ các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn bằng cách dung hợp dạng kháng thể IgG và các miền chuỗi đơn chẳng hạn (xem ví dụ Coloma, M.J., et al., Nature Biotech 15 (1997) 159-163; WO 2001/077342; và Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234).

Cũng có một vài định dạng mới khác trong đó cấu trúc nhân kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM) không giữ lại được nữa như các thể dia-, tria- hoặc tetra-, mini-, một vài định dạng chuỗi đơn (scFv, Bis-scFv), chúng có khả năng gắn kết hai hoặc

hiệu kháng nguyên, đã được phát triển (Holliger, P., et al, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3–14; Shen, J., et al., Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65–74; Wu, C., et al., Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297).

Tất cả các định dạng này sử dụng các liên kết hoặc để kết hợp nhân kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM) với protein gắn kết khác (ví dụ scFv) hoặc để kết hợp hai phần Fab hoặc scFvs (Fischer, N., Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3–14). Cần lưu ý rằng có thể muốn giữ lại các chức năng tác động, như tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), chúng được tạo ra nhờ gắn kết thụ thể Fc, bằng cách duy trì mức độ cao của các kháng thể xuất hiện tương tự đến tự nhiên.

Các globulin miễn dịch miễn biến đổi kép được đề cập trong WO 2007/024715 như các protein gắn kết đa đặc hiệu và đa hoá trị được biến đổi di truyền. Quy trình để tạo ra các dime kháng thể có hoạt tính sinh học được đề cập trong US 6.897.044. Cấu trúc kháng thể đa hoá trị Fv có ít nhất bốn miền biến đổi được liên kết với nhau qua các liên kết peptit được đề cập trong US 7.129.330. Các cấu trúc gắn kết kháng nguyên lưỡng phân và đa phân được đề cập trong US 2005/0079170. Protein gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đơn hoá trị ba hoặc bốn bao gồm ba hoặc bốn phần Fab gắn kết với nhau cộng hoá trị bằng cấu trúc nối, protein đó không là globulin miễn dịch tự nhiên được đề cập trong US 6.511.663. Trong WO 2006/020258 các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn được đề cập có thể được biểu hiện có hiệu quả trong các tế bào không nhân và có nhân điển hình, và được sử dụng trong các phương pháp chữa bệnh và chẩn đoán. Phương pháp để tách hoặc tổng hợp một cách ưu tiên các dime được liên kết qua ít nhất một liên kết giữa các chuỗi disulfua từ các dime không liên kết qua ít nhất một liên kết giữa các chuỗi disulfua từ hỗn hợp bao gồm hai loại dime polypeptit được đề cập trong US 2005/0163782. Các thụ thể đặc hiệu kép hoá trị bốn được đề cập trong US 5,959,083. Các kháng thể được biến đổi di truyền với ba hoặc nhiều các điểm gắn kết kháng nguyên chức được đề cập trong WO 2001/077342.

Các polypeptit gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu và đa hoá trị được đề cập trong WO 1997/001580. WO 1992/004053 đề xuất các thể tiếp hợp đồng nhất, thường được tạo ra từ các kháng thể đơn dòng thuộc loại IgG gắn kết với yếu tố di truyền kháng

nguyên tương tự được liên kết cộng hoá trị bằng liên kết chéo tổng hợp. Các kháng thể đơn dòng thiếu hợp với ái lực cao đối với kháng nguyên được đề cập trong WO 1991/06305 nhờ đó các oligome, thường là loại IgG, được tiết xuất có hai hoặc nhiều globulin monome miễn dịch cùng nhau tạo ra các phân tử IgG hoá trị bốn hoặc hoá trị sáu. Các kháng thể thu được từ cừu và các cấu trúc kháng thể biến đổi di truyền được đề cập trong US 6,350,860 có thể được sử dụng để điều trị các bệnh trong đó hoạt tính interferon gamma là nguồn bệnh. Các cấu trúc có thể là đích được đề cập trong US 2005/0100543 là các chất mang đa hoá trị của các kháng thể đặc hiệu kép, tức là mỗi phân tử của cấu trúc có thể là đích có thể được sử dụng như chất mang của hai hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn được biến đổi di truyền được đề cập trong WO 1995/009917. Các phân tử gắn kết ổn định gồm có hoặc bao gồm scFv ổn định được đề cập trong WO 2007/109254.

Tổ hợp của các chất ức chế VEGF và ANG-2

WO 2007/068895 đề cập đến tổ hợp của chất đối kháng ANG-2 và các chất đối kháng VEGF, KDR và/hoặc FLT4. WO 2007/089445 đề cập đến các tổ hợp chất ức chế ANG-2 và VEGF.

WO 2003/106501 đề cập đến các protein dung hợp gắn kết với Angiopoietin và chứa miền multimerization. WO 2008/132568 đề xuất các protein dung hợp gắn kết với Angiopoietin và VEGF.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF người và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 28 với các đột biến T92L, H93Q và W94T, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng

CDR2 của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

hoặc điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:11 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2 của SEQ ID NO:13, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:14 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

hoặc điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 17, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 18, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:19 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 20, vùng CDR2 của SEQ ID NO:21, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:22 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 25, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 26, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:27 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 28 hoặc SEQ ID NO: 28 với các đột biến T92L, H93Q và W94T, vùng CDR2 của SEQ ID NO:29, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 30 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T SEQ ID

NO: 45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO:

45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 46, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 47, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 48 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 51 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 52 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 53 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 62, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 63, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 64, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 65, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 66, hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 67, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 68, hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 69, hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 62, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 63, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 64 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 65, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 66, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 67 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 như miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 68 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 69 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Các kháng thể đặc hiệu kép này ít nhất có hoá trị hai và có thể có hoá trị ba, hoá trị bốn hoặc đa hoá trị. Tốt hơn là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có hoá trị hai, hoá trị ba hoặc hoá trị bốn.

Khía cạnh khác của sáng chế là phân tử axit nucleic mã hoá chuỗi của kháng thể đặc hiệu kép đã nêu.

Sáng chế còn đề xuất các vector biểu hiện chứa axit nucleic đã nêu theo sáng chế có khả năng biểu hiện axit nucleic đã nêu trong tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình, và các tế bào chủ chứa các vector này để sản sinh tái tổ hợp kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình bao gồm vector theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, khác biệt bởi biểu hiện axit nucleic theo sáng chế trong tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình và thu hồi kháng thể đặc hiệu kép này từ tế bào hoặc dịch nổi nuôi cấy tế bào. Sáng chế còn bao gồm kháng thể thu được bằng phương pháp tái tổ hợp này.

Các khía cạnh khác nữa của sáng chế là dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép đã nêu, dược phẩm này để điều trị bệnh ung thư, việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép này để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư, phương pháp điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư bằng cách cung cấp kháng thể đặc hiệu kép đã nêu cho bệnh nhân cần sự điều trị này.

Các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có các lợi ích cho các bệnh nhân cần liệu pháp nhằm vào VEGF và ANG-2. Các kháng thể theo sáng chế có các đặc tính sáng tạo và mới đem lại lợi ích cho bệnh nhân bị bệnh đã nêu, đặc biệt là bệnh ung thư. Đáng ngạc nhiên khi phát hiện ra rằng các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là hữu hiệu nhiều hơn đối với sự phát triển khối u và/hoặc ức chế sự hình thành mạch khối u so với tổ hợp của các kháng thể gốc đặc hiệu đơn tương ứng.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với VEGF người và ANG-2 người bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF người và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người, khác biệt ở chỗ:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 28 với các đột biến T92L, H93Q và W94T, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng

CDR2 của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

hoặc điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 9, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:11 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 12, vùng CDR2 của SEQ ID NO:13, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:14 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

hoặc điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 17, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 18, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:19 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 20, vùng CDR2 của SEQ ID NO:21, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:22 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 25, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 26, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:27 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 28 hoặc SEQ ID NO: 28 với các đột biến T92L, H93Q và W94T, vùng CDR2 của SEQ ID NO:29, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:30 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T SEQ ID

NO: 45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO:

45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 78, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 79, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 81, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 82 hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 83, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85 hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 46, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 47, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 48 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 51 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 52 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 53 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, hoặc SEQ ID NO: 94, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 95, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 96 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 97, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 98, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 99 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 62, hoặc SEQ ID NO: 86, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 63, hoặc SEQ ID NO: 87, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 64, hoặc SEQ ID NO: 88 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 65, hoặc SEQ ID NO: 89, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 66, hoặc SEQ ID NO: 90, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 67, hoặc SEQ ID NO: 91 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 100 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 101 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 68, hoặc SEQ ID NO: 92 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 69, hoặc SEQ ID NO: 93 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 62, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 63, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 64 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 66, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 67.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 như miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 68 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 69 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO:5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO:6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 78, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 79, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 80 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 81, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 82, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 83 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm SEQ ID NO: 7 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 8 như miền biến đổi chuỗi nhẹ, và

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm SEQ ID NO: 84 như miền biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 85 như miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Phương án khác của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) khác biệt ở chỗ kháng thể kháng ANG-2 gốc không gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin 1 người (ANG-1). Các kháng thể gốc thông thường gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người, nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 người, ví dụ là Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, và tốt hơn là Ang2i_LC10 hoặc các kháng thể gắn kết với epitop tương tự như Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10, tốt hơn là các kháng thể gắn kết với epitop tương tự như Ang2i_LC06, hoặc Ang2i_LC10. Vì vậy theo một phương án của sáng chế, kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 người (hoặc trong đó kháng thể kháng ANG-2 gốc không gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin 1 người (ANG-1)) mà gắn kết với epitop tương tự như Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09,

Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10, tốt hơn là với epitope tương tự như Ang2i_LC06 hoặc Ang2i_LC10. Các kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 người (hoặc trong đó kháng thể kháng ANG-2 gốc không gắn kết đặc hiệu với Angiopoetin 1 người (ANG-1)) có thể có các đặc tính được cải thiện như hoạt tính sinh học hoặc dược lý, kém độc, hoặc profil được động lực, so với các kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) cũng như với ANG-1 người.

Vì vậy, một phương án ưu tiên là kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với VEGF người và ANG-2 người bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF người và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người, khác biệt ở chỗ điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai không gắn kết đặc hiệu với Angiopoetin 1 người (ANG-1).

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF người và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người, khác biệt ở chỗ tỷ lệ của các ái lực gắn kết KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với VEGF)/KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với ANG-2) là 1,0-10,0, tốt hơn là 1,5 -8,0 (theo một phương án 5,0-8,0) và tốt hơn nữa là giá trị KD xác thực nằm trong khoảng 10^{-8} - 10^{-13} mol/l. Các giá trị KD được xác định trong BIACORE gắn kết ANG-2/VEGF (xem Ví dụ 2, và Fig.15A). Do cả hai protein VEGF người và ANG-2 người đều có mặt như các phối tử thụ thể hoà tan trong huyết thanh người với các nồng độ gần tương tự nên việc phong bế cả hai phối tử thụ thể này bằng cách đặc hiệu khác biệt ở chỗ tỷ lệ của các ái lực gắn kết KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với VEGF)/KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với ANG-2) là 1,0-10,0, tốt hơn là 1,5 -8,0, và theo một phương án 5,0-8,0 có thể tạo ra các đặc tính cải thiện về các hiệu quả chống tạo mạch, ức chế sự phát triển khối u hoặc cơ chế chống chịu trong quá trình điều trị bệnh ung thư hoặc các bệnh mạch bằng kháng thể đặc hiệu kép này. Tốt hơn là kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ tỷ lệ của các ái lực gắn kết

KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với VEGF)/KD (điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với ANG-2) là 1,0-10,0, tốt hơn là 1,5 -8,0 (theo một phương án 5,0-8,0) và kháng thể đặc hiệu kép này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8 như điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF, a) hoặc miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 52, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53 hoặc b) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 84, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 85 như điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai đã nêu gắn kết đặc hiệu với ANG-2.

Theo sáng chế, "kháng thể" đề cập tới protein gắn kết mà bao gồm các điểm gắn kết kháng nguyên. Các thuật ngữ "điểm gắn kết" hoặc "điểm gắn kết kháng nguyên" theo sáng chế đề cập đến (các) vùng của phân tử kháng thể mà phối tử gắn kết thực tế với. Thuật ngữ "điểm gắn kết kháng nguyên" bao gồm các miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi (VH) và/hoặc các miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL), hoặc các cặp VH/VL, và có thể được dẫn xuất từ các kháng thể nguyên hoặc các phần kháng thể như Fv chuỗi đơn, miền VH và/hoặc miền VL, Fab, hoặc (Fab)₂. Theo một phương án của sáng chế mỗi trong số các điểm gắn kết bao gồm miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi (VH) và/hoặc miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL), và tốt hơn là được tạo ra bằng một cặp gồm có miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL) và miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi (VH).

Điểm gắn kết kháng nguyên, và đặc biệt các miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và/hoặc các miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL), gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) có thể được dẫn xuất a) từ các kháng thể kháng VEGF đã biết như Kim et al., Nature 362 (1993) 841-844; Warren, R.S., et al., J. Clin. Invest. 95 (1995) 1789-1797; Borgstrom, P., et al., Cancer Res. 56 (1996) 4032-4039; Melnyk, O., et al., Cancer Res. 56 (1996) 921-924). WO 94/10202, WO 98/45332, WO 2005/00900, WO 00/35956 và US 2007/0141065 hoặc b) từ các kháng thể kháng VEGF mới thu được bằng cách phương pháp tạo miễn dịch de novo nhờ sử dụng hoặc protein VEGF người hoặc axit nucleic hoặc các phần của chúng hoặc bằng cách thể hiện thể thực khuẩn.

Điểm gắn kết kháng nguyên, và đặc biệt các miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và/hoặc các miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), gắn kết đặc hiệu với angiopoietin-2 người

(ANG-2) có thể được dẫn xuất a) từ các kháng thể kháng ANG-2 đã biết như WO 03/030833, WO 2006/068953, WO 2006/045049 hoặc US 6,166,185; hoặc b) từ các kháng thể kháng ANG-2 mới thu được, ví dụ bằng các phương pháp tạo miễn dịch de novo nhờ sử dụng hoặc protein ANG-2 người hoặc axit nucleic hoặc các phần của chúng hoặc bằng cách thể hiện thể thực khuẩn.

Tính đặc hiệu kháng thể đề cập tới sự chấp nhận chọn lọc của kháng thể đối với epitop đặc biệt của kháng nguyên. Các kháng thể tự nhiên là đặc hiệu đơn chẳng hạn.

“Các kháng thể đặc hiệu kép” theo sáng chế là các kháng thể có hai tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên khác nhau. Trong đó kháng thể có nhiều hơn một tính đặc hiệu, các epitop thừa nhận có thể liên kết với một kháng nguyên đơn hoặc với nhiều hơn một kháng nguyên. Các kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu đối với hai kháng nguyên khác nhau, tức là VEGF là kháng nguyên thứ nhất và ANG-2 là kháng nguyên thứ hai.

Thuật ngữ kháng thể “đặc hiệu đơn” theo sáng chế đề cập đến kháng thể có một hoặc nhiều điểm gắn kết mà mỗi điểm trong số đó gắn kết với cùng epitop của cùng kháng nguyên.

Thuật ngữ “hoá trị” như được sử dụng đề cập đến sự có mặt của tổng số các điểm gắn kết quy định trong phân tử kháng thể. Theo đó, các thuật ngữ “hoá trị hai”, “hoá trị bốn”, và “hoá trị sáu” lần lượt đề cập đến sự có mặt của hai điểm gắn kết, bốn điểm gắn kết, và sáu điểm gắn kết trong phân tử kháng thể. Các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế ít nhất là “hoá trị hai” và có thể là “hoá trị ba” hoặc “đa hoá trị” (ví dụ (“hoá trị bốn” hoặc “hoá trị sáu”). Tốt hơn là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có hoá trị hai, ba hoặc bốn. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị hai. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị ba. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị bốn.

Các kháng thể theo sáng chế có hai hoặc nhiều điểm gắn kết và là đặc hiệu kép. Tức là các kháng thể có thể là đặc hiệu kép ngay cả đối với trường hợp trong đó có nhiều hơn hai điểm gắn kết (tức là kháng thể đó có hoá trị ba hoặc đa hoá trị). Các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các kháng thể, các thể dia- và các thể tria- chuỗi đơn đa hoá trị, cũng như các kháng thể có cấu trúc miền không đổi của các kháng thể có độ dài đầy đủ mà các điểm gắn kết kháng nguyên khác (ví dụ Fv chuỗi đơn, miền VH và/hoặc miền VL, Fab, hoặc (Fab)₂) gắn kết với qua một hoặc

hiều liên kết peptit. Các kháng thể có độ dài đầy đủ từ loại đơn, hoặc được khảm hoá hoặc được làm tương thích với người. Đối với kháng thể có nhiều hơn hai điểm gắn kết kháng nguyên, thì một số điểm gắn kết có thể giống nhau, với điều kiện là protein có các điểm gắn kết đối với hai kháng nguyên khác nhau. Tức là, trong khi điểm gắn kết thứ nhất là đặc hiệu đối với VEGF thì điểm gắn kết thứ hai là đặc hiệu đối với ANG-2, và ngược lại.

Nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF/VEGF-A) (SEQ ID No: 105) được mô tả, ví dụ trong Leung, D.W., et al., Science 246 (1989) 1306-9; Keck, P.J., et al., Science 246 (1989) 1309-12 and Connolly, D.T., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 20017-24. VEGF có liên quan đến quá trình điều chỉnh sự hình thành mạch và quá trình tạo mạch mới bình thường và bất thường liên quan đến các khối u và các rối loạn trong mắt (Ferrara, N., et al., Endocr. Rev. 18 (1997) 4-25; Berkman, R.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 153-159; Brown, L.F., et al., Human Pathol. 26 (1995) 86-91; Brown, L.F., et al., Cancer Res. 53 (1993) 4727-4735; Mattern, J., et al., Brit. J. Cancer. 73 (1996) 931-934; và Dvorak, H., et al., Am. J. Pathol. 146 (1995) 1029-1039). VEGF là glycoprotein homodime được phân lập từ một vài nguồn. VEGF có hoạt tính phân bào đặc hiệu cao đối với các tế bào nội mô.

Angiopoietin-2 người (ANG-2) (theo cách khác được viết tắt là ANGPT2 hoặc ANG2) (SEQ ID No: 106) được mô tả trong Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 and Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Các angiopoietin-1 và -2 (ANG-1 (SEQ ID No: 107) và ANG-2 (SEQ ID No: 106)) được nhận biết như các phối tử đối với các Tie, họ của các tyrosin kinaza được biểu hiện một cách chọn lọc trong nội mô mạch. Yancopoulos, G.D., et al., Nature 407 (2000) 242-48. Hiện nay có bốn thành viên chính thức của họ angiopoietin. Angiopoietin-3 và -4 (Ang-3 và Ang-4) có thể là các đối tác phân kỳ rộng của locus gen tương tự ở chuột nhắt và người Kim, I., et al., FEBS Lett, 443 (1999) 353-56; Kim, I., et al., J Biol Chem 274 (1999) 26523-28. ANG-1 và ANG-2 có thể được bắt đầu nhận dạng trong các thử nghiệm nuôi cấy mô như chất chủ vận và chất đối kháng tương ứng (xem đối với ANG-1: Davis, S., et al., Cell 87 (1996) 1161-69; và đối với ANG-2: Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55- 60) Tất cả các angiopoietin gắn kết chủ yếu với

Tie2, và cả Ang-1 và -2 gắn kết với Tie2 với ái lực là 3 nM (Kd). Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60.

Điểm gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa sáu vùng xác định bổ trợ (CDRs) góp phần làm thay đổi các mức độ với ái lực của điểm gắn kết cho kháng nguyên. Có ba miền biến đổi chuỗi nặng CDR (CDRH1, CDRH2 và CDRH3) và ba miền biến đổi chuỗi nhẹ CDR (CDRL1, CDRL2 và CDRL3). Mức độ của CDR và các vùng khung (FRs) được xác định bằng cách so sánh với dữ liệu biên soạn về các trình tự axit amin trong đó các vùng đó được xác định theo tính biến đổi trong số các trình tự. Cũng nằm trong phạm vi sáng chế là các điểm gắn kết kháng nguyên chức bao gồm một vài CDR (tức là trong đó tính gắn kết đặc hiệu được xác định bằng ba, bốn hoặc năm CDR). Ví dụ, ít hơn một bộ đầy đủ gồm 6 CDR có thể có khả năng gắn kết. Trong một số trường hợp, miền VH hoặc VL sẽ đầy đủ.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế còn bao gồm các vùng globulin miễn dịch ổn định của một hoặc nhiều loại globulin miễn dịch. Các loại globulin miễn dịch bao gồm các isotyp IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE và, đối với trường hợp IgG và IgA, các kiểu phụ của chúng. Theo một phương án ưu tiên, kháng thể theo sáng chế có cấu trúc miền không đổi của kháng thể kiểu IgG, nhưng có bốn các điểm gắn kết kháng nguyên. Điều này đạt được bằng cách liên kết hai điểm gắn kết kháng nguyên hoàn toàn (ví dụ Fv chuỗi đơn) gắn kết đặc hiệu với EGFR với hoặc chuỗi nặng hoặc nhẹ đầu N hoặc C của kháng thể đầy đủ gắn kết đặc hiệu với IGF-1R. Theo cách khác điều này đạt được bằng cách dung hợp hai peptit gắn kết gắn kết đặc hiệu với ANG-2 với hoặc chuỗi nặng hoặc nhẹ đầu N hoặc C của kháng thể đầy đủ gắn kết đặc hiệu với VEGF. Tốt hơn là bốn điểm gắn kết kháng nguyên bao gồm hai điểm gắn kết cho từng tính đặc hiệu của hai tính đặc hiệu gắn kết khác nhau.

Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các phân tử kháng thể của hợp chất axit amin đơn.

Thuật ngữ "kháng thể dạng khảm" đề cập đến kháng thể bao gồm vùng biến đổi, tức là vùng gắn kết, từ một nguồn hoặc loài và ít nhất một phần của vùng bảo toàn thu được từ một nguồn hoặc loài khác, thường được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Các kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi chuột và vùng bảo toàn người

được ưu tiên đặc biệt. Các dạng được ưu tiên khác của “các kháng thể dạng khảm” nằm trong sáng chế là các loại trong đó vùng bảo toàn được cải biến hoặc thay đổi từ miền không đổi của kháng thể gốc để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt liên quan đến gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR). Các kháng thể dạng khảm này cũng được đề cập đến như “các kháng thể chuyển đổi nhóm”. Các kháng thể dạng khảm là sản phẩm của các gen globulin miễn dịch biểu hiện bao gồm các đoạn ADN mã hoá các vùng biến đổi globulin miễn dịch và các đoạn ADN mã hoá các vùng bảo toàn globulin miễn dịch. Các phương pháp để tạo ra các kháng thể dạng khảm bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển gen thông thường hiện đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ tài liệu Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244.

Thuật ngữ “kháng thể được làm tương thích với người” đề cập đến các kháng thể trong đó khung hoặc “các vùng xác định hỗ trợ” (CDR) được cải biến để bao gồm CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc. Theo một phương án được ưu tiên, CDR chuột được cấy ghép vào vùng khung của kháng thể người để tạo ra “kháng thể được làm tương thích với người.” Xem, ví dụ tài liệu Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Các CDR được ưu tiên đặc biệt tương ứng với các trình tự đại diện nhận dạng các kháng nguyên thể hiện ở trên đối với các kháng thể dạng khảm. Các dạng được ưu tiên khác của “các kháng thể được làm tương thích với người” nằm trong sáng chế là các loại trong đó miền không đổi được cải biến hoặc thay đổi thêm từ miền không đổi của kháng thể gốc để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt liên quan đến gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR).

Thuật ngữ “kháng thể người”, theo sáng chế, sẽ bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự người globulin miễn dịch dòng mầm. Các kháng thể người là đã biết rõ trong phần tình trạng kỹ thuật (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). Các kháng thể người cũng có thể được tạo ra ở động vật chuyển gen (ví dụ chuột) mà có khả năng, khi tạo đột biến, tạo ra kho vốn đầy đủ hoặc sự chọn lọc các kháng thể người không có quá trình tạo globulin miễn dịch nội sinh. Việc chuyển chuỗi gen globulin miễn dịch dòng

mầm người ở chuột đột biến dòng mầm này sẽ dẫn đến quá trình tạo ra các kháng thể người khi kích thích kháng nguyên (xem, ví dụ Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551- 2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Các kháng thể người cũng có thể được tạo ra ở các thư viện thể hiện thực khuẩn (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381- 388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Các kỹ thuật của Cole et al. and Boerner et al. cũng đang được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng người (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Như đã nêu trên đối với các kháng thể dạng khả hoặc được làm tương thích với người theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể người" theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể này được cải biến ở vùng bảo toàn để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt liên quan đến gắn kết C1q và/hoặc gắn kết FcR, ví dụ bằng cách “chuyển đổi nhóm” tức là làm thay đổi hoặc đột biến các phần Fc (ví dụ từ IgG1 thành IgG4 và/hoặc đột biến IgG1/IgG4.)

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", theo sáng chế, sẽ bao gồm tất cả các kháng thể người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, như các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ như tế bào NS0 hoặc hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ như chuột nhắt) được chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch người hoặc các kháng thể biểu hiện nhờ sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Các kháng thể người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi và ổn định dưới dạng sắp xếp lại. Các kháng thể người tái tổ hợp theo sáng chế được tạo siêu đột biến soma *in vivo*. Vì vậy, các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi thu được và liên quan đến các trình tự người dòng mầm VH và VL, có thể không tồn tại tự nhiên trong kho vốn dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Thuật ngữ "miền biến đổi" (miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)) theo sáng chế đề cập đến từng cặp các chuỗi nặng và nhẹ tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên. Các miền của các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của người có cấu trúc chung tương tự và mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) mà các trình tự của chúng được bảo toàn rộng rãi, liên kết bởi ba “vùng siêu

biến” (hoặc các vùng xác định hỗ trợ, các CDR). Các vùng khung chấp nhận cấu hình tám β - và các CDR có thể tạo ra các vòng nối với cấu trúc tám β . Các CDR ở mỗi chuỗi được giữ trong cấu trúc ba chiều của chúng bằng các vùng khung và cùng với các CDR của chuỗi khác tạo ra điểm gắn kết kháng nguyên. Các vùng chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể CDR3 đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong tính đặc hiệu/ái lực gắn kết của các kháng thể theo sáng chế và vì vậy tạo ra mục đích khác nữa của sáng chế.

Các thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể" theo sáng chế đề cập đến các gốc axit amin của kháng thể mà có thể tạo ra gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm các gốc axit amin từ "các vùng xác định hỗ trợ" hoặc "các CDR". Các vùng "khung" hoặc "FR" là các vùng miền biến đổi ngoài các gốc vùng siêu biến như được xác định ở đây. Vì vậy, các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 có các đầu N đến C. Các CDR trên mỗi chuỗi được tách bằng các axit amin khung này. Đặc biệt, CDR3 của chuỗi nặng là vùng góp phần nhiều nhất vào gắn kết kháng nguyên. Các vùng CDR và FR được xác định theo cách xác định chuẩn của Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Ngoài ra, các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế còn bao gồm các kháng thể này có “các cải biến trình tự bảo toàn” (nó có nghĩa là bằng “các thể cải biến” của các kháng thể đặc hiệu kép). Điều này có nghĩa là các cải biến trình tự nucleotit và axit amin không tác động hoặc làm biến đổi các đặc tính nêu trên của kháng thể theo sáng chế. Các cải biến có thể được đưa vào bằng cách kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như gây đột biến định hướng điểm và gây đột biến nhờ PCR. Các thay thế axit amin bảo toàn bao gồm các thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các họ của các gốc axit amin có chuỗi bên tương tự được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật. Các họ đó bao gồm các axit amin có các chuỗi bên bazơ (ví dụ lysin, arginin, histidin), các chuỗi bên axit (ví dụ axit aspartic, axit glutamic), các chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), các chuỗi bên không phân cực (ví dụ alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), các chuỗi bên nhánh

beta (ví dụ threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi bên thơm (ví dụ tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Vì vậy, gốc axit amin không cơ bản dự đoán trong kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> tốt hơn là có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác từ họ chuỗi bên tương tự. Vì vậy, ở đây kháng thể đặc hiệu kép “biến thể” <VEGF-ANG-2> đề cập tới phân tử khác trong trình tự axit amin từ trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kép “gốc” <VEGF-ANG-2> bởi tới mười, tốt hơn là khoảng từ hai đến năm, xen đoạn, khuyết đoạn và/hoặc thay thế ở một hoặc nhiều vùng biến đổi hoặc vùng bảo toàn của kháng thể gốc. Các thay thế axit amin có thể được thực hiện bằng cách gây đột biến dựa vào mô hình hoá phân tử như được mô tả bởi Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 and Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033. Kháng thể đặc hiệu kép “biến thể” <VEGF-ANG-2> theo sáng chế còn bao gồm các định dạng kháng thể đặc hiệu kép trong đó liên kết (nếu tồn tại) được cải biến hoặc thay thế bằng liên kết khác.

Theo sáng chế, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết một cách đặc hiệu với" đề cập đến gắn kết của kháng thể với epitop của kháng nguyên (hoặc VEGF người hoặc ANG-2 người) trong thử nghiệm *in vitro*, tốt hơn là trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon (Biacore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) (Ví dụ 2) với kháng nguyên kiểu đại tinh khiết. Ái lực gắn kết được xác định bằng thuật ngữ k_a (hằng số tốc độ để kết hợp của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên), k_D (hằng số phân ly), và K_D (k_D/k_a). Gắn kết hoặc gắn kết đặc hiệu có nghĩa là ái lực gắn kết (K_D) là 10^{-8} mol/l hoặc thấp hơn, tốt hơn 10^{-9} M đến 10^{-13} M.

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

Theo sáng chế, thuật ngữ “không gắn kết với ANG-1” hoặc “không gắn kết đặc hiệu với ANG-1” đề cập đến kháng thể có giá trị EC50-cao hơn 8000 ng/ml trong thử nghiệm ELISA gắn kết ANG-1 *in vitro* (theo Ví dụ 9).

Thuật ngữ "epitop" bao gồm yếu tố xác định polypeptit bất kỳ nào có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Theo một số phương án, yếu tố xác định epitop bao gồm các nhóm phân tử hoạt động bề mặt hoá học như các axit amin, các chuỗi đường

bên, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có đặc tính cấu trúc ba chiều đặc trưng, và hoặc các đặc tính tích điện đặc hiệu. Epitop là một vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi kháng thể.

Theo một số phương án, kháng thể đã nêu gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khi nó nhận dạng một cách tốt hơn kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức chất gồm các protein và/hoặc các đại phân tử.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm kháng thể gốc có độ dài đầy đủ làm khung.

Thuật ngữ “kháng thể có độ dài đầy đủ” đề cập đến kháng thể gồm có hai “chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ” và hai “chuỗi nhẹ kháng thể có độ dài đầy đủ”. “Chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ” là polypeptit gồm có định hướng từ đầu N đến đầu C của miền kháng thể biến đổi chuỗi nặng (VH), miền kháng thể không đổi chuỗi nặng 1 (CH1), vùng bản lề kháng thể (HR), miền kháng thể không đổi chuỗi nặng 2 (CH2), và miền kháng thể không đổi chuỗi nặng 3 (CH3), được viết tắt là VH-CH1-HR-CH2-CH3; và tùy ý miền kháng thể không đổi chuỗi nặng 4 (CH4) trong trường hợp kháng thể thuộc kiểu phụ IgE. Tốt hơn nếu “chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ” là polypeptit gồm có định hướng từ đầu N đến đầu C của VH, CH1, HR, CH2 và CH3. “Chuỗi nhẹ kháng thể có độ dài đầy đủ” là polypeptit gồm có định hướng từ đầu N đến đầu C của miền kháng thể biến đổi chuỗi nhẹ (VL), và miền kháng thể không đổi chuỗi nhẹ (CL), được viết tắt là VL-CL. Miền kháng thể không đổi chuỗi nhẹ (CL) có thể là κ (kappa) hoặc λ (lambda). Hai chuỗi kháng thể có độ dài đầy đủ cùng nhau liên kết qua giữa các liên kết polypeptit disulfua trong miền CL và miền CH1 và trong các vùng bản lề của các chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ. Các ví dụ về các kháng thể có độ dài đầy đủ thông thường là các kháng thể tự nhiên như IgG (ví dụ IgG 1 và IgG2), IgM, IgA, IgD, và IgE. Các kháng thể có độ dài đầy đủ theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ loài đơn, ví dụ người, hoặc chúng có thể được khám hoá hoặc các kháng thể được làm tương thích với người. Các kháng thể có độ dài đầy đủ theo sáng chế bao gồm hai điểm gắn kết kháng nguyên mà mỗi điểm được tạo ra bởi một cặp VH và VL, cả hai gắn kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên. Vì vậy, kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai (= độ dài đầy đủ) bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất và gồm có hai chuỗi nhẹ kháng thể và hai chuỗi nặng kháng thể là

kháng thể có độ dài đầy đủ. Đầu C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này đề cập đến axit amin cuối cùng tại đầu C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ này. Đầu N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này đề cập đến cuối cùng axit amin tại đầu N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ này.

Phương án ưu tiên đối với các định dạng kháng thể đặc hiệu kép đối với kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) theo sáng chế là các kháng thể hoá trị hai với hai tính đặc hiệu khác nhau như ví dụ a) được mô tả trong WO 2009/080251, WO 2009/080252 hoặc WO 2009/080253 (các kháng thể trao đổi miễn - xem Ví dụ 13) hoặc b) dựa vào kháng thể dung hợp scFab-Fc trong đó một phần Fab chuỗi đơn (cuối cùng là làm ổn định bằng disulfua) đặc hiệu đối với VEGF và phần Fab chuỗi đơn khác (cuối cùng là làm ổn định bằng disulfua) đối với ANG-2 (xem Ví dụ 14) hoặc c) được mô tả trong Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; WO 96/027011; Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35 và EP 1 870 459A1.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123 và SEQ ID NO: 124 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127 và SEQ ID NO: 128 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin of SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131 và SEQ ID NO: 132 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 133, và SEQ ID NO: 134 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin of SEQ ID NO: 135, và SEQ ID NO: 136 hoặc các thể cải biến của chúng.

Các trình tự axit amin gốc từ các miền biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 7, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 8 (dẫn xuất từ bevacizumab (Avastin)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với VEGF, và từ các miền biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 52, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 53 (dẫn xuất từ Ang2i_LC06)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với ANG-2.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị ba nhờ các định dạng gốc từ kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với một trong hai kháng nguyên VEGF hoặc ANG-2, mà với nó chỉ tại đầu C của chuỗi nặng phần scFab được dung hợp gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên kia trong hai kháng nguyên VEGF hoặc ANG-2, bao gồm kỹ thuật các mẫu-thành-các lỗ, như được mô tả, ví dụ trong EP Appl. No 09004909.9 (xem Ví dụ 11) hoặc ví dụ các dạng dựa vào kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với một trong hai kháng nguyên VEGF hoặc ANG-2, mà với nó tại một đầu C của chuỗi nặng phần VH hoặc VH-CH1 và tại đầu C khác của chuỗi nặng thứ hai phần VL hoặc VL-CL được dung hợp gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên kia trong hai kháng nguyên VEGF hoặc ANG-2, bao gồm kỹ thuật các mẫu-thành-các lỗ như được mô tả, ví dụ trong EP Appl. No 09005108.7. (xem Ví dụ 12)

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, và SEQ ID NO: 117 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, và SEQ ID NO: 120 hoặc các thể cải biến của chúng.

Các trình tự axit amin gốc từ các miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8 (dẫn xuất từ bevacizumab (Avastin)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với VEGF, và gốc từ các miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 52, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53 (dẫn xuất từ Ang2i_LC06)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với ANG-2.

Các định dạng kháng thể đặc hiệu kép đối với kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) theo sáng chế là các kháng thể hoá trị bốn (TvAb) với hai đặc tính khác nhau

như được mô tả, ví dụ trong WO 2007/024715, hoặc WO 2007/109254 hoặc EP Appl. No 09004909.9. Vì vậy, theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị bốn nhờ các định dạng như được mô tả, ví dụ trong WO 2007/024715, hoặc WO 2007/109254 hoặc EP Appl. No 09004909.9 (xem các Ví dụ 1 hoặc 10).

Theo một phương án của sáng chế the kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb-2441-bevacizumab-LC06 khác biệt ở chỗ bao gồm peptit của SEQ ID No: 102 và chuỗi nhẹ của SEQ ID No: 62 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 109, và SEQ ID NO: 110 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 111, và SEQ ID NO: 112 hoặc các thể cải biến của chúng.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm như các trình tự axit amin SEQ ID NO: 113, và SEQ ID NO: 114 hoặc các thể cải biến của chúng.

Các trình tự axit amin gốc từ các miền biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 7, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8 (dẫn xuất từ bevacizumab (Avastin)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với VEGF, và từ các miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 52, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53 (dẫn xuất từ Ang2i_LC06)) như điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với ANG-2.

Theo một phương án của sáng chế kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb-2441-bevacizumab-LC08 khác biệt ở chỗ bao gồm peptit của SEQ ID No: 103 và chuỗi nhẹ của SEQ ID No: 62 hoặc các thể cải biến của chúng.

Các điểm gắn kết trong kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bởi từng cặp của hai cặp miền biến đổi, tức là của một miền biến đổi chuỗi nặng và một miền biến đổi chuỗi nhẹ. Yếu tố xác định điểm gắn kết tối thiểu trong kháng thể là vùng chuỗi nặng CDR3.

Theo một phương án kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có hoá trị bốn. Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn này có các đặc tính dưới đây:

- kháng thể này bao gồm:

a) kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ và hai chuỗi nhẹ kháng thể có độ dài đầy đủ nhờ đó mỗi chuỗi chỉ bao gồm một miền biến đổi,

b) hai liên kết peptit, và

c) hai kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu đơn hoá trị một, mỗi chuỗi gồm có miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi, miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi, và liên kết chuỗi đơn giữa miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi này và miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi này;

và tốt hơn là các kháng thể chuỗi đơn được liên kết với cùng đầu (đầu C và N) của các chuỗi nặng kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai hoặc, theo cách khác với cùng đầu C) của các chuỗi nhẹ kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai, và tốt hơn nữa là với cùng đầu (đầu C và N) của các chuỗi nặng kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai

Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị bốn, và gồm có

a) kháng thể có độ dài đầy đủ bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên này và gồm có hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể; và

b) hai phần chuỗi đơn giống nhau Fab bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này,

trong đó các phần chuỗi đơn Fab này theo b) được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ này theo a) qua liên kết peptit tại đầu C hoặc N của chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một phương án khác kháng thể đặc hiệu kép này có hoá trị bốn, và gồm có:

a) kháng thể có độ dài đầy đủ bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này và gồm có hai kháng thể chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ kháng thể; và

b) hai phần chuỗi đơn giống nhau Fab bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này,

trong đó các phần chuỗi đơn Fab này theo b) được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ này theo a) qua liên kết peptit tại đầu C hoặc N của chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Tốt hơn là các phần chuỗi đơn Fab này theo b) được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ này theo a) qua liên kết peptit tại đầu C của chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một phương án, hai phần chuỗi đơn giống nhau Fab gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ này qua liên kết peptit tại đầu C của mỗi chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một phương án, hai phần chuỗi đơn giống nhau Fab gắn kết với kháng nguyên thứ hai được ngưng tụ với kháng thể có độ dài đầy đủ này qua liên kết peptit tại đầu C của mỗi chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một phương án, hai phần chuỗi đơn giống nhau Fab gắn kết với kháng nguyên thứ hai được ngưng tụ với kháng thể có độ dài đầy đủ này qua liên kết peptit tại đầu C của mỗi chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Các phương án này bao gồm các phần chuỗi đơn Fab được mô tả chi tiết trong ví dụ EP Appl. No 09004909.9, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ “liên kết peptit” như được sử dụng trong sáng chế đề cập đến peptit với các trình tự axit amin, tốt hơn nó có nguồn gốc tổng hợp. Các liên kết peptit theo sáng chế được sử dụng để liên kết các điểm gắn kết kháng nguyên và/hoặc các phần kháng thể khác nhau cuối cùng bao gồm các điểm gắn kết kháng nguyên khác nhau (ví dụ Fv chuỗi đơn, các kháng thể có độ dài đầy đủ, miền VH và/hoặc miền VL, phần Fab, (Fab)₂, Fc) cùng nhau tạo ra kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế. Các liên kết peptit có thể bao gồm một hoặc nhiều gồm trình tự axit amin dưới đây liệt kê trong Bảng 1 cũng như các axit amin lựa chọn tùy ý khác. Các liên kết peptit này là các peptit với trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 5 axit amin, tốt hơn ít nhất là 10 axit amin, tốt hơn nữa là có độ dài giữa 10 và 50 axit amin. Tốt hơn nếu các liên kết peptit này theo b) là các peptit với trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 10 axit amin. Theo một phương án, liên kết peptit này là (GxS)_n với G = glyxin, S = serin, (x = 3 và n = 3, 4, 5 hoặc 6) hoặc (x = 4 và n = 2, 3, 4 hoặc 5), tốt hơn nếu x = 4 và n = 2 hoặc 3, tốt hơn

nữa nếu $x = 4$, $n = 2$ $((G_4S)_2)$. G = các glyxin cũng được thêm vào liên kết peptit $(GxS)_n$ đã nêu, ví dụ GG, hoặc GGG.

Thuật ngữ “liên kết chuỗi đơn” theo trong sáng chế đề cập đến peptit với các trình tự axit amin, tốt hơn nếu nó có nguồn gốc tổng hợp. Các liên kết chuỗi đơn theo sáng chế được sử dụng để liên kết miền VH và VL nhằm tạo ra Fv chuỗi đơn. Tốt hơn nếu liên kết chuỗi đơn đã nêu theo c) là peptit với trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 15 các axit amin, tốt hơn nữa nếu có độ dài ít nhất là 20 axit amin. Theo một phương án, liên kết chuỗi đơn đã nêu là $(GxS)_n$ với G = glyxin, S = serin, ($x = 3$ và $n = 4, 5$ hoặc 6) hoặc ($x = 4$ và $n = 3, 4$ hoặc 5), tốt hơn nếu với $x = 4$, $n = 4$ hoặc 5, tốt hơn nữa nếu với $x = 4$, $n = 4$.

Ngoài ra, tốt hơn nếu các kháng thể chuỗi đơn đã nêu (Fv chuỗi đơn) được làm ổn định bằng disulfua. Quá trình làm ổn định bằng disulfua khác của các kháng thể chuỗi đơn đạt được bằng cách đưa liên kết disulfua giữa các miền biến đổi của các kháng thể chuỗi đơn và được mô tả, ví dụ trong WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. 10 (12) (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology 25 (1998) 387-393; hoặc Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711 -1721.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể chuỗi đơn được làm ổn định bằng disulfua (Fv chuỗi đơn), liên kết disulfua giữa các miền biến đổi của các kháng thể chuỗi đơn bao gồm trong kháng thể theo sáng chế là độc lập đối với mỗi kháng thể chuỗi đơn được chọn từ:

- i) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 44 đến vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100,
- ii) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 105 đến vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 43, hoặc
- iii) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 101 đến vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100.

Theo một phương án, liên kết disulfua giữa các miền biến đổi gồm các kháng thể chuỗi đơn bao gồm trong kháng thể theo sáng chế nằm giữa vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 44 và vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100.

Theo một phương án, liên kết disulfua giữa các miền biến đổi gồm các kháng thể chuỗi đơn bao gồm trong kháng thể theo sáng chế nằm giữa vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 105 và vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 43.

Cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép của phương án hoá trị bốn này theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với VEGF và ANG-2, trong đó một trong các Kháng nguyên A hoặc B là VEGF, trong khi kháng nguyên còn lại là ANG-2. Cấu trúc dựa vào kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết với kháng nguyên A, mà hai Fv chuỗi đơn (được làm ổn định tùy ý bằng disulfua) gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên B, được liên kết với nó qua một liên kết peptit được minh họa trong các sơ đồ của các Fig.1 và 2.

Theo một phương án, các kháng thể chuỗi đơn này (Fv chuỗi đơn) không làm ổn định tùy ý bằng disulfua trong các miền biến đổi VH và VL của kháng thể chuỗi đơn kháng thể (Fv chuỗi đơn) là được ưu tiên.

Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn này khác biệt ở chỗ phần kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai đã nêu theo a) gắn kết đặc hiệu với VEGF và hai kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu đơn hoá trị một đã nêu theo c) gắn kết với ANG-2.

Theo một phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn này khác biệt ở chỗ phần kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị hai theo a) gắn kết đặc hiệu với ANG-2 và hai kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu đơn hoá trị một đã nêu theo c) gắn kết với VEGF.

“Phần chuỗi đơn Fab” (xem Fig.11) là polypeptit gồm có miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi (VH), miền kháng thể không đổi 1 (CH1), miền kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL), miền kháng thể chuỗi nhẹ không đổi (CL) và một liên kết, trong đó các miền kháng thể này và liên kết đã nêu có một trong các thứ tự dưới đây theo hướng đầu N đến đầu C:

a) VH-CH1-liên kết-VL-CL, b) VL-CL-liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-liên kết-VL-CH1 hoặc d) VL-CH1-liên kết-VH-CL; và trong đó liên kết đã nêu là polypeptit có ít nhất 30 axit amin, tốt hơn là giữa 32 và 50 axit amin. Các phần chuỗi đơn Fab đã nêu a) VH-CH1-liên kết-VL-CL, b) VL-CL-liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-liên kết-VL-CH1 và d) VL-CH1-liên kết-VH-CL, được làm ổn định bằng liên kết disulfua tự nhiên giữa miền CL và miền CH1. Thuật ngữ “đầu N-” đề cập đến axit amin cuối cùng có đầu N-. Thuật ngữ “đầu C-” đề cập đến axit amin cuối cùng có đầu C-.

Theo một phương án ưu tiên, các miền kháng thể này và liên kết đã nêu trong phần chuỗi đơn Fab có một trong các thứ tự dưới đây theo hướng đầu N đến đầu C:

a) VH-CH1-liên kết-VL-CL, hoặc b) VL-CL-liên kết-VH-CH1, tốt hơn nữa là VL-CL-liên kết-VH-CH1.

Theo một phương án ưu tiên khác, các miền kháng thể này và liên kết đã nêu trong phần chuỗi đơn Fab này có một trong các thứ tự dưới đây theo hướng đầu N đến đầu C:

a) VH-CL-liên kết-VL-CH1 hoặc b) VL-CH1-liên kết-VH-CL.

Thuật ngữ “liên kết peptit” như được sử dụng trong sáng chế đề cập đến peptit với các trình tự axit amin, tốt hơn nếu nó có nguồn gốc tổng hợp. Các liên kết peptit theo sáng chế được sử dụng để dung hợp các phần chuỗi đơn Fab với đầu C- hoặc N- của kháng thể có độ dài đầy đủ nhằm tạo ra kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế. Tốt hơn nếu các liên kết peptit này theo b) là các peptit với trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 5 axit amin, tốt hơn nếu có độ dài từ 5 đến 100, tốt hơn nữa nếu là từ 10 đến 50 axit amin. Theo một phương án, liên kết peptit này là $(GxS)_n$ hoặc $(GxS)_nG_m$ với G = glyxin, S = serin, và $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ hoặc } 6, \text{ và } m = 0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$ hoặc $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ hoặc } 5 \text{ và } m = 0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$, tốt hơn nếu $x = 4$ và $n = 2$ hoặc 3, tốt hơn nữa nếu với $x = 4, n = 2$. Theo một phương án, liên kết peptit này là $(G_4S)_2$.

Thuật ngữ “liên kết” như được sử dụng trong sáng chế đề cập đến peptit với các trình tự axit amin, tốt hơn nếu nó có nguồn gốc tổng hợp. Các peptit theo sáng chế được sử dụng để liên kết a) VH-CH1 với VL-CL, b) VL-CL với VH-CH1, c) VH-CL với VL-CH1 hoặc d) VL-CH1 với VH-CL để tạo ra các phần chuỗi đơn Fab dưới đây theo sáng chế a) VH-CH1-liên kết-VL-CL, b) VL-CL-liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-liên kết-VL-CH1 hoặc d) VL-CH1-liên kết-VH-CL. Liên kết đã nêu trong các phần chuỗi đơn Fab là peptit với trình tự axit amin có độ dài ít nhất là 30 axit amin, tốt hơn nếu có độ dài từ 32 đến 50 axit amin. Theo một phương án, liên kết đã nêu là $(GxS)_n$ với G = glyxin, S = serin, $(x = 3, n = 8, 9 \text{ hoặc } 10 \text{ và } m = 0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$ hoặc $(x = 4 \text{ và } n = 6, 7 \text{ hoặc } 8 \text{ và } m = 0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$, tốt hơn nếu với $x = 4, n = 6$ hoặc 7 và $m = 0, 1, 2$ hoặc 3, tốt hơn nữa nếu với $x = 4, n = 7$ và $m = 2$. Theo một phương án, liên kết đã nêu là $(G_4S)_6G_2$.

Tuỳ ý trong phần chuỗi đơn Fab đã nêu, ngoài liên kết disulfua tự nhiên giữa miền CL và miền CH1, còn có miền kháng thể chuỗi nặng biến đổi (VH) và miền

kháng thể chuỗi nhẹ biến đổi (VL) được làm ổn định nhờ disulfua bằng cách đưa liên kết disulfua vào giữa các vị trí dưới đây:

- i) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 44 tới vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100,
- ii) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 105 tới vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 43, hoặc
- iii) vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 101 đến vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100 (luôn đánh số theo danh mục EU của Kabat).

Quá trình làm ổn định các phần chuỗi đơn Fab nhờ disulfua khác này đạt được bằng cách đưa liên kết disulfua vào giữa các miền biến đổi VH và VL của các phần chuỗi đơn Fab. Các kỹ thuật đưa các cầu disulfua không tự nhiên để làm ổn định cho chuỗi đơn Fv được mô tả, ví dụ trong WO 94/029350, Rajagopal, V., et al, Prot. Engin. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al; Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; hoặc Schmidt, M., et al, Oncogen (1999) 18, 1711 -1721. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa các miền biến đổi của các phần chuỗi đơn Fab bao gồm trong kháng thể theo sáng chế nằm giữa vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 44 và vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 100. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa các miền biến đổi của các phần chuỗi đơn Fab bao gồm trong kháng thể theo sáng chế nằm giữa vị trí miền biến đổi chuỗi nặng 105 và vị trí miền biến đổi chuỗi nhẹ 43 (luôn đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án, phần chuỗi đơn Fab không có quá trình làm ổn định bằng disulfua tùy ý giữa các miền biến đổi VH và VL của các phần chuỗi đơn Fab được ưu tiên.

Tốt hơn theo phương án thứ hai đã nêu, kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn theo sáng chế bao gồm hai phần chuỗi đơn Fab giống nhau (tốt hơn là VL-CL-liên kết-VH-CH1) mà cả hai được dung hợp với hai đầu C- của hai chuỗi nặng hoặc với hai đầu C- của hai chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này theo a). Quá trình dung hợp này tạo ra hai peptit dung hợp giống nhau (hoặc i) phần chuỗi đơn và chuỗi nặng Fab hoặc ii) phần chuỗi đơn và chuỗi nhẹ Fab) được đồng biểu hiện với hoặc i) chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ vùng bảo toàn có nguồn gốc từ người.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ vùng bảo toàn của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là của kiểu phụ IgG1 người hoặc kiểu phụ IgG1 người với các đột biến L234A và L235A.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ vùng bảo toàn của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là của kiểu phụ IgG2 người.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ vùng bảo toàn của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là của kiểu phụ IgG3 người.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép này khác biệt ở chỗ vùng bảo toàn của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là của kiểu phụ IgG4 người hoặc, kiểu phụ IgG4 với đột biến khác S228P.

Hiện nay đã phát hiện ra rằng các kháng thể đặc hiệu kép kháng VEGF người và ANG-2 người theo sáng chế có đặc tính được cải thiện như hoạt tính sinh học hoặc dược lý, các đặc tính dược động lực hoặc đặc tính độc. Chúng có hiệu quả ức chế sự phát triển khối u *in vivo* tăng và/hoặc ức chế sự hình thành mạch khối u nếu so với các kháng thể gốc đặc hiệu đơn kháng VEGF và ANG-2 (xem các Ví dụ 16, 17 và 18: so sánh các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau <VEGF-ANG-2> bevacizumab-ANG2i-LC06 với chỉ riêng các kháng thể đặc hiệu đơn Avastin (bevacicimab), chỉ riêng ANG2i-LC06, hoặc kết hợp cả hai).

Ngoài ra các tác dụng phụ độc ít hơn (nó được phản ánh ở trọng lượng cơ thể của động vật thử nghiệm được cải thiện cũng như tỷ lệ động vật chết ít hơn trong quá trình ứng dụng *in vivo*) so với ứng dụng kết hợp hai kháng thể đặc hiệu đơn riêng biệt tương ứng kháng VEGF và ANG-2 cũng có lợi thế của các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế.

Ngoài ra, các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế này có thể tạo ra các lợi ích như giảm liều và/hoặc tần xuất sử dụng và đồng thời tiết kiệm chi phí.

Thuật ngữ “vùng bảo toàn” như được sử dụng trong các ứng dụng hiện nay đề cập đến tổng số các miền của kháng thể ngoài vùng biến đổi. Vùng bảo toàn không tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể, nhưng có các chức năng tác động khác nhau. Tuy

thuộc vào trình tự axit amin của vùng bảo toàn của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể được chia thành các loại: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài loại trong số đó có thể được chia thành các kiểu phụ, như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA1 và IgA2. Các vùng bảo toàn chuỗi nặng tương ứng với các loại khác nhau của các kháng thể được lần lượt gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ . Các vùng bảo toàn chuỗi nhẹ có thể được thấy trong tất cả năm loại kháng thể được gọi là κ (kappa) và λ (lambda).

Thuật ngữ “vùng bảo toàn có nguồn gốc người” như được sử dụng trong ứng dụng hiện nay đề cập đến vùng bảo toàn chuỗi nặng của kháng thể người thuộc kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 và/hoặc vùng bảo toàn chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Các vùng bảo toàn này là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả bởi Kabat, E.A., (xem ví dụ Johnson, G. and Wu, T.T., *Axit nucleics Res.* 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788).

Trong khi các kháng thể thuộc kiểu phụ IgG4 có gắn kết thụ thể Fc giảm (FcγRIIIa), các kháng thể thuộc kiểu phụ IgG khác có gắn kết mạnh. Tuy nhiên Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (suy giảm carbohydrat Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, và His435 là các gốc, nếu nó được biến đổi, cũng tạo ra gắn kết thụ thể Fc giảm (Shields, R., L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có gắn kết FcR giảm so với kháng thể IgG1 và kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (độ dài đầy đủ) với gắn kết FcR thuộc kiểu phụ IgG4 hoặc thuộc kiểu phụ IgG1 hoặc IgG2 với đột biến ở S228, L234, L235 và/hoặc D265, và/hoặc chứa đột biến PVA236. Theo một phương án, các đột biến ở kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là S228P, L234A, L235A, L235E và/hoặc PVA236. Theo một phương án khác, các đột biến ở kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là ở IgG4 S228P và ở IgG1 L234A và L235A. Các vùng chuỗi nặng không đổi được thể hiện ở SEQ ID NO:35 và 36. Theo một phương án, vùng chuỗi nặng không đổi của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là của SEQ ID NO: 35 với các đột biến L234A và L235A. Theo một phương án khác, vùng chuỗi nặng không đổi của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là của SEQ ID NO: 36 với đột biến S228P. Theo một phương

án khác, vùng chuỗi nhẹ không đổi của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là vùng chuỗi nhẹ kappa của SEQ ID NO: 37 hoặc vùng chuỗi nhẹ lambda của SEQ ID NO: 34. Tốt hơn là vùng chuỗi nặng không đổi của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (có độ dài đầy đủ) là của SEQ ID NO: 35 hoặc của SEQ ID NO: 36 với đột biến S228P.

Vùng bảo toàn của kháng thể trực tiếp liên quan đến ADCC (tính gây độc tế bào do tế bào tạo ra phụ thuộc kháng thể) và CDC (tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể). Quá trình hoạt hoá bổ thể (CDC) được kích thích bằng gắn kết của nhân tố bổ thể C1q với vùng bảo toàn của phần lớn các kiểu phụ kháng thể IgG. Gắn kết của C1q với kháng thể được tạo ra bởi các tương tác protein-protein xác định tại điểm gắn kết. Các điểm gắn kết vùng bảo toàn này là đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả, ví dụ bởi Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434. Các điểm gắn kết vùng bảo toàn này, ví dụ khác biệt bởi các axit amin L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)” đề cập sự phân giải của các tế bào đích người bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của các tế bào tác động. Tốt hơn là ADCC được xác định nhờ xử lý chế phẩm chứa các tế bào biểu hiện CCR5 bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của các tế bào tác động như PBMC mới được phân lập hoặc các tế bào tác động tinh chế từ các lớp đệm, tương tự các bạch cầu đơn nhân to hoặc các tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc dòng tế bào sinh trưởng ổn định NK.

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)” đề cập đến quy trình được kích thích bởi sự gắn kết của nhân tố bổ thể C1q với phần Fc của phần lớn các kiểu phụ kháng thể IgG. Gắn kết của C1q với kháng thể được tạo ra bởi các tương tác protein-protein đã xác định tại điểm gắn kết. Các điểm gắn kết phần Fc này là đã biết trong tình trạng kỹ thuật (xem ở trên). Các điểm gắn kết phần Fc này, ví dụ khác biệt bởi các axit amin L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, và P329 (đánh

số theo chỉ số EU của Kabat). Các kháng thể thuộc kiểu phụ IgG1, IgG2, và IgG3 thường thể hiện quá trình hoạt hoá bổ thể bao gồm gắn kết C1q và C3, trong khi IgG4 không hoạt hoá hệ bổ thể và không gắn kết với C1q và/hoặc C3.

Kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Vì vậy, một khía cạnh của sáng chế này là axit nucleic mã hoá kháng thể theo sáng chế và khía cạnh khác là tế bào bao gồm axit nucleic đã nêu mã hoá kháng thể theo sáng chế. Các phương pháp để sản sinh tái tổ hợp được biết rộng rãi trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm biểu hiện protein trong các tế bào không nhân và có nhân điển hình với quá trình phân lập tiếp theo kháng thể và thường là quá trình tinh chế tới độ tinh khiết được dụng. Để biểu hiện các kháng thể như nêu trên ở tế bào chủ, các axit nucleic mã hoá các chuỗi nặng và nhẹ đã cải biến tương ứng được xen đoạn vào các vectơ biểu hiện bằng các phương pháp chuẩn. Quá trình biểu hiện được thực hiện ở các tế bào chủ không nhân và có nhân điển hình thích hợp như các tế bào CHO, các tế bào NS0, các tế bào SP2/0, các tế bào HEK293, các tế bào COS, các tế bào PER.C6, nấm men, hoặc các tế bào E.coli, và kháng thể được thu hồi từ các tế bào (dịch nổi hoặc các tế bào sau khi phân giải). Các phương pháp chung để sản sinh tái tổ hợp các kháng thể là đã biết rõ trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả, ví dụ, trong các bài báo của Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

Các kháng thể đặc hiệu kép được tách một cách thích hợp từ môi trường nuôi cấy bằng các phương pháp tinh chế globulin miễn dịch thông thường, ví dụ như protein A-Sepharosa, phép sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc phép sắc ký ái lực. ADN hoặc ARN mã hoá các kháng thể đơn dòng được phân lập và tạo trình tự dễ dàng nhờ sử dụng các phương pháp thông thường. Các tế bào lai có thể được sử dụng làm nguồn của ADN hoặc ARN này. Khi phân lập, ADN có thể được xen đoạn vào các vectơ biểu hiện, sau đó nó được chuyển nhiễm vào các tế bào chủ như các tế bào HEK 293, các tế bào CHO, hoặc các tế bào u tủy mà theo cách khác không tạo ra protein globulin miễn dịch, để thu được các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp tổng hợp trong các tế bào chủ.

Các thể cải biến trình tự axit amin (hoặc thể đột biến) của kháng thể đặc hiệu kép, hoá trị hai được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào kháng thể ADN, hoặc bằng cách tổng hợp nucleotit. Các cải biến này có thể được tiến hành, tuy nhiên, chỉ trong giới hạn rất hạn chế, ví dụ như được mô tả ở trên. Ví dụ, các cải biến không làm thay đổi các đặc tính của kháng thể đã nêu trên như isotyp IgG và gắn kết kháng nguyên, nhưng có thể cải thiện hiệu suất của quá trình sản xuất tái tổ hợp, tính ổn định của protein hoặc tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế.

Thuật ngữ “tế bào chủ” như được sử dụng trong sáng chế này đề cập đến loại bất kỳ của hệ tế bào mà có thể được biến đổi di truyền để tạo ra các kháng thể theo sáng chế này. Theo một phương án, các tế bào HEK293 và các tế bào CHO được sử dụng làm các tế bào chủ. Theo sáng chế, các từ ngữ “tế bào,” “dòng tế bào,” và “dịch nuôi cấy tế bào” có thể được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các chỉ định này bao gồm thể hệ con. Vì vậy, các từ “các thể biến nạp” và “các tế bào biến nạp” bao gồm tế bào sơ cấp đích và các dịch nuôi cấy thu được từ đó mà không quan tâm đến số lần cấy. Cũng cần hiểu rằng tất cả các thể hệ con không thể giống nhau hoàn toàn về lượng ADN, do các đột biến có ý hoặc vô ý. Thể hệ con biến dị có chức năng tương tự hoặc hoạt tính sinh học tương tự khi được sàng lọc để nằm trong tế bào biến nạp gốc được tính đến.

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

Các trình tự kiểm tra thích hợp cho các sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ bao gồm gen khởi đầu, tùy ý trình tự điều khiển, và điểm gắn kết ribosom. Các tế bào có nhân điển hình được biết để sử dụng các gen khởi đầu, các gen tăng cường và các tín hiệu polyadenyl hoá.

Axit nucleic được "liên kết động" khi nó được đặt trong mối liên quan chức với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN đối với tiền trình tự hoặc trình tự dẫn đầu tiết xuất được liên kết động với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện như tiền protein tham gia vào quá trình tiết xuất polypeptit; gen khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết động với trình tự mã hoá nếu nó tác động tới quá trình phiên mã của trình tự; hoặc điểm gắn kết ribosom được liên kết động với trình tự mã hoá nếu nó được đặt ở vị trí để tạo thuận tiện cho quá trình dịch mã. Nói chung, "liên kết động" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết tiếp giáp, và đối với trường hợp trình tự dẫn đầu tiết xuất, là liên kết tiếp giáp và trong khung đọc. Tuy nhiên, gen tăng cường không phải tiếp giáp. Liên kết được hoàn thành bằng cách ghép buộc tại các điểm giới hạn thuận tiện. Nếu các điểm này không tồn tại, các thể thích nghi oligonucleotit tổng hợp hoặc gen liên kết tổng hợp thường được sử dụng theo thực tế.

Quá trình tinh chế các kháng thể được thực hiện để loại bỏ các thành phần tế bào hoặc các chất gây bẩn khác, ví dụ các axit nucleic tế bào hoặc các protein khác, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý bằng kiềm/SDS, phép làm hiện bằng CsCl, phép sắc ký cột, phép điện di trên gel agarosa, và các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem tài liệu Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Các phương pháp khác đã tồn tại từ lâu và phổ biến được sử dụng để tinh chế protein, như phép sắc ký ái lực với các protein vi khuẩn (ví dụ phép sắc ký ái lực protein A hoặc protein G), phép sắc ký trao đổi ion (ví dụ trao đổi cation (các nhựa carboxymetyl), trao đổi anion (các nhựa amino etyl) và trao đổi kiểu hỗn hợp), hấp thụ ưa lưu huỳnh (ví dụ với beta-mercaptoetanol và các phối tử SH khác), phép sắc ký tương tác kỵ nước hoặc phép sắc ký hấp thụ chất thơm (ví dụ với phenyl-sepharosa, các nhựa ưa arene aza, hoặc axit m-aminophenylboronic), phép sắc ký ái lực chelat kim loại (ví dụ với chất ái lực Ni(II)- và Cu(II)-), phép sắc ký loại trừ kích cỡ, và các phương pháp điện di (như phép điện di gel, phép điện di mao quản (Vijayalakshmi, M., A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Một khía cạnh của sáng chế là được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế được phẩm. Một khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp để bào chế được phẩm bao

gồm kháng thể theo sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ dược phẩm, chứa kháng thể theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế để điều trị bệnh ung thư.

Khía cạnh khác của sáng chế là dược phẩm đã nêu để điều trị bệnh ung thư.

Khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều trị cho bệnh nhân bị bệnh ung thư bằng cách cung cấp kháng thể theo sáng chế cho bệnh nhân cần sự điều trị này.

Theo sáng chế, “chất mang dược” bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, các tác nhân kháng khuẩn và chống nấm, các tác nhân làm chậm đẳng trương và hấp thụ, và các chất tương tự tương hợp về mặt sinh học. Tốt hơn nếu chất mang thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hoá, trong xương sống hoặc biểu bì (ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền).

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Như sẽ được hiểu rõ bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật, chu trình và/hoặc cách sử dụng sẽ thay đổi tùy thuộc vào các kết quả mong muốn. Để cung cấp hợp chất theo sáng chế bằng một số chu trình sử dụng, có thể cần bao hợp chất bằng, hoặc đồng cung cấp hợp chất với, chất để ngăn ngừa sự bất hoạt của nó. Ví dụ, hợp chất có thể được cung cấp cho đối tượng với chất mang thích hợp, ví dụ, các liposom hoặc chất pha loãng. Các chất pha loãng được dùng thích hợp bao gồm nước muối và các dung dịch đệm chứa nước. Các chất mang dược bao gồm các dung dịch nước tiệt trùng hoặc các thể phân tán và các bột tiệt trùng để bào chế ngay tức thì các dung dịch tiệt trùng có thể tiêm hoặc thể phân tán. Việc sử dụng môi trường và các tác nhân này đối với các chất có hoạt tính dược là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các cụm từ “việc sử dụng ngoài đường tiêu hoá” và “sử dụng ngoài đường tiêu hoá” theo sáng chế có nghĩa là các cách sử dụng khác với sử dụng trong ruột hoặc khu trú, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, và không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tuỷ mạc, trong bao, trong mắt, trong tim, trong

da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới mạng nhện, trong cột sống, gây tê ngoài màng cứng và trong ứ.

Thuật ngữ bệnh ung thư theo sáng chế đề cập tới các bệnh tăng sinh, như các u bạch huyết, các bệnh bạch cầu limphô, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào tiểu phế quản, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, khối u ác tính da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom các ống dẫn trứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ tử cung, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột nhỏ, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc ống niệu, caxinom tế bào thận, caxinom bề thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, ung thư hệ thần kinh trung ương (CNS), các khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào xốp đa dạng, u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u tế bào màng não thất, u nguyên thủy bào, u màng não, caxinom tế bào có vảy, u tuyến yên và sacôm Ewing, bao gồm cả các dạng khó chữa của bất kỳ loại nào trong số bệnh ung thư nêu trên, hoặc kết hợp của một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Khía cạnh khác của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc được phẩm đã nêu như chất chống tạo mạch. Chất chống tạo mạch này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt các khối u rắn, và các bệnh mạch khác.

Theo một phương án của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế để điều trị các bệnh mạch.

Khía cạnh khác của sáng chế là được phẩm đã nêu để điều trị các bệnh mạch.

Khía cạnh khác của sáng chế là sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc điều trị các bệnh mạch.

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều trị cho bệnh nhân bị các bệnh mạch bằng cách cung cấp kháng thể theo sáng chế cho bệnh nhân cần sự điều trị này.

Thuật ngữ “các bệnh mạch” bao gồm bệnh ung thư, các bệnh viêm nhiễm, chứng xơ vữa động mạch, chứng thiếu máu cục bộ, chấn thương, nhiễm khuẩn huyết, COPD, bệnh hen, bệnh đái đường, AMD, bệnh màng lưới, đột quỵ, chứng béo phì, tổn thương phổi cấp tính, xuất huyết, rò mạch ví dụ kích thích bởi Xytokin, dị ứng, bệnh Graves, viêm tuyến giáp tự miễn dịch Hashimoto, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, chứng viêm đa khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống (SLE), viêm then lupus, bệnh Crohn, xơ cứng rải rác, viêm loét đại tràng, đặc biệt tới các khối u rắn, các rối loạn tạo mạch mới trong mắt như các bệnh màng lưới tăng sinh hoặc thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi tác (AMD), chứng viêm đa khớp dạng thấp, và bệnh vẩy nến (Folkman, J., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., *Annu. Rev. Physiol.* 53 (1991) 217-239; và Garner, A., Vascular diseases, In: *Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach*, Garner, A., và Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710).

Các chế phẩm đó có thể còn bao gồm các tá dược như các chất bảo quản, các chất thẩm ướt, các chất nhũ hoá và các chất phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của các vi sinh vật có thể được đảm bảo cả bằng các phương pháp tiệt trùng trước đây lẫn bằng các chất kháng khuẩn và chống nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và các chất tương tự. Cũng có thể mong muốn đưa các chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và các chất tương tự vào trong các chế phẩm. Ngoài ra, độ hấp thụ kéo dài của dạng dược phẩm để tiêm truyền có thể được tạo ra bằng các chất làm chậm sự hấp thụ như nhôm monostearate và gelatin.

Không cần quan tâm tới chu trình sử dụng lựa chọn, các hợp chất theo sáng chế, có thể được sử dụng dưới dạng hydrat thích hợp, và/hoặc các dược phẩm theo sáng chế, được bào chế thành các dạng liều dụng bằng các phương pháp thông thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các mức liều thực tế của các hoạt chất trong các dược phẩm theo sáng chế có thể được thay đổi để thu được lượng hoạt chất có tác dụng nhằm đạt được đáp ứng điều trị mong muốn đối với bệnh nhân cụ thể, chế phẩm, và cách sử dụng không độc với bệnh nhân. Mức liều lựa chọn sẽ thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố dược động lực bao gồm hoạt tính của các chế phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, chu trình sử dụng,

thời gian sử dụng, tốc độ tiết xuất của hợp chất cụ thể được sử dụng, khoảng thời gian điều trị, các dược chất khác, các hợp chất và/hoặc các chất sử dụng kết hợp với các chế phẩm cụ thể sử dụng, độ tuổi, giới tính, trọng lượng cơ thể, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử bệnh của bệnh nhân được cần điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết rõ trong các lĩnh vực y học.

Chế phẩm phải tiệt trùng và dễ chảy tới mức độ mà chế phẩm có thể được phân phối bằng bơm tiêm. Ngoài nước, tốt hơn nếu chất mang là dung dịch nước muối đậm đặc đẳng trương.

Độ chảy thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách sử dụng chất bao như lexithin, bằng cách duy trì kích cỡ cần thiết đối với trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm các chất đẳng trương, ví dụ đường, rượu đa chức như manitol hoặc sorbitol, và natri clorua trong chế phẩm.

Theo sáng chế, các từ ngữ "tế bào," "dòng tế bào," và "dịch nuôi cấy tế bào" có thể được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các chỉ định này bao gồm thể hệ con. Vì vậy, các từ "các thể biến nạp" và "các tế bào biến nạp" bao gồm tế bào sơ cấp đích và các dịch nuôi cấy thu được từ đó mà không quan tâm đến số lần cấy. Cũng cần hiểu rằng tất cả các thể hệ con không thể giống nhau hoàn toàn về lượng ADN, do các đột biến có ý hoặc vô ý. Thể hệ con biến dị có chức năng tương tự hoặc hoạt tính sinh học tương tự khi được sàng lọc để nằm trong tế bào biến nạp gốc được tính đến. Trong đó các chỉ định riêng biệt được dự tính, nó sẽ trở nên rõ ràng hơn từ phạm vi sáng chế.

Thuật ngữ "quá trình biến nạp" theo sáng chế đề cập đến quy trình cấy các vectơ/axit nucleic vào tế bào chủ. Nếu các tế bào mà không có các hàng rào màng tế bào kinh khủng được sử dụng như các tế bào chủ, quá trình chuyển nhiễm được tiến hành, ví dụ bằng phương pháp kết tủa canxi phosphat như được mô tả bởi Graham, F.L., and Van der Eb, A.J., *Virology* 52 (1973) 456-467. Tuy nhiên, các phương pháp khác để đưa ADN vào các tế bào như bằng cách tiêm nhân hoặc bằng cách dung hợp tế bào trần cũng có thể được sử dụng. Nếu các tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc các tế bào chứa các cấu trúc màng tế bào trọng yếu được sử dụng, ví dụ phương pháp chuyển nhiễm là xử lý bằng canxi nhờ sử dụng canxi clorua như được mô tả bởi Cohen, S.N., et al, *PNAS*. 69 (1972) 2110-2114.

Theo sáng chế, thuật ngữ "biểu hiện" đề cập đến quy trình mà nhờ đó axit nucleic được phiên mã vào ARN thông tin và/hoặc tới quy trình mà nhờ đó ARN thông tin phiên mã (còn được đề cập đến như sản phẩm phiên mã) sau đó được dịch mã thành các peptit, các polypeptit, hoặc các protein. Các sản phẩm phiên mã và các polypeptit mã hoá được đề cập chung tới như sản phẩm gen. Nếu polynucleotit thu được từ ADN hệ gen, quá trình biểu hiện trong tế bào có nhân điển hình có thể bao gồm tách intron của ARN thông tin.

Thuật ngữ "vector" là phân tử axit nucleic, đặc biệt là tự sao chép, nó chuyển phân tử axit nucleic xen đoạn vào và/hoặc giữa các tế bào chủ. Thuật ngữ bao gồm các vector mà cơ bản là thực hiện chức năng xen đoạn ADN hoặc ARN vào tế bào (ví dụ hợp nhất thể nhiễm sắc), sao chép các vector mà cơ bản là thực hiện chức năng sao chép ADN hoặc ARN, và các vector biểu hiện để thực hiện chức năng phiên mã và/hoặc dịch mã ADN hoặc ARN. Ngoài ra cũng bao gồm là các vector tạo ra nhiều hơn một trong số các chức năng như được mô tả.

Thuật ngữ "vector biểu hiện" là polynucleotit, polynucleotit đó khi được đưa vào tế bào chủ thích hợp, có thể được phiên mã và dịch mã thành polypeptit. Thuật ngữ "hệ biểu hiện" thường đề cập đến tế bào chủ thích hợp bao gồm vector biểu hiện có thể thực hiện chức năng để tạo ra sản phẩm biểu hiện mong muốn.

Mô tả các trình tự axit amin

SEQ ID NO:	1	chuỗi nặng CDR3, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	2	chuỗi nặng CDR2, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	3	chuỗi nặng CDR1, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	4	chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	5	chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	6	chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	7	miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	8	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF>bevacizumab
SEQ ID NO:	9	chuỗi nặng CDR3, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	10	chuỗi nặng CDR2, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	11	chuỗi nặng CDR1, <VEGF>ranibizumab

SEQ ID NO:	12	chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	13	chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	14	chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	15	miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	16	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF>ranibizumab
SEQ ID NO:	17	chuỗi nặng CDR3, <VEGF>HuMab G6-31
SEQ ID NO:	18	chuỗi nặng CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	19	chuỗi nặng CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	20	chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	21	chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	22	chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	23	miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	24	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF> HuMab G6-31
SEQ ID NO:	25	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	26	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	27	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	28	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	29	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	30	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	31	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	32	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Mab 536
SEQ ID NO:	33	liên kết (G4S) ₄
SEQ ID NO:	34	vùng bảo toàn chuỗi nhẹ lambda
SEQ ID NO:	35	vùng bảo toàn chuỗi nặng người dẫn xuất từ IgG1
SEQ ID NO:	36	vùng bảo toàn chuỗi nặng người dẫn xuất từ IgG4
SEQ ID NO:	37	vùng bảo toàn chuỗi nhẹ kappa
SEQ ID NO:	38	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	39	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	40	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	41	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	42	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	43	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	44	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

SEQ ID NO:	45	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
SEQ ID NO:	46	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	47	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	48	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	49	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	50	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	51	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	52	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	53	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2i_LC06
SEQ ID NO:	54	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	55	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	56	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	57	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	58	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	59	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	60	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	61	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2i_LC07
SEQ ID NO:	62	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	63	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	64	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	65	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	66	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	67	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	68	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	69	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2k_LC08
SEQ ID NO:	70	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	71	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	72	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	73	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	74	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	75	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	76	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_LC09
SEQ ID NO:	77	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_LC09

SEQ ID NO:	78	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	79	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	80	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	81	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	82	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	83	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	84	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	85	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2i_LC10
SEQ ID NO:	86	chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	87	chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	88	chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	89	chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	90	chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	91	chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	92	miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	93	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2k_LC11
SEQ ID NO:	94	chuỗi nặng CDR3, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	95	chuỗi nặng CDR2, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	96	chuỗi nặng CDR1, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	97	chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	98	chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	99	chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	100	miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	101	miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF>B20-4.1
SEQ ID NO:	102	peptit dung hợp chuỗi nặng bevacizumab Ang2i_LC06 scFv của <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06
SEQ ID NO:	103	peptit dung hợp chuỗi nặng bevacizumab Ang2i_LC08 scFv của <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08
SEQ ID NO:	104	chuỗi nhẹ của bevacizumab
SEQ ID NO:	105	Nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF)
SEQ ID NO:	106	Angiopoietin-2 người (ANG-2)
SEQ ID NO:	107	Angiopoietin-1 người (ANG-1)
SEQ ID NO:	108	Thụ thể Tie-2 người

SEQ ID NO:	109	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin-LC06-2620
SEQ ID NO:	110	Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin -LC06-2620
SEQ ID NO:	111	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640
SEQ ID NO:	112	Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin -Ang2i-LC06-2640
SEQ ID NO:	113	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641
SEQ ID NO:	114	Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin -Ang2i-LC06-2641
SEQ ID NO:	115	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEQ ID NO:	116	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEQ ID NO:	117	Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể Fab <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab
SEQ ID NO:	118	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEQ ID NO:	119	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEQ ID NO:	120	Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hoá trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS
SEQ ID NO:	121	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-CH1-CL
SEQ ID NO:	122	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-CH1-CL
SEQ ID NO:	123	Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-CH1-CL
SEQ ID NO:	124	Chuỗi nhẹ 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi

		miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-CH1-CL
SEQ ID NO:	125	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-VH-VL
SEQ ID NO:	126	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-VH-VL
SEQ ID NO:	127	Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06- VH-VL
SEQ ID NO:	128	Chuỗi nhẹ 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06- VH-VL
SEQ ID NO:	129	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-VH-VL-SS
SEQ ID NO:	130	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-VH-VL-SS
SEQ ID NO:	131	Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06- VH-VL-SS
SEQ ID NO:	132	Chuỗi nhẹ 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06- VH-VL-SS
SEQ ID NO:	133	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-N-scFab
SEQ ID NO:	134	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-N-scFab
SEQ ID NO:	135	Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-N-scFabSS
SEQ ID NO:	136	Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hoá trị hai Avastin-LC06-N-scFabSS

Các ví dụ, danh sách trình tự và các hình vẽ dưới đây được đưa ra để nhằm giúp hiểu rõ sáng chế, phạm vi cụ thể của chúng được nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Cần hiểu rằng các cải biến có thể được tạo ra theo các phương pháp đã nêu mà vượt quá ý tưởng của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A Cấu trúc dạng sơ đồ của phương án hoá trị bốn của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế gắn kết với VEGF và ANG-2, trong đó một trong các kháng nguyên A hoặc B là VEGF, trong khi kháng nguyên còn lại là ANG-2. Cấu trúc dựa vào kháng

thể có độ dài đầy đủ gắn kết với Kháng nguyên A, mà hai (tuỳ ý làm ổn định bằng disulfua) chuỗi đơn Fv gắn kết với Kháng nguyên B, được liên kết với nó qua liên kết peptit.

Fig. 1B biểu diễn dưới dạng sơ đồ các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn được tạo ra nhờ sử dụng danh pháp TvAb (xem các Ví dụ) – hoặc có không có quá trình làm ổn định bằng disulfua của scFv

Fig. 2A biểu diễn dưới dạng sơ đồ kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-ANG-2> được làm ổn định bằng disulfua (= <VEGF-ANG-2> TvAb6; No. 2331, xem Bảng 3)

Fig. 2B các bản đồ plasmid của các vector chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã cải biến được sử dụng để biểu hiện <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua

Fig. 3 SDS-PAGE của <VEGF-ANG-2> TvAb6 tinh khiết làm ổn định bằng disulfua so với kháng thể IgG1 người “chuẩn” G6-31 (<VEGF> HuMab G6-31) dưới các điều kiện khử và không khử

Fig. 4 phép sắc ký loại trừ kích cỡ <VEGF-ANG-2> TvAb6 tinh khiết làm ổn định bằng disulfua so với kháng thể IgG1 người “chuẩn” G6-31 chứng tỏ rằng TvAb6 làm ổn định bằng disulfua không tạo ra các thể tích tụ như trước khi tinh chế

Fig. 5 hình vẽ dạng sơ đồ và các kết quả từ ELISA gắn kết VEGF. <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua gắn kết với VEGF có thể so sánh với <VEGF> G6-31. <ANG-2> Mab536 không gắn kết với VEGF

Fig. 6A hình vẽ dạng sơ đồ và các kết quả từ ELISA gắn kết ANG-2. <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua gắn kết với ANG-2 có thể so sánh với <ANG-2> Mab536. <VEGF> G6-31 không gắn kết với ANG-2.

Fig. 6B hình vẽ dạng sơ đồ và các kết quả từ phân tích gắn kết ANG-2 bằng sự cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore). <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua gắn kết với ANG-2 có ái lực có thể so sánh như <ANG-2> Mab536.

Fig. 7 hình vẽ dạng sơ đồ và các kết quả từ ELISA liên kết cầu VEGF-ANG-2. <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua gắn kết đồng thời với VEGF và

ANG-2 trong khi <VEGF> G6-31 và <ANG-2> Mab536 không có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2.

Fig. 8a Hiệu quả của <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua so với <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 và hỗn hợp của Mab536 và G6-31 ở kiểu mô ghép khác loài dưới da theo giai đoạn Colo205 trong chuột Scid màu be (thử nghiệm ANG2_Pz_Colo205_003)

Fig. 8b Hiệu quả của <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua so với <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 và hỗn hợp của Mab536 và G6-31 ở kiểu mô ghép khác loài dưới da theo giai đoạn Colo205 trong chuột Scid màu be (thử nghiệm ANG2_Pz_Colo205_005)

Fig. 9 phong bế quá trình hình thành ống bị kích thích bởi VEGF nhờ kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-ANG-2> TvAb6- các kết quả

Fig. 10A + B phong bế quá trình hình thành ống bị kích thích bởi VEGF nhờ <VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua – các phân tích định lượng

Fig. 11 hình vẽ dạng sơ đồ phân tích gắn kết VEGF bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore).

Fig. 12 các đặc tính động học của hai kháng thể <VEGF> <VEGF-Ang-2> TvAb6 và <VEGF> G6-31 trong biểu đồ Ka-Kd.

Fig. 13 Hình vẽ dạng sơ đồ thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore) để phát hiện gắn kết đồng thời của ANGPT2 và VEGF với các kháng thể đặc hiệu kép

Fig. 14 các kết quả từ các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore) chứng tỏ rằng TvAb6 gắn kết đồng thời với ANGPT2 và VEGF.

Fig. 15A + B A) biểu diễn dưới dạng sơ đồ thử nghiệm gắn kết Biacore đặc hiệu và đồng thời các kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>. B) thông số Biacore thể hiện gắn kết đồng thời của ANG-2 và VEGF với TvAb-2441-bevacicumab_LC06

Fig. 16A +B quá trình phosphoryl Tie2 các kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và <VEGF-ANG-2>TvAb-2441, so với các kháng thể kháng Ang2 <ANG-2>Ang2i_LC06 và <ANG-2>Ang2k_LC08

Fig. 17 biểu diễn dưới dạng sơ đồ tương tác Angiopoietin ELISA

Fig. 18 quá trình tăng sinh HUVEC được kích thích bởi VEGF của <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và <VEGF-ANG-2>TvAb-2441-bevacizumab-LC08 và bevacizumab

Fig. 19 hiệu quả chống tạo mạch *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> bevacizumab-LC06 kháng thể so với <ANG-2> ANG2i-LC06, và tổ hợp của <ANG-2> ANG2i-LC06 và Avastin (bevacizumab) ở kiểu mô ghép khác loài Calu3 được theo dõi bằng kháng thể kháng CD31 đánh dấu và sự thay đổi tương đối của tín hiệu CD31 trong quá trình điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp thử nghiệm

Các ví dụ

Các chất và các phương pháp chung

Thông tin chung về các trình tự nucleotit của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng các globulin miễn dịch người được đưa ra trong: tài liệu Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Các axit amin của các chuỗi kháng thể được đánh số và đề cập tới theo cách đánh số EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)).

Các kỹ thuật tái tổ hợp ADN

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để thao tác ADN như được mô tả trong tài liệu Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Các chất phản ứng phân tử sinh học được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được chuẩn bị từ các oligonucleotit được tạo ra bằng cách tổng hợp hoá học. Các đoạn gen, đặt ở cạnh các điểm phân cắt endonucleaza giới hạn đơn, được tập hợp bằng cách ủ và ghép buộc các oligonucleotit bao gồm quá trình khuếch đại PCR và tiếp theo tách dòng qua các điểm giới hạn chỉ dẫn, ví dụ KpnI/

SacI hoặc AscI/PacI vào vector tách dòng pGA4 gốc pPCRScript (Stratagene) trên cơ sở tách dòng vector pGA4. Các trình tự ADN của các phần gen tách dòng phụ được khẳng định bằng cách tạo trình tự ADN. Các phần gen tổng hợp được sắp xếp theo các bản yêu cầu kỹ thuật đã nêu tại Geneart (Regensburg, Germany). Tất cả các đoạn gen mã hoá các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể đặc hiệu kép Ang-2/VEGF được tổng hợp với trình tự ADN có đầu 5' mã hoá peptit dẫn đầu (MGWSCIILFLVATATGVHS), nó nhằm vào các protein để tiết xuất trong các tế bào có nhân điển hình, và các điểm giới hạn 5'-BamHI và 3'-XbaI. Các trình tự ADN mang các chuỗi nặng cải biến "các máu-thành-lỗ" làm ổn định bằng disulfua được thiết kế với các đột biến S354C và T366W ở chuỗi nặng "các máu" và ở các đột biến Y349C, T366S, L368A và Y407V ở chuỗi nặng "lỗ"

Xác định trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách tạo trình tự sợi kép được tiến hành tại MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) hoặc Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany).

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

Bộ phần mềm GCG's (Genetics Computer Nhóm, Madison, Wisconsin) version 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite version 9.1 được sử dụng để tạo, vẽ bản đồ, phân tích, chú thích và minh hoạ trình tự.

Các vector biểu hiện (đối với Ví dụ 1)

Để biểu hiện các kháng thể mô tả, các thể cải biến của các plasmit biểu hiện để biểu hiện tạm thời (ví dụ trong các tế bào HEK293 EBNA hoặc HEK293-F) hoặc để biểu hiện ổn định (ví dụ trong các tế bào CHO) dựa vào hoặc tổ chức ADN hỗ trợ với gen khởi đầu CMV-Intron A hoặc tổ chức hệ gen với gen khởi đầu CMV (ví dụ Fig. 2B) được ứng dụng.

Ngoài catxet biểu hiện kháng thể các vector còn chứa:

- điểm khởi đầu sao chép cho phép sao chép plasmit này trong *E. coli*, và
- gen β (beta)-lactamaza tạo ra tính kháng ampicillin ở *E. coli*,

Đơn vị phiên mã của gen kháng thể bao gồm những thành phần sau đây:

- (các) điểm giới hạn duy nhất tại đầu 5'
- gen khởi đầu tức thời-sớm chính và gen tăng cường từ virus cự bào người,
- tiếp theo là trình tự Intron A đối với trường hợp là tổ chức ADN hỗ trợ,
- vùng không dịch mã 5' của gen kháng thể người,
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,
- chuỗi kháng thể người (chuỗi nặng, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cải biến) hoặc như tổ chức ADN hỗ trợ hoặc như tổ chức hệ gen với tổ chức exon-intron globulin miễn dịch
- vùng không dịch mã 3' với trình tự tín hiệu polyadenyl hoá, và
- (các) điểm giới hạn duy nhất tại đầu 3'.

Các gen dung hợp bao gồm các trình tự chuỗi nặng của kháng thể chọn lựa và thể dung hợp scFv đầu C như được mô tả dưới đây được tạo ra bằng PCR và/hoặc bằng cách tổng hợp gen và kết hợp với các phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết nhờ nối các đoạn axit nucleic phù hợp, ví dụ nhờ sử dụng các điểm NsiI và EcoRI duy nhất trong các vector chuỗi nặng thuộc hệ gen. Các trình tự axit nucleic tách dòng kiểu phụ được thử nghiệm bằng cách tạo trình tự ADN. Để chuyển nhiễm tạm thời và ổn định các lượng lớn plasmit được tạo ra bằng chế phẩm plasmit từ dịch nuôi cấy *E. coli* biến đổi (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Các vector biểu hiện (đối với Ví dụ 10-14)

Vector biểu hiện được sử dụng bao gồm các thành phần dưới đây:

- gen kháng hygromycin làm gen đánh dấu chọn lọc,
- điểm khởi đầu sao chép, oriP, của virus Epstein-Barr (EBV),
- điểm khởi đầu sao chép từ vector pUC18 cho phép sao chép plasmit này trong *E. coli*, và
- gen beta-lactamaza tạo ra tính kháng ampicillin ở *E. coli*,
- trình tự khởi đầu tức thời-sớm chính và gen tăng cường từ virus cự bào người (HCMV),
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,

- trình tự tín hiệu polyadenyl 1-immunoglobulin người (“poly A”), và
- các điểm cắt giới hạn BamHI và XbaI.

Các gen dung hợp globulin miễn dịch bao gồm các cấu trúc trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cũng như các cấu trúc “các mẫu-thành-lỗ” với các miền VH và VL đầu C được tạo ra bằng cách tổng hợp gen và tách dòng vào các plasmit pGA18 (ampR) như được mô tả. Các plasmit pG18 (ampR) mang các đoạn ADN tổng hợp và vector biểu hiện Roche được cắt bằng các enzyme giới hạn BamHI và XbaI (Roche Molecular Biochemicals) và được tiến hành điện di gel agarosa. Sau đó các đoạn ADN mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tinh khiết được ghép buộc vào phần BamHI/XbaI vector biểu hiện Roche phân lập tạo ra các vector biểu hiện cuối cùng. Các vector biểu hiện cuối cùng được biến nạp vào các tế bào *E. coli*, biểu hiện ADN plasmit được phân lập (Miniprep) và chuyển tới phân tích giới hạn enzyme và tạo trình tự ADN. Các dòng vô tính chuẩn được sinh trưởng trong 150 ml môi trường LB-Amp, một lần nữa ADN plasmit được phân lập (Maxiprep) và tính nguyên vẹn SEQUENCE được khẳng định bằng cách tạo trình tự ADN.

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào

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

Các quá trình chuyển nhiễm tạm thời ở hệ HEK293F (đối với Ví dụ 1)

Các kháng thể được tạo ra bằng quá trình chuyển nhiễm tạm thời hai plasmit mã hoá chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng cải biến, theo thứ tự và chuỗi nhẹ tương ứng nhờ sử dụng hệ HEK293-F (Invitrogen) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Một cách vắn tắt, các tế bào HEK293-F (Invitrogen) sinh trưởng trong huyền phù hoặc trong bình lắc hoặc trong thùng lên men có khuấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 không có huyết thanh (Invitrogen) được chuyển nhiễm với hỗn hợp của hai plasmit biểu hiện tương ứng và 293fectin hoặc fectin (Invitrogen). Ví dụ trong bình lắc dung tích 2L (Corning) các tế bào HEK293-F được cấy với mật độ 1.0×10^6 tế bào/ml trong 600 mL và ủ với 120 rpm, 8% CO₂. Ngày hôm sau các tế bào được chuyển nhiễm với mật độ tế bào khoảng 1.5×10^6 tế bào/ml với khoảng 42 mL hỗn hợp của A) 20 mL Opti-MEM

(Invitrogen) với 600 µg ADN plasmit toàn bộ (1 µg/mL) mã hoá chuỗi nặng hoặc chuỗi nặng cải biến, theo thứ tự và chuỗi nhẹ tương ứng với tỷ lệ đẳng mol và B) 20 ml Opti-MEM + 1,2 mL 293fectin hoặc 293fectin (2 µl/mL). Tùy theo mức tiêu thụ glucoza, dung dịch glucoza được thêm vào trong quá trình lên men. Dịch nổi chứa kháng thể tiết xuất được thu hoạch sau 5-10 ngày và các kháng thể hoặc được tinh chế ngay từ dịch nổi hoặc dịch nổi được làm đông lạnh và lưu giữ.

Các quá trình chuyển nhiễm tạm thời ở hệ HEK293F (đối với Ví dụ 10-14)

Các thể cải biến globulin miễn dịch tái tổ hợp được biểu hiện bằng quá trình chuyển nhiễm tạm thời các tế bào phôi thận người 293-F nhờ sử dụng hệ FreeStyle™ 293 Expression System theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, USA). Một cách vắn tắt, các tế bào dạng huyền phù FreeStyle™ 293-F được nuôi cấy trong môi trường FreeStyle™ 293 Expression ở 37°C/CO₂ 8% và các tế bào được cấy trong môi trường tinh khiết với mật độ 1-2x10⁶ tế bào có thể sống/ml vào ngày chuyển nhiễm. Các phức hệ DNA-293fectin™ được điều chế trong môi trường Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) nhờ sử dụng 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) và 250 µg ADN plasmit chuỗi nhẹ và chuỗi nặng với tỷ số mol 1:1 cho 250 ml thể tích chuyển nhiễm cuối cùng. Các phức hệ DNA-293fectin™ “các mẫu-thành-lỗ” với hai chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ được tạo ra trong môi trường Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) nhờ sử dụng 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) và 250 µg ADN plasmit chuỗi nhẹ và chuỗi nặng 1 và 2 “các mẫu-thành-lỗ” với tỷ số mol 1:1:2 cho 250 ml thể tích chuyển nhiễm cuối cùng. Các phức hệ DNA-293fectin™ với hai chuỗi nặng được tạo ra trong môi trường Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) nhờ sử dụng 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) và 250 µg ADN plasmit chuỗi nặng 1 và 2 “các mẫu-thành-lỗ” với tỷ số mol 1:1 cho 250 ml thể tích chuyển nhiễm cuối cùng. Các phức hệ CrossMab DNA-293fectin™ được tạo ra trong môi trường Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) nhờ sử dụng 325 µl 293fectin™ (Invitrogen, Germany) và 250 µg ADN plasmit chuỗi nặng 1 và 2 và chuỗi nhẹ “các mẫu-thành-lỗ” với tỷ số mol 1:1:1:1 cho 250 ml thể tích chuyển nhiễm cuối cùng. Các dịch nổi nuôi cấy tế bào chứa kháng thể được thu hoạch 7 ngày sau khi chuyển nhiễm bằng cách làm ly tâm với 14000 g trong 30 phút và lọc qua màng lọc vô trùng (0,22 µm). Các dịch nổi được giữ ở -20°C cho tới khi tinh chế.

Xác định protein

Nồng độ protein của các kháng thể tinh khiết và các dẫn xuất được xác định bằng cách xác định mật độ quang học (OD) ở 280 nm, nhờ sử dụng hệ số dập tắt mol đã tính toán dựa vào trình tự axit amin theo Pace et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Xác định nồng độ kháng thể trong dịch nổi

Nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong các dịch nổi nuôi cấy tế bào được dự đoán bằng quá trình tạo kết tủa miễn dịch với các hạt Protein A Agarosa (Roche). 60 μ L các hạt Protein A Agarosa được rửa ba lần bằng TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40). Sau đó, 1 -15 mL dịch nổi nuôi cấy tế bào được phết lên các hạt Protein A Agarosa đã làm cân bằng trước bằng TBS-NP40. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các hạt được rửa trên cột Ultrafree-MC-filter (Amicon) một lần bằng 0,5 mL TBS-NP40, hai lần bằng 0,5 mL 2x nước muối đệm phosphat (2xPBS, Roche) và trong thời gian ngắn bốn lần bằng 0,5 mL 100 mM Na-xitrat pH 5,0. Kháng thể kết hợp được rửa giải bằng cách bổ sung 35 μ L chất đệm mẫu NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Một nửa mẫu được kết hợp với chất khử mẫu NuPAGE® hoặc để không khử tương ứng, và gia nhiệt trong 10 phút ở 70°C. Vì vậy, 20 μ L được đưa vào 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (với chất đệm MOPS cho SDS-PAGE không khử và chất đệm MES với phụ gia chất đệm thao tác chống oxy hoá NuPAGE® (Invitrogen) cho SDS-PAGE khử) và nhuộm bằng phẩm xanh tươi Coomassie.

Nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong các dịch nổi nuôi cấy tế bào được xác định bằng phép sắc ký ái lực HPLC. Một cách vắn tắt, các dịch nổi nuôi cấy tế bào chứa các kháng thể và các dẫn xuất gắn kết với Protein A được đưa vào cột HiTrap Protein A (GE Healthcare) trong 50 mM K₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,3 và rửa giải khỏi chất nền với 550 mM axit axetic, pH 2,5 bằng hệ Dionex HPLC-System. Protein rửa giải được xác định số lượng bằng hệ số hấp thụ UV và tích hợp các vùng đỉnh. Kháng thể tinh chế chuẩn IgG1 được sử dụng làm tiêu chuẩn.

Theo cách khác, nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong các dịch nổi nuôi cấy tế bào được xác định bằng Sandwich-IgG-ELISA. Một cách vắn tắt, các đĩa vi chuẩn độ 96 giếng chứa StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche) được bao 100 μ L/giếng phân tử giữ IgG kháng người biotin hoá F(ab')₂<h-Fcgamma> BI (Dianova) với 0,1 μ g/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc theo cách khác qua

đêm ở 4°C và sau đó rửa ba lần bằng 200 μ L/giếng PBS, 0,05% Tween (PBST, Sigma). 100 μ L/giếng các dịch nổi nuôi cấy tế bào chứa kháng thể tương ứng pha loãng theo bậc trong PBS (Sigma) được thêm vào các giếng và ủ trong 1-2 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng 200 μ L/giếng PBST và kháng thể kết hợp được phát hiện bằng 100 μ L F(ab')₂-hFc γ POD (Dianova) với 0,1 μ g/mL như kháng thể phát hiện trong 1-2 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không kết hợp được rửa sạch ba lần bằng 200 μ L/giếng PBST và kháng thể phát hiện kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L ABTS/giếng. Quá trình xác định hệ số hấp thụ được tiến hành bằng quang phổ kế Tecan Fluor với độ dài bước sóng đo là 405 nm (độ dài bước sóng tham khảo là 492 nm).

Quá trình tinh chế protein

Các protein được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào đã lọc để cập tới các phương pháp chuẩn. Một cách vắn tắt, các kháng thể được đưa lên cột Protein A Sepharose (GE Healthcare) và rửa bằng PBS. Quá trình rửa giải các kháng thể đạt được ở độ pH axit tiếp theo là trung hoà ngay mẫu. Protein kết tụ được tách khỏi các kháng thể đơn phân bằng phép sắc ký loại trừ kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong 20 mM Histidin, 140 mM NaCl pH 6,0. Các phần kháng thể đơn phân được tập hợp, cô nếu cần thiết nhờ sử dụng máy cô đặc ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) và giữ ở -80°C. Một phần của các mẫu được cung cấp cho các phân tích protein tiếp theo và quá trình mô tả phân tích, ví dụ bằng SDS-PAGE, phép sắc ký loại trừ kích cỡ, phép đo phổ khối và xác định nội độc tố (xem các Fig. 3 và 4).

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast gel system (Invitrogen) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 4-20% NuPAGE® Novex® các gel TRIS-Glyxin Pre-Cast và chất đệm thao tác Novex® TRIS-Glyxin SDS được sử dụng. (xem ví dụ Fig. 3). Việc khử các mẫu đạt được bằng cách bổ sung chất khử mẫu NuPAGE® trước khi xử lý gel.

Phép sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích

Phép sắc ký loại trừ kích cỡ để xác định mức kết tụ và tình trạng thiếu hợp của các kháng thể được tiến hành bằng phép sắc ký HPLC. Một cách vắn tắt, các kháng thể tinh khiết protein A được đưa lên cột Tosoh TSKgel G3000SW trong 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5 bằng hệ Agilent HPLC 1100 hoặc lên cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2 x PBS bằng Dionex HPLC-System. Protein rửa giải được xác định số lượng bằng hệ số hấp thụ UV và tích hợp các vùng đỉnh. BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 được sử dụng làm tiêu chuẩn (xem ví dụ Fig. 4).

Phép đo phổ khối

Khối lượng tổng các kháng thể giao nhau khử glycosyl hoá được xác định và khẳng định bằng phép đo phổ khối ion hoá điện phun (ESI-MS). Một cách vắn tắt, 100 µg các kháng thể tinh khiết được khử glycosyl hoá bằng 50 mU N-Glycosidaza F (PNGaseF, ProZyme) trong 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7 ở 37°C trong 12-24 giờ với nồng độ protein tới 2 mg/ml và tiếp theo khử muối bằng HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Khối lượng của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng được xác định bằng ESI-MS sau khi khử glycosyl hoá và khử. Một cách vắn tắt, 50 µg kháng thể trong 115 µl được ủ với 60 µl 1M TCEP và 50 µl 8 M Guanidine-hydroclorua sau đó được khử muối. Khối lượng tổng và khối lượng của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khử được xác định bằng ESI-MS nhờ hệ Q-Star Elite MS có gắn nguồn NanoMate.

ELISA gắn kết VEGF

Các đặc tính gắn kết của các kháng thể hoá trị bốn (TvAb) được đánh giá trong thử nghiệm với protein VEGF165-His có độ dài đầy đủ (R&D Systems) (Fig. 5). Vì mục đích này, các đĩa vi chuẩn độ tăng cường sạch Falcon polystyren được bao 100 µl 2 µg/mL VEGF165 người tái tổ hợp (R&D Systems) trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 µl PBST (0,2% Tween 20) và phong bế bằng 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo rửa ba lần bằng 300 µl PBST. 100 µL/giếng <VEGF-ANG-2> TvAb tinh khiết pha loãng theo bậc (40 pM-0,01 pM) và để tham khảo kháng thể <ANG-2> kháng thể Mab536 người kháng ANG-2 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370) kháng thể <VEGF> kháng thể G6-31 kháng VEGF (Liang et al., J Biol Chem. 2006 Jan 13;281(2):951-61; US 2007/0141065)

trong PBS (Sigma) được thêm vào các giếng và ủ trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 μ L PBST (0,2% Tween 20) và kháng thể kết hợp được phát hiện bằng 100 μ L/giếng 0,1 μ g/ml F(ab')₂ <hFcgamma>POD (nguyên cứu miễn dịch) trong 2% BSA 0,1% Tween 20 như kháng thể phát hiện trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không kết hợp được rửa sạch ba lần bằng 300 μ L/giếng PBST và kháng thể phát hiện kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L ABTS/giếng. Quá trình xác định hệ số hấp thụ được tiến hành bằng quang phổ kế Tecan Fluor với độ dài bước sóng đo là 405 nm (độ dài bước sóng tham khảo là 492 nm).

Gắn kết VEGF: mô tả đặc tính động lực của gắn kết VEGF ở 37°C bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore)

Để chứng thực thêm các phát hiện ELISA về sự gắn kết của các kháng thể <VEGF> G6-31 hoặc Avastin và <VEGF-Ang-2> TvAb6 hoặc TvAb-2441-bevacizumab-LC06 hoặc TvAb-2441-bevacizumab-LC08 với VEGF được phân tích theo định lượng nhờ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng thiết bị Biacore T100 theo phương pháp dưới đây và được phân tích nhờ sử dụng gói phần mềm T100: Một cách vắn tắt, các kháng thể <VEGF> được giữ bằng CM5-Chip qua gắn kết với IgG dê kháng người (JIR 109-005-098). Kháng thể giữ được làm bất động bằng kết hợp amino nhờ sử dụng kết hợp amino chuẩn như sau: chất đệm HBS-N được sử dụng làm chất đệm thao tác, quá trình hoạt hoá được tiến hành bằng hỗn hợp của EDC/NHS với mục đích để mật độ của phối tử là 700 RU. Kháng thể giữ được pha loãng trong chất đệm kết hợp NaAc, pH 5,0, c = 2 μ g/mL, các nhóm carboxyl hoạt hoá vẫn còn cuối cùng được phong bế bằng cách phun 1 M Etanolamin. Việc giữ các kháng thể Mabs <VEGF> được tiến hành với lưu lượng 5 μ L/phút và c(Mabs<VEGF>) = 10 nM, pha loãng bằng chất đệm thao tác + 1 mg/mL BSA; mức giữ khoảng 30 RU phải đạt được. rhVEGF (rhVEGF, R&D-Systems Cat.-No, 293-VE) được sử dụng làm chất phân tích. Quá trình mô tả đặc tính động lực của gắn kết VEGF với các kháng thể <VEGF> được tiến hành ở 37°C trong PBS + 0,005 % (thể tích/thể tích) Tween20 làm chất đệm thao tác. Mẫu được phun với lưu lượng 5 μ L/phút và thời gian kết hợp là 80 giây và thời gian phân ly là 1200 giây với các mức nồng độ của rhVEGF từ 300 - 0.29 nM. Quá trình phục hồi bề mặt kháng thể giữ tự do được tiến hành với 10 mM Glyxin pH 1,5 và

thời gian tiếp xúc là 60 giây sau mỗi chu trình phân tích. Các hằng số động lực được tính toán nhờ sử dụng phương pháp tham chiếu kép thông thường (tham chiếu đối chứng: gắn kết của rhVEGF với phân tử giữ IgG dê kháng người, các trị trống dựa vào tế bào lưu lượng đo, nồng độ rhVEGF “0”, Kiểu: gắn kết Langmuir 1:1, (Rmax đặt theo khu vực do gắn kết phân tử giữ). Fig. 11 thể hiện hình vẽ dạng sơ đồ của thử nghiệm Biacore.

ELISA gắn kết ANG-2

Các đặc tính gắn kết của các kháng thể hoá trị bốn (TvAb) được đánh giá trong thử nghiệm ELISA với protein Angiopoietin-2-His có độ dài đầy đủ (R&D Systems) (Fig. 6a). Vì mục đích này, các đĩa vi chuẩn độ tăng cường sạch Falcon polystyren được bao 100 µl 1 µg/mL angiopoietin-2 người tái tổ hợp (R&D Systems, không có chất mang) trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 µl PBST (0,2% Tween 20) và phong bế bằng 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo rửa ba lần bằng 300 µl PBST. 100 µL/giếng <VEGF-ANG-2> TvAb tinh khiết pha loãng theo bậc (40 pM-0,01 pM) và như kháng thể tham khảo <ANG-2> kháng thể Mab536 và VEGF> G6-31 trong PBS (Sigma) được thêm vào các giếng và ủ trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 µl PBST (0,2% Tween 20) và kháng thể kết hợp được phát hiện bằng 100 µL/giếng 0,1 µg/ml F(ab') <hk>POD (Biozol Cat.No. 206005) trong 2% BSA 0,1% Tween 20 như kháng thể phát hiện trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không kết hợp được rửa sạch ba lần bằng 300 µL/giếng PBST và kháng thể phát hiện kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 µL ABTS/giếng. Quá trình xác định hệ số hấp thụ được tiến hành bằng quang phổ kế Tecan Fluor với độ dài bước sóng đo là 405 nm (độ dài bước sóng tham khảo là 492 nm).

Gắn kết tương đối với ANG-1 và ANG-2 (ELISA gắn kết ANG-1 và ANG-2)

Các đặc tính gắn kết của các kháng thể được đánh giá trong thử nghiệm ELISA với protein Angiopoietin-2-His có độ dài đầy đủ (R&D Systems #623-AN/CF hoặc chất được tạo ra tại nhà máy) hoặc Angiopoietin-1-His (R&D systems #923-AN). Vì vậy, các đĩa 96 giếng (các đĩa vi chuẩn độ tăng cường sạch Falcon polystyren hoặc Nunc Maxisorb) được bao 100 µl 1 µg/mL angiopoietin-1 hoặc angiopoietin-2 người

tái tổ hợp (không có chất mang) trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) và phong bế bằng 200 μ l 2% BSA 0,1% Tween 20 trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo rửa ba lần bằng 300 μ l PBST. 100 μ L/giếng kháng thể thử nghiệm tinh khiết pha loãng theo bậc (40 pM-0,01 pM) được thêm vào các giếng và ủ trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) và kháng thể kết hợp được phát hiện bằng 100 μ L/giếng 0,1 μ g/ml F(ab')₂ <hk>POD (Biozol Cat.No. 206005) trong 2% BSA 0,1% Tween 20 như kháng thể phát hiện trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không kết hợp được rửa sạch ba lần bằng 300 μ L/giếng PBST và kháng thể phát hiện kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L ABTS/giếng. Quá trình xác định hệ số hấp thụ được tiến hành bằng quang phổ kế Tecan Fluor với độ dài bước sóng đo là 405 nm (độ dài bước sóng tham khảo là 492 nm).

BIACORE gắn kết ANG-2

Gắn kết của các kháng thể với kháng nguyên, ví dụ ANG-2 người được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt nhờ sử dụng thiết bị BIACORE T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Một cách vắn tắt, để xác định ái lực các kháng thể đa dòng dẽ <hIgG-Fcgamma> được cố định CM5 nhờ kết hợp amin để thể hiện các kháng thể kháng ANG-2 người (Fig. 6B). Gắn kết được xác định trong chất đệm HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. ANG-2-His tinh khiết (các hệ R&D hoặc được tinh chế tại nhà máy) được thêm vào với các nồng độ khác nhau giữa 6,25 nM và 200 nM trong dung dịch. Hằng số kết hợp được xác định bằng cách phun ANG-2 trong 3 phút; Hằng số phân ly được xác định bằng cách rửa bề mặt chip bằng chất đệm HBS trong 3 phút và giá trị KD được đánh giá nhờ sử dụng kiểu gắn kết Langmuir 1:1. Do tính không tương đồng của chế phẩm ANG-2 không có gắn kết 1:1 có thể được thấy; vì vậy các giá trị KD chỉ là các đánh giá tương đối. Thông số đối chứng âm tính (ví dụ các đường cong chất đệm) được trừ từ các đường cong mẫu để hiệu chỉnh hệ độ lệch giới hạn thực chất hệ thống và để giảm tín hiệu tiếng ồn. Phần mềm đánh giá Biacore T100 version 1.1.1 được sử dụng để phân tích đồ thị các đáp ứng theo thời gian trong thử nghiệm cộng hưởng

plasmon bề mặt và để tính toán thông số ái lực. Theo cách khác, Ang-2 có thể được giữ với mức giữ là 2000-1700 RU nhờ PentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-free, Qiagen No. 34660) mà được cố định CM5 qua kết hợp amin (BSA-free) (xem dưới đây).

Ức chế gắn kết huANG-2 với Tie-2 (ELISA)

Tương tác ELISA được tiến hành bằng các đĩa vi chuẩn độ 384 giếng (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) ở RT. Sau mỗi bước ủ, các đĩa được rửa 3 bằng PBST. Các đĩa ELISA được bao 0,5 µg/ml Tie-2 protein (R&D Systems, UK, Cat.No.313-TI) trong ít nhất 2 giờ (h). Sau đó các giếng được phong bế bằng PBS có bổ sung 0,2% Tween-20 và 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) trong 1 giờ. Các dung dịch pha loãng chứa các kháng thể tinh khiết trong PBS được ủ cùng với 0,2 µg/ml huAngiopoietin-2 (R&D Systems, UK, Cat.No. 623-AN) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa hỗn hợp của 0,5 µg/ml dòng vô tính biotin hoá kháng Angiopoietin-2 BAM0981 (R&D Systems, UK) và streptavidin HRP pha loãng với tỷ lệ 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat.No.11089153001) được thêm vào trong 1 h. Sau đó, các đĩa được rửa 6 lần bằng PBST. Các đĩa được mở rộng bằng chất phản ứng mới được điều chế ABTS (Roche Diagnostics GmbH, DE, chất đậm #204 530 001, các thẻ #11 112 422 001) trong 30 phút ở RT. Hệ số hấp thụ được xác định ở 405 nm.

ELISA liên kết ANG-2-VEGF

Các đặc tính gắn kết của các kháng thể hoá trị bốn (TvAb) được đánh giá trong thử nghiệm ELISA với VEGF165-His protein (R&D Systems) và ANG-2 người-His protein (R&D Systems) được làm bất động có độ dài đầy đủ để phát hiện kháng thể đặc hiệu kép kết hợp (Fig. 7). Chỉ <VEGF-ANG-2> TvAb đặc hiệu kép có thể gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 và vì vậy liên kết cầu hai kháng nguyên trong khi các kháng thể IgG1 đặc hiệu đơn “chuẩn” sẽ không có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 (Fig. 7).

Vì mục đích này các đĩa vi chuẩn độ tăng cường sạch Falcon polystyren được bao 100 µl 2 µg/mL VEGF165 người tái tổ hợp (R&D Systems) trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc qua đêm ở 4°C. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 µl PBST (0,2% Tween 20) và phong bế bằng 200 µl 2% BSA 0,1% Tween 20 trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo rửa ba lần bằng 300 µl PBST. 100 µL/giếng

<VEGF-ANG-2> TvAb tinh khiết pha loãng theo bậc (40 pM-0,01 pM) và như kháng thể tham chiếu <ANG-2> kháng thể Mab536 và VEGF> G6-31 trong PBS (Sigma) được thêm vào các giếng và ủ trong 1 giờ bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) và kháng thể kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L/giếng 0,5 μ g/ml ANG-2-His người (R&D Systems) trong PBS. Các giếng được rửa ba lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) và ANG-2 kết hợp được phát hiện bằng 100 μ l 0,5 μ g/mL kháng thể <ANG-2>mIgG1-Biotin (BAM0981, R&D Systems) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không kết hợp được rửa sạch ba lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) kháng thể phát hiện được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L thể tiếp hợp Streptavidin-POD với tỷ lệ 1:2000 (Roche Diagnostics GmbH, Cat. No.11089153) pha loãng trong chất đệm phong bế với tỷ lệ 1:4 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thể tiếp hợp Streptavidin-POD không kết hợp được rửa sạch ba-sáu lần bằng 300 μ l PBST (0,2% Tween 20) và thể tiếp hợp Streptavidin-POD kết hợp được phát hiện bằng cách bổ sung 100 μ L ABTS/giếng. Quá trình xác định hệ số hấp thụ được tiến hành bằng quang phổ kế Tecan Fluor với độ dài bước sóng đo là 405 nm (độ dài bước sóng tham khảo là 492 nm).

Biểu hiện gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép, hoá trị bốn <VEGF-Ang-2> TvAb6 với VEGF-A và ANG-2 bằng Biacore

Để chứng thực thêm thông số từ ELISA liên kết cầu, thử nghiệm khác được tiến hành để khẳng định gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 nhờ sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng thiết bị Biacore T100 theo phương pháp dưới đây và phân tích nhờ sử dụng gói phần mềm T100 (T100 Control, Version 2.01, T100 Evaluation, Version 2.01, T100 Kinetics Summary, Version 1.01): Ang-2 được giữ với mức giữ là 2000-1700 RU trong PBS, 0,005% (thể tích/thể tích) chất đệm thao tác Tween20 nhờ PentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-free, Qiagen No. 34660) mà được cố định CM5 qua liên kết amin (không có BSA). Chất đệm HBS-N được sử dụng làm chất đệm thao tác trong khi kết hợp, quá trình hoạt hoá được tiến hành bằng hỗn hợp của EDC/NHS. Kháng thể giữ không có BSA PentaHis-Ab được pha loãng trong chất đệm kết hợp NaAc, pH 4.5, c = 30 μ g/mL, các nhóm carboxyl hoạt hoá vẫn còn cuối cùng được phong bế bằng cách phun 1 M Etanolamin, các mật độ phối tử bằng 5000 và 17000

RU được thử nghiệm. Ang-2 với nồng độ 500 nM được giữ bằng PentaHis-Ab với lưu lượng 5 μ L/phút pha loãng bằng chất đệm thao tác + 1 mg/mL BSA. Sau đó, kháng thể đặc hiệu kép <Ang-2, VEGF> gắn kết với Ang-2 và với VEGF được biểu thị bằng cách ủ với rhVEGF và tạo ra phức hệ dạng nhiều lớp. Vì mục đích này, <VEGF-Ang-2> TvAb6 đặc hiệu kép được kết hợp với Ang-2 với lưu lượng 50 μ L/phút và nồng độ là 100 nM, pha loãng bằng chất đệm thao tác + 1 mg/mL BSA và gắn kết đồng thời được phát hiện bằng cách ủ với VEGF (rhVEGF, R&D-Systems Cat.-No, 293-VE) trong PBS + 0,005% (thể tích/thể tích) chất đệm thao tác Tween20 với lưu lượng 50 μ L/phút và nồng độ VEGF là 150 nM. Thời gian kết hợp là 120 giây, thời gian phân ly là 1200 giây. Quá trình phục hồi được tiến hành sau mỗi chu trình với lưu lượng 50 μ L/phút với 2 x 10 mM Glyxin pH 2,0 và thời gian tiếp xúc là 60 giây. Các đồ thị của các đáp ứng theo thời gian trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt được hiệu chỉnh nhờ sử dụng tham chiếu kép thông thường (tham chiếu đối chứng: gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép và rhVEGF với phân tử giữ PentaHisAb). Các trị trọng đối với mỗi Ab được xác định với nồng độ rhVEGF “0”. Sơ đồ thử nghiệm Biacore được thể hiện trên Fig. 13. Định dạng thử nghiệm Biacore khác được thể hiện trên Fig. 15.

Tạo dòng tế bào HEK293-Tie2

Để xác định sự can thiệp của các kháng thể Angiopoietin-2 với quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bằng ANGPT2 và gắn kết của ANGPT2 với Tie2 trên các tế bào, dòng tế bào HEK293-Tie tái tổ hợp được tạo ra. Một cách vắn tắt, plasmid gốc pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) mã hoá Tie2 người có độ dài đầy đủ (SEQ ID 108) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu CMV và gen kháng Neomycin được chuyển nhiễm nhờ sử dụng Eugene (Roche Applied Science) làm chất phản ứng chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293 (ATCC) và các tế bào bên được chọn lọc bằng DMEM 10% FCS, 500 μ g/ml G418. Các dòng vô tính riêng biệt được phân lập nhờ bình đông dùng tách dòng, và sau đó phân tích đối với biểu hiện Tie2 nhờ FACS. Dòng vô tính 22 được nhận dạng như dòng vô tính với biểu hiện Tie2 cao và ổn định ngay cả khi không có mặt G418 (HEK293-Tie2 clone22). Sau đó HEK293-Tie2 clone22 được sử dụng cho các thử nghiệm tế bào: thử nghiệm phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 và gắn kết phối tử tế bào ANGPT2.

Thử nghiệm phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2

Mức ức chế phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 bằng các kháng thể ANGPT2 được xác định theo nguyên tắc thử nghiệm dưới đây. HEK293-Tie2 clone 22 kích thích bằng ANGPT2 trong 5 phút với sự có mặt hoặc không có kháng thể ANGPT2 và P-Tie2 được định lượng bằng ELISA dạng nhiều lớp. Một cách vắn tắt, 2×10^5 tế bào HEK293-Tie2 clone 22 trên giếng được sinh trưởng qua đêm trên các đĩa vi chuẩn độ 96 giếng có phủ Poly-D-Lysin trong 100 μ l DMEM, 10% FCS, 500 μ g/ml Geneticin. Ngày tiếp theo, dãy chuẩn độ của các kháng thể ANGPT2 được chuẩn bị trong đĩa vi chuẩn độ (cô gấp 4 lần, 75 μ l thể tích cuối cùng/giếng, các bản sao) và trộn với 75 μ l dung dịch ANGPT2 (R&D systems # 623-AN] (3,2 μ g/ml thành dung dịch cô gấp 4 lần). Các kháng thể và ANGPT2 được ủ sơ bộ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. 100 μ l hỗn hợp được thêm vào các tế bào HEK293-Tie2 clone 22 (đã ủ sơ bộ trong 5 phút với 1 mM NaV_3O_4 , Sigma #S6508) và ủ trong 5 phút ở 37°C. Sau đó, các tế bào được rửa bằng 200 μ l PBS làm lạnh bằng nước đá + 1mM NaV_3O_4 trên giếng và làm tan bằng cách bổ sung 120 μ l chất đệm phân giải (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1 mM NaV_3O_4 , 1 mM PMSF và 10 μ g/ml Aprotinin) trên giếng trên đá. Các tế bào được làm tan trong 30 phút ở 4°C bằng máy lắc đĩa vi chuẩn độ và 100 μ l dịch tan được chuyển trực tiếp vào đĩa vi chuẩn độ p-Tie2 ELISA (R&D Systems, R&D #DY990) mà không làm ly tâm trước và không xác định protein. Các lượng P-Tie2 được định lượng theo hướng dẫn của nhà sản xuất và các giá trị IC_{50} để ức chế được xác định nhờ sử dụng phần mềm phân tích XLfit4 cho Excel (Dose-response one site, model 205). Các giá trị IC_{50} có thể so sánh trong khi đang thử nghiệm, nhưng có thể thay đổi theo thử nghiệm.

Thử nghiệm tăng sinh HUVEC được kích thích bởi VEGF

Quá trình tăng sinh HUVEC kích thích bởi VEGF (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Promocell #C-12200) được chọn để xác định chức năng tế bào của các kháng thể VEGF. Một cách vắn tắt, các tế bào 5000 HUVEC (chỉ số cấy chuyển thấp, ≤ 5 lần cấy chuyển) trên 96 giếng được ủ trong 100 μ l môi trường đối (EBM-2 Endothelial basal medium 2, Promocell # C-22211, 0,5% FCS, Penixillin/Streptomycin) trong các đĩa vi chuẩn độ 96 giếng BD Biocoat Collagen I phủ collagen (BD #354407 / 35640) qua đêm. Các nồng độ kháng thể thay đổi được trộn với rhVEGF (30 ng1/ml nồng độ cuối cùng, BD # 354107) và ủ sơ bộ trong 15

phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp được thêm vào các tế bào HUVEC và chúng được ủ trong 72 h ở 37°C, 5% CO₂. Vào ngày phân tích đĩa được làm cân bằng tới nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và khả năng sống sót/tăng sinh tế bào được xác định nhờ sử dụng bộ dụng cụ CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay theo chỉ dẫn (Promega, # G7571/2/3). Độ phát quang được xác định bằng phổ quang kế.

Cấu trúc của các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn và các kháng thể đặc hiệu đơn hoá trị bốn

Các kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với VEGF (VEGF-A) và ANG-2 (Angiopoietin-2) theo sáng chế bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với VEGF và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết với ANG-2. Khi điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết với VEGF, ví dụ miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 24 thì cả hai được dẫn xuất từ biểu hiện thể thực khuẩn người thu được từ kháng thể G6-31 kháng VEGF được mô tả chi tiết trong tài liệu Liang, W.C., et al., J Biol Chem. 281(2) (2006) 951-61 và trong US 2007/0141065, có thể được sử dụng. Theo cách khác, ví dụ điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm các miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 100, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 101 từ các kháng thể kháng VEGF <VEGF>bevacizumab và <VEGF>B20-4.1., tốt hơn là từ <VEGF> bevacizumab.

Khi điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai bao gồm các miền biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 31, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 32 hoặc SEQ ID NO: 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T (đánh số theo Kabat), thì cả hai được dẫn xuất từ kháng thể người kháng ANG-2 <ANG-2> Mab536 được mô tả chi tiết trong tài liệu Oliner, J., et al., Cancer Cell. 6(5) (2004) 507-16, và trong US 2006/0122370, có thể được sử dụng. Theo cách khác, ví dụ điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm các miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 84 hoặc SEQ ID NO: 92, và các miền biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 93 từ các kháng thể kháng ANG-2 <ANG-2> Ang2s_R3_LC03, <ANG-2>Ang2i_LC06, <ANG-2>Ang2i_LC07, <ANG-2> Ang2k_LC08, <ANG-2> Ang2s_LC09, <ANG-2>

Ang2i_LC10, or <ANG-2> Ang2k_LC11, tốt hơn là từ <ANG-2>Ang2i_LC06, hoặc <ANG-2> Ang2k_LC08.

Để tạo ra các chất mà có thể kết hợp các đặc điểm của cả hai kháng thể, các thực thể protein thu được từ kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn mới được cấu trúc. Trong các phân tử đó, các phân tử gắn kết chuỗi đơn tái tổ hợp của kháng thể được kết nối nhờ các kỹ thuật dung hợp protein tái tổ hợp với kháng thể khác được giữ dưới định dạng IgG1 có độ dài đầy đủ. Kháng thể thứ hai này mang tính gắn kết đặc hiệu mong muốn.

Bằng cách tổng hợp gen và các kỹ thuật sinh học phân tử tái tổ hợp, miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể tương ứng được liên kết bởi liên kết chuỗi đơn glyxin serin (G4S)3 hoặc (G4S)4 để tạo ra chuỗi đơn Fv (scFv), chuỗi này được gắn kết với đầu C của chuỗi nặng kháng thể khác nhờ sử dụng liên kết (G)6- hoặc (G4S)3-.

Ngoài ra, các gốc xystein được đưa vào miền VH (bao gồm vị trí Kabat 44) và VL (bao gồm vị trí Kabat 100) của scFv gắn kết với ANG-2 hoặc VEGF như được mô tả trước đây (ví dụ WO 94/029350; Reiter, Y., et al., Nature biotechnology (1996) 1239-1245; Young, N.M., et al, FEBS Letters (1995) 135-139; hoặc Rajagopal, V., et al., Protein Engineering (1997) 1453-59).

Tất cả các phân tử đó được tạo ra, tinh chế và đặc trưng hoá và biểu hiện protein bằng cách tái tổ hợp, tính ổn định và hoạt tính sinh học được đánh giá.

Tóm tắt về các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép được ứng dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép, hoá trị bốn <VEGF-ANG-2>, <ANG-2-VEGF> và các kháng thể đặc hiệu đơn, hoá trị bốn <ANG-2> được nêu trong Bảng 3. Đối với nghiên cứu này, các tác giả sử dụng thuật ngữ “TvAb” để mô tả các thực thể protein hoá trị bốn khác nhau.

Để thu được các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-ANG-2> TvAb5 và TvAb6, Fv (scFv) chuỗi đơn gắn kết với Angiopoietin-2 dẫn xuất từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 31, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T dẫn xuất từ kháng thể người kháng ANG-2 <ANG-2> Mab536 được dung hợp với trình tự tương ứng với đầu C của vector

chuỗi nặng của kháng thể người <VEGF> G6-31 kháng VEGF SEQ ID NO: 23 và đồng biểu hiện với vector biểu hiện chuỗi nhẹ tương ứng gốc từ SEQ ID NO: 24. Đại diện của các định dạng đưa vào được thể hiện trên Fig.1B và được liệt kê trong Bảng 3.

Để thu được các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb9 và TvAb15 Fv chuỗi đơn (scFv) gắn kết với VEGF dẫn xuất từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 23, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 24 dẫn xuất từ kháng thể <VEGF> G6-31 người kháng VEGF được dung hợp với trình tự tương ứng với đầu C của vector chuỗi nặng của kháng thể <ANG-2> Mab536 người kháng ANG-2 SEQ ID NO: 31 và đồng biểu hiện với vector biểu hiện chuỗi nhẹ tương ứng gốc từ SEQ ID NO: 32. Đại diện của các định dạng đưa vào được thể hiện trên Fig.1B và được liệt kê trong Bảng 3.

Bảng 3 – Các định dạng kháng thể đặc hiệu kép, hoá trị bốn khác nhau với tận cùng C các gắn kết scFv và TvAb tương ứng- tên danh pháp. An “-” trong bảng có nghĩa là “không có mặt”

Tên phân tử (TvAb- tên danh pháp đối với các kháng thể đặc hiệu kép)	khung chính kháng thể dẫn xuất từ	scFv dẫn xuất từ	Các miền biến đổi VH và VL: SEQ ID NO:	Vị trí của scFv gắn kết với kháng thể	Liên kết chuỗi đơn	Liên kết peptit	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100
G6-31 (1000)	<VEGF> G6-31	-	23 + 24	-	-	-	-
Mab536 (1000)	<ANG-2> Mab536	-	31 + 32	-	-	-	-
Bevacizu-mab	<VEGF>b evacizu-mab	-	23 + 24	-	-	-	-
Ang2i_LC06 (LC06)	<ANG-2>Ang2i_LC06	-	52 + 53	-	-	-	-
Ang2k_LC06 (LC08)	<ANG-2>Ang2k_LC08	-	68 + 69				

TvAb5 (2310)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T	HC đầu C	(G4S)3	(G)6	-
TvAb6 (2331)	<VEGF> G6-31	<ANG-2> Mab536	23 + 24, 31 + 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T	HC đầu C	(G4S)3	(G4S)3	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100
TvAb9 (2330)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31 + 32, và 23 + 24	HC đầu C	(G4S)3	(G4S)3	-
TvAb15 (2431)	<ANG-2> Mab536	<VEGF> G6-31	31 + 32, và 23 + 24	HC đầu C	(G4S)4	(G4S)3	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100
TvAb-2441- bevacizumab- LC06	bevacizumab	LC06	7 + 8 và 52 + 53	HC đầu C	(G4S)4	(G4S)4	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100
TvAb-2441- bevacizumab- LC08	Bevacizumab	LC08	7 + 8 và 68 + 69	HC đầu C	(G4S)4	(G4S)4	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100
TvAb- 3421_bevacizumab_LC06	Bevacizumab	LC06	7 + 8 và 52 + 53	LC đầu C	(G4S)4	(G4S)2	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/ VL100

TvAb-4421_bevacizumab_LC06	Bevacizumab	LC06	7 + 8 và 52 + 53	LC đầu C	(G4S)4	(G4S)2	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/VL100
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	Bevacizumab	LC06	7 + 8 và 52 + 53	LC đầu C	(G4S)4	(G4S)6	Làm ổn định bằng scFv disulfua VH44/VL100

Các định dạng TvAb gốc từ, ví dụ

a) aa) kháng thể người kháng VEGF <VEGF> G6-31 và ab) hai Fv chuỗi đơn (scFv) gắn kết với Angiopoietin-2 dẫn xuất từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 31, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 32 với các đột biến T92L, H93Q và W94T, được liên kết với đầu C- của chuỗi nặng của kháng thể kháng VEGF <VEGF> G6-31 (SEQ ID NO: 23); hoặc

b) ba) kháng thể người kháng ANG-2 <ANG-2> Mab536 và bb) hai Fv chuỗi đơn (scFv) gắn kết với VEGF dẫn xuất từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 23, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 24, được liên kết với đầu C- của chuỗi nặng của kháng thể kháng ANG-2 <ANG-2> Mab536 (SEQ ID NO: 31); hoặc

c) ca) kháng thể người kháng VEGF <VEGF> bevacizumab (Avastin) và cb) hai Fv chuỗi đơn (scFv) gắn kết với Angiopoietin-2 dẫn xuất từ miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 52 hoặc của SEQ ID NO: 68, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 53 hoặc của SEQ ID NO: 69, được liên kết với đầu C- của chuỗi nặng của kháng thể kháng VEGF <VEGF> bevacizumab (Avastin) (Các trình tự của peptit dung hợp thu được là SEQ ID NO: 102 hoặc SEQ ID NO: 103, được đồng biểu hiện với chuỗi nhẹ của bevacizumab SEQ ID NO: 104. (Theo cách khác hai Fv chuỗi đơn (scFv) gắn kết với Angiopoietin-2 có thể cũng được gắn kết với đầu C- của chuỗi nhẹ hoặc đầu N- của chuỗi nặng).

Theo cách khác đối với hai Fv chuỗi đơn (scFv) cả các phần Fab chuỗi đơn cũng có thể được sử dụng như được mô tả ở trên (nhờ sử dụng các liên kết peptit để dung hợp với đầu C- hoặc đầu N-), trong EP Appl. No 09004909.9 và trong Ví dụ 10.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1.

Biểu hiện và tinh chế các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn

Các chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn tương ứng TvAb5 và TvAb6 được cấu trúc trong các vector biểu hiện hệ gen như được mô tả ở trên. Các plasmit được khuếch đại trong E.coli, tinh chế, và tiếp theo chuyển nhiễm để biểu hiện tạm thời các protein tái tổ hợp trong các tế bào HEK293F (nhờ sử dụng hệ Invitrogen's FreeStyle 293 system). Sau 7 ngày, các dịch nổi tế bào HEK 293 được thu gom, lọc và các kháng thể đặc hiệu kép được tinh chế bằng protein A và phép sắc ký loại trừ kích cỡ. Tính đồng nhất của tất cả các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép được khẳng định bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử và không khử và phép sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Trong các điều kiện khử (Fig.3), các chuỗi polypeptit <VEGF-ANG-2> TvAb6 mang các thể dung hợp scFv đầu C thể hiện nhờ các kích cỡ phân tử biểu kiến SDS-PAGE khoảng 75 kDa tương tự với các trọng lượng phân tử đã tính toán. Phép đo phổ khối khẳng định tính đồng nhất của các cấu trúc kháng thể tinh khiết. Các mức biểu hiện của tất cả các cấu trúc được phân tích bằng Protein A HPLC và tương tự với các hiệu suất biểu hiện của các IgG 'chuẩn'. Các hiệu suất protein đạt được tới 150 mg TvAb6 <VEGF-ANG-2> trên lít dịch nổi nuôi cấy tế bào như được xác định bằng Protein A HPLC.

Phân tích phép sắc ký loại trừ kích cỡ HP cấu trúc không làm ổn định bằng disulfua tinh khiết TvAb5 với đầu C dung hợp scFv tại chuỗi nặng so với các IgG "chuẩn" thể hiện xu hướng kết tụ lại tăng sau khi tinh chế kháng thể đơn phân bằng phép sắc ký loại trừ kích cỡ (được gọi là hiện tượng "chuỗi xích"). Phát hiện này được hỗ trợ bởi các ví dụ khác (Rajagopal, V., et al., Prot. Engin. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al, Nucl Med Biol. (1998) 387-393 hoặc Schmidt, M., et al, Oncogene (1999) 18, 1711 – 1721) chứng tỏ rằng các phân tử chứa các scFv không được làm ổn định bằng các disulfua tâm chuỗi giữa VH và VL có xu hướng tăng kết tụ và các hiệu suất giảm. Để giải quyết các vấn đề kết tụ của các kháng thể đặc hiệu kép

này, quá trình làm ổn định bằng disulfua của các gốc scFv được ứng dụng. Đối với vấn đề này các tác giả sáng chế đã đề xuất các thay thế xystein đơn trong VH và VL của scFv tại các vị trí xác định (các vị trí VH44/VL100 theo sơ đồ đánh số Kabat). Các đột biến có khả năng kích thích sự hình thành của các disulfua tâm chuỗi giữa VH và VL, nó lần lượt làm ổn định modul scFv đã ổn định bằng disulfua thu được. Việc thêm vào các VH44/VL100 disulfua ở các scFv tại đầu C- của Fv trong TvAb6 <VEGF-ANG-2> dẫn đến kháng thể hoá trị bốn ổn định không có xu hướng kết tụ chút nào nữa sau khi tinh chế và vẫn giữ nguyên ở tình trạng đơn phân (Fig. 4). Ngoài ra, TvAb6 <VEGF-ANG-2> không thể hiện xu hướng kết tụ tăng khi lặp lại các chu trình làm tan đông lạnh, ví dụ với nồng độ ứng dụng *in vitro* và *in vivo* là 3 mg/kg.

Tất cả các phân tử TvAb khác được mô tả trong Bảng 3 (ví dụ TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab -LC08) được tạo ra và đặc trưng hoá bằng cách phân tích tương tự với quy trình đã mô tả.

Ví dụ 2

Gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-ANG-2> TvAb6, TvAb-2441-bevacizumab -LC06 và TvAb-2441-bevacizumab -LC08 với VEGF-A và ANG-2

Gắn kết của các modul scFv và của các Fv duy trì trong modul IgG của các định dạng kháng thể đặc hiệu kép khác nhau được so sánh với gắn kết của các IgG 'kiểu đại' mà từ đó các phân tử gắn kết và các kháng thể đặc hiệu kép được dẫn xuất. Các phân tích đó được tiến hành với các nồng độ đẳng mol bằng cách tiến hành các ELISA gắn kết hoá học và bằng cách ứng dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore).

Đối với <VEGF-ANG-2> TvAb6 được thể hiện bằng ELISA gắn kết VEGF như được mô tả ở trên rằng nó gắn kết với VEGF có thể so sánh với kháng thể gốc G6-31 của nó với nồng độ đẳng mol là 0,625 pM (Fig. 5). Phát hiện này được mong đợi với vùng Fv của TvAb là giống với gắn kết của G6-31. Sự khác biệt một chút giữa <VEGF-ANG-2> TvAb6 và <VEGF> G6-31 là do các khác biệt nhỏ về nồng độ protein và sự cản trở không gian không đáng kể của scFv đầu C- với gắn kết của kháng thể phát hiện <hFc>-POD có thể được khắc phục bằng cách ứng dụng kháng thể phát hiện <hk> POD (Biozol Cat.No. 206005) như sử dụng đối với ELISA gắn kết ANG-2.

Nhờ sử dụng Biacore, các phát hiện đó được khẳng định nhờ sử dụng các chuỗi nồng độ cổ điển tại 37°C (Fig. 11). Các thông số đó thể hiện tốc độ Kon nhanh $k(a)$ là $4,7-4,8 \times 10^6 \text{ 1/(Ms)}$, quá trình bão hoà đạt được bằng các nồng độ VEGF cao nhất. Các tốc độ Koff đạt tới các giới hạn của bản mô tả kỹ thuật (tức là $5 \times 10^{-6} \text{ (s/s)}$) có lẽ do vẫn còn gắn kết hoá trị hai (tác dụng ái lực) trong các điều kiện như kết quả của chất phân tích hai phần rhVEGF, mặc dù mật độ phối tử rất thấp được sử dụng tạo ra đáp ứng VEGF cuối cùng là 10-15 RU. Tuy nhiên, các hằng số động học của các kháng thể <VEGF> khác nhau có thể so sánh được bằng phương pháp này và trong phạm vi sai số của phương pháp không có sự khác biệt đáng kể về các hằng số động học của các kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-Ang-2> TvAb6 và kháng thể gốc <VEGF> G6-31 có thể được thấy. Các hằng số động học đối với <VEGF-Ang-2> TvAb6 và <VEGF> G6-31 trong các điều kiện đó gần như giống nhau bởi phương pháp này. Vì vậy, có thể kết luận rằng TvAb6 duy trì hoàn toàn các đặc tính gắn kết VEGF của nó. Bảng 4 thể hiện các hằng số động học tương ứng và Fig.12 thể hiện các đặc tính động học của hai kháng thể <VEGF> <VEGF-Ang-2> và <VEGF> G6-31 trong biểu đồ Ka-Kd.

Bảng 14: các đặc tính động học của <VEGF-Ang-2> TvAb6 và <VEGF> G6-31

Xác định ở 37°C	Ka	kd	t1/2	KD
Các kháng thể	[1/(Ms)]	[1/giây]	[phút]	[M]
<VEGF> G6-31	$4,83 \times 10^6$	$9,33 \times 10^{-6}$	1237,8	$1,93 \times 10^{-12}$
<VEGF-Ang-2> TvAb6	$4,72 \times 10^6$	$7,24 \times 10^{-6}$	1596,7	$1,53 \times 10^{-12}$

Trong thử nghiệm khác nó được thể hiện bằng ELISA gắn kết ANG-2 nhờ sử dụng kháng thể phát hiện <hk>-POD (Biozol Catalogue No. 206005) như được mô tả ở trên là <VEGF-ANG-2> TvAb6 gắn kết với ANG-2 theo cách có thể so sánh với đặc tính động học của Mab536 với nồng độ đẳng mol là 0,039 pM (Fig. 6A). Điều này chứng tỏ rằng modul scFv của TvAb6 vẫn giữ được các đặc tính gắn kết trong cấu trúc TvAb.

Để xác thực thêm phát hiện này <ANG-2> Mab536 và <VEGF-ANG-2> TvAb6 được làm bất động bằng kháng thể sơ cấp trên chip Biacore CM5 và các động lực gắn kết với ANG-2 người được xác định. Do tính không đồng nhất của chế phẩm ANG-2 nên không có gắn kết 1:1 có thể được thấy; vì vậy các giá trị KD chỉ là các đánh giá

tương đối. Phân tích Biacore chứng tỏ rằng <VEGF-ANG-2> TvAb6 có giá trị KD dự đoán là 4,4 nM đối với ANG-2. Theo so sánh, Mab536 có giá trị KD dự đoán là 1.6 nM. Trong phạm vi sai số của phương pháp không có khác biệt về kiểu gắn kết và các ái lực giữa <ANG-2> Mab536 và <VEGF-ANG-2> TvAb6 có thể được thấy (Fig. 6B). Vì vậy, có thể kết luận rằng môđun scFv của TvAb6 duy trì hoàn các đặc tính gắn kết của nó trong cấu trúc TvAb.

Để xác nhận rằng <VEGF-ANG-2> TvAb6 có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2, các thử nghiệm ELISA liên kết cầu và thử nghiệm Biacore như mô tả ở trên được áp dụng.

Bằng cách áp dụng ELISA liên kết cầu VEGF-ANG-2 được mô tả ở trên, được chứng tỏ rằng chỉ <VEGF-ANG-2> TvAb6 có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 ở nồng độ đẳng mol là 0,625 pM trong khi các kháng thể IgG1 “chuẩn” đơn phân <ANG-2> Mab536 và <VEGF> G6-31 không có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 (Fig. 7).

Fig. 14 thể hiện thông số tương ứng từ thử nghiệm Biacore. Gắn kết đồng thời của cả hai kháng nguyên Ang-2 và VEGF có thể được thể hiện đối với kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-Ang-2> TvAb6. Các đối chứng âm tính là như mong đợi: kháng thể <Ang-2> Mab536 đơn phân thể hiện chỉ gắn kết với Ang-2, nhưng không gắn kết VEGF. Kháng thể đặc hiệu đơn <VEGF> G6-31 có gắn kết với VEGF nhưng không gắn kết với Ang-2 tại tất cả (thông số không thể hiện). Từ các đơn vị đáp ứng tương đối của kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn <VEGF-Ang-2> TvAb6 gắn kết với bề mặt bao Ang-2, và gắn kết tiếp theo với gắn kết VEGF hai phần, phép tính hệ số tỷ lệ có thể được tính toán để nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:1,4. Cũng như bằng cách ứng dụng các thử nghiệm ELISA và Biacore đã mô tả, chứng tỏ rằng chỉ <VEGF-Ang-2> TvAb6 có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 trong khi các kháng thể IgG1 “chuẩn” đặc hiệu đơn <Ang-2> Mab536 và <VEGF> G6-31 không có khả năng gắn kết đồng thời với VEGF và ANG-2 (Fig. 15).

Các kết quả tương tự thu được với các cấu trúc TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 trong thử nghiệm Biacore tương tự thể hiện trên Fig.15A. Gắn kết của các kháng thể với kháng nguyên, ví dụ ANG-2 người và VEGF được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt nhờ sử dụng thiết bị BIACORE

T100 (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Một cách vắn tắt, đối với các số đo ái lực các kháng thể đa dòng $\text{<hIgG-Fc\gamma>}$ được cố định CM4 nhờ kết hợp amin để biểu thị các kháng thể đặc hiệu kép kháng ANG-2 người và VEGF. Gắn kết được xác định trong chất đệm HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, pH 7,4), 25°C. ANG-2-His tinh khiết (các hệ R&D hoặc tinh chế tại nhà máy) được thêm vào với các nồng độ khác nhau giữa 6,25 nM và 200 nM trong dung dịch. Hằng số kết hợp được xác định bằng cách phun ANG-2 trong 3 phút; hằng số phân ly được xác định bằng cách rửa bề mặt chip với chất đệm HBS trong 3 phút và giá trị KD được dự tính nhờ sử dụng kiểu gắn kết 1:1 Langmuir. Do tính không đồng nhất của chế phẩm ANG-2 không có gắn kết 1:1 có thể được thấy; vì vậy các giá trị KD chỉ là các dự đoán tương đối.

VEGF (các hệ R&D) được thêm vào với các nồng độ khác nhau giữa 6,25 nM và 200 nM trong dung dịch. Hằng số kết hợp được xác định bằng cách phun VEGF trong 3 phút; hằng số phân ly được xác định bằng cách rửa bề mặt chip với chất đệm HBS trong 3 phút và giá trị KD được dự tính nhờ sử dụng kiểu gắn kết 1:1 Langmuir.

Thứ tự phun các đối tác gắn kết có thể thay đổi, trước tiên là VEGF và sau đó là Ang2 hoặc ngược lại.

Thông số đối chứng âm tính (ví dụ các đường cong chất đệm) được trừ từ các đường cong mẫu để hiệu chỉnh hệ độ lệch giới hạn thực chất hệ thống và để giảm tín hiệu tiếng ồn. Phần mềm đánh giá Biacore T100 version 1.1.1 được sử dụng để phân tích đồ thị các đáp ứng theo thời gian trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt và để tính toán thông số ái lực.

Kháng thể	Ái lực hAng-2	Ái lực hVEGF
TvAb-2441-bevacizumab-LC06	2,3 nM	0,35 nM
TvAb-2441-bevacizumab-LC08	0,7 nM	0,34 nM
G6-31	--	< 0,1 nM
MAb536	3 nM	--
bevacizumab	--	0,59 nM

Cuối cùng, gắn kết đồng thời của TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 có thể được chứng minh bằng cách ủ với ANGPT2 và

VEGF theo cách liên tục. Như thể hiện trên Fig. 15B ANGPT2 và VEGF có thể gắn kết đồng thời với các kháng thể đặc hiệu kép.

Ví dụ 3

Hiệu quả *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép hoá trị bốn làm ổn định bằng disulfua <VEGF-ANG-2> TvAb6 so với <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 và tổ hợp của Mab536 và G6-31 và kiểu mô ghép khác loài dưới da theo giai đoạn Colo205 ở kiểu chuột màu be Scid

<VEGF-ANG-2> TvAb6 làm ổn định bằng disulfua (n00.2331 xem Bảng 3) được so sánh với các kháng thể <ANG-2> Mab536, <VEGF> G6-31 và tổ hợp của <ANG-2> Mab536 và <VEGF> G6-31 trong hai thử nghiệm kiểu mô ghép khác loài dưới da Colo205 theo giai đoạn (Ang2_PZ_Colo205_003 và Ang2_PZ_Colo205_005) ở chuột cái màu be Scid với các liều khác nhau.

Kháng thể: <ANG-2> Mab536 được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc đông lạnh ($c = 4,5 \text{ mg/mL}$), <VEGF> G6-31 được cung cấp dưới dạng dung dịch đông lạnh ($c = 0,6 \text{ mg/mL}$) và <VEGF-ANG-2> TvAb6 được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc đông lạnh ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$) trong 20 mM Histidin, 140 mM NaCl, pH 6,0. Dung dịch kháng thể được pha loãng một cách thích hợp bằng PBS từ dung dịch gốc trước khi tiêm trong đó bắt buộc và PBS được sử dụng làm chất mang.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy: các tế bào ung thư ruột kết trực tràng Colo205 người trước tiên thu được từ ATCC và sau khi mở rộng được lưu giữ ở ngân hàng tế bào nội địa Roche Penzberg. Các dòng tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Lần cấy chuyển 2-5 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật: chuột cái màu be SCID; 4–5 tuần tuổi khi tới nơi (được mua của Charles River Germany) được giữ trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn đã được chấp nhận (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật thử nghiệm được giữ ở điều kiện cách ly trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được tiến hành theo nguyên tắc thông thường. Khẩu phần ăn kiêng

(Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá tới độ pH 2,5-3) được cung cấp tùy ý. Tuổi chuột khi bắt đầu nghiên cứu khoảng 10 tuần.

Theo dõi: Động vật được kiểm tra hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để theo dõi trong toàn bộ thử nghiệm, trọng lượng cơ thể động vật được dẫn chứng bằng số liệu và thể tích khối u được xác định bằng thước cặp theo giai đoạn.

Cấy tế bào khối u: vào ngày cấy, các tế bào Colo205 được rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS, nồng độ tế bào và kích cỡ tế bào được xác định nhờ sử dụng hệ thống máy đếm và phân tích tế bào (Vi-CELL, Beckman Coulter). Để cấy tế bào, các tế bào Colo205, A549, độ chuẩn cuối cùng được điều chỉnh tới $5,0 \times 10^7$ tế bào/ml, khả năng sống sót của tế bào là 90%. Tiếp theo 100 μ l hỗn hợp này tương ứng với $2,5 \times 10^6$ tế bào trên động vật được cấy vào sườn phải chuột.

Việc điều trị cho động vật được bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên, 16 ngày sau khi cấy ghép tế bào (thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_003) và 14 ngày sau khi cấy ghép tế bào (thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_005) với thể tích khối u trung bình tương ứng là 100 mm³ hoặc 150 mm³.

Phác đồ liều dùng cho đến ngày 74 (xem Fig 8A) của thử nghiệm

Ang2_PZ_Colo205_003:

Nhóm	Số lượng động vật	Hợp chất	Liều mg/kg	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy mg/kg
1	10	Chất dẫn		Tiêm trong màng bụng tuần/lần	4	
2	10	<VEGF> G6-31	6 mg/kg	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	8	48
3	10	<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	8	48
4	10	<VEGF> G6-31+	5 mg/kg +	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	8	40
		<ANG-2> Mab536	6 mg/kg	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	8	48
5	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	7 mg/kg	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	8	56

Trong thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_003 <VEGF-ANG-2> TvAb6 là liều không đủ do sơ suất về tỷ lệ đẳng mol. Liều <VEGF-ANG-2> TvAb6 được điều chỉnh trong thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_005 sao cho động vật nhận được tỷ lệ đẳng mol của các điểm gắn kết ANG-2 và VEGF bởi <VEGF-ANG-2> TvAb6 cũng như hỗn hợp của <VEGF> G6-31 và <ANG-2> Mab536.

Mức độ ức chế khối u cho tới ngày 74 (xem Fig 8a) thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_003:

<VEGF-ANG-2> TvAb6 với liều 7 mg/kg có hiệu quả có thể so sánh với hiệu quả của hỗn hợp <VEGF> G6-31 với 5 mg/kg và <ANG-2> Mab536 với 6 mg/kg và <VEGF> G6-31 làm chất đơn với liều 6 mg/kg (Fig. 8A) và tốt hơn chất đơn <ANG-2> Mab536 với liều 6 mg/kg. Do kiểu tiêm Colo205 dưới da là rất đáp ứng với kháng thể <VEGF> G6-31, kháng thể này phong bế VEGF người cũng như chuột tạo ra mức ức chế sự phát triển khối u hầu như hoàn toàn, vì vậy <VEGF-ANG-2> TvAb6 có thể được thấy là không thể khác biệt do G6-31 làm chất đơn (6 mg/kg) trong các điều kiện thử nghiệm đã chọn, trong khi <VEGF-ANG-2> TvAb6 thể hiện mức ức chế có thể so sánh như tổ hợp của <ANG-2> Mab536 và <VEGF> G6-31 với liều tích lũy thấp hơn rõ ràng (<VEGF-ANG-2> TvAb6 = 56 mg/kg kháng thể so với tổ hợp của <ANG-2> Mab536 và <VEGF> G6-31 = 40 + 48 = 88 mg/kg kháng thể).

Phác đồ liều dùng của thử nghiệm cho đến ngày 63 Ang2_PZ_Colo205_005:

Nhóm	Số lượng động vật	Hợp chất	Liều mg/kg	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy mg/kg
6	10	Chất dẫn		Tiêm trong màng bụng tuần/lần	6	
7	10	<VEGF> G6-31	3	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	7	21 mg/kg
8	10	<VEGF> G6-31+	3	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	7	21 mg/kg
		<ANG-2> Mab536	3	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	7	21 mg/kg
9	10	<ANG-2> Mab536	3	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	7	21 mg/kg
10	10	<VEGF-ANG-2> TvAb6	4	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	7	28 mg/kg

Mức độ ức chế khối u cho tới ngày 63 thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_005:

<VEGF-ANG-2> TvAb6 với liều 4 mg/kg có hiệu quả có thể so sánh với hiệu quả của hỗn hợp <VEGF> G6-31 và <ANG-2> Mab536 với mỗi liều 3 mg/kg và tốt hơn với hoặc chất đơn <VEGF> G6-31 cũng như <ANG-2> Mab536 với liều 3 mg/kg (Fig. 8B). Đây là ví dụ thứ nhất chứng tỏ rằng liều thấp hơn (với nồng độ của kháng thể tổng - liều tích lũy của tổ hợp là $21+21 = 42$ m/kg so với 28 mg/kg kháng thể đặc hiệu kép TvAb6) kháng thể đặc hiệu kép nhằm vào VEGF và ANG-2 có thể tạo ra hiệu quả chống u mạnh hơn so với với tổ hợp của các chất đơn tương ứng phong bế VEGF và ANG-2 và tốt hơn hoặc chất đơn.

Ví dụ 4

Phong bế quá trình hình thành ống do kích thích bởi VEGF

Để khẳng định rằng các hoạt tính liên quan kháng VEGF được giữ lại trong <VEGF-ANG-2> TvAb6 đặc hiệu kép hoá trị bốn được thể hiện trong thử nghiệm hình thành ống do kích thích bởi VEGF AngioKit TCS CellWorks (CellSystems) rằng mức ức chế sự hình thành u phụ thuộc liều do <VEGF-ANG-2> TvAb6 tạo ra có thể được so sánh với kháng thể đặc hiệu đơn <VEGF> G6-31. Thử nghiệm AngioKit TCS CellWorks được tiến hành theo quy trình dưới đây: Các tế bào được kích thích mỗi lần bằng 2 ng/ml VEGF trước khi điều trị bằng các kháng thể vào ngày 1, 4, 7 và 9. Các ống mạch được hiển thị bằng cách nhuộm các tế bào nội mô bằng kháng thể CD31-PE (BD Pharmingen #555446) vào ngày 11. Các hình ảnh được chụp với độ phóng đại 4x và các giá trị đối với độ dài ống và số lượng các điểm nhánh được phân tích định lượng nhờ sử dụng Angiogenesis Tube Formation Application Module trong MetaMorph (Molecular Devices). Các giá trị và độ lệch chuẩn được tính toán bằng các bản sao và phân tích 4 hình ảnh trên một mẫu. Fig. 9 thể hiện các kết quả tương ứng và Fig.10 A và B là phân tích định lượng. Angiotensin-2 không có ảnh hưởng đến sự hình thành ống và vì vậy sự ức chế ANG-2 không được nghiên cứu trong thử nghiệm này. Thông số chứng tỏ rằng các kháng thể <VEGF-ANG-2> TvAb6 đặc hiệu kép và <VEGF> G6-31 đặc hiệu đơn có hiệu quả ức chế sự hình thành ống được kích thích bởi VEGF như nhau.

Ví dụ 5

Quá trình phosphoryl hoá Tie2

Để khẳng định rằng các hoạt tính liên quan kháng ANGPT2 được giữ lại trong các kháng thể <VEGF-ANGPT2> đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08, nó được chứng minh rằng TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 cản trở quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 theo cách tương tự như các dòng vô tính gốc của chúng LC06 và LC08 trong thử nghiệm hoá phosphoryl Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 như được mô tả ở trên.

Trong thử nghiệm thứ nhất cả hai kháng thể đặc hiệu kép TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 có sự ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 phụ thuộc liều với các giá trị IC₅₀ so sánh được với của các dòng vô tính gốc LC06 và LC08 như được thể hiện trên Fig.16A. TvAb-2441-bevacizumab-LC06 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 721 ng/ml, trong khi LC06 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 508 ng/ml. TvAb-2441-bevacizumab-LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 364 ng/ml, trong khi LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ với giá trị IC₅₀ khoảng 499 ng/ml.

Trong thử nghiệm thứ hai cả hai kháng thể đặc hiệu kép TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 có sự ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 phụ thuộc liều với các giá trị IC₅₀ so sánh được với của các dòng vô tính gốc LC06 và LC08 được thể hiện trên Fig.16B. TvAb-2441-bevacizumab-LC06 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 488 ng/ml, trong khi LC06 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 424 ng/ml. TvAb-2441-bevacizumab-LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ khoảng 490 ng/ml, trong khi LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC₅₀ với giá trị IC₅₀ khoảng 399 ng/ml.

Cùng với các thông số đó chứng tỏ các kháng thể <VEGF-ANGPT2> đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 theo cách có thể so sánh với các dòng vô tính gốc của chúng LC06 và LC08 trong phạm vi sai số của thử nghiệm tế bào này.

Ví dụ 6

Quá trình ức chế huANG-2 gắn kết với Tie-2 (ELISA)

ELISA tương tác được tiến hành trên các đĩa vi chuẩn độ 384 giếng (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) RT. Sau mỗi bước ủ, các đĩa được rửa 3 lần bằng PBST. Các đĩa ELISA được bao 0,5 µg/ml Tie-2 protein (R&D Systems, UK, Cat.No.313-TI) trong ít nhất 2 giờ (h). Sau đó các giếng được phong bế bằng PBS có bổ sung 0,2% Tween-20 và 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) trong 1 h. Các dung dịch pha loãng chứa các kháng thể tinh khiết trong PBS được ủ cùng với 0,2 µg/ml huAngiopoietin-2 (R&D Systems, UK, Cat.No. 623-AN) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa, hỗn hợp gồm 0,5 µg/ml dòng vô tính biotin hoá kháng Angiopoietin-2 BAM0981 (R&D Systems, UK) và streptavidin HRP đã pha loãng với tỷ lệ 1:3000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, Cat.No.11089153001) được thêm vào trong 1 h. Sau đó các đĩa được rửa 6 lần bằng PBST. Các đĩa được mở rộng bằng chất phản ứng mới được điều chế ABTS (Roche Diagnostics GmbH, DE, chất đậm #204 530 001, các thẻ #11 112 422 001) trong 30 phút ở RT. Hệ số hấp thụ được xác định ở 405 nm.

Thông số tóm tắt đối với ELISA tương tác Ang2:

kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> (hoặc các kháng thể gốc đặc hiệu đơn)	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	hANG2	
<VEGF-ANG-2> G6_31	>20000	
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	75	39
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	66	31
TvAb-2441_bevacizumab_LC06	44	8
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	42	11
<ANG-2>Mab 536	15	8
<VEGF >Bevacizumab	>20000	

TvAb-3421_bevacizumab_LC06	31	1
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	35	17
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	46	10

Ví dụ 7

Quá trình ức chế hVEGF gắn kết với thụ thể hVEGF (ELISA)

Thử nghiệm được tiến hành trên các đĩa vi chuẩn độ 384 giếng (MicroCoat, DE, Cat.No. 464718) ở RT. Sau mỗi bước ủ, các đĩa được rửa 3 lần bằng PBST. Khi bắt đầu, các đĩa được bao 0,5 g/ml hVEGF-R protein (R&D Systems, UK, Cat.No.321-FL) trong ít nhất 2 giờ (h). Sau đó các giếng được phong bế bằng PBS có bổ sung 0,2% Tween-20 và 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) trong 1 h. Các dung dịch pha loãng chứa các kháng thể tinh khiết trong PBS được ủ cùng với 0,15 µg/ml huVEGF121 (R&D Systems, UK, Cat.No. 298-VS) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa, hỗn hợp gồm 0,5 µg/ml dòng vô tính Mab923 kháng VEGF (R&D Systems, UK) và IgG F(ab')₂ kháng chuột nhất kết hợp với peroxidaza cây cải ngựa (HRP) với tỷ lệ 1:2000 (GE Healthcare, UK, Cat.No.NA9310V) được thêm vào trong 1 h. Sau đó các đĩa được rửa 6 lần bằng PBST. Các đĩa được mở rộng bằng chất phản ứng mới được điều chế ABTS (Roche Diagnostics GmbH, DE, chất đậm #204 530 001, các thể #11 112 422 001) trong 30 phút ở RT. Hệ số hấp thụ được xác định ở 405 nm.

Thông số tóm tắt đối với ELISA tương tác VEGF:

Kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2>	AVG IC50 (ng/ml)	STDEV
	VEGF	
<VEGF-ANG-2> G6_31	1431	130
TvAb-2441_G6_31_Ang2i_LC06	1654	213
TvAb-2441_G6_31_Ang2k_LC08	1392	184
TvAb-2441_bevacizumab_LC06	2831	503
TvAb-2441_bevacizumab_LC08	2305	972
TvAb-<ANG-2>Mab 536	>20000	
TvAb-<VEGF>Bevacizumab	1584	357
TvAb-3421_bevacizumab_LC06	2660	284
TvAb-4421_bevacizumab_LC06	1980	1319
TvAb-4461_bevacizumab_LC06	1677	394

Ví dụ 8

Quá trình tăng sinh HUVEC

Để khẳng định rằng các hoạt tính liên quan kháng VEGF được giữ lại trong các kháng thể <VEGF-ANG2> đặc hiệu kép hoá trị bốn TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 nó được chứng minh rằng TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 ngăn cản quá trình tăng sinh HUVEC được kích thích bởi VEGF theo cách có thể so sánh được như các dòng vô tính gốc của chúng LC06 và LC08 trong thử nghiệm tăng sinh HUVEC được kích thích bởi VEGF như được mô tả ở trên.

Fig.18 thể hiện rằng thực vậy TvAb-2441-bevacizumab-LC06 và TvAb-2441-bevacizumab-LC08 ngăn cản theo cách phụ thuộc nồng độ quá trình tăng sinh HUVEC được kích thích bởi VEGF có thể so sánh được với kháng thể gốc bevacizumab.

Ví dụ 9

Thử nghiệm gắn kết ELISA với ANG-1 người và với ANG-2 người

Gắn kết của các kháng thể <ANG-2> gốc Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 và Ang2k-LC08 với ANG-1 người và ANG-2 người được xác định bằng ELISA gắn kết ANG-1 hoặc ANG-2 như được mô tả ở trên (xem gắn kết so sánh với ANG-1 và ANG-2 (ELISA gắn kết ANG-1 và ANG-2)). Một cách vắn tắt, thử nghiệm kiểu ELISA dựa vào quá trình làm bất động Angiopoietin-1 hoặc -2 người kiểu đại trong đĩa vi chuẩn độ. Gắn kết của kháng thể trực tiếp kháng ANG-1 hoặc ANG-2 đã làm bất động được xác định bằng kháng thể <human Fc> (kháng IgG) với thể tiếp hợp POD. Chuỗi pha loãng kháng thể <ANG-2> cho phép xác định nồng độ EC₅₀. Để tham khảo kháng thể người <ANG-2> kháng ANG-2 kháng thể Mab536 (Oliner et al., Cancer Cell. 2004 Nov;6(5):507-16, US 2006/0122370) được sử dụng. Các nồng độ xác định EC₅₀ được tóm tắt trong bảng dưới đây.

Kháng thể	Gắn kết hANG-1 EC ₅₀	Gắn kết hANG-2 EC ₅₀
<ANG-2>Mab536	2538 ng/mL	133 ng/mL
<ANG-2>Ang2i-LC06	> 8000 ng/mL	84 ng/mL
<ANG-2>Ang2i-LC07	> 8000 ng/mL	3006 ng/mL
<ANG-2>Ang2i-LC08	4044 ng/mL	105 ng/mL

Tất cả các kháng thể được gắn kết đặc hiệu với ANG-2. MAb536 và Ang2k-LC08 cũng thể hiện gắn kết với ANG-1, trong khi Ang2i-LC06 và Ang2i-LC07 không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 khi chúng có giá trị EC50-hơn 8000 ng/ml (giới hạn phát hiện).

Ví dụ 10

Quá trình biểu hiện & tinh chế các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640 và scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

Tương tự với các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và trong các chất và phương pháp nêu trên, các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hoá trị bốn scFab-Avastin-LC06-2620, scFab-Avastin-LC06-2640 và scFab-Avastin-LC06-2641, toàn bộ cả ba kháng thể này gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC06 được biểu hiện và tinh chế. Các ái lực gắn kết và các đặc tính khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan (cuối cùng được cải biến) của các kháng thể đặc hiệu kép được đưa ra bằng SEQ ID NO: 109 -110 (scFab-Avastin-LC06-2620), bằng SEQ ID NO: 111-112 (scFab-Avastin-LC06-2640) và bằng SEQ ID NO: 113-114 (scFab-Avastin-LC06-2641).

Thông số chính	scFab-Avastin-LC06-2620	scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640	scFab-Avastin-LC06-Ang2i-2641
Quá trình tinh chế (hiệu suất)	29 µg/mL	27 µg/mL	18 µg/mL
Quá trình tinh chế (hiệu suất, Prot. A. homog.)	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%
Tính đồng nhất sau SEC tuyển chọn	98%	98%	99%
Chức năng			
Ái lực hANG-2 (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
Ái lực hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

Ví dụ 11

Quá trình biểu hiện & tinh chế phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab

Tương tự với các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và trong các chất và phương pháp nêu trên, các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC06 được biểu hiện và tinh chế. Các ái lực gắn kết và các đặc tính khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan (cuối cùng được cải biến) của kháng thể đặc hiệu kép được đưa ra bằng SEQ ID NO: 115-117 (Avastin-LC06-KiH-C-scFab).

Thông số chính	Avastin-LC06-KiH-C-scFab
Quá trình tinh chế (hiệu suất)	15 µg/mL
Quá trình tinh chế (hiệu suất, Prot. A. homog.)	4,8 mg, 91%
Tính đồng nhất sau SEC tuyển chọn	97%
Chức năng	
Ái lực hANG-2 (Biacore)	4,4 E-9 M
Ái lực hVEGF (Biacore)	1 E-10 M

Ví dụ 12

Quá trình biểu hiện & tinh chế phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

Tương tự với các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và trong các chất và phương pháp nêu trên (cũng xem, phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC06 được biểu hiện và tinh chế. Các ái lực gắn kết và các đặc tính khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên. Các phân tử kháng thể đặc hiệu kép, hoá trị ba có định dạng này nói chung được mô tả trong EP Appl. No 09005108.7. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan (cuối cùng được cải biến) của kháng thể đặc hiệu kép này <VEGF-ANG-2> được đưa ra bằng SEQ ID NO: 118-120 (Avastin-LC06-C-Fab-6CSS).

Thông số chính	scFab-Avastin - LC06-2620	scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640	scFab-Avastin-LC06-Ang2i-2641
Quá trình tinh chế (hiệu suất)	29 µg/mL	27 µg/mL	18 µg/mL
Quá trình tinh chế (hiệu suất, Prot.	21 mg, 57%	19 mg, 86%	12 mg, 90%

A. homog.)			
Tính đồng nhất sau SEC tuyển chọn	98%	98%	99%
Chức năng			
Ái lực hANG-2 (Biacore)	1,9 E-9 M	1,8 E-9 M	1,9 E-9 M
Ái lực hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

Ví dụ 13

Quá trình biểu hiện & tinh chế các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL, Avastin-LC06-VH-VL và Avastin-LC06-VH-VL-SS

Tương tự với các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và trong các chất và phương pháp nêu trên, các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL, (trao đổi CH-CL như được mô tả trong WO 2009/080253), Avastin-LC06-VH-VL (trao đổi VH-VL như được mô tả trong WO 2009/080252) và Avastin-LC06-VH-VL-SS (trao đổi VH-VL như được mô tả trong WO 2009/080252 và liên kết cầu VH44 VL100 được đưa thêm vào) gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC06 được biểu hiện và tinh chế. Các ái lực gắn kết và các đặc tính khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan (cuối cùng được cải biến) của các kháng thể đặc hiệu kép này được đưa ra bằng SEQ ID NO: 121 -124 (Avastin-LC06-CH1-CL), bằng SEQ ID NO: 125 -128 (Avastin-LC06-VH-VL) và bằng SEQ ID NO: 129 -132 (Avastin-LC06-VH-VL-SS).

Thông số chính	Avastin-LC06-CM-CH1-CL	Avastin-LC06-CM-VH-VL	Avastin-LC06-VH-VL-SS
Quá trình tinh chế (hiệu suất)	87 µg/mL	44 µg/mL	65 µg/mL
Quá trình tinh chế (hiệu suất, Prot. A. homog.)	50 mg, 62%	22 mg, 95%	91 mg, 74%
Tính đồng nhất sau SEC tuyển chọn	84%	>99%	95%
Chức năng			
Ái lực hANG-2 (Biacore)	1,3 E-9 M	2,1 E-9 M	1,46 E-9 M
Ái lực hVEGF (Biacore)	1 E-10 M	1E-10 M	1E-10 M

Ví dụ 14

Quá trình biểu hiện & tinh chế các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFab và Avastin-LC06-N-scFabSS

Tương tự với các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và trong các chất và phương pháp nêu trên, các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFab và Avastin-LC06-N-scFabSS gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC06 được biểu hiện và tinh chế. Các ái lực gắn kết và các đặc tính khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên. Các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên quan của các kháng thể đặc hiệu kép này được đưa ra bằng SEQ ID NO: 133-134 (Avastin-LC06-N-scFab), và bằng SEQ ID NO: 135 -136 (Avastin-LC06-N-scFabSS).

Thông số chính	Avastin-LC06-N-scFab	Avastin-LC06-N-scFabSS
Quá trình tinh chế (hiệu suất)		62 µg/mL
Quá trình tinh chế (hiệu suất, Prot. A. homog.)		43%
Chức năng		
Ái lực hANG-2 (Biacore)		1 nM
Ái lực hVEGF (Biacore)		1 nM

Ví dụ 15

Quá trình ức chế hVEGF gắn kết với Thụ thể hVEGF (ELISA), phong bế quá trình hình thành ống được kích thích bởi VEGF, quá trình ức chế huANG-2 gắn kết với Tie-2 (ELISA), quá trình phosphoryl hoá Tie2, và quá trình tăng sinh HUVEC của các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép của các Ví dụ từ 10 đến 14

Quá trình ức chế hVEGF gắn kết với Thụ thể hVEGF (ELISA), Phong bế quá trình hình thành ống được kích thích bởi VEGF, quá trình ức chế huANG-2 gắn kết với Tie-2 (ELISA), quá trình phosphoryl hoá Tie2, và quá trình tăng sinh HUVEC của các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép của các Ví dụ từ 10 đến 14 có thể được tiến hành tương tự với các quy trình được mô tả trong Các chất và các Phương pháp và các Ví dụ từ 4 đến 9 nêu trên.

Ví dụ 16

Hiệu quả *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép kháng thể <VEGF-ANG-2> so với <ANG-2> ANG2i-LC06, và tổ hợp của <ANG-2> ANG2i-LC06 và Avastin trong kiểu mô ghép khác loài khó chữa Colo205 ở chuột màu be Scid (sau khi kháng lại việc điều trị bằng bevacizumab (Avastin))

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy:

Các tế bào ung thư ruột kết trực tràng Colo205 người trước tiên thu được từ ATCC và sau khi mở rộng được lưu giữ ở ngân hàng tế bào nội địa Roche Penzberg. Các dòng tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Lân cấy chuyển 2-5 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật:

Chuột cái màu be SCID; 4–5 tuần tuổi khi tới nơi (được mua của Charles River Germany) được giữ trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn đã được chấp nhận (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật được giữ ở điều kiện cách ly trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khoẻ liên tục được tiến hành theo nguyên tắc thông thường. Khẩu phần ăn kiêng (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá tới độ pH 2,5-3) được cung cấp tuỳ ý. Tuổi chuột khi bắt đầu nghiên cứu khoảng 10 tuần.

Cấy tế bào khối u:

Vào ngày tiêm, các tế bào khối u được thu gom (trypsin-EDTA) từ các bình nuôi cấy (Greiner) và chuyển vào 50 ml môi trường nuôi cấy, được rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS và lọc (bộ lọc tế bào; Falcon Ø 100 µm) độ chuẩn tế bào cuối cùng được điều chỉnh tới $2,5 \times 10^7$ /ml. Huyền phù tế bào khối u được trộn kỹ với pipet chuyển để tránh kết tụ tế bào. Sau đó, huyền phù tế bào được làm đầy vào bơm tiêm tuberculin dung tích 1,0 ml (Braun Melsungen) nhờ sử dụng kim to (1,10 x 40 mm); để tiêm cỡ kim được thay đổi (0,45 x 25 mm) và mỗi lần

tiêm một kim mới được sử dụng. Việc gây mê được tiến hành nhờ sử dụng máy xông Stephens động vật thử nghiệm nhỏ với buồng ủ trước (plexiglas), mặt nạ mũi chuột riêng biệt (silicon) và không có hợp chất gây mê dễ cháy hoặc dễ nổ Isoflurane (cp-pharma) trong hệ thống tuần hoàn đóng kín. Hai ngày trước khi tiêm, lông của động vật được cạo và đối với vùng da cấy tế bào của động vật thử nghiệm đã gây mê được nâng lên cẩn thận bằng kẹp giải phẫu và 100 μ l huyền phù tế bào ($= 2,5 \times 10^6$ tế bào) được tiêm dưới da vào sườn phải của động vật thử nghiệm.

Việc điều trị cho động vật:

Việc điều trị cho động vật được bắt đầu 14 ngày sau khi cấy ghép (thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_008) với thể tích khối u trung bình tương ứng là 100 mm³ hoặc 150 mm³. Chuột được điều trị tuần một lần bằng Avastin (10 mg/kg) trong khoảng 5 tuần.

Lần điều trị thứ hai:

Sau đó chuột được ngẫu nhiên hoá để điều trị lần thứ hai và chia thành bốn nhóm mỗi nhóm 10 con. Thể tích khối u lúc bắt đầu điều trị lần thứ hai vào ngày 51 khoảng từ 336 đến 341 mm³. Chuột được điều trị tuần một lần bằng cách tiêm trong màng bụng các hợp chất khác nhau như thể hiện trong bảng dưới đây:

Nhóm	Số lượng động vật	Hợp chất	Liều mg/kg (nMol/kg)	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy (mg/kg)
11	10	Avastin	10 mg/kg (68 nMol/kg)	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	11	110
12	10	ANG2i-LC06	10 mg/kg (68 nMol/kg)	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	6	60
13	10	ANG2i-LC06 +	10 mg/kg (68 nMol/kg)	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	6	60
		Avastin	10 mg/kg (68 nMol/kg)	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	11	110
14	10	TvAb-2441-bevacizumab-LC06	13 mg/kg (64 nMol/kg)	Tiêm trong màng bụng tuần/lần	6	78

Theo dõi:

Động vật được kiểm tra 2x mỗi tuần về tình trạng sức khoẻ của chúng. Trọng lượng cơ thể động vật được dẫn chứng bằng số liệu 2x mỗi tuần sau khi cấy tế bào. Các kích thước khối u được xác định bằng thước cặp bắt đầu ngày theo giai đoạn và sau đó 2 lần mỗi tuần trong toàn thời gian điều trị. Thể tích khối u được tính toán theo phương pháp NCI (trọng lượng khối u = $1/2ab^2$, trong đó “a” và “b” tương ứng là đường kính dài và ngắn của khối u). Chỉ tiêu cuối là khối lượng khối u giới hạn (tối 1,7 g hoặc $\varnothing > 1,5$ cm), mức giảm trọng lượng cơ thể nhiều hơn 20% so với gốc, vết loét khối u hoặc tình trạng chung kém.

Kết quả: mức ức chế sự phát triển khối u dựa vào các động mạch giữa dây thần kinh
(theo phần trăm) tại ngày 91

ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nMol/kg) tiêm trong màng bụng; Avastin 10 mg/kg (68 nMol/kg) tiêm trong màng bụng.	TGI
ANG2i-LC06 10 mg/kg (68 nMol/kg) tiêm trong màng bụng; Avastin 10 mg/kg (68 nMol/kg) tiêm trong màng bụng	45,3
ANG2i-LC06 10 mg/kg tiêm trong màng bụng (68 nMol/kg)	44,4
TvAb-2441-bevacizumab-LC06_13 mg/kg tiêm trong màng bụng (64 nMol/kg)	60,4

Kết quả chứng tỏ rằng kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06 có hiệu quả ức chế khối u cao hơn (với các mức liều thấp hơn) trong kiểu u ghép mô khác loài Colo205 kháng bevacizumab(Avastin) ở chuột màu be Scid so với việc điều trị chỉ bằng kháng thể ANG2i-LC06 đặc hiệu đơn hoặc tổ hợp của ANG2i-LC06 và Avastin.

Ví dụ 17

Quá trình ức chế *in vivo* sự hình thành mạch khối u trong kiểu mô ghép khác loài s.c. Calu-3 NSCLC

- Phát hiện nhờ hình ảnh hình thành mạch không xâm lấn *in vivo* bằng cách sử dụng kháng CD31 đánh dấu bằng

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy:

Dòng tế bào ung thư tuyến phổi người lấy từ đàn ông Cáp-ca bị bệnh ung thư phổi. Các tế bào thu được từ Roche, Kamakura và được cấy chuyển trong nhà máy cho ngân hàng xử lý tế bào. Các tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Việc cấy chuyển 2-5 được thực hiện với trypsin/EDTA 1x (PAN) phân cắt một lần/tuần.

Động vật:

Chuột trụi cái BALB/c; 4–5 tuần tuổi khi tới nơi (được mua của Charles River Germany) được giữ trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn đã được chấp nhận (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật được giữ ở điều kiện cách ly trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khoẻ liên tục được tiến hành theo nguyên tắc thông thường. Khẩu phần ăn kiêng (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá tới độ pH 2,5-3) được cung cấp tuỳ ý. Tuổi chuột khi bắt đầu nghiên cứu khoảng 10 tuần.

Cấy tế bào khối u:

Vào ngày tiêm, các tế bào khối u được thu gom (trypsin-EDTA) từ các bình nuôi cấy (Greiner) và chuyển vào 50 ml môi trường nuôi cấy, được rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS và lọc (bộ lọc tế bào; Falcon Ø 100 µm) độ chuẩn tế bào cuối cùng được điều chỉnh tới $5,0 \times 10^7$ /ml. Huyền phù tế bào khối u được trộn kỹ với pipet chuyển để tránh kết tụ tế bào. Sau đó, huyền phù tế bào được làm đầy vào bơm tiêm tuberculin dung tích 1,0 ml (Braun Melsungen) nhờ sử dụng kim to (1,10 x 40 mm); để tiêm cỡ kim được thay đổi (0,45 x 25 mm) và mỗi lần tiêm một kim mới được sử dụng. Việc gây mê được tiến hành nhờ sử dụng máy xông Stephens cho động vật nhỏ với buồng ủ trước (plexiglas), mặt nạ mũi chuột riêng biệt (silicon) và không có hợp chất gây mê dễ cháy hoặc dễ nổ Isoflurane (cp-pharma) trong hệ thống tuần hoàn đóng kín. Hai ngày trước khi tiêm, lông của động vật thử nghiệm được cạo và đối với vùng da cấy tế bào của động vật thử nghiệm đã gây mê

được nâng lên cẩn thận bằng kẹp giải phẫu và 100 μ l huyền phù tế bào ($= 5,0 \times 10^6$ tế bào) được cấy dưới da vào sườn phải của động vật thử nghiệm.

Điều trị cho động vật thử nghiệm:

Vào ngày thử nghiệm thứ 35, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm theo thống kê một cách hợp lý, tùy thuộc vào trọng lượng cơ thể và kích thước khối u của chúng. Để điều trị bằng các kháng thể chữa bệnh, mỗi nhóm gồm 10 con và điều trị bằng các kháng thể chữa bệnh tuần một lần bằng cách tiêm trong màng bụng trong thời gian 6 tuần. (xem Fig 19)

Nhóm 1: chất dẫn (Xolair) 10 mg/kg

Nhóm 2: Avastin 10 mg/kg

Nhóm 3: kết hợp <VEGF> Avastin đặc hiệu đơn 10 mg/kg cùng với <ANG-2> Ang2i-LC06 đặc hiệu đơn 10 mg/kg (= Avastin / Ang2i-LC06)

Nhóm 4: kháng thể <VEGF-ANG-2> 2441-Avastin-scFv-LC06 đặc hiệu kép 13,3 mg/kg

Theo dõi:

Động vật thử nghiệm được kiểm tra 2x mỗi tuần về tình trạng sức khỏe của chúng. Trọng lượng cơ thể động vật thử nghiệm được dẫn chứng bằng số liệu 2x mỗi tuần sau khi cấy tế bào. Các kích thước khối u được xác định bằng thước cặp bắt đầu ngày theo giai đoạn và sau đó 2 lần mỗi tuần trong toàn thời gian điều trị. Thể tích khối u được tính toán theo phương pháp NCI (trọng lượng khối u $= 1/2ab^2$, trong đó “a” và “b” tương ứng là đường kính dài và ngắn của khối u). Chỉ tiêu cuối là khối lượng khối u giới hạn (tối 1,7 g hoặc $\varnothing > 1,5$ cm), mức giảm trọng lượng cơ thể nhiều hơn 20% so với gốc, vết loét khối u hoặc tình trạng chung kém.

Theo dõi mạch máu và sự hình thành mạch bằng kháng thể đánh dấu kháng CD 31

Các thử nghiệm sơ bộ phát hiện rằng kháng thể kháng CD31 là tác nhân tốt nhất để tạo ảnh hệ mạch khối u. Tác nhân này nhằm vào các thụ thể nội mô chuột CD31 và làm hiện hình các mạch máu đơn với tỷ lệ tín hiệu trên nền thấp. Vì vậy, việc tạo ảnh cho kháng thể kháng CD31 là cách khả thi để tạo ảnh hệ mạch khối u. Ba con chuột của từng nhóm điều trị được chọn và tiêm trong tĩnh mạch 50 μ g/chuột kháng thể kháng CD3 đánh dấu cộng hoá trị bằng nhóm huỳnh quang hữu cơ Alexa610 vào ngày

35, 49 và 79. Việc tạo ảnh gần hồng ngoại được tiến hành 24 giờ sau mỗi lần sử dụng kháng thể đánh dấu trong khi gây mê bằng cách xông. Việc tăng hoặc giảm hệ mạch khối u được làm hiện hình bằng cách sử dụng công cụ ảnh so sánh của hệ MAESTRO. Trong khi điều trị bằng đối chứng mab Xolair và kháng thể chữa bệnh Avastin, mức gia tăng các mạch máu khối u từ ngày 35 đến ngày 79 được quan sát thấy. Trái lại, việc điều trị kết hợp bằng Avastin cùng với Ang2i-LC06 và 2441-Avastin-scFv-LC06 làm giảm hệ mạch khối u (Fig 19).

Các vùng khối u được xác định khối lượng bằng các diện tích số đo bản vẽ bằng tay và các cường độ tín hiệu được đánh giá theo các giá trị cường độ (tín hiệu tổng/thời gian tiếp xúc). Các thay đổi trung bình của các tín hiệu CD31 từ ngày 35 đến ngày 49 và từ ngày 49 đến 79 được vẽ đồ thị trên Fig19. Tất cả các nhóm điều trị thể hiện mức gia tăng hệ mạch khối u từ ngày 35 đến ngày 49. Trong khi các tín hiệu khối u CD31 tăng nhanh chắc chắn ở nhóm 1 (Xolair) và nhóm 2 (Avastin), hệ mạch khối u giảm đáng kể ở nhóm 3 (tổ hợp của Avastin cùng với <ANG-2> Ang2i-LC06) và nhóm 4 (kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép 2441-Avastin-scFv-LC06), với nhóm 4 thể hiện rõ ràng hiệu quả chống tạo mạch mạnh mẽ nhất (Fig 19).

Ngay sau các thử nghiệm tạo ảnh *in vivo* cuối cùng, các khối u được cấy mô (ngày 79), cố định bằng formalin và gắn vào parafin cho các thử nghiệm *ex vivo*. Phương pháp hiển vi huỳnh quang thể hiện nhiều mao mạch được xác định rõ trong các khối u được điều trị mab Xolair đối chứng. Một số mạch máu khối u được thấy ở chuột điều trị Avastin. Ngược lại, các nhóm điều trị 3 và 4 có các mạch máu được xác định ít và kém hơn đáng kể ở các khối u so với các nhóm điều trị 1 và 2 trong khi nhóm 4 thể hiện hiệu quả dễ thấy nhất. Nhóm 4 có mật độ vi mạch thấp hơn, các mao mạch thường nhỏ hơn và không cấu trúc và chúng có các tín hiệu huỳnh quang kháng CD31 yếu hơn so với Nhóm 1, 2 và 3. Nhuộm HE hoá học mô thể hiện các vùng hoại tử trong khối u lên đến 90% ở nhóm điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép của nhóm 4 mà cũng đã thể hiện trước.

Ví dụ 18

Hiệu quả *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> và so với các kháng thể gốc đặc hiệu đơn (riêng biệt hoặc kết hợp) trong kiểu mô ghép khác loài Colo205 dưới da theo giai đoạn ở chuột màu be Scid

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy:

Dòng tế bào ung thư ruột kết trực tràng người thu được từ ATCC và sau khi mở rộng được lưu giữ ở ngân hàng tế bào nội địa Roche Penzberg. Các dòng tế bào khối u thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2 mM L-glutamin, ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Làn cấy chuyển 2-5 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật:

Chuột cái màu be SCID; 4–5 tuần tuổi khi tới nơi (được mua của Charles River Germany) được giữ trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn đã được chấp nhận (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi động vật thử nghiệm được giữ ở điều kiện cách ly trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khoẻ liên tục được tiến hành theo nguyên tắc thông thường. Khẩu phần ăn kiêng (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hoá tới độ pH 2,5-3) được cung cấp tuỳ ý. Tuổi chuột khi bắt đầu nghiên cứu khoảng 10 tuần.

Cấy tế bào khối u:

Vào ngày cấy, các tế bào Colo205 được làm ly tâm, rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS, nồng độ tế bào và kích cỡ tế bào được xác định nhờ sử dụng hệ thống máy đếm và phân tích tế bào (Vi-CELL, Beckman Coulter). Để cấy các tế bào Colo205, độ chuẩn cuối cùng được điều chỉnh tới $5,0 \times 10^7$ tế bào/ml, khả năng sống sót của tế bào là 90%. Tiếp theo 100 µl huyền phù này tương ứng với $2,5 \times 10^6$ tế bào trên động vật thử nghiệm được cấy dưới da vào sườn phải chuột.

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm được bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên, 16 ngày sau khi cấy ghép tế bào (thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_009)) với thể tích khối u trung bình tương ứng là 100 mm³.

Phác đồ liều dùng của thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_009:

Số lượng động vật	Hợp chất	Liều mg/kg	Chu trình/ cách sử dụng
10	Xolair	10	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	<VEGF > Avastin	10	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	< ANG-2> Ang2i-LC06		Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	Ang2i-LC06	10	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
	+ Avastin	10	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	13,3	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- CH1-CL	20	Tiêm trong màng bụng tuần/lần
10	<VEGF-ANG-2> scFAB-Avastin-LC06-2620	16,6	Tiêm trong màng bụng tuần/lần

Theo dõi:

Động vật thử nghiệm được kiểm tra 2x mỗi tuần về tình trạng sức khỏe của chúng. Trọng lượng cơ thể động vật thử nghiệm được dẫn chứng bằng số liệu 2x mỗi tuần sau khi cấy tế bào. Các kích thước khối u được xác định bằng thước cặp bắt đầu ngày theo giai đoạn và sau đó 2 lần mỗi tuần trong toàn thời gian điều trị. Thể tích khối u được tính toán theo phương pháp NCI (trọng lượng khối u = $1/2ab^2$, trong đó “a” và “b” tương ứng là đường kính dài và ngắn của khối u). Chỉ tiêu cuối là khối lượng khối u giới hạn (tới 1,7 g hoặc $\varnothing > 1,5$ cm), mức giảm trọng lượng cơ thể nhiều hơn 20% so với gốc, vết loét khối u hoặc tình trạng chung kém.

Kết quả:

Mức ức chế sự phát triển khối u dựa vào các động mạch giữa dây thần kinh (theo phần trăm) tại ngày 61 median

	TGI
<VEGF > Avastin	66
< ANG-2> Ang2i-LC06	47

Ang2i-LC06 + Avastin	78
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06	87
<VEGF-ANG-2> Avastin-LC06- CH1-CL	92
<VEGF-ANG-2> scFab-Avastin-LC06-2620	86

Các kết quả chứng tỏ rằng ba kháng thể đặc hiệu kép <VEGF-ANG-2> Avastin (bevacizumab)-ANG2i-LC06 (tất cả gốc từ các trình tự bevacizumab SEQ ID No: 7 và 8 và gốc từ các trình tự ANG2i-LC06 SEQ ID No: 52 và 53) có hiệu quả ức chế khối u cao hơn trong kiểu khối u mô ghép khác loài Colo205 ở chuột màu be Scid so với việc điều trị chỉ bằng các kháng thể ANG2i-LC06 đặc hiệu đơn hoặc tổ hợp của ANG2i-LC06 và Avastin.

Ví dụ 19

Quá trình biểu hiện & tinh chế và các đặc tính của các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 và scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL và Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab và Avastin-LC10-N-scFabSS

Bằng cách thay thế các miền VH và VL của Ang2i-LC06 (SEQ ID No: 52 và 53) với các miền VH và VL tương ứng của Ang2i-LC10 (SEQ ID No: 84 và 85) và sử dụng các quy trình tương tự (trừ thay thế này) và các trình tự được mô tả trong Ví dụ 10 đến 14, các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 và scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL và Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab và Avastin-LC10-N-scFabSS, tất cả gốc từ <VEGF> bevacizumab và <ANG-2> Ang2i-LC10 được biểu hiện và tinh chế.

Ái lực gắn kết và các đặc tính *in vitro* khác được xác định như được mô tả trong các Ví dụ nêu trên.

Ví dụ 20

Hiệu quả *in vivo* của các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 và scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL và Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab và Avastin-LC10-N-scFabSS.

Hiệu quả *in vivo* của các phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép scFab-Avastin-LC10-2620, scFab-Avastin-LC10-2640 và scFab-Avastin-LC10-2641, Avastin-LC10-KiH-C-scFab, Avastin-LC10-C-Fab-6CSS, Avastin-LC10-CH1-CL, Avastin-LC10-VH-VL và Avastin-LC10-VH-VL-SS, Avastin-LC10-N-scFab và Avastin-LC10-N-scFabSS được xác định theo cách tương tự với các Ví dụ tương ứng nêu trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu với nhân tố sinh trưởng nội mô mạch người (VEGF) và angiopoietin-2 người (ANG-2) bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với VEGF người và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 người,

trong đó:

i) các điểm gắn kết kháng nguyên này là từng cặp của miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể và miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể;

ii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất này gắn kết đặc hiệu với VEGF bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 3 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 6 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ;

iii) điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai này gắn kết đặc hiệu với ANG-2 bao gồm vùng CDR3 của SEQ ID NO: 46, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 47, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 48 ở miền biến đổi chuỗi nặng, và vùng CDR3 của SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 51 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ; và

iv) kháng thể này có hóa trị hai.

2. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, khác biệt ở chỗ tỷ lệ của các ái lực gắn kết KD của điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với VEGF)/KD của điểm gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với ANG-2 là từ 1,0 đến 10,0.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, khác biệt ở chỗ điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với ANG-2 ngòai không gắn kết đặc hiệu với Angiopoetin 1 người (ANG-1).

4. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo các điểm từ 1 đến 3.

5. Axit nucleic mã hoá kháng thể đặc hiệu kép theo các điểm từ 1 đến 3.

6. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 5 có khả năng biểu hiện axit nucleic đã nêu trong tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình.
7. Tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình chứa vector theo điểm 6.
8. Phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép theo các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở bước biểu hiện axit nucleic theo điểm 5 trong tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình và thu hồi kháng thể đặc hiệu kép này từ tế bào hoặc dịch nổi nuôi cấy tế bào.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG VEGF/KHÁNG ANG-2 VÀ PHƯƠNG PHÁP
TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 25401 FT

<150> EP 08017607.6

<151> 2008-10-08

<150> EP 08021834.0

<151> 2008-12-16

<160> 136

<170> PatentIn phiên bản 3.2

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <VEGF>bevacizumab

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <VEGF>bevacizumab

<400> 2

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

Arg

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR1, <VEGF>bevacizumab

<400> 3

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>bevacizumab

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>bevacizumab

<400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>bevacizumab

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miễn biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>bevacizumab

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

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

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

<220>
<223> miền biển đổi chuỗi năng, <VEGF>bevacizumab

$\langle 400 \rangle$ 8

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

<210>	9
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> chuỗi nặng CDR3, <VEGF>ranibizumab

<400> 9

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

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <VEGF>ranibizumab

<400> 10

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

Arg

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR1, <VEGF>ranibizumab

<400> 11

His	Tyr	Gly	Met	Asn
1				5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>ranibizumab

<400> 12

Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>ranibizumab

<400> 13

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>ranibizumab

<400> 14

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

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>ranibizumab

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF>ranibizumab

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 17

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

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 18

Gly	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 19

<211> 5

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 19

Asp Tyr Trp Ile His
 1 5

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

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 20

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 21

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>HuMab G6-31

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 23

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

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF> HuMab G6-31

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 25

Asp	Leu	Leu	Asp	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Gly	Tyr
1				5					10			

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Mab 536

<400> 26

Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 27

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Mab 536

<400> 28

Met	Gln	Gly	Thr	His	Trp	Pro	Pro	Thr
1				5				

<210> 29

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Mab 536

<400> 29

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Mab 536

<400> 30

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Mab 536

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Gly Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Mab 536

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> (G4S)4 cầu nối

<400> 33

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

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 34
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

<210> 35
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

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

<210> 36
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 38

Asp	Leu	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Val
1				5		

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 39

Arg	Ile	Lys	Ser	Lys	Thr	Asp	Gly	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro
1				5					10					15	

Val Lys Gly

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 40

Asn Ala Trp Met Ser

1 5

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 41

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 42

His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 43

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

<210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
 <400> 44

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

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

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

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

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 110

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 46

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

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 47

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

Gly

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 48

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 49

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

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 50

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 51

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

<210> 52

<211> 129

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 53

<211> 110
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC06

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 54

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

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 55

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

1 5 10 15

Gly

<210> 56
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 56

Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 57

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

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 58

Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 59

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

<210> 60
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 60

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

<210> 61
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC07

<400> 61

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

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

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 62

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

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 63

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 64

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 65

Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	Pro	Val
1				5					10	

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 66

Asn	Asn	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

<400> 67

Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Asn
1				5					10			

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 68

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

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

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

Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	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 Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

<210> 69

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2k_LC08

<400> 69

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

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

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 70

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 71

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 71

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 72

Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 73

Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
 1 5

<210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 74

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 75
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 75

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp
1				5					10					15	

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 76

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

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

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

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

Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75				80	

Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	

Tyr	Cys	Thr	Thr	Asp	Leu	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Val	Trp	Gly	Ser	Pro	Gly
			100					105					110		

Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
						115

<210> 77

<211> 109

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 77

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

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

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 78

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

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 79

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

Gly

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 80

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 81

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

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 82

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 83

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

<210> 84

<211> 129

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 84

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

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

Ser

<210> 85
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2i_LC10

<400> 85

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

<210> 86

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 86

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

<210> 87
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 87

Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10				15		

Gly

<210> 88
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 88

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1			5	

<210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 89

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

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 90

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 91

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

<210> 92

<211> 124

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC11

<400> 92

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

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

Arg Ile Thr
15

Tyr Gln Gln
30

Ser Asp Arg

Gly Asn Thr

Ala Asp Tyr
80

Val Phe Gly
95

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <VEGF>B20-4.1

<400> 95

Ala	Ile	Trp	Pro	Phe	Gly	Gly	Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR1, <VEGF>B20-4.1

<400> 96

Phe	Ser	Ile	Asn	Gly	Ser	Trp	Ile
1				5			

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR3, <VEGF>B20-4.1

<400> 97

Gln	Gln	Ser	Asn	Thr	Ser	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR2, <VEGF>B20-4.1

<400> 98

Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5			

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CDR1, <VEGF>B20-4.1

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Val Ile Arg Arg Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 100

<211> 117

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <VEGF>B20-4.1

<400> 100

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn Gly Ser
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Trp Pro Phe Gly Gly Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gln Gly Thr Leu Val
 115

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <VEGF>B20-4.1

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

<210> 102

<211> 730

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng peptit dung hợp Ang2i_LC06 scFv chuỗi nặng
bevacizumab của <VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC06

<400> 102

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
 465 470 475 480
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 485 490 495
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln
 500 505 510
 Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser
 515 520 525
 Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr
 530 535 540
 Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg
 545 550 555 560
 Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr
 565 570 575
 Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 580 585 590
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro
 610 615 620
 Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala
 625 630 635 640
 Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp
 645 650 655
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp
 660 665 670
 Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 675 680 685
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
 690 695 700
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
 705 710 715 720
 Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 725 730

<210> 103
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Ang2i_LC08 scFv peptit dung hợp chuỗi nặng bevacizumab của
<VEGF-ANG-2> TvAb-2441-bevacizumab-LC08

<400> 103

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

275		280		285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				
290		295		300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu				
305		310		315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala				
		325		330
				335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro				
		340		345
				350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln				
		355		360
				365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
		370		375
				380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
		385		390
				395
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
		405		410
				415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser				
		420		425
				430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser				
		435		440
				445
Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly				
		450		455
				460
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser				
		465		470
				475
Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala				
		485		490
				495
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln				
		500		505
				510
Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly				
		515		520
				525
Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser				
		530		535
				540
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg				
		545		550
				555
Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Thr Leu Asp Ile				
		565		570
				575
Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr				

580 585 590
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro
 610 615 620
 Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser
 625 630 635 640
 Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln
 645 650 655
 Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg
 660 665 670
 Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser
 675 680 685
 Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 690 695 700
 Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Cys
 705 710 715 720
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 725

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ của bevacizumab

<400> 104

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 105

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 106

<211> 504

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> angiopoietin-2 người (ANG-2) với đoạn dẫn đầu và His-tag

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser

195				200				205							
Ile	Lys	Glu	Glu	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Gln	Asn
	210					215					220				
Ser	Ile	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Asn
225					230					235					240
Asn	Ser	Val	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	His	Asp	Leu	Met	Glu	Thr	Val	Asn
				245					250					255	
Asn	Leu	Leu	Thr	Met	Met	Ser	Thr	Ser	Asn	Ser	Ala	Lys	Asp	Pro	Thr
			260					265					270		
Val	Ala	Lys	Glu	Glu	Gln	Ile	Ser	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe
		275					280					285			
Lys	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Tyr	Cys	Asp	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly
305					310					315					320
Gly	Trp	Thr	Ile	Ile	Gln	Arg	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln
				325					330					335	
Arg	Thr	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu
			340					345					350		
Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg
		355					360					365			
Tyr	Val	Leu	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr
	370					375					380				
Ser	Leu	Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg
385					390					395					400
Ile	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile
				405					410					415	
Ser	Gln	Pro	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Asp	Asn	Asp	Lys
			420					425					430		
Cys	Ile	Cys	Lys	Cys	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp
		435					440					445			
Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln
	450					455					460				
Asn	Thr	Asn	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ser
465					470					475					480
Gly	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Asp	Phe
				485					490					495	
Ser	Gly	His	His	His	His	His	His								

500

<210> 107

<211> 506

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> angiopoietin-1 người (ANG-1) với đoạn dẫn đầu và His-tag

<400> 107

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```


Thr	Thr	Asn	Asn	Ser	Val	Leu	Gln	Lys	Gln	Gln	Leu	Glu	Leu	Met	Asp	
				245					250					255		
Thr	Val	His	Asn	Leu	Val	Asn	Leu	Cys	Thr	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	
			260					265					270			
Lys	Gly	Gly	Lys	Arg	Glu	Glu	Glu	Lys	Pro	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Asp	
		275					280					285				
Val	Tyr	Gln	Ala	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Ile	
	290					295					300					
Asn	Asn	Met	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Phe	Cys	Asn	Met	Asp	Val	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Gly	Gly	Trp	Thr	Val	Ile	Gln	His	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Asp	
				325					330					335		
Phe	Gln	Arg	Gly	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Met	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	
			340					345					350			
Gly	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Ile	Phe	Ala	Ile	Thr	Ser	Gln	
		355					360					365				
Arg	Gln	Tyr	Met	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Met	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Arg	
		370				375					380					
Ala	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Asp	Arg	Phe	His	Ile	Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn	
385					390					395					400	
Tyr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser	
				405					410					415		
Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn	
			420					425					430			
Asp	Asn	Cys	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	
		435					440					445				
Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala	
	450					455					460					
Gly	Gln	Asn	His	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	His	Tyr	Phe	Lys	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	
				485					490					495		
Asp	Phe	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His							
			500					505								

<210> 108

<211> 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

Gly	Phe	Tyr	Gly	Pro	Asp	Cys	Lys	Leu	Arg	Cys	Ser	Cys	Asn	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Met	Cys	Asp	Arg	Phe	Gln	Gly	Cys	Leu	Cys	Ser	Pro	Gly	Trp	Gln	
				325					330					335		
Gly	Leu	Gln	Cys	Glu	Arg	Glu	Gly	Ile	Pro	Arg	Met	Thr	Pro	Lys	Ile	
			340					345					350			
Val	Asp	Leu	Pro	Asp	His	Ile	Glu	Val	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Pro	
		355					360					365				
Ile	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Trp	Pro	Leu	Pro	Thr	Asn	Glu	Glu	Met	Thr	
	370					375					380					
Leu	Val	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Leu	His	Pro	Lys	Asp	Phe	Asn	His	
385					390					395					400	
Thr	Asp	His	Phe	Ser	Val	Ala	Ile	Phe	Thr	Ile	His	Arg	Ile	Leu	Pro	
				405					410					415		
Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Trp	Val	Cys	Ser	Val	Asn	Thr	Val	Ala	Gly	Met	
			420					425					430			
Val	Glu	Lys	Pro	Phe	Asn	Ile	Ser	Val	Lys	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	
		435					440					445				
Asn	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	Asp	Thr	Gly	His	Asn	Phe	Ala	Val	Ile	Asn	
	450					455					460					
Ile	Ser	Ser	Glu	Pro	Tyr	Phe	Gly	Asp	Gly	Pro	Ile	Lys	Ser	Lys	Lys	
465					470					475					480	
Leu	Leu	Tyr	Lys	Pro	Val	Asn	His	Tyr	Glu	Ala	Trp	Gln	His	Ile	Gln	
				485					490					495		
Val	Thr	Asn	Glu	Ile	Val	Thr	Leu	Asn	Tyr	Leu	Glu	Pro	Arg	Thr	Glu	
			500					505					510			
Tyr	Glu	Leu	Cys	Val	Gln	Leu	Val	Arg	Arg	Gly	Glu	Gly	Gly	Glu	Gly	
		515					520					525				
His	Pro	Gly	Pro	Val	Arg	Arg	Phe	Thr	Thr	Ala	Ser	Ile	Gly	Leu	Pro	
	530					535					540					
Pro	Pro	Arg	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Pro	Lys	Ser	Gln	Thr	Thr	Leu	Asn	
545					550					555					560	
Leu	Thr	Trp	Gln	Pro	Ile	Phe	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Asp	Phe	Tyr	Val	
				565					570					575		
Glu	Val	Glu	Arg	Arg	Ser	Val	Gln	Lys	Ser	Asp	Gln	Gln	Asn	Ile	Lys	
			580					585					590			
Val	Pro	Gly	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Leu	Leu	Asn	Asn	Leu	His	Pro	Arg	
		595					600					605				

Glu	Gln	Tyr	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Val	Asn	Thr	Lys	Ala	Gln	Gly	Glu	610	615	620	
Trp	Ser	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala	Trp	Thr	Leu	Ser	Asp	Ile	Leu	Pro	Pro	625	630	635	640
Gln	Pro	Glu	Asn	Ile	Lys	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Val	645	650	655	
Ile	Ser	Trp	Thr	Ile	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ile	Thr	Ile	660	665	670	
Arg	Tyr	Lys	Val	Gln	Gly	Lys	Asn	Glu	Asp	Gln	His	Val	Asp	Val	Lys	675	680	685	
Ile	Lys	Asn	Ala	Thr	Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	690	695	700	
Glu	Thr	Ala	Tyr	Gln	Val	Asp	Ile	Phe	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	705	710	715	720
Ser	Asn	Pro	Ala	Phe	Ser	His	Glu	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	Glu	Ser	Gln	725	730	735	
Ala	Pro	Ala	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Leu	Leu	Ile	Ala	Ile	Leu	740	745	750	
Gly	Ser	Ala	Gly	Met	Thr	Cys	Leu	Thr	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	755	760	765	
Ile	Leu	Gln	Leu	Lys	Arg	Ala	Asn	Val	Gln	Arg	Arg	Met	Ala	Gln	Ala	770	775	780	
Phe	Gln	Asn	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Ala	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Gly	Thr	785	790	795	800
Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Lys	Val	Lys	Asn	Asn	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Tyr	805	810	815	
Pro	Val	Leu	Asp	Trp	Asn	Asp	Ile	Lys	Phe	Gln	Asp	Val	Ile	Gly	Glu	820	825	830	
Gly	Asn	Phe	Gly	Gln	Val	Leu	Lys	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Asp	Gly	Leu	835	840	845	
Arg	Met	Asp	Ala	Ala	Ile	Lys	Arg	Met	Lys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	850	855	860	
Asp	His	Arg	Asp	Phe	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Cys	Lys	Leu	Gly	865	870	875	880
His	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Glu	His	Arg	Gly	885	890	895	
Tyr	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ile	Glu	Tyr	Ala	Pro	His	Gly	Asn	Leu	Leu	Asp	900	905	910	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 109

<211> 946

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFAB-Avastin-LC06-2620

<400> 109

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

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

Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala		
				325					330					335			
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
			340					345					350				
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln		
		355					360					365					
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
	370					375					380						
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr		
385					390					395					400		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu		
				405					410					415			
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
			420					425					430				
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
		435					440					445					
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln		
	450					455					460						
Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr		
465					470					475					480		
Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His		
				485					490					495			
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp		
			500					505					510				
Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn		
		515					520					525					
Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp		
	530					535					540						
Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Tyr		
545					550				555						560		
Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala		
				565				570						575			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
			580					585					590				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
		595					600					605					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
	610					615					620						

Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	625	630	635	640
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	645	650	655	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	660	665	670	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	675	680	685	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	690	695	700	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	705	710	715	720
Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	725	730	735	
Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	740	745	750	
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	755	760	765	
Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	770	775	780	
Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	785	790	795	800
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	805	810	815	
Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	820	825	830	
Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	835	840	845	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	850	855	860	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	865	870	875	880
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	885	890	895	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	900	905	910	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	915	920	925	

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 930 935 940

Thr His
 945

<210> 110
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab
 đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFAB-Avastin-LC06-2620

<400> 110

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 111

<211> 956

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

<400> 111

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
545					550					555					560	
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	
				565					570					575		
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	
			580					585					590			
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	
		595					600					605				
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	
610						615					620					
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	
625					630					635					640	
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
				645					650					655		
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	
			660					665					670			
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
		675					680					685				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
690						695					700					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
705					710				715						720	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
				725					730					735		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
			740					745					750			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		755					760					765				
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
770					775						780					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
785					790					795					800	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				805					810					815		
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	
			820					825					830			
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	
		835					840					845				

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
850 855 860

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
865 870 875 880

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
885 890 895

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
900 905 910

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
915 920 925

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
930 935 940

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
945 950 955

<210> 112

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2640

<400> 112

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 113

<211> 956

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

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

450						455						460				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	
465					470					475					480	
Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	
			485						490					495		
Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
			500					505					510			
Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	
		515					520					525				
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	
	530					535					540					
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	
545					550					555					560	
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	
				565					570					575		
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	
			580					585					590			
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	
		595					600					605				
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	
	610					615					620					
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	
625					630					635					640	
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
				645					650					655		
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	
			660					665					670			
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
		675					680					685				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	690					695						700				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
705					710					715					720	
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
				725					730					735		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
			740					745					750			
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Met	

755	760	765
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe 770 775 780		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr 785 790 795 800		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 805 810 815		
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr 820 825 830		
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser 835 840 845		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 850 855 860		
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 865 870 875 880		
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 885 890 895		
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 900 905 910		
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 915 920 925		
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 930 935 940		
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 945 950 955		

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn scFab-Avastin-Ang2i-LC06-2641

<400> 114

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

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

<210> 115

<211> 946

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị bốn Avastin-LC06-KiH-C-scFab

<400> 115

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

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

Val 370	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met 435	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gln
Pro 465	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro 470	Pro	Ser	Val	Ser	Val 475	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr 480
Ala	Arg	Ile	Thr	Cys 485	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile 490	Gly	Ser	Lys	Ser	Val 495	His
Trp	Tyr	Gln	Gln 500	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala 505	Pro	Val	Leu	Val	Val 510	Tyr	Asp
Asp	Ser 515	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile 520	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser 525	Gly	Ser	Asn
Ser	Gly 530	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr 535	Ile	Ser	Arg	Val 540	Glu	Ala	Gly	Asp
Glu 545	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys 550	Gln	Val	Trp	Asp	Ser 555	Ser	Ser	Asp	His	Tyr 560
Val	Phe	Gly	Thr	Gly 565	Thr	Lys	Val	Thr	Val 570	Leu	Arg	Thr	Val	Ala 575	Ala
Pro	Ser	Val	Phe 580	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser 585	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys 590	Ser	Gly
Thr	Ala	Ser 595	Val	Val	Cys	Leu	Leu 600	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro 605	Arg	Glu	Ala
Lys	Val 610	Gln	Trp	Lys	Val	Asp 615	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser 620	Gly	Asn	Ser	Gln
Glu 625	Ser	Val	Thr	Glu	Gln 630	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser 635	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser 640
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu 645	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr 650	Glu	Lys	His	Lys	Val 655	Tyr
Ala	Cys	Glu	Val 660	Thr	His	Gln	Gly	Leu 665	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys 670	Ser

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 690 695 700
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 705 710 715 720
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 725 730 735
 Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 740 745 750
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 755 760 765
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 770 775 780
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 785 790 795 800
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp
 805 810 815
 Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 820 825 830
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 835 840 845
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 850 855 860
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 865 870 875 880
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 885 890 895
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 900 905 910
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 915 920 925
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 930 935 940

Thr His
 945

<210> 116
 <211> 453
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 117
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> chuỗi đơn Fab
 đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-KiH-C-scFab
 <400> 117
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 118

<211> 698

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

<400> 118

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

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

Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala			
370						375					380							
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr			
385					390					395					400			
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu			
				405					410					415				
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser			
			420					425					430					
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser			
		435					440					445						
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
450					455						460							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
465				470						475					480			
Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala			
				485				490						495				
Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser			
		500						505					510					
Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu			
		515					520					525						
Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe			
		530				535					540							
Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val			
545				550						555					560			
Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser			
				565					570					575				
Ser	Asp	His	Tyr	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Arg			
		580						585					590					
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln			
		595					600					605						
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr			
610						615					620							
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser			
625					630					635					640			
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr			
			645						650					655				
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys			
			660					665					670					

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
675 680 685

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 119

<211> 719

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép, hóa trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS

<400> 119

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

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

515	520	525
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala		
530	535	540
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser		
545	550	555
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val		
	565	570
		575
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly		
	580	585
		590
Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val		
	595	600
		605
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
	610	615
		620
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
625	630	635
		640
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
	645	650
		655
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	660	665
		670
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	675	680
		685
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	690	695
		700
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
705	710	715
<210> 120		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Nhân tạo		
<220>		
<223> Chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> đặc hiệu kép,		
hóa trị ba Avastin-LC06-C-Fab-6CSS		
<400> 120		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
		15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
	20	25
		30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile		
	35	40
		45

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

<210> 121

<211> 459

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 121

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

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

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

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

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

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

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

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

<210> 122

<211> 457

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 122

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

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

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

450 455

<210> 123
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 123

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 124
 <211> 212

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-CH1-CL

<400> 124

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Lys	Ser	Cys
210			

<210> 125

<211> 459

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-VH-VL

<400> 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

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

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

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
305	310	315
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
	325	330
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp		
	355	360
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe		
	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
385	390	395
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
	405	410
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
	420	425
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
	435	440
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	

<210> 126

<211> 439

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-VH-VL

<400> 126

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

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
385 390 395 400

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 127

<211> 215

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06- VH-VL

<400> 127

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 128

<211> 230

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06- VH-VL

<400> 128

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

	180		185		190
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	195		200		205
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	210		215		220
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	225		230		

<210> 129
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miễn đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 129

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

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

<210> 130
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-VH-VL-SS

<400> 130

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
	210					215					220				

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

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

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			260					265					270		

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

<210> 131
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> trao đổi miền đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06- VH-VL-SS

<400> 131

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

[illegible]

```

<400> 132
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20          25          30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50          55          60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

```

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
195 200 205

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 133

<211> 706

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp
ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFab

<400> 133

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

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

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

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

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

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

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

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
				405					410					415		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
			420					425					430			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
		435					440					445				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
	450					455					460					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
465					470					475					480	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
				485					490					495		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
			500					505					510			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
		515					520					525				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	530					535					540					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
545					550					555					560	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				565					570					575		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
			580					585					590			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
		595					600					605				
Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
	610					615					620					
Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
625					630					635					640	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
				645					650					655		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
			660					665					670			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
		675					680					685				
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
	690					695					700					

Gly Lys
705

<210> 134
<211> 699
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFab

<400> 134

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

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

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

530 535 540
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 545 550 555 560
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 565 570 575
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 580 585 590
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 595 600 605
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 610 615 620
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 625 630 635 640
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 645 650 655
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 660 665 670
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 675 680 685
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690 695
 <210> 135
 <211> 706
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Chuỗi nặng 1 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp
 ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFabSS

 <400> 135
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	385	390	395	400
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		405	410	415
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		420	425	430
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		435	440	445
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		450	455	460
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		465	470	475
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		485	490	495
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		500	505	510
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		515	520	525
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		530	535	540
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		545	550	555
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		565	570	575
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		580	585	590
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		595	600	605
Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		610	615	620
Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		625	630	635
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		645	650	655
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		660	665	670
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		675	680	685

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 690 695 700

Gly Lys
 705

<210> 136
 <211> 699
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng 2 của phân tử kháng thể <VEGF-ANG-2> dung hợp
 ScFab-Fc đặc hiệu kép, hóa trị hai Avastin-LC06-N-scFabSS

<400> 136

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

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

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

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

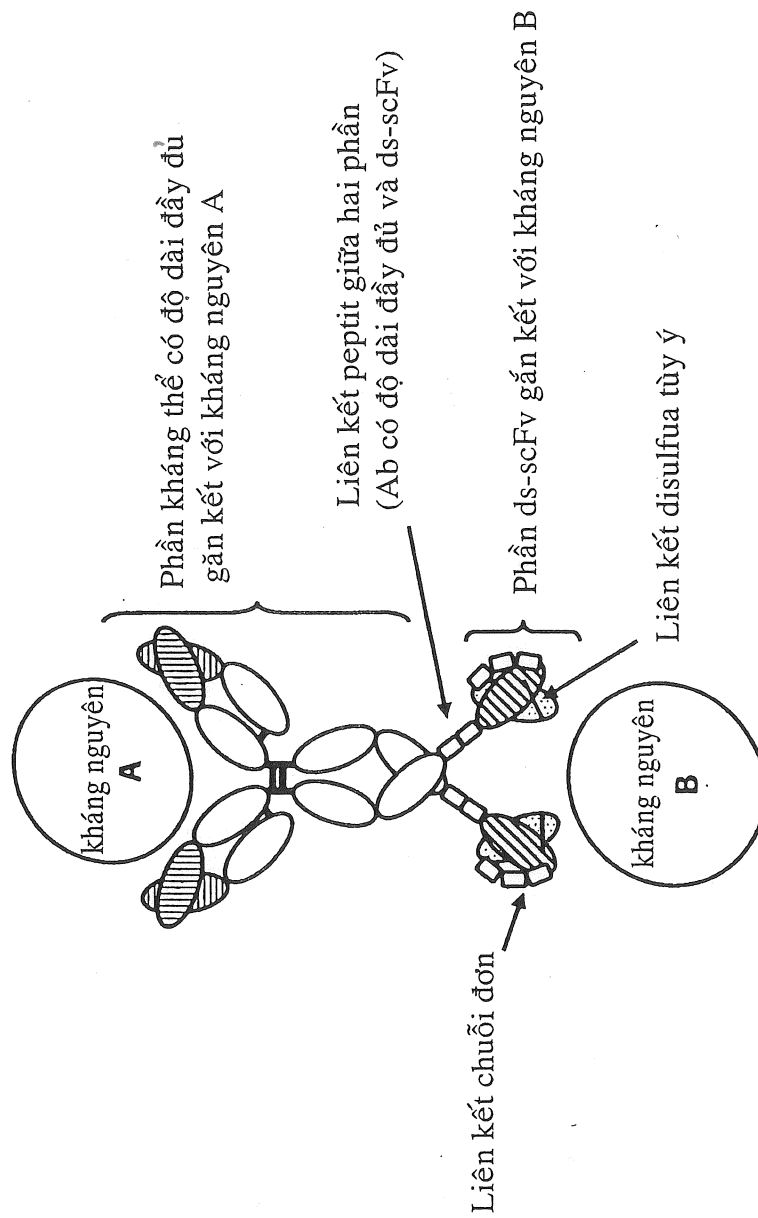
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

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

Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn			
	515						520					525						
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg			
	530					535					540							
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val			
545					550					555					560			
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser			
				565					570					575				
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys			
			580					585					590					
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp			
		595					600						605					
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe			
	610					615					620							
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu			
625					630					635					640			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe			
				645					650					655				
Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly			
			660					665					670					
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr			
		675					680					685						
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	690					695												

FIG 1A



1/ 25

Fig.1B

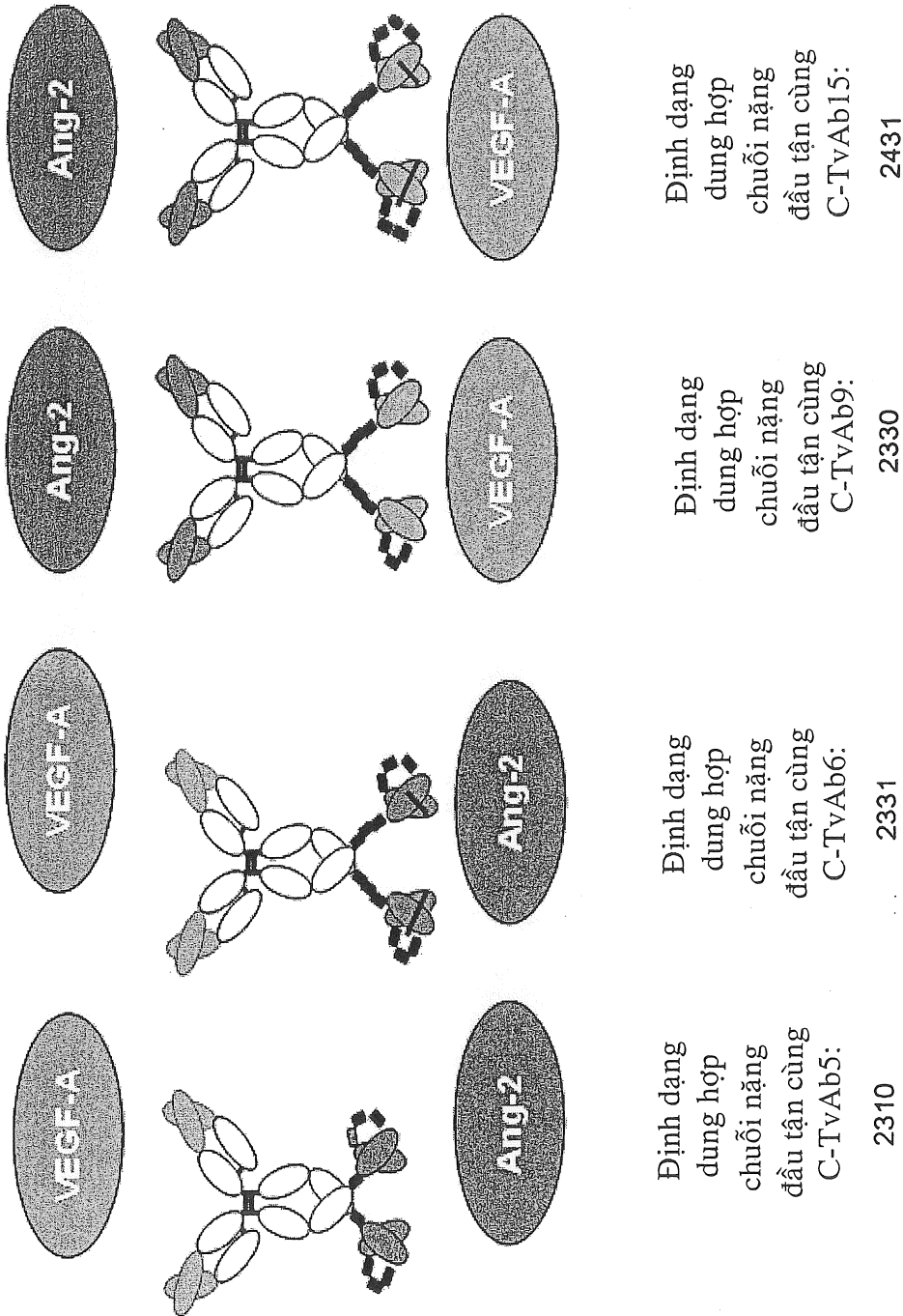
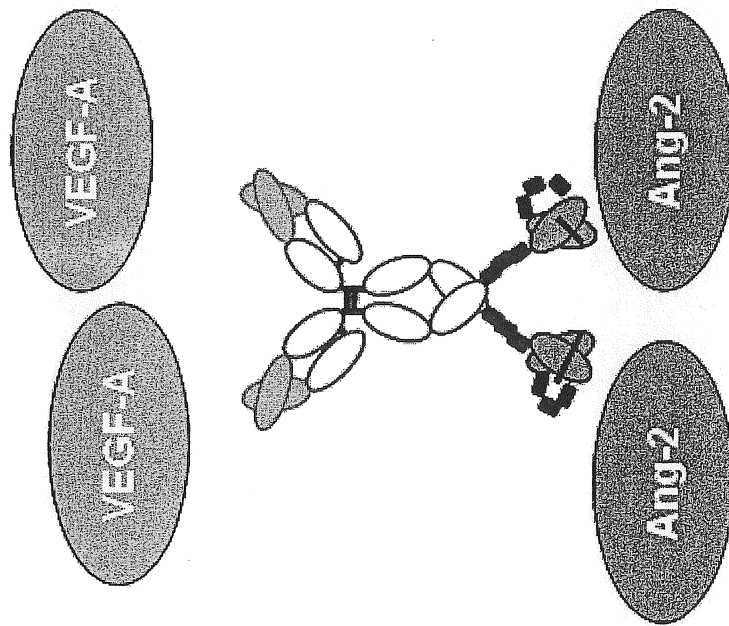
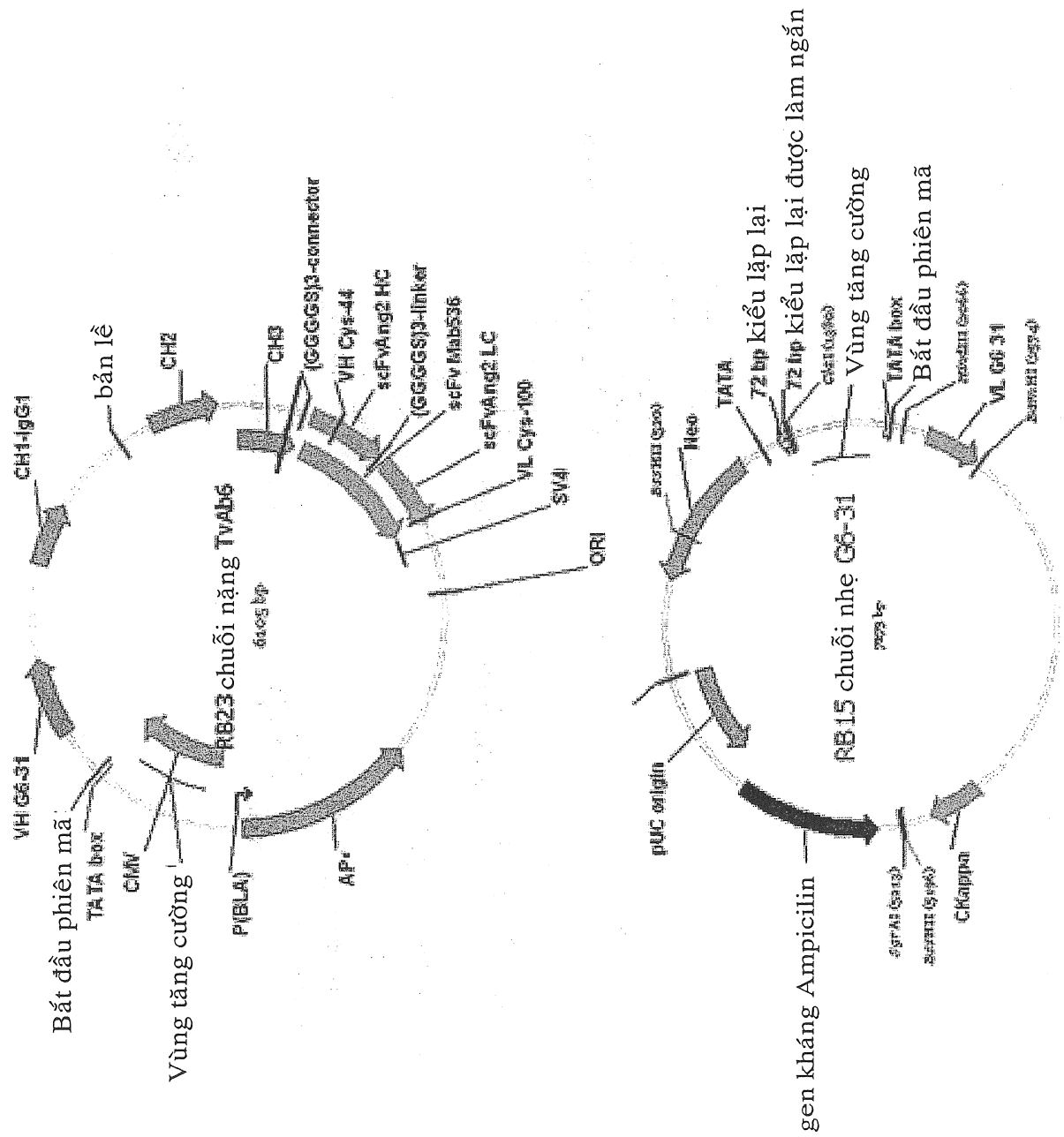


Fig.2A



3/25

Fig.2B



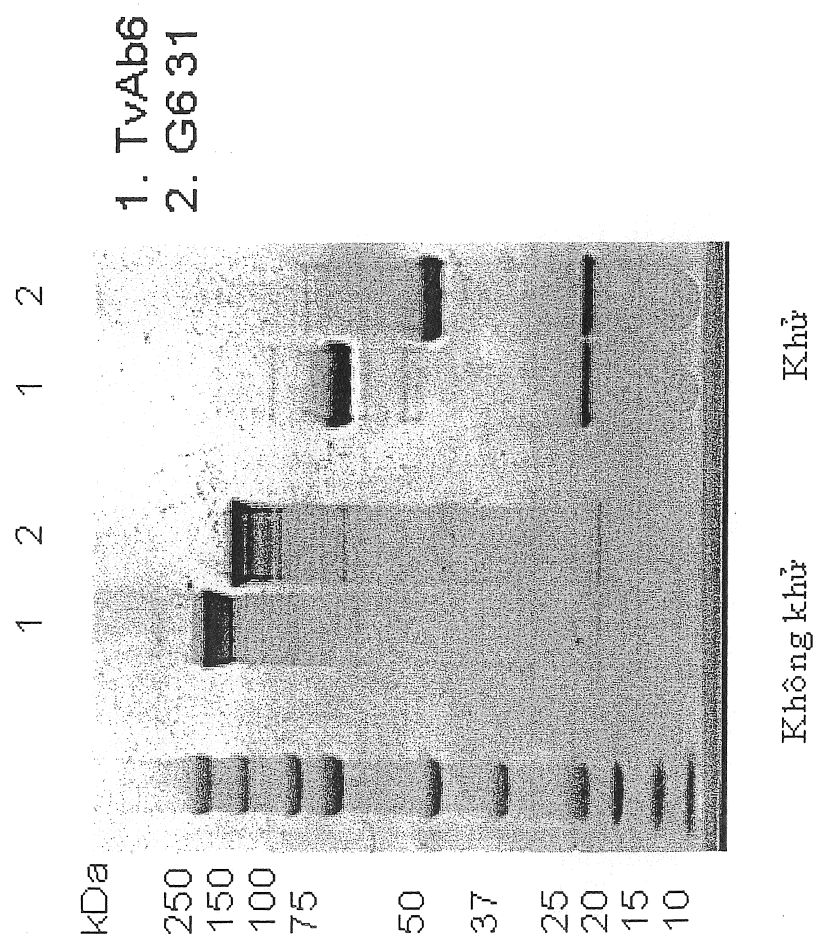
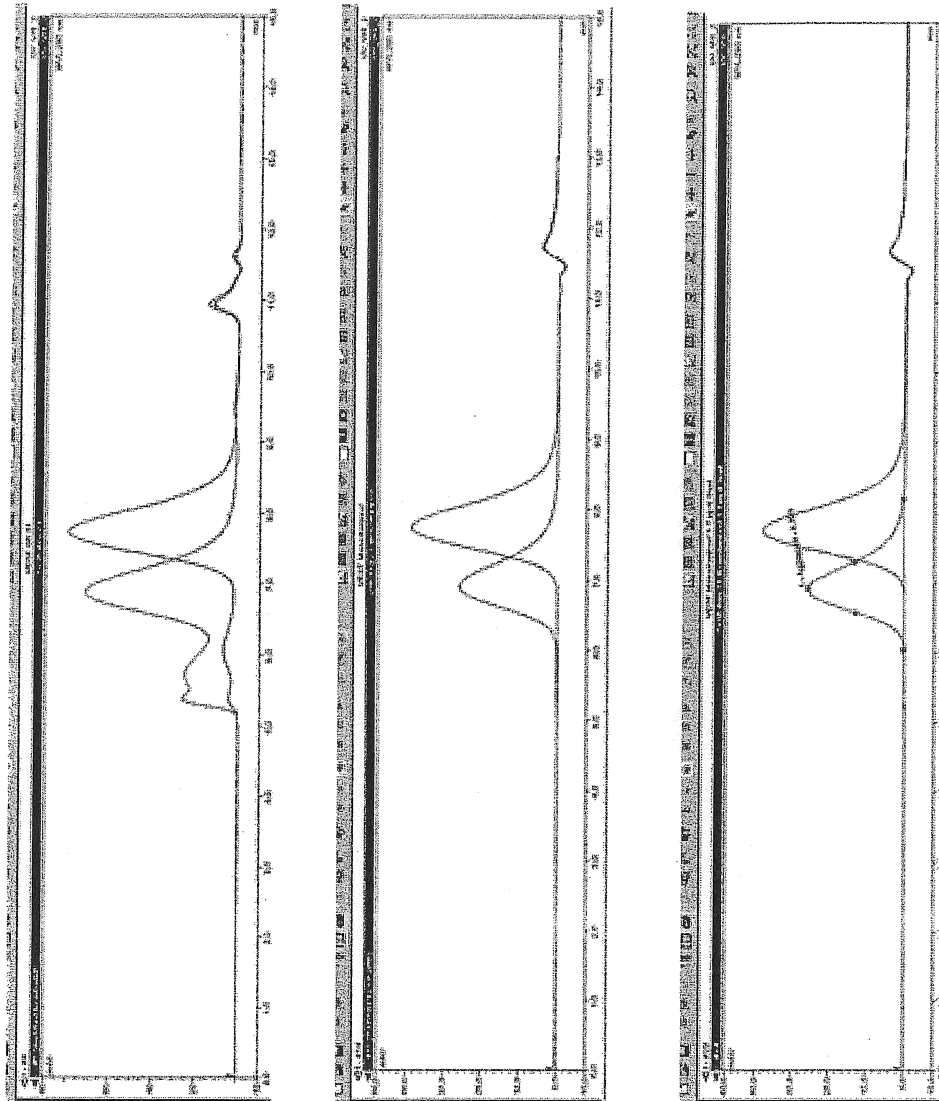


Fig.3

Fig.4

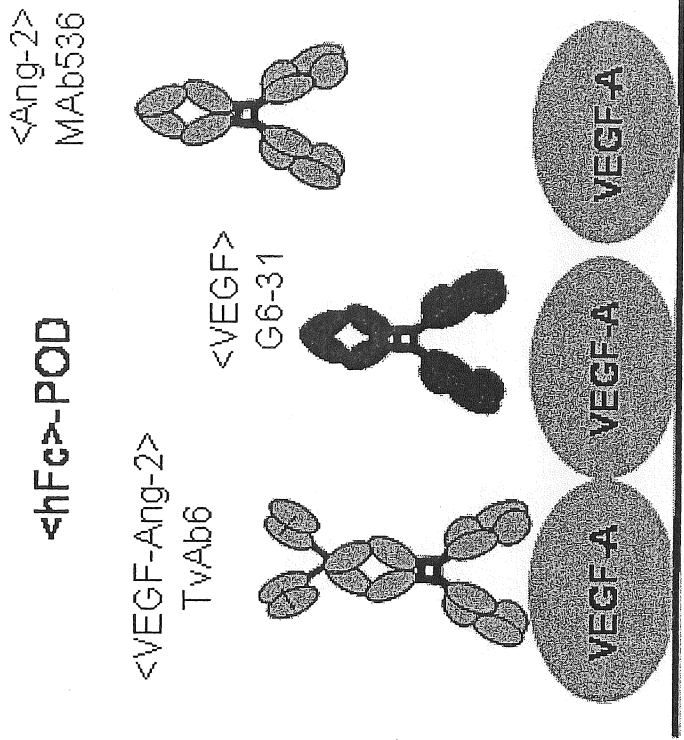


1. Nhóm protein A G6-31: 10% kết tụ
G6-31: 10% kết tụ
TvAb6: 25% kết tụ

2. Nhóm SEC, sau khi tinh chế
G6-31: 99% monome
TvAb6: 99% monome

3. Nhóm SEC, sau 24h ở 4 °C
G6-31: 99% monome
TvAb6: 99% monome

Fig.5



ELISA gắn kết VEGF

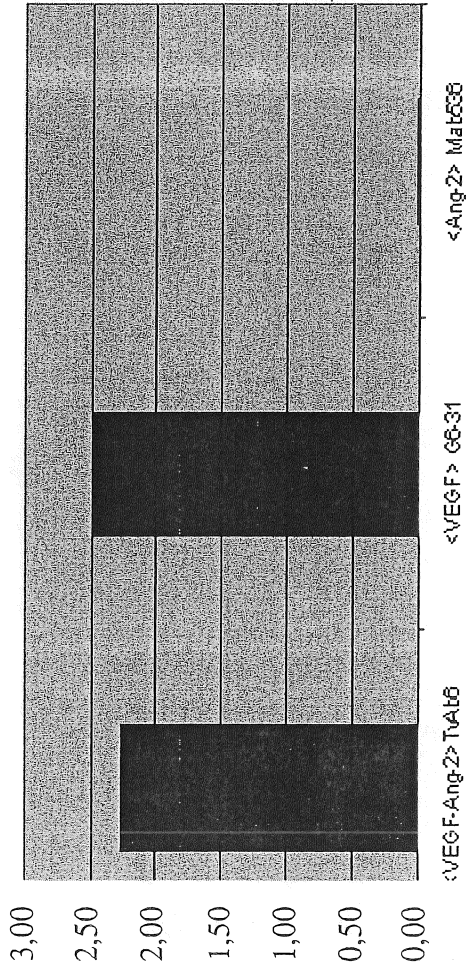
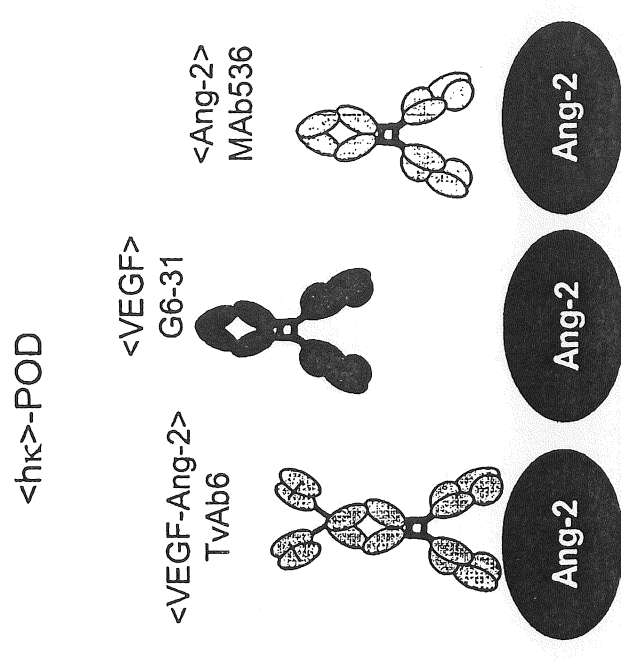


Fig.6A



ELISA gắn kết Ang-2

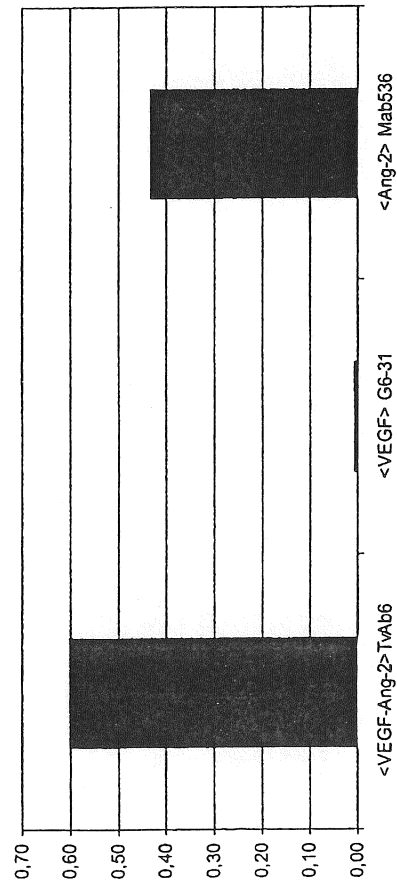


Fig.6B

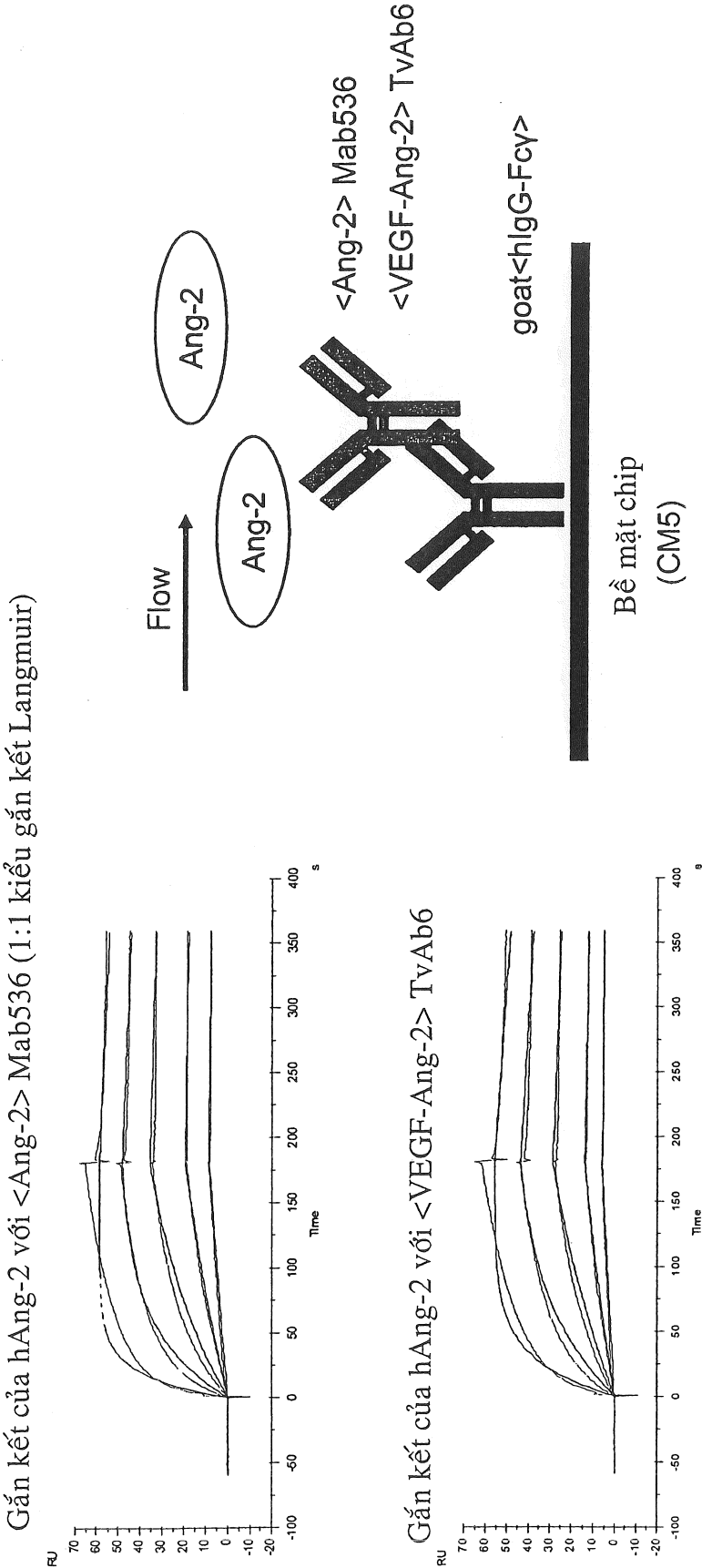
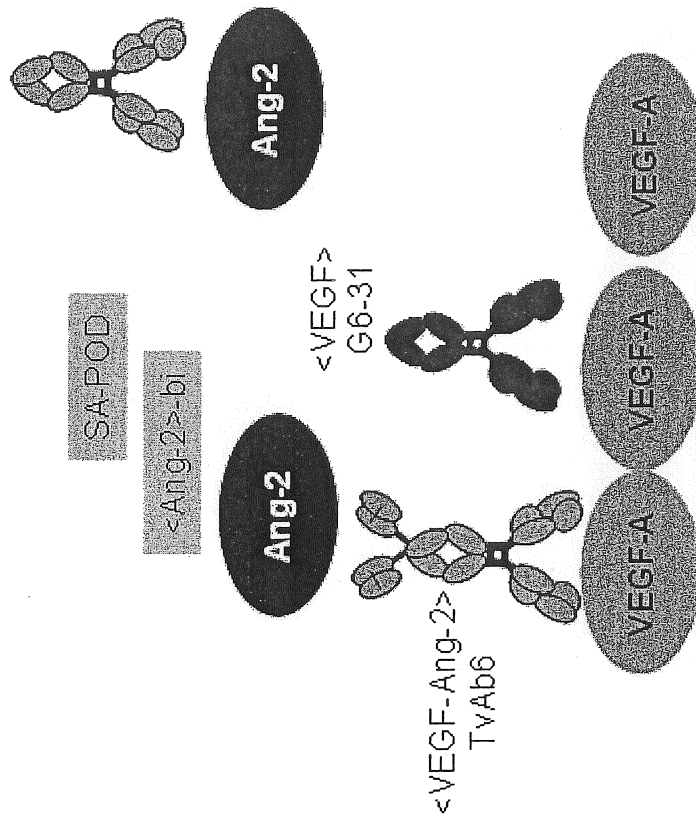


Fig.7



ELISA liên kết cầu VEGF-Ang-2

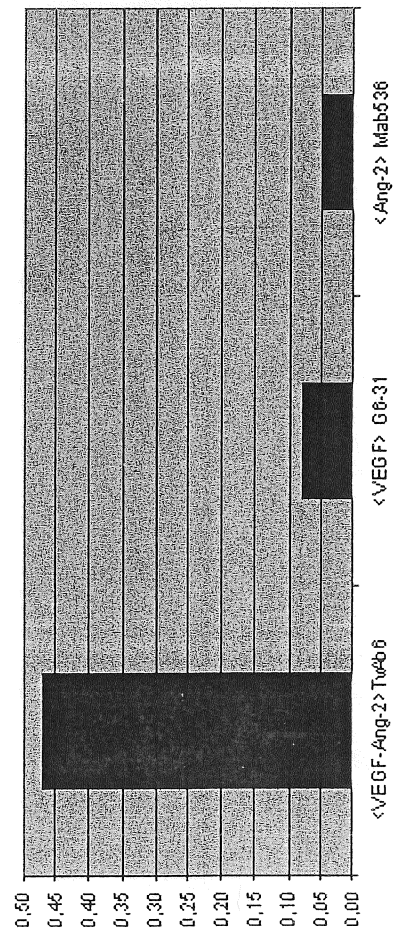


Fig.8A

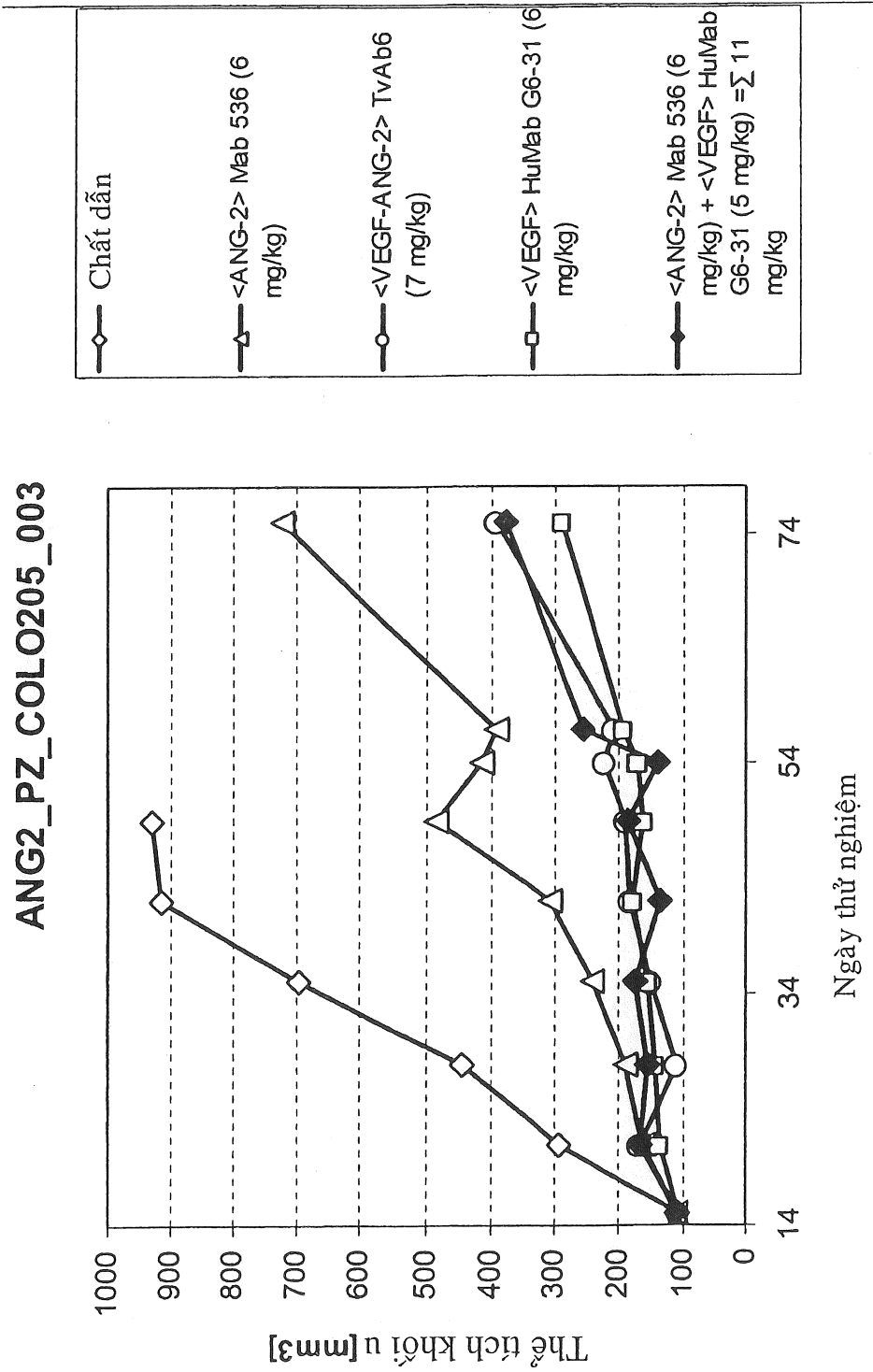
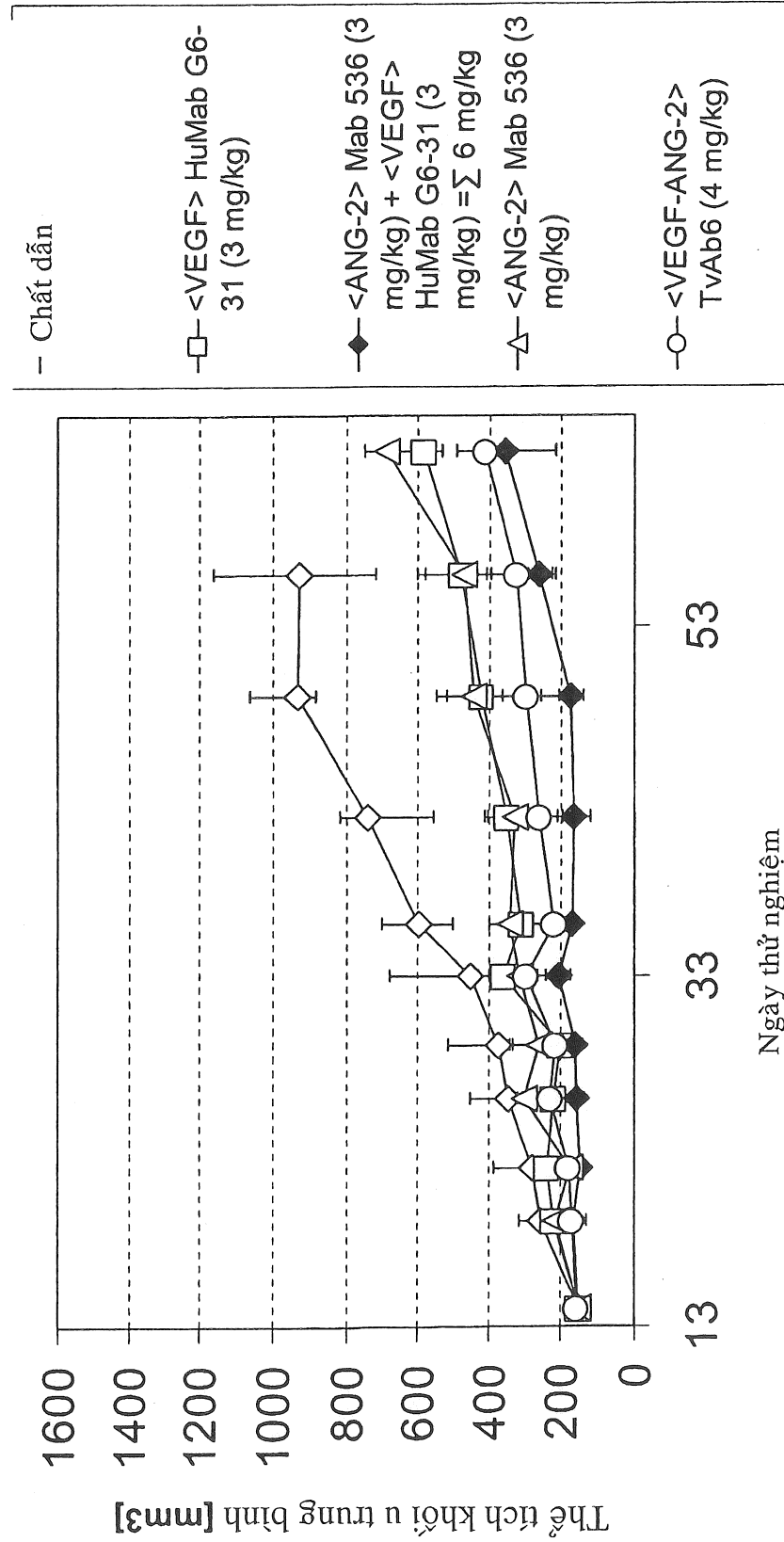


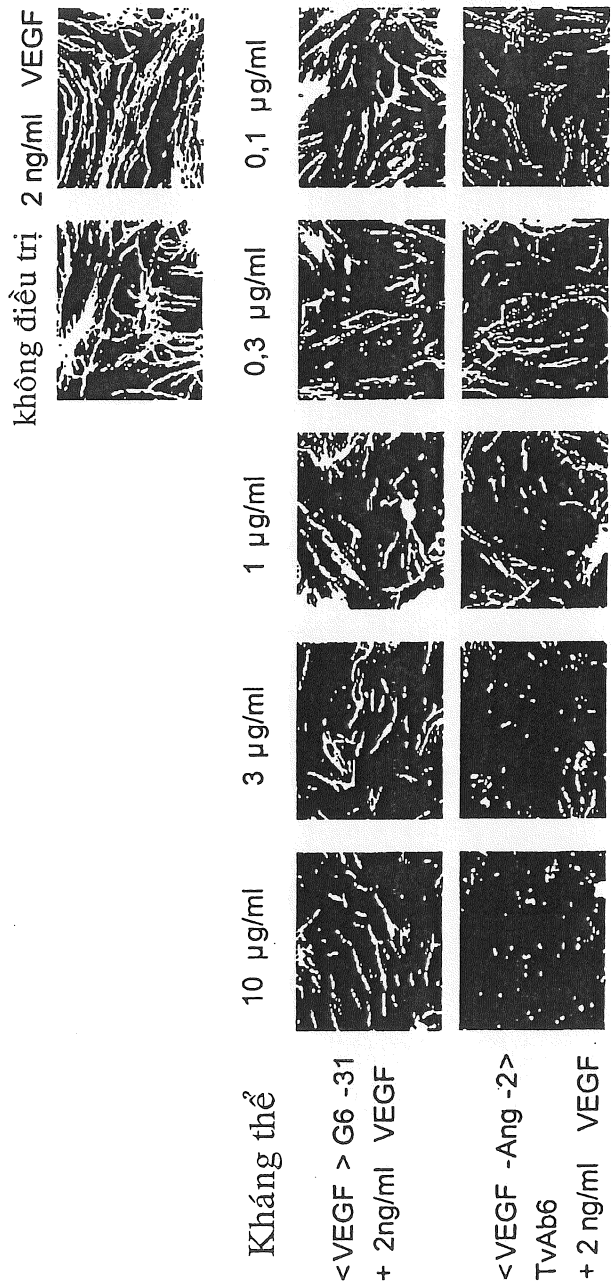
Fig.8B

ANG2_PZ_COLO205_005



12/ 25

Fig.9



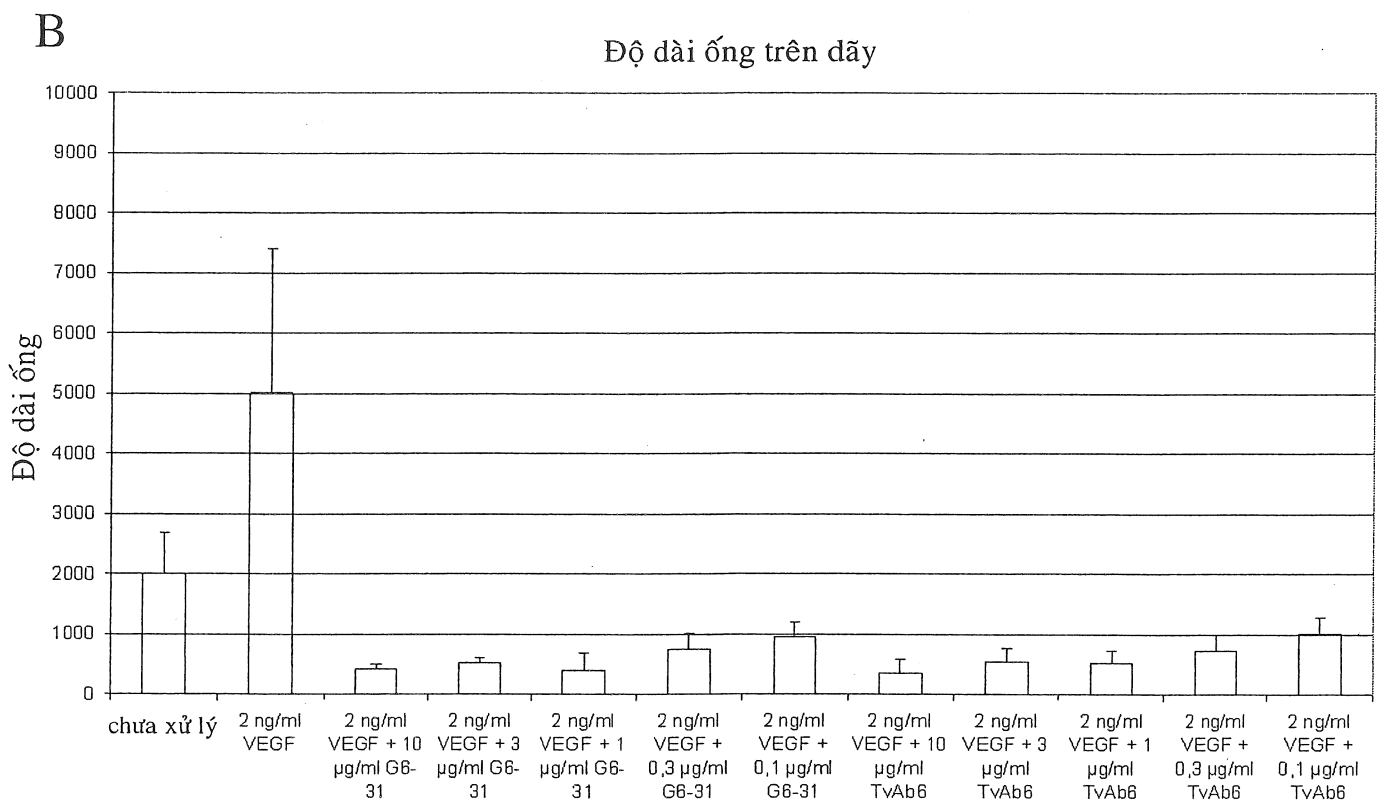
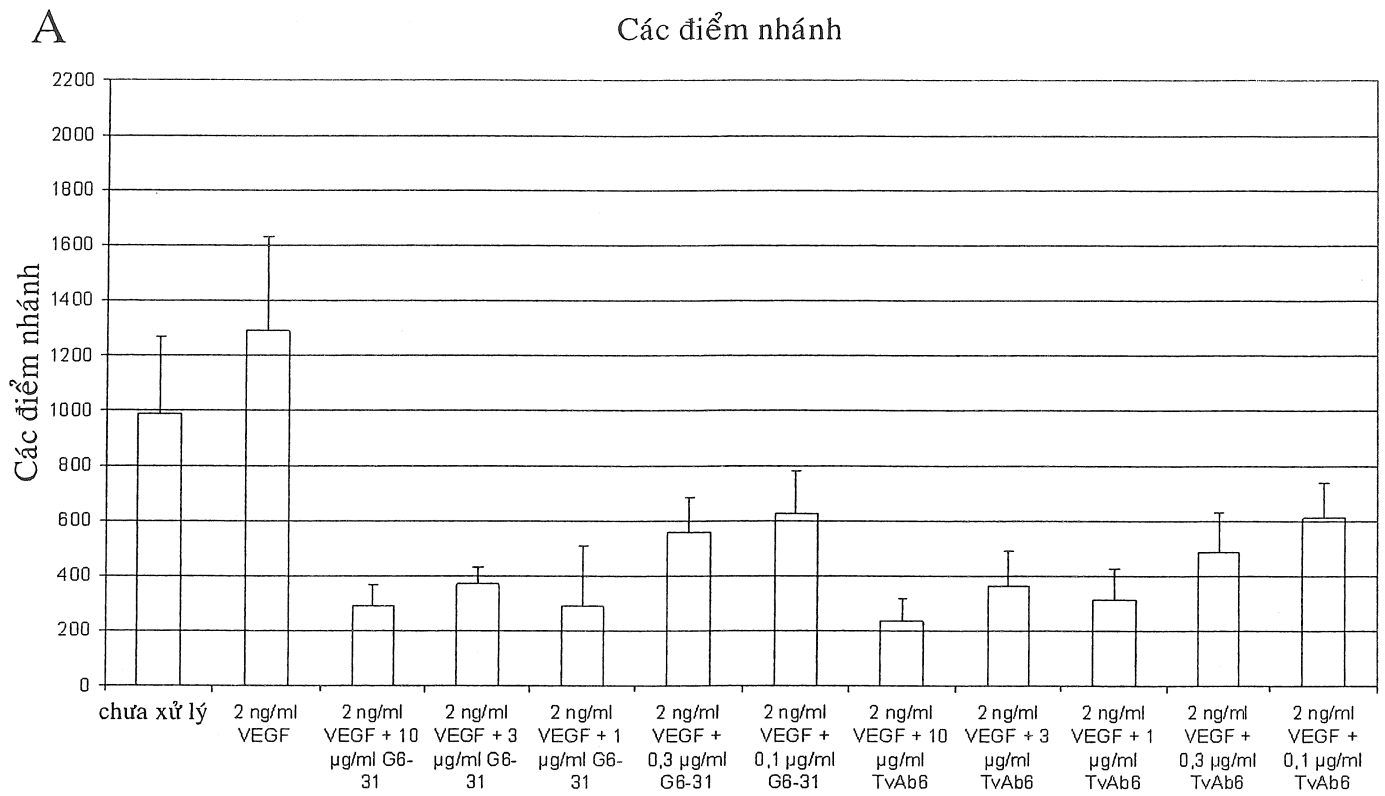


Fig.11

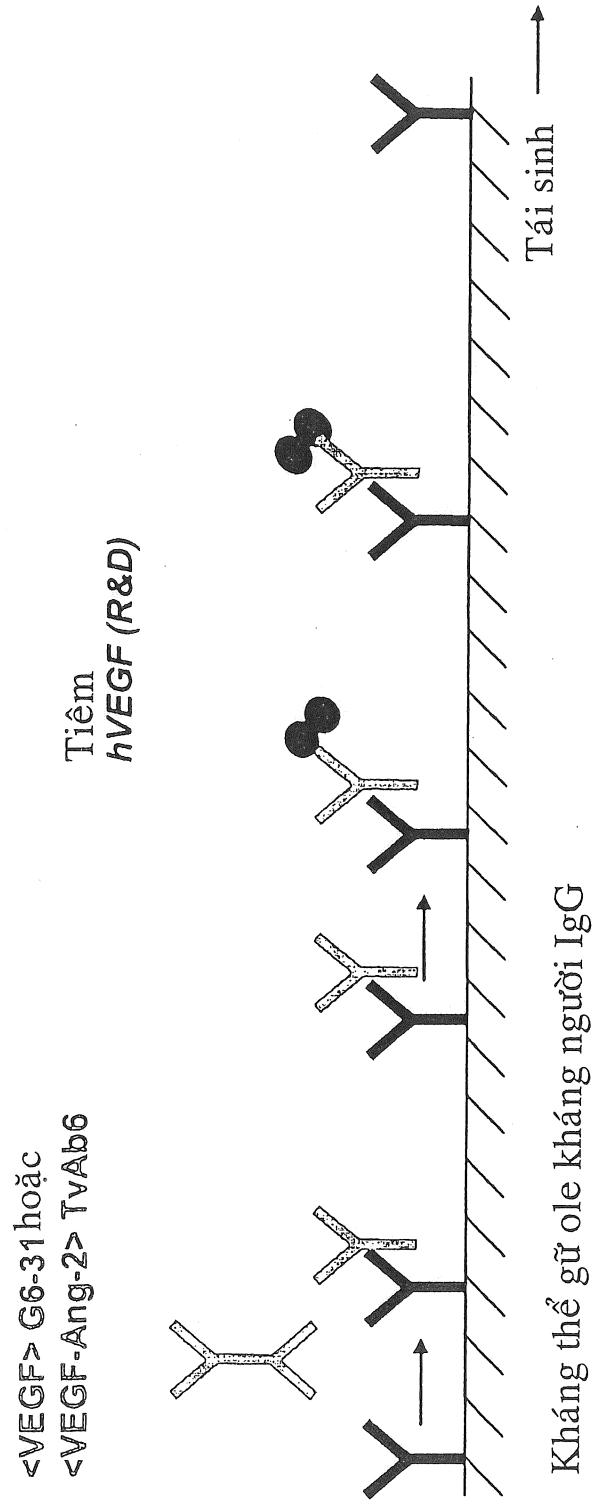
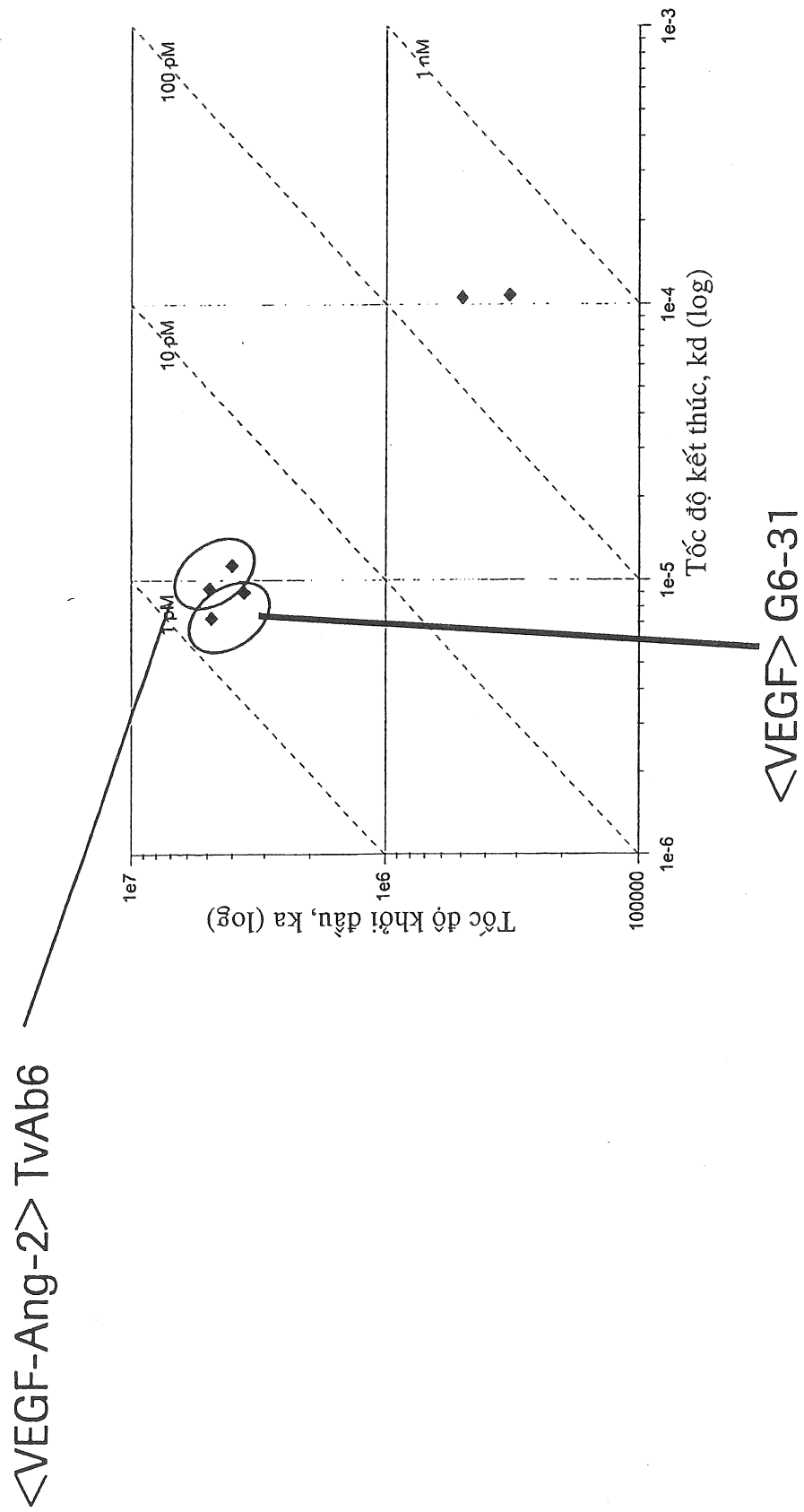


Fig.12



16/25

Fig.13

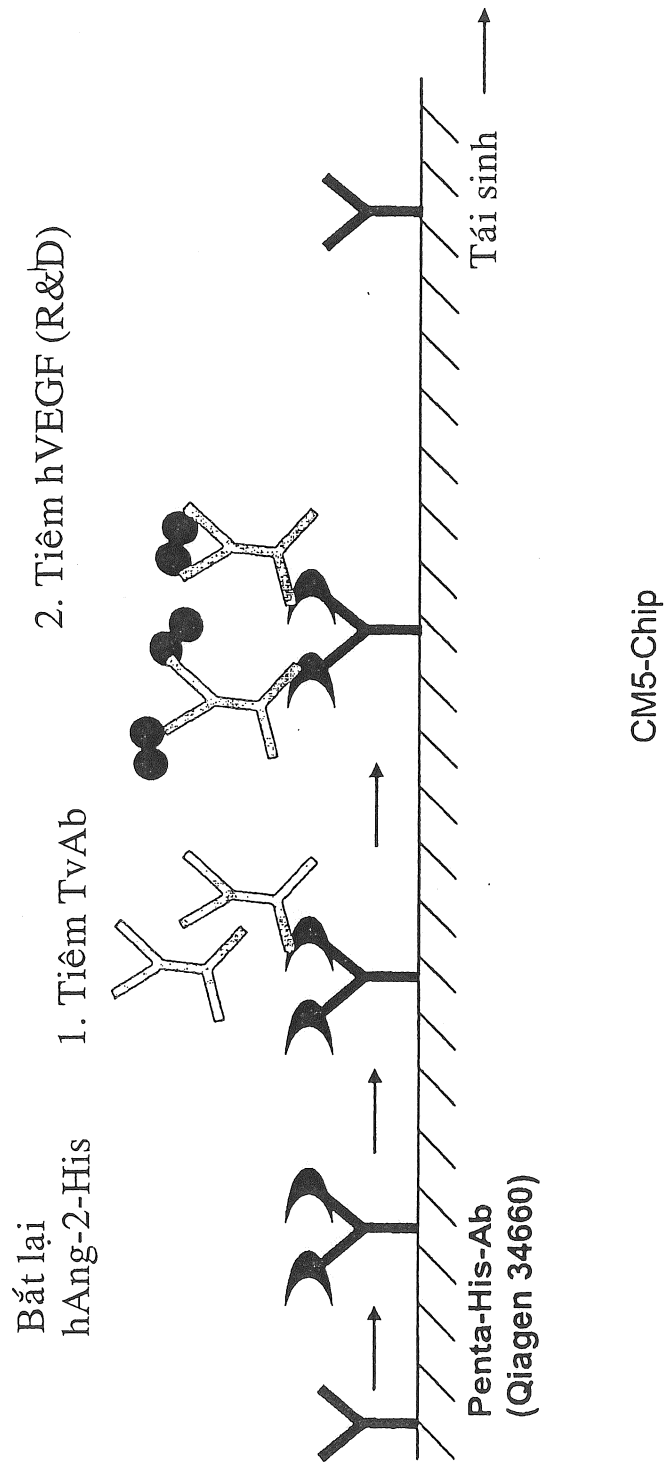


Fig.14

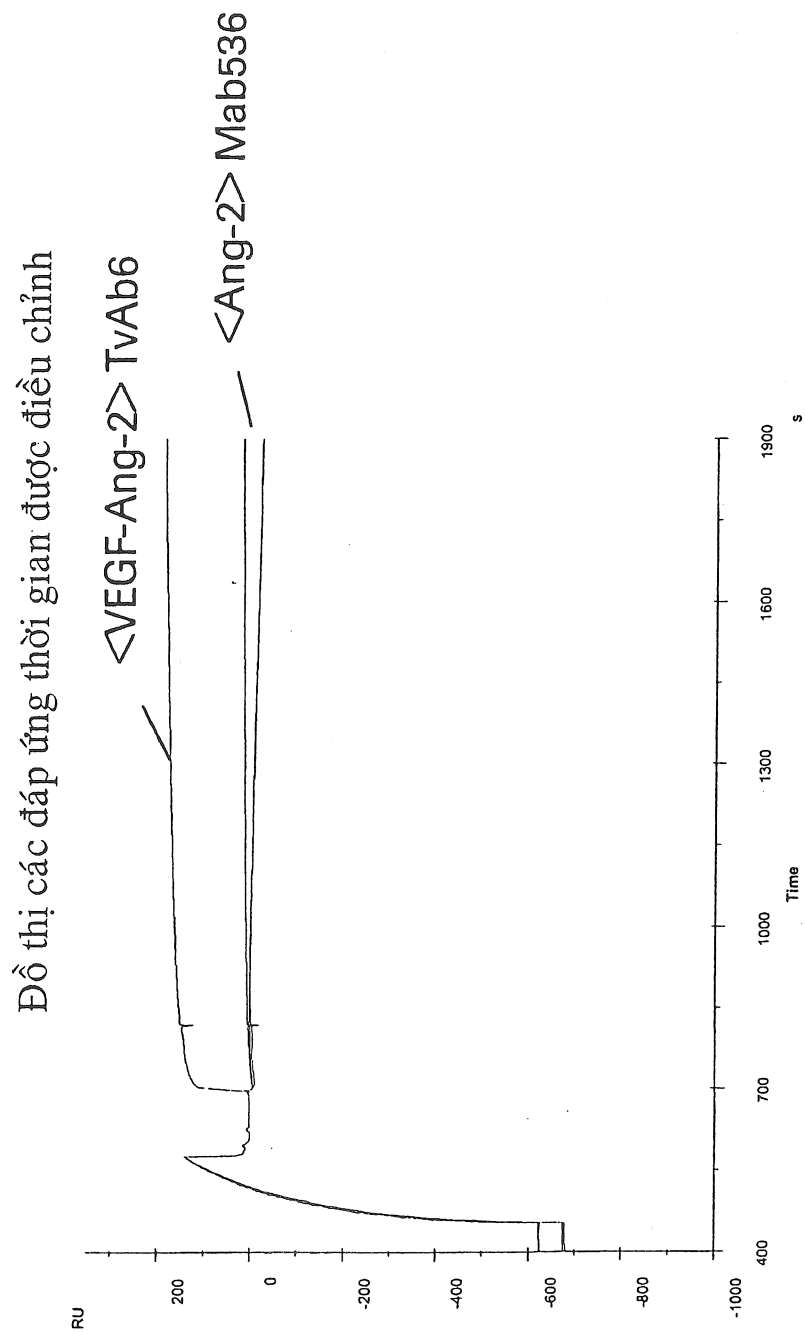


Fig.15A

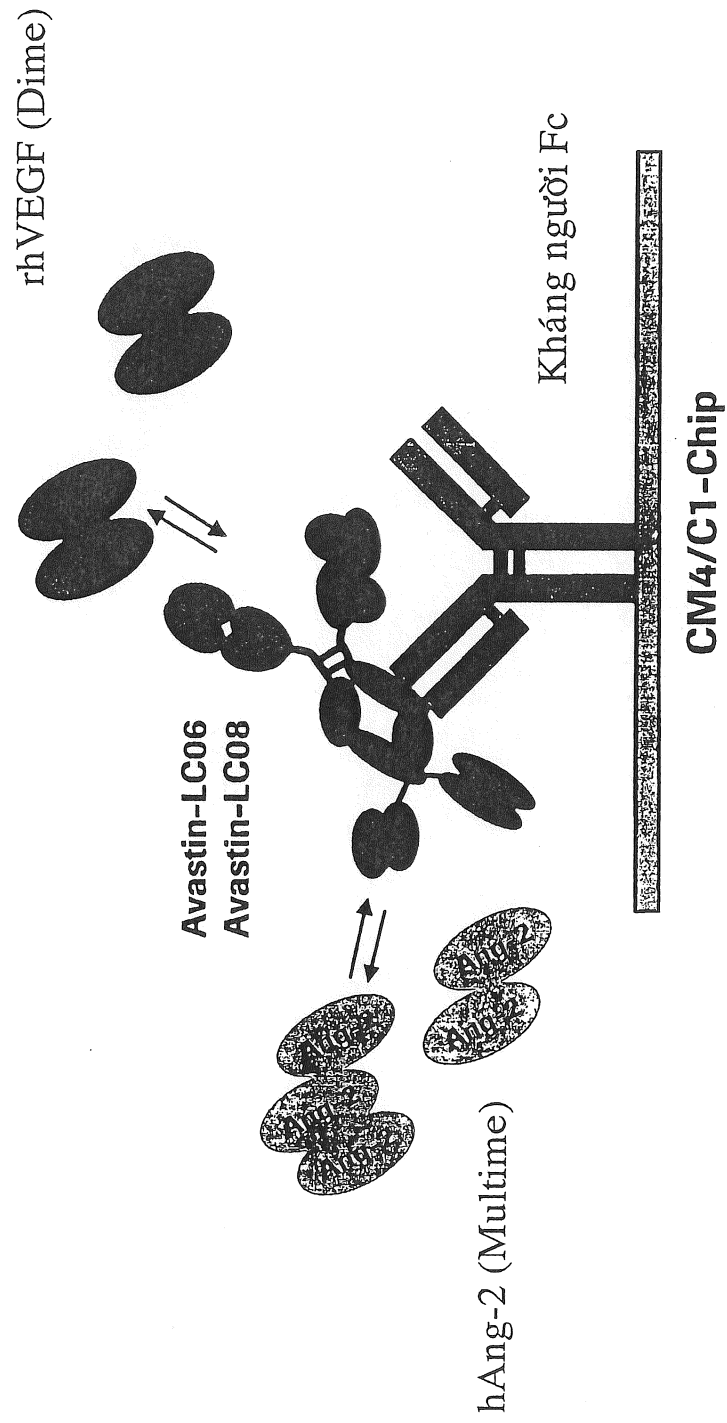


Fig.15B

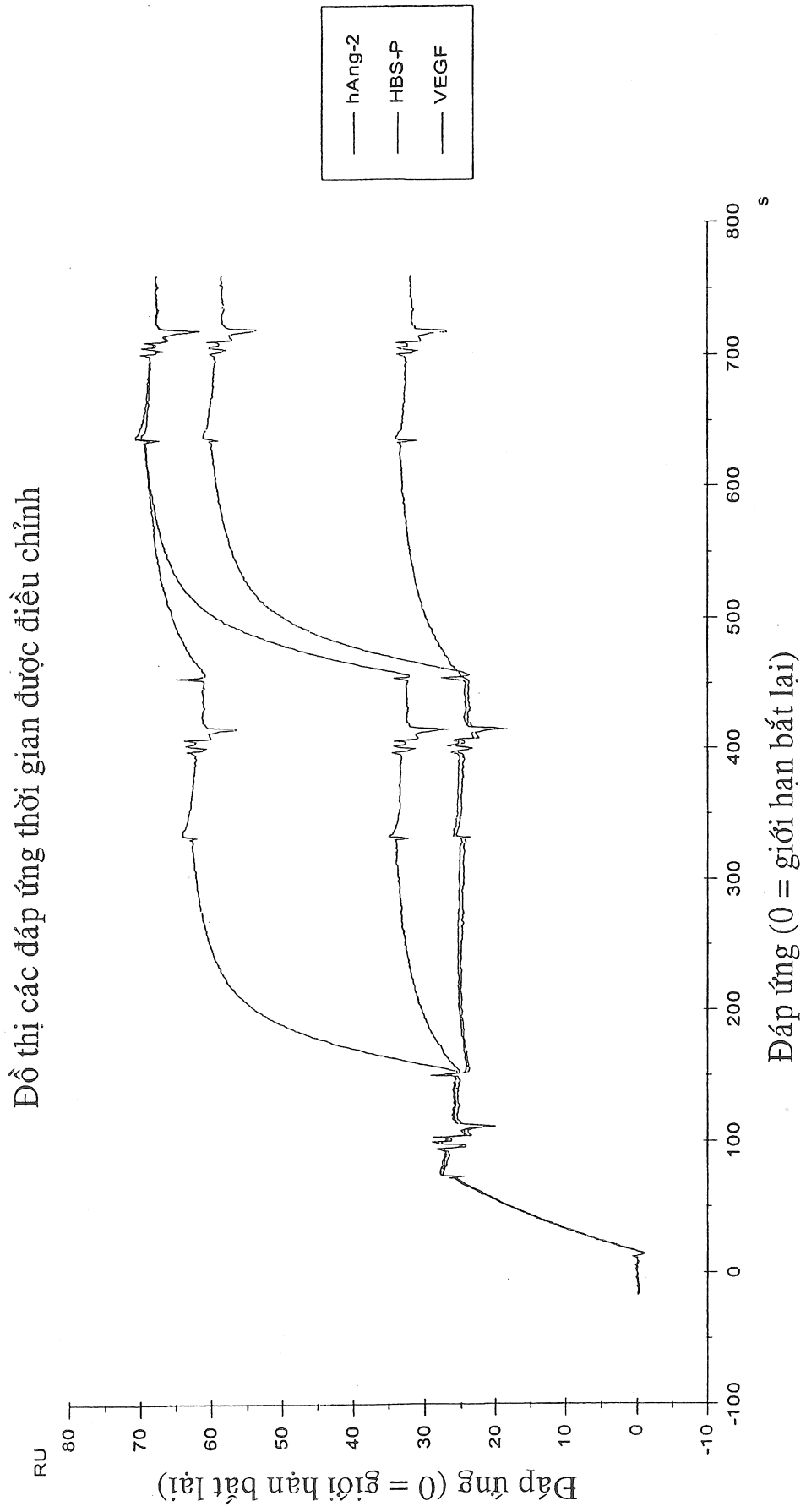


Fig.16A

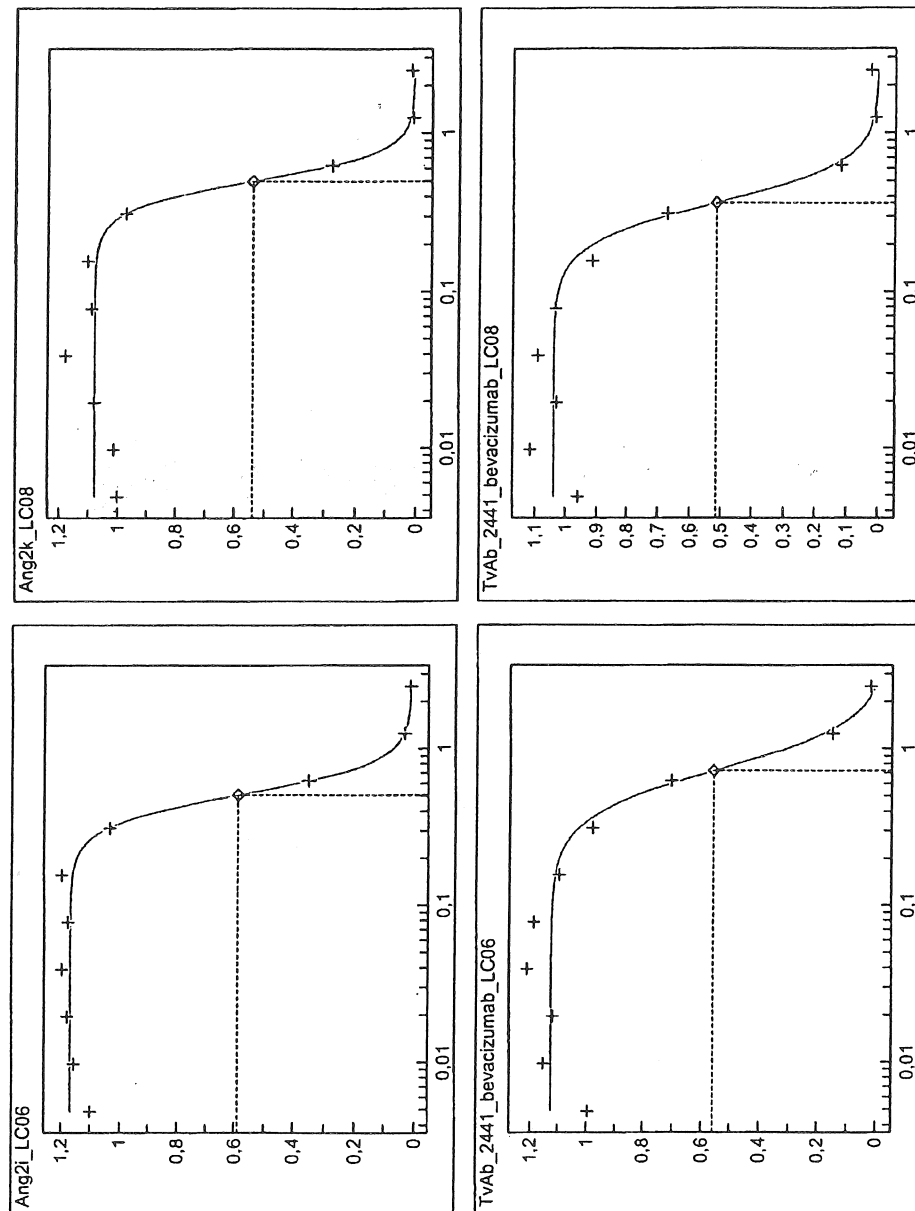
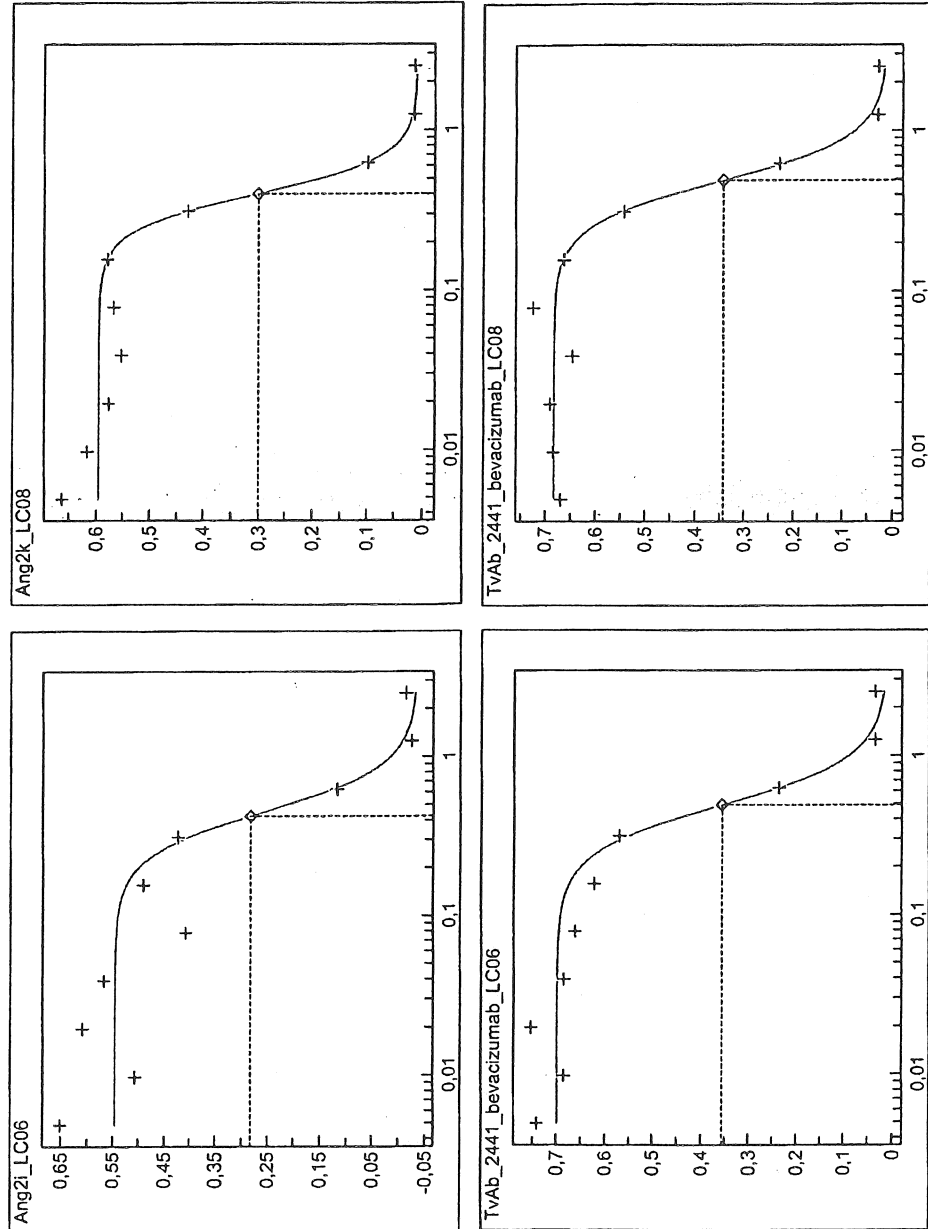


Fig.16B



22/25

Fig.17

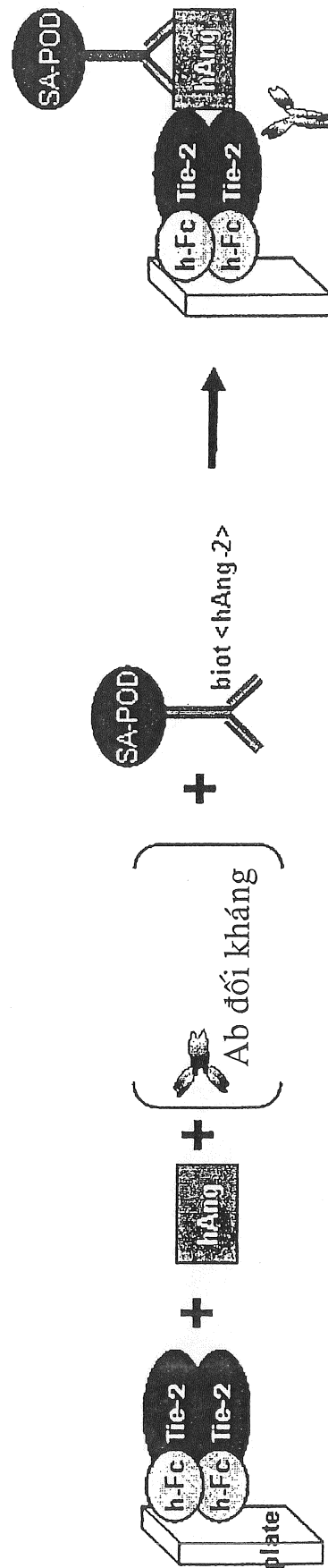


Fig.18

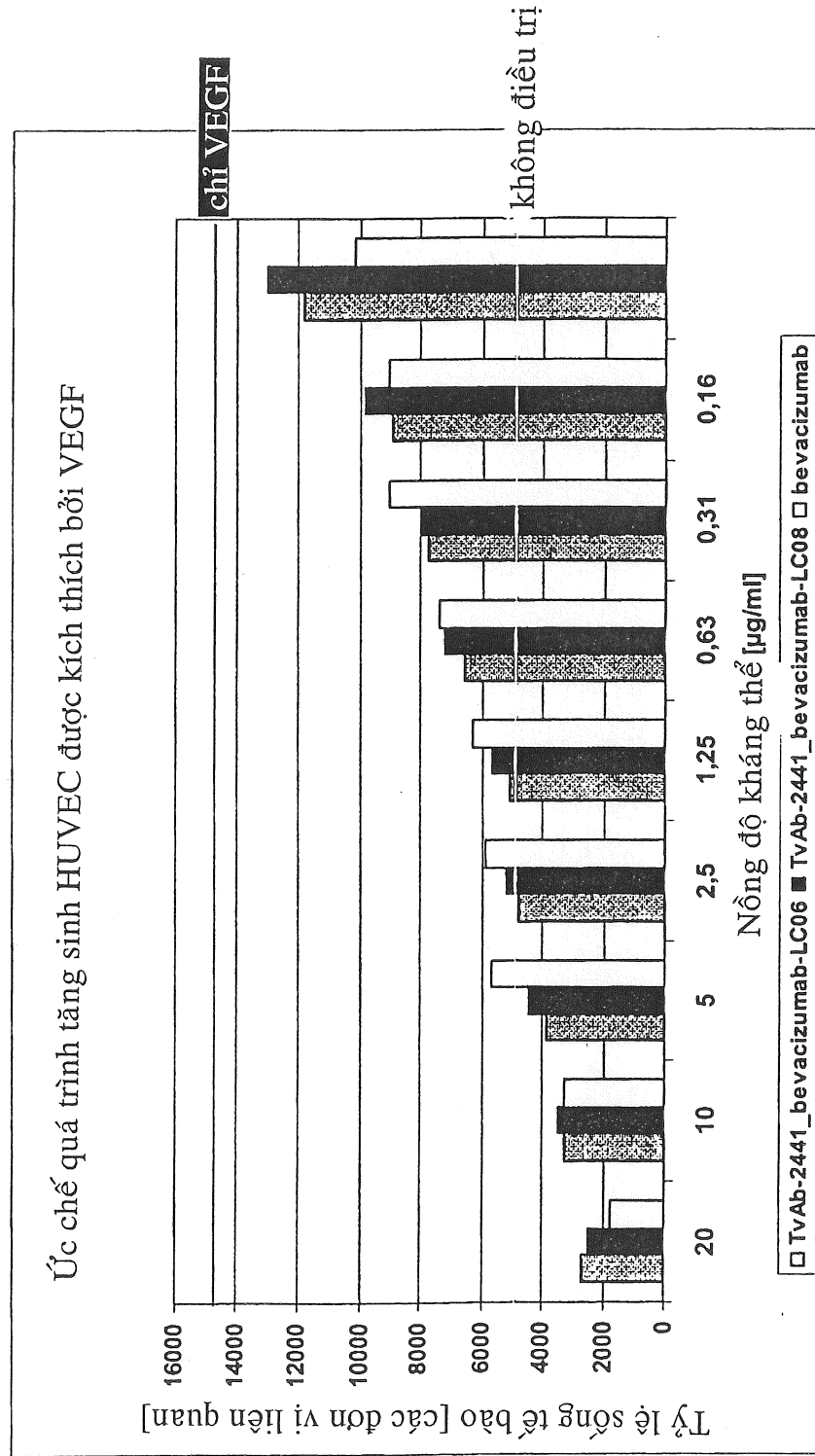


Fig.19

