



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

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

(11) 
1-0023141

(51)⁷ **C07K 16/22, A61K 39/395, A61P 35/00** (13) **B**

-
- | | | | |
|------|--|---------------|-------------------------------|
| (21) | 1-2013-02927 | (22) | 14.12.2009 |
| (62) | 1-2011-01888 | | |
| (86) | PCT/EP2009/008930 | 14.12.2009 | (87) WO2010/069532 24.06.2010 |
| (30) | 08021835.7 | 16.12.2008 EP | |
| (45) | 25.02.2020 | 383 | (43) 27.01.2014 310 |
| (73) | F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel, Switzerland | | |
| (72) | BRINKMANN, Ulrich (DE), GRIEP, Remko Albert (NL), KALUZA, Klaus (DE),
KAVLIE, Anita (NO), KLEIN, Christian (DE), REGULA, Joerg Thomas (DE),
SCHEUER, Werner (DE) | | |
| (74) | Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH) | | |
-

(54) **KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI ANGIOPOIETIN 2 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng Angiotensin 2 của người (kháng thể kháng ANG-2), phương pháp để tạo ra kháng thể này và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Angiopoietin 2 của người (kháng thể kháng ANG-2), phương pháp để sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa 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 tuổi già (AMD), chứng viêm đa khớp dạng thấp, và bệnh vảy 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 tế bào khối đạt được lợi thế phát triển và tăng sinh nhanh hơn so với tế bào bình thường. Vì vậy, có một mối liên quan mật thiết giữa mật độ các mao mạch trong khối u với khả năng sống sót của bệnh nhân bị 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 ANG-2 và kháng ANG-2

Angiopoietin-2 của người (ANG-2) (còn được viết tắt là ANGPT2 hoặc ANG2) (SEQ ID No:106) đã được mô tả trong tài liệu: Maisonpierre, P.C., et al, Science 277 (1997) 55-60, và Cheung, A.H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. Các Angiopoietin-1 và -2 (ANG-1 (SEQ ID No: 108) và ANG-2 (SEQ ID No: 107)) được phát hiện là các phối tử của 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 có bốn thành viên chính thức của họ Angiopoietin.

Angiopoietin-3 và -4 (Ang-3 và Ang-4) có thể là các bản sao được thấy phổ biến trong các 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 đã biết 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 hình thành và suy thoái mạch. Hỗ trợ vai trò này của ANG-2, các phân tích biểu hiện chứng tỏ rằng ANG-2 dễ bị kích thích, 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 đều có tác dụng tương đương, tác động hiệp đồng 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 tăng theo liều lượng đã quan sát được *in vitro* với nồng độ cao, ANG-2 có thể cũng 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 chu trình 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 thời điểm 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 quan sát được, 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 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 đã loại bỏ trạng thái đáp ứng với VEGF, trong khi sự có mặt của VEGF và ANG-2 lại kích thích hình thành mạch. Korff, T., et al., Faseb J. 15 (2001) 447-57. Etoh, T.H. et al. đã chứng tỏ rằng các EC biểu hiện chủ yếu Tie2, quá trình biểu hiện MMP-1, -9 và u-PA được điều chỉnh tăng rõ rệt bởi ANG-2 trong điều kiện 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 với sự có mặt của VEGF nội sinh làm tăng nhanh đường kính ống mao dẫn, thay đổi phiên nền, quá trình tăng sinh và di trú của các tế bào nội mô và kích thích hình thành các mạch máu mới. Lobov, I.B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11205-10. Ngược lại, ANG-2 thúc đẩy sự tử vong tế bào và sự kìm hãm sự phát 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. cho thấy rằng các thể kết tụ đa bào kích thích sự phát triển mạch bởi việc hình thành mạch thông qua việc đồng biểu hiện VEGFR-2 và ANG-2 ở vật chủ và khối u nội mô. Vajkoczy, P., et al., J. Clin. Invest. 109 (2002) 777-85. Kiểu này chứng tỏ rằng hệ mạch ổn định của các khối u sinh trưởng khác biệt bởi có sự thay 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 được kích thích bởi Angiopoietin-1 gây ra sự sửa đổi và phát triển mạch ổn định, 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 nhiều nơi và liên tục (Hanahan, D., Science, 277 (1997) 48-50; Zagzag, D., et al., Exp Neurology, 159 (1999) 391-400). Ngược 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 chung hoặc làm trưởng thành của Angiopoietin-1, cho phép tái tạo mạch, và vẫn giữ ở trạng thái mềm dẻo và có thể đáp ứng nhiều hơn với các tín hiệu hình thành (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 năng gợi ý rằng Angiopoietin-2 liên quan đến sự hình thành mạch khối u và liên quan đến quá trình biểu hiện quá mức Angiopoietin-2 với sự phát triển khối u tăng ở kiểu mô ghép khác loài của 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 gây ra tình trạng siêu mạch khối u (Etoh, T., et al., Cancer Res. 61 (2001) 2145-53; Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29).

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 được 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. (1999) 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 chứng tỏ 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, nhưng trong các thử nghiệm đó không rõ ràng là liệu Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 hoặc Tie-2 có phải là đích hấp dẫn để làm liệu pháp kháng ung thư không. Tuy nhiên, liệu pháp kháng 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 bất thường mà việc phong bế quá trình đó có thể giúp phòng ngừa bệnh sớm (Follunan, J., Nature Medicine. 1 (1995) 27-31).

Ngoài ra một số nhóm đề xuất 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 đáp ứng lại tín hiệu Angiopoietin-1/Tie-2 làm lỏng cấu trúc mạch rắn nhờ đó các EC tiếp xúc được với các tín hiệu hoạt hoá từ các tác nhân gây kích thích hình thành mạch, ví dụ VEGF (Hanahan, (1997). Tác dụng tiền tạo mạch này thu được từ sự ức chế Angiopoietin-1 cho thấy rằng liệu pháp kháng Angiopoietin-1 sẽ không phải là phương pháp điều trị bệnh ung thư hữu hiệu.

ANG-2 được biểu hiện trong quá trình phát triển tại các điểm mà xuất hiện việc sửa đổi mạch máu. 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 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, ung thư biểu mô tế bào gan, Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 341-45, ung thư biểu mô 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 ung thư biểu mô 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) 228-30, 235 (2001). Bằng cách phát hiện các mức ANG-2 ARN thông tin trong các mẫu bệnh ung thư vú người, Sfiligoi, C., et al., *Int. J. Cancer* 103 (2003) 466-74, mà liên quan đặc biệt đến sự xâm nhập hạch bạch huyết, thời gian không mắc bệnh ngắn và sự sống sót nói chung kém. Tanaka, F., et al., *Cancer Res.* 62 (2002) 7124-29, đã 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 việc sử dụng học miễn dịch, các tác giả đã phát hiện ra rằng 16,9% bệnh nhân NSCLC có ANG-2 dương tính. Mật độ mạch đối với khối u ANG-2 dương tính cao hơn đáng kể so với mật độ 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, việc 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 của mạch. Tanaka, F., et al., Cancer Res. 62 (2002) 7124-29. Kết quả thu được cho thấy rằng ANG-2 là chất chỉ thị ở bệnh nhân bị một số dạng bệnh ung thư mà 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 ở trẻ sơ sinh. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23. Chúng chúng tỏ rằng sự thoái triển màng trong của mạch trong mắt được thực hiện theo chương trình không xuất hiện ở chuột gây mê bằng ANG-2 và mạch máu võng mạc của chúng không thể phát triển được từ động mạch chính của 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 nặng ở kiểu và chức năng của hệ mạch bạch huyết. Gale, N.W., et al., Dev. Cell 3 (2000) 411-23. Việc tách khỏi 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 virus, ức chế sự phát triển *in vivo* ung thư biểu mô vú ở 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 cộng sự đã chứng minh rằng việc

bổ sung ANG-2 vào VEGF kích thích tình trạng mạch mới có chu vi lớn hơn và dài hơn trường hợp chỉ kích thích bằng VEGF. Asahara, T., et al., Circ. Res. 83 (1998) 233-40. Lượng thụ thể Tie2 hoà tan dư có khả năng ngăn chặn sự điều hòa 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 ở chuột.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bao gồm kháng thể gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin-2 của người (ANG-2), khác biệt bởi bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, hoặc SEQ ID NO: 49 như vùng CDR3 của miền biến đổi của chuỗi nặng.

Tốt hơn là kháng thể khác biệt ở chỗ:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, hoặc SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42, hoặc SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:

11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 hoặc SEQ ID NO: 51, và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 44, hoặc SEQ ID NO: 52, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, hoặc SEQ ID NO: 53, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46 hoặc SEQ ID NO: 54.

Tốt hơn là kháng thể khác biệt ở chỗ bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, hoặc SEQ ID NO: 55; và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, hoặc SEQ ID NO: 56.

Tốt hơn là kháng thể khác biệt ở chỗ kháng thể này không gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin 1 (ANG-1).

Một phương án khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Một phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hoá miền biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các vector biểu hiện chứa axit nucleic 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 chứa vector theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp để tạo ra kháng thể của người tái tổ hợp hoặc được làm tương thích với người theo sáng chế, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm bước biểu hiện axit nucleic theo sáng chế trong tế bào không nhân hoặc có nhân điển hình và thu hồi kháng thể, tế bào hoặc dịch nổi nuôi cấy tế bào này. Sáng chế còn bao gồm kháng thể có thể thu được bằng phương pháp tái tổ hợp này.

Kháng thể theo sáng chế là đặc biệt có tác dụng để ngăn ngừa các khối u thứ phát/di căn hoặc để điều trị các bệnh mạch như các bệnh vớng mạc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế bao gồm kháng thể gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin-2 của người (ANG-2), khác biệt bởi kháng thể này bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, hoặc SEQ ID NO: 49 như vùng CDR3 của miền biến đổi của chuỗi nặng.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể khác biệt ở chỗ:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41, hoặc SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42, hoặc SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43, hoặc SEQ ID NO: 51, và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 44, hoặc SEQ ID NO: 52, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 5,

SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 45, hoặc SEQ ID NO: 53 và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 46, hoặc SEQ ID NO: 54.

Tốt hơn là kháng thể khác biệt ở chỗ bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47, hoặc SEQ ID NO: 55; và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, hoặc SEQ ID NO: 56.

Phương án khác của sáng chế là đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với ANG-2 của người, khác biệt ở chỗ kháng thể không gắn kết đặc hiệu với Angiopoetin 1 của người (ANG-1). Các kháng thể thông thường gắn kết đặc hiệu với ANG-2 của người, nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 của người, ví dụ là Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, 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. Vì vậy theo một phương án của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin-2 của người (ANG-2), nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 của người mà gắn kết với epitop tương tự như Ang2s_R3_LC03, Ang2s_LC09, Ang2i_LC06, Ang2i_LC07, Ang2i_LC10, tốt hơn là gắn kết với epitop tương tự như Ang2i_LC06. Các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu ANG-2 nhưng không gắn kết đặc hiệu với ANG-1 có thể cải thiện các đặc tính như các đặc tính về hiệu lực, tính gây độc kém, các đặc tính dược động lực khi so sánh với các kháng thể đặc hiệu ANG-2 và ANG-1.

Vì vậy theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin-2 của người (ANG-2), nhưng không gắn kết với ANG-1 của người, trong đó kháng thể này khác biệt ở chỗ:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, hoặc SEQ ID NO: 49, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, hoặc SEQ ID NO: 50, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 35, hoặc SEQ ID NO: 51, và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36, hoặc SEQ ID NO: 52, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 37, hoặc SEQ ID NO: 53, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, hoặc SEQ ID NO: 54.

Tốt hơn nếu kháng thể này gắn kết đặc hiệu với Angiopoietin-2 của người (ANG-2), nhưng không gắn kết với ANG-1, khác biệt ở chỗ kháng thể này bao gồm:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, hoặc SEQ ID NO: 55; và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, hoặc SEQ ID NO: 56.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, hoặc SEQ ID NO: 9, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 10, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 11, và

b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 12, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 13, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm:

- a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 15; và
- b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8, hoặc SEQ ID NO: 16.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

- a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 1, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 2, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 3, và
- b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 4, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 5, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 6.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm:

- a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7; và
- b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ:

- a) miền biến đổi của chuỗi nặng bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 17, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 18, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 19, và
- b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR3 nêu trong SEQ ID NO: 20, vùng CDR2 nêu trong SEQ ID NO: 21, và vùng CDR1 nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một phương án kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ bao gồm:

- a) miền biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 23; và
- b) miền biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 24.

Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ kháng thể này thuộc kiểu phụ IgG1 của người hoặc thuộc kiểu phụ IgG4 của người.

Thuật ngữ “kháng thể” bao hàm các dạng khác nhau của các cấu trúc kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể nguyên vẹn và các quá trình làm ổn định bằng disulfua. Tốt hơn là kháng thể theo sáng chế là kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể dạng khảm, hoặc kháng thể được cải biến di truyền khác, với điều kiện là các đặc tính đặc trưng theo sáng chế được duy trì.

Thuật ngữ “quá trình làm ổn định bằng disulfua” bao gồm một phần của kháng thể có chiều dài đầy đủ, tốt hơn là miền biến đổi của chúng. Các ví dụ về các quá trình làm ổn định bằng disulfua bao gồm các kháng thể kép, các phân tử kháng thể mạch đơn ((scFv hoặc scFab), và các kháng thể đa hiệu (ví dụ đặc hiệu kép) được tạo ra từ các quá trình làm ổn định bằng disulfua. Các kháng thể scFv, ví dụ được mô tả trong tài liệu: Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88). Ngoài ra, các phân kháng thể bao gồm các polypeptit mạch đơn có các đặc tính của miền V_H , cụ thể là có thể kết hợp với miền V_L , hoặc của miền V_L gắn kết với ANG-2, cụ thể là có thể kết hợp với miền V_H thành điểm chức gắn kết kháng nguyên và tạo ra đặc tính. ScFvs có thể được làm ổn định nhờ sử dụng, ví dụ a) quá trình làm ổn định bằng disulfua (xem, 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., *Oncogene* (1999) 18 1711-1721.) hoặc b) các vùng khung ổn định (ví dụ bằng các đột biến đặc hiệu, xem ví dụ WO 2007/109254, các vùng khung ổn định đặc hiệu xem ví dụ US7,258,985, Furrer, F., et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009), pp. 771–778 hoặc Ottiger, M., et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009), pp. 779–786.

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 ổn định thu được từ một nguồn hoặc loài khác nhau, thường được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Các kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi của chuột và vùng ổn định của người được đặc biệt ưu tiên. Các dạng ưu tiên khác của "các kháng thể dạng khảm" theo sáng chế là các loại trong đó vùng ổn định được cải biến hoặc thay đổi từ vùng ổn định của kháng thể gốc để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt đối với gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR). "kháng thể dạng khảm" này còn được đề cập tới 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 ổn định globulin miễn dịch. Các phương pháp để tạo ra kháng thể dạng khảm bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và chuyển gen thông thường mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem: Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; các patent Hoa Kỳ số US 5,202,238 và US 5,204,244.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" đề cập đến kháng thể mà trong đó khung hoặc "các vùng xác định hỗ trợ" (CDR) được cải biến để chứa 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 của chuột được ghép vào vùng khung của kháng thể của 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 "kháng thể được làm tương thích với người" thuộc sáng chế là

các loại mà trong đó miễn bảo toàn được cải biến hoặc thay đổi thêm từ miễn 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 của người", theo sáng chế, sẽ bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ trình tự người globulin miễn dịch dòng mầm. Các kháng thể của người là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374). Các kháng thể của 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 tất cả các dạng 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 của người khi kích thích bằng kháng nguyên (ví dụ, xem: 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 của người cũng có thể được tạo ra ở các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381- 388; Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Các kỹ thuật của Cole và cộng sự và của Boerner và cộng sự. cũng đã được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng của 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 khảm hoặc được làm tương thích với người theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể của người" theo sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đã được cải biến ở vùng ổn định để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt liên quan đến gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc, 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 của người tái tổ hợp", theo sáng chế bao gồm tất cả các kháng thể của người được điều chế, 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 CHO hoặc từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen vào các gen globulin miễn dịch của người hoặc các kháng thể biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Các kháng thể của người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi và ổn định dưới dạng được 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 kháng thể tái tổ hợp là trình tự mã, 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 danh mục dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Thuật ngữ "miền biến đổi" (miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L), miền biến đổi của chuỗi nặng (V_H)) theo sáng chế đề cập đến từng cặp chuỗi nặng và nhẹ mà tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên. Các miền của chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của người có cấu trúc chung tương tự và mỗi miền này bao gồm bốn vùng khung (FR), mà các trình tự của chúng được bảo toàn rộng rãi, được liên kết bởi ba "vùng siêu biến" (hoặc các vùng xác định hỗ trợ, các CDR). Các vùng khung chấp nhận cấu hình tấm β - và các CDR có thể tạo ra các vòng nối với cấu trúc tấm 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 kháng thể theo sáng chế và vì vậy tạo ra mục đích khác nữa của sáng chế.

Thuật ngữ "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 với kháng nguyên. Phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể này 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 theo sáng chế. Vì vậy, các miền chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của kháng thể bao

gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4 từ đầu N đến đầu C. Đặc biệt, CDR3 của chuỗi nặng là vùng góp phần nhiều nhất vào việc gắn kết kháng nguyên và xác định các đặc tính của kháng thể. 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)) và/hoặc các gốc từ “vòng siêu biến”.

Thuật ngữ "axit nucleic hoặc phân tử axit nucleic", theo sáng chế, sẽ bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là ADN sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Thuật ngữ “axit amin” theo sáng chế đề cập đến nhóm các axit carboxy α -amin xuất hiện tự nhiên bao gồm alanin (mã ba ký tự: ala, mã một ký tự: A), arginin (arg, R), asparagin (asn, N), axit aspartic (asp, D), cystein (cys, C), glutamin (gln, Q), axit glutamic (glu, E), glyxin (gly, G), histidin (his, H), isoleuxin (ile, I), leuxin (leu, L), lysin (lys, K), methionin (met, M), phenylalanin (phe, F), prolin (pro, P), serin (ser, S), threonin (thr, T), tryptophan (trp, W), tyrosin (tyr, Y) và valin (val, V).

Axit nucleic được "liên kết một cách có kiểm soát" khi nó được đặt trong mối quan hệ về mặt chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN đối với tiền trình tự hoặc trình tự dẫn đầu tiết xuất được liên kết một cách có kiểm soát với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện như tiền protein tham gia vào quá trình tiết xuất polypeptit; trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết một cách có kiểm soát 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 một cách có kiểm soát với trình tự mã hoá nếu nó được đặt ở vị trí dễ dàng cho quá trình dịch mã. Nói chung, "liên kết một cách có kiểm soát" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết liền kề, và đối với trường hợp trình tự dẫn đầu tiết xuất, liền kề và trong khung đọc. Tuy nhiên, trình tự tăng cường không nằm liền kề. Liên kết hoàn chỉnh được thực hiện bằng cách ghép với 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 được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

Theo sáng chế, "tế bào," "dòng tế bào," và "dịch nuôi cấy tế bào" biểu hiện có thể được sử dụng thay thế cho nhau và các thuật ngữ này bao gồm thể hệ con. Vì vậy, các thuật ngữ "thể biến nạp" và "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 chủ 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.

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 (ANG-2) trong thử nghiệm *in vitro*, tốt hơn là trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon (Biacore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) (Ví dụ 3) 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 Fc γ RIII 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 2).

Thuật ngữ "epitop" bao gồm yếu tố xác định polypeptit bất kỳ mà 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 một kháng thể.

Thuật ngữ "phần Fc" của kháng thể không liên quan trực tiếp đến gắn kết của kháng thể với kháng nguyên, nhưng có các chức năng tác động khác nhau. "phần Fc của kháng thể" là thuật ngữ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được xác định dựa vào sự phân cắt papain của kháng thể. Tùy vào trình tự axit amin của vùng ổn định của các chuỗi nặng của chúng, kháng thể hoặc globulin miễn dịch được chia thành các loại: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một vài loại trong số đó còn được chia thành các kiểu phụ (các isotyp), ví dụ IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA1 và IgA2. Theo các vùng chuỗi nặng ổn định thì các loại khác nhau của các globulin miễn dịch được gọi là α , δ , ϵ và γ tương ứng. Phần Fc của kháng thể liên quan trực tiếp đến ADCC (tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể) và CDC (tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể) dựa vào quá trình hoạt hoá bổ thể, gắn kết với C1q và gắn kết với thụ thể Fc. Quá trình hoạt hoá bổ thể CDC được khởi đầu bằng gắn kết của nhân tố bổ thể C1q với phần Fc của phần lớn kiểu phụ kháng thể IgG. Trong khi tác động của kháng thể đối với hệ bổ trợ lại phụ thuộc vào một số điều kiện, gắn kết với C1q được tạo ra bởi các điểm gắn kết xác định ở phần Fc. Các điểm gắn kết này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả, ví dụ bởi Boakle, R.J., et al., Nature 282 (1975) 742-743, 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. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0307434. Các điểm gắn kết này, ví dụ là L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat, xem dưới đây). Các kháng thể có kiểu phụ IgG1, IgG2 và IgG3 thường thể hiện quá trình hoạt hoá bổ thể, gắn

kết C1q và C3, trong khi IgG4 không hoạt hoá hệ bổ thể và không gắn kết với C1q và C3.

Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là bao gồm phần Fc có nguồn gốc từ người mà là phần Fc của kháng thể người có kiểu phụ IgG1.

Kháng thể theo sáng chế khác biệt ở chỗ các chuỗi ổn định có nguồn gốc người. Các chuỗi ổn định này là đã biết rõ trong phần tình trạng kỹ thuật và ví dụ được mô tả bởi Kabat, E.A. (ví dụ, xem: Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218). Ví dụ, vùng chuỗi nặng ổn định người được sử dụng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 hoặc nêu trong SEQ ID NO: 58. Ví dụ, vùng chuỗi nhẹ ổn định người được sử dụng bao gồm trình tự axit amin của vùng chuỗi nhẹ ổn định kappa nêu trong SEQ ID NO: 59, hoặc của vùng chuỗi nhẹ ổn định lambda nêu trong SEQ ID NO: 60.

Thuật ngữ "vùng ổn định" theo sáng chế đề cập đến tổng các miền của kháng thể ngoài vùng ổn định. Vùng ổn định không trực tiếp tạo ra sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên, nhưng có các chức năng điều hòa khác nhau. Tùy thuộc vào trình tự axit amin của vùng ổn định 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 còn được chia thành các kiểu phụ, như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, IgA1, và IgA2. Các vùng chuỗi nặng ổn định mà tương ứng với các loại khác nhau của các kháng thể được gọi là α , δ , ϵ , γ và μ tương ứng. Các vùng chuỗi nhẹ ổn định mà có thể được thấy trong tất cả năm loại kháng thể được gọi là κ (kappa) và λ (lambda).

Thuật ngữ "vùng ổn định có nguồn gốc từ người" theo sáng chế đề cập đến vùng chuỗi nặng ổn định của kháng thể người thuộc kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 và/hoặc vùng chuỗi nhẹ ổn định κ . Các vùng ổn định này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả bởi Kabat, E.A., (xem ví dụ Johnson, G. and Wu, T.T., *Axit nucleic 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 gắn kết với thụ thể Fc giảm (FcγRIIIa), thì các kháng thể thuộc kiểu phụ IgG khác lại 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 với FcR giảm so với kháng thể IgG1 và kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai (chiều 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 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 ổn định được nêu trong SEQ ID NO:57 và 58. Theo một phương án, vùng chuỗi nặng ổn định của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai là nêu trong SEQ ID NO:57 với các đột biến L234A và L235A. Theo một phương án khác, vùng chuỗi nặng ổn định của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai là nêu trong SEQ ID NO:58 với đột biến S228P. Theo một phương án khác, vùng chuỗi nhẹ ổn định của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai là vùng chuỗi nhẹ kappa nêu trong SEQ ID NO:59 hoặc vùng chuỗi nhẹ ổn định lambda nêu trong SEQ ID NO:60. Theo một phương án của sáng chế, vùng chuỗi nặng ổn định của kháng thể gốc đặc hiệu đơn hoá trị hai là nêu trong SEQ ID NO: 57 hoặc nêu trong SEQ ID NO:58 với đột biến S228P.

Vùng ổn định 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 bề mặt). Quá trình hoạt hoá bề mặt (CDC) được kích thích bằng gắn kết của nhân tố bề mặt C1q với vùng ổn định 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 ổn định 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 ổn định 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 trong điều kiện 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 trong điều kiện 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 tiêu diệt tự nhiên (NK) hoặc dòng tế bào sinh trưởng ổn định NK.

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc bề mặt (CDC)” đề cập đến quy trình được kích thích bởi sự gắn kết của nhân tố bề mặt 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, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến 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 là đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm việc 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 trong tế bào chủ, các axit nucleic mã hoá các chuỗi nặng và nhẹ đã cải biến tương ứng được cài vào vector biểu hiện bằng các phương pháp chuẩn. Quá trình biểu hiện được thực hiện trong tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình thích hợp như tế bào CHO, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào HEK293, tế bào COS, tế bào PER.C6, tế bào nấm men, hoặc các tế bào *E.coli*, và kháng thể được thu hồi từ tế bào (dịch nổi hoặc dung dịch ly giải tế bào). Các phương pháp chung để sản sinh tái tổ hợp các kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này 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.

Kháng thể theo sáng chế được tách một cách thích hợp ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng các phương pháp tinh chế globulin miễn dịch thông thường, ví dụ như protein A-Sepharosa, phương pháp sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, hoặc phép sắc ký ái lực. ADN hoặc ARN mã hoá kháng thể đơn dòng được phân lập và tạo trình tự dễ dàng bằng cách 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 vector 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 tuỷ 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 biến dị trình tự axit amin (hoặc thể đột biến) của kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách đưa các nucleotit cải biến 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 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” theo sáng chế đề cập đến hệ tế bào bất kỳ mà có thể được biến đổi di truyền để tạo ra các kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào HEK293 và tế bào CHO được sử dụng làm tế bào chủ. Theo sáng chế, các thuật ngữ “tế bào,” “dòng tế bào,” và “dịch nuôi cấy tế bào” có thể được sử dụng thay thế cho nhau nhằm chỉ cả thể hệ con. Vì vậy, các thuật ngữ “thể biến nạp” và “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 trong 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 miên biến đổi được mô tả bởi Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; và Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Hệ biểu hiện tạm thời ưu tiên (HEK 293) được mô tả bởi Schlaeger, E.-J., và Christensen, K.,

trong Cytotechnology³⁰ (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 trình tự 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 trình tự khởi đầu, các trình tự tăng cường và các tín hiệu polyadenyl hoá.

Axit nucleic được "liên kết một cách có kiểm soát" 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 một cách có kiểm soát với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện như tiền protein tham gia vào quá trình tiết xuất polypeptit; trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết một cách có kiểm soát 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 một cách có kiểm soát 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 một cách có kiểm soát" 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, trình tự 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 trình tự liên kết tổng hợp được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

Quá trình tinh chế các kháng thể được thực hiện để loại bỏ các thành phần tế bào hoặc các tạp chất 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 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 ái lực 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-sepharoza, nhựa ưa areneaza, 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).

Sáng chế bao gồm phương pháp điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khác biệt bởi cung cấp cho bệnh nhân một lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc ngăn ngừa sự di căn.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư.

Một khía cạnh của sáng chế là dược 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 dược phẩm. Một khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp để bào chế dược 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.

Một khía cạnh khác của sáng chế là dược phẩm để ngăn ngừa sự di căn.

Một khía cạnh khác của sáng chế là kháng thể theo sáng chế để ngăn ngừa sự di căn.

Một khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc ngăn ngừa sự di căn.

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

Theo sáng chế, “chất mang được dụng” bao gồm 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).

Các tác giả sáng chế nhận thấy rằng có một sự ngăn ngừa rất hiệu quả sự di căn tự phát/các khối u thứ phát *in vivo* ở đúng vị trí và kiểu bệnh ung thư dưới da (xem ví dụ 9) (ngược với kiểu thử nghiệm nơi các tế bào u được tiêm trong tĩnh mạch. Điều này tương tự với trạng thái lâm sàng trong đó các tế bào phát tán từ khối u nguyên phát và di căn tới bộ phận thứ hai như phổi hoặc gan (trong các khối u thứ phát).

Thuật ngữ “di căn” theo sáng chế đề cập đến việc truyền các tế bào ung thư từ khối u nguyên phát tới một hoặc nhiều điểm khác ở bệnh nhân nơi mà sau đó các khối u thứ phát phát triển. Metastasis Means để xác định khả năng mắc bệnh ung thư đã bị di căn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm siêu âm xương, chụp tia X ngực, cắt lớp CAT, cắt lớp MRI và các thử nghiệm gen đánh dấu khối u.

Thuật ngữ “ngăn ngừa sự di căn” hoặc “ngăn ngừa các khối u thứ phát” theo sáng chế có cùng nghĩa và đề cập đến tác nhân phòng ngừa chống lại sự di căn ở bệnh nhân bị bệnh ung thư dương tính HER2 tái phát để ức chế hoặc làm giảm sự lan truyền các tế bào ung thư từ khối u nguyên phát tới một hoặc nhiều điểm khác ở bệnh nhân. Điều này có nghĩa là sự di căn của khối u hoặc bệnh ung thư nguyên phát được ngăn ngừa, làm chậm, hoặc giảm và nhờ đó sự phát triển của các khối u thứ phát được ngăn ngừa, làm chậm, hoặc giảm. Tốt hơn là

sự di căn, nghĩa là các khối u thứ phát của phổi được ngăn ngừa hoặc giảm, điều này có nghĩa là sự lan truyền các tế bào ung thư từ khối u nguyên phát tới phổi được ngăn ngừa hoặc giảm.

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

Khía cạnh khác của sáng chế là kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh ung thư.

Theo sáng chế, “chất mang dược dụng” bao gồm và tất cả các dung môi bất kỳ, 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 được biết bởi người có hiểu biết trung bình 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 chặn sự bất hoạt của nó. Ví dụ, hợp chất có thể được cung cấp cho đối tượng trong một chất mang thích hợp, ví dụ, các liposom hoặc chất pha loãng. Các chất pha loãng dược dụng thích hợp bao gồm nước muối và các dung dịch đệm chứa nước. Các chất mang dược dụng bao gồm các dung dịch nước tiệt trùng hoặc các thể phân tán và các bột tiệt trùng để bào chế để pha thành 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 dụng 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, việc

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 ruột, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, ung thư biểu mô các ống dẫn trứng, ung thư biểu mô nội mạc tử cung, ung thư biểu mô cổ tử cung, ung thư biểu mô âm đạo, ung thư biểu mô 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, sarcom 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, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô bể 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 xóp đa dạng, u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u tế bào màng não thất, u nguyên tuỷ bào, u màng não, ung thư biểu mô tế bào có vảy, u tuyến yên và sarcom 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 dược 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.

Khía cạnh khác của sáng chế là đề cập đến kháng thể theo sáng chế để điều trị các bệnh mạch.

Một phương án ưu tiên là kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh võng mạc.

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 quy, 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 thận 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 vảy 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 monostearat và gelatin.

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

Các mức liều dùng thực tế của hoạt chất trong được 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 được 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 được 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 tiết 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 đệm 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 thế hệ con không thể giống nhau hoàn toàn về lượng ADN, do các đột biến có ý hoặc vô ý. Thế 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 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 dày 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 chuẩn 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) 7110ff.

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 bước tách intron ra khỏi ARN thông tin.

Thuật ngữ "vectơ" 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 này bao gồm các vectơ 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 vectơ mà cơ bản là thực hiện chức năng sao chép ADN hoặc ARN và các vectơ 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.

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

Mô tả các trình tự axit amin

SEQ ID NO: 1: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 2: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 3: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 4: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 5: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 6: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 7: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 8: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC06

SEQ ID NO: 9: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 10: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 11: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 12: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 13: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 14: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 15: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 16: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC07

SEQ ID NO: 17: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 18: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 19: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 20: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 21: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 22: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 23: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 24: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2k_LC08

SEQ ID NO: 25: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 26: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 27: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 28: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 29: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 30: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 31: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 32: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2s_LC09

SEQ ID NO: 33: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC10

SEQ ID NO: 34: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC10

SEQ ID NO: 35: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC10

SEQ ID NO: 36: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC10

- SEQ ID NO: 37: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
- SEQ ID NO: 38: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
- SEQ ID NO: 39: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC10
- SEQ ID NO: 40: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2i_LC10
- SEQ ID NO: 41: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 42: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 43: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 44: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 45: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 46: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 47: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 48: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2k_LC11
- SEQ ID NO: 49: chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 50: chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 51: chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 52: chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 53: chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 54: chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 55: miền biến đổi của chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 56: miền biến đổi của chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
- SEQ ID NO: 57: vùng chuỗi nặng người ổn định thu được từ IgG1
- SEQ ID NO: 58: vùng chuỗi nặng người ổn định thu được từ IgG4
- SEQ ID NO: 59: vùng chuỗi nhẹ ổn định kappa

SEQ ID NO: 60: vùng ổn định chuỗi nhẹ lambda

SEQ ID NO: 61: thụ thể người Tie-2

SEQ ID NO: 62: Angiopoietin-2 của người (ANG-2) với trình tự dẫn đầu và His-tag

SEQ ID NO: 63: Angiopoietin-1 của người (ANG-1) với trình tự dẫn đầu và His-tag

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Tách dòng các IgG cho các quá trình biểu hiện tạm thời vào các vector biểu hiện các quá trình biểu hiện tạm thời A) Ang2i-LC06 (Fig.1A) B) Ang2i-LC06 (Fig.1B)

Fig.2: SDS-PAGE Gel của kháng thể tinh khiết kháng ANG-2 Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 và Ang2k-LC08

Fig.3: ELISA tương tác Angiopoietin-Tie2

Fig.4: Quá trình ức chế gắn kết của ANG-2 với Tie2 bằng Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08

Fig.5 quá trình ức chế gắn kết của ANG-1 với Tie2 bằng Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08

Fig.6: Kiểu mô ghép khác loài Colo205 để thử nghiệm *in vivo* hiệu quả của các kháng thể kháng ANG-2

Fig.7: Kiểu mô ghép khác loài KPL-4 để thử nghiệm *in vivo* hiệu quả của các kháng thể kháng ANG-2.

Fig.8: Gắn kết của ANG-1 qua đồ thị các đáp ứng theo thời gian trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt Biacore.

Fig.9: Ngăn ngừa sự di căn phổi/các khối u thứ phát bằng các kháng thể theo sáng chế ở kiểu mô ghép khác loài ruột kết nguyên phát (9A) và kiểu mô ghép khác loài vú (9B).

Fig.10. Quá trình ức chế rồi loạn liên quan đến võng mạc bằng các kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp thử nghiệm 1

Các hợp 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 đó 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 nối các oligonucleotit bao gồm quá trình khuếch đại PCR và tiếp theo tách dòng qua các điểm cắt giới hạn, ví dụ KpnI/ SacI hoặc AscI/PacI vào vectơ tách dòng pGA4 gốc pPCRScrip (Stratagene). 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).

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 Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite version 8.0 được sử dụng để tạo, vẽ bản đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vectơ biểu hiện

Để biểu hiện các kháng thể mô tả, các thể biến dị 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 trình tự khởi đầu CMV-Intron A hoặc tổ chức hệ gen với trình tự khởi đầu CMV (ví dụ Fig.1) được ứng dụng.

Ngoài catxet biểu hiện kháng thể các vectơ 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',
- trình tự khởi đầu tức thời-sớm chính và trình tự 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 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 bằng cách 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 kiểm tra bằng cách tạo trình tự ADN. Để chuyển nhiễm tạm thời và ổn định, một lượng lớn plasmit được tạo ra bằng chế phẩm plasmit từ dịch nuôi cấy *E. coli* biến đổi (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

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.

Quá trình chuyển nhiễm tạm thời ở hệ HEK293F

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 $1,0E*6$ tế bào/ml trong 600 mL và ủ với 120 vòng/phút, 8% CO₂. Ngày hôm sau các tế bào được chuyển nhiễm với mật độ tế bào khoảng $1,5E*6$ 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 293 fectin hoặc fectin (2 µl/mL). Tuỳ 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.

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 agaroza (Roche). 60 µL các hạt protein A agaroza 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 agaroza đã được 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 µl 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 thuốc nhuộm xanh 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 protein A-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 K_2HPO_4 , 300 mM NaCl, pH 7,3 và rửa giải khỏi chất nền với 50 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 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 IgG-ELISA kiểu bánh kẹp. 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 được biotin hoá F(ab')₂-Fc γ 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-Fc 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 Fig.2).

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast gel system (Invitrogen) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 4-20% các gel NuPAGE® Novex® TRIS-Glyxin Pre-Cast và chất đệm thao tác Novex® TRIS-Glyxin SDS được sử dụng. (xem ví dụ Fig.1). 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 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 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 chuẩn.

Phép đo phổ khối

Khối lượng tổng các kháng thể 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 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 ANG-1 và ANG-2

Các đặc tính gắn kết của các kháng thể trực tiếp kháng ANGPT (Angiopoietin 1 hoặc 2) 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 cơ sở thực nghiệm) 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 của người tái tổ hợp (không có chất mang) trong PBS (Sigma) 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 kháng thể thử nghiệm tinh khiết pha loãng theo bậc (40 pM-0,01 pM) không <ANG-2> và như Mab536 tham chiếu (Oliner, J., et al., Cancer Cell. Nov 6 (2004) 507-16, US 2006/0122370) trong PBS 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-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 chiếu là 492 nm).

BIACORE gắn kết ANG-2

Gắn kết của các kháng thể với kháng nguyên, ví dụ ANG-2 của người được nghiên cứu bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách 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 dê γ -IgG được cố định trên chip CM5 nhờ kết hợp amin để thể hiện các kháng thể kháng ANG-2 của 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 cơ sở thực nghiệm) được bổ sung vào với các nồng độ khác nhau giữa 0,41 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 (ví dụ các đường cong chất đệm) được trừ từ các đường cong mẫu để hiệu chỉnh hệ độ lệch chuẩn thực chất hệ thống và để giảm tín hiệu nhiễu. 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 trên chip 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 bổ sung trong 1 giờ. 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.

Ức chế gắn kết huANG-1 với Tie-2 (ELISA)

Tương tác ELISA được tiến hành bằng các đĩa vi chuẩn độ 384 giếng (MaxiSorb Nunc#442768) 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 hoặc trong chất được tạo ra trong nhà máy) 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-1 (R&D Systems #923-AN/CF hoặc trong chất được tạo ra

trong nhà máy) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa hỗn hợp của 0,5 µg/ml dòng vô tính biotin hoá kháng Angiopoietin-1 (R&D Systems #BAF923) 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.

Hình thành 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, plasmit gốc pcDNA3 (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) mã hoá Tie2 người có độ dài đầy đủ (SEQ ID 61) dưới sự kiểm soát của trình tự 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 bền được chọn lọc bằng DMEM 10% FCS, 500 µg/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 clone22 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, 2x10⁵ 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 NaV3O4, 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 NaV3O4 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 NaV3O4, 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 tổng. Các lượng P-Tie2 được định lượng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và các giá trị IC50 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 IC50 có thể so sánh trong khi đang thử nghiệm nhưng có thể thay đổi theo thử nghiệm.

Thử nghiệm phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT1

Mức ức chế phosphoryl hoá Tie2 được kích thích bởi ANGPT1 bằng các kháng thể ANGPT1 được xác định theo nguyên tắc thử nghiệm dưới đây. HEK293-Tie2 clone22 kích thích bằng ANGPT1 trong 5 phút với sự có mặt hoặc không có kháng thể ANGPT1 và P-Tie2 được định lượng bằng ELISA dạng nhiều lớp. Một cách vắn tắt, 2x10⁵ 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 ANGPT1 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 ANGPT1 (R&D systems # 923-AN] (0,8 μ g/ml thành dung dịch cô gấp 4 lần). Các kháng thể và ANGPT1 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 NaV3O4, 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 NaV3O4 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% glyxerol, 2mM EDTA, 1 mM NaV3O4, 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 tổng. Các lượng P-Tie2 được định lượng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và các giá trị IC50 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 IC50 có thể so sánh trong khi đang thử nghiệm, nhưng có thể thay đổi theo thử nghiệm.

Ví dụ 1. Quá trình biểu hiện và tinh chế các kháng thể <ANG-2> đơn dòng Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 và Ang2k-LC08

Các chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể tương ứng Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 và Ang2k-LC08 tương ứng được cấu trúc trong các vector biểu hiện như được mô tả ở trên. Chuỗi nặng và nhẹ kappa được tách dòng vào catxet biểu hiện hệ gen, trong khi chuỗi nhẹ lambda được tách dừng như AND bổ trợ với intron A (Fig 1B). 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 FreeStyle 293 của Invitrogen). 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 kháng thể 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.1), các chuỗi polypeptit nặng của kháng thể <ANG-2> SDS-PAGE thể hiện nhờ các kích cỡ phân tử biểu kiến SDS-PAGE khoảng 50 kDa tương tự với các trọng lượng phân tử đã tính toán, các chuỗi polypeptit nhẹ thể hiện nhờ các khối lượng phân tử biểu kiến là 25 kDa theo kích cỡ dự đoán của chúng. 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.

Phân tích phép sắc ký loại trừ kích cỡ kháng thể tinh khiết. Tất cả kháng thể được chuẩn bị và đặc trưng hoá bằng cách phân tích tương tự với quy trình đã mô tả. Dữ liệu SEC của các kháng thể tương ứng được tóm tắt trong bảng dưới đây.

	Chuỗi kháng thể	Khối lượng theo lý thuyết (Da)	Khối lượng theo thử nghiệm (Da)	Đỉnh SEC chính (%)
<ANG-2>Ang- 2i_LC07	HC	50343	50325 (pyro-Glu)	99,7%
	LC	22738	22720 (pyro-Glu)	
<ANG-2>Ang- 2i_LC06	HC	50343	50325 (pyro-Glu)	99,8%
	LC	22620	22605 (pyro-Glu)	
<ANG-2>Ang- 2k_LC08	HC	49544	49527 (pyro-Glu)	99,8%
	LC	22685	22667 (pyro-Glu)	

Ví dụ 2. Thử nghiệm gắn kết ELISA với ANG-1 của người và với ANG-2 của người

Gắn kết của các kháng thể <ANG-2> Ang2i-LC06, Ang2i-LC07 và Ang2k-LC08 với ANG-1 của người và ANG-2 của người được xác định bằng ELISA gắn kết ANG-1 hoặc ANG-2 như được mô tả ở trên. Một cách vắn tắt, thử nghiệm kiểu ELISA dựa vào quá trình cố định Angiopoietin-1 hoặc -2 của người kiểu đại trong đĩa vi chuẩn độ. Gắn kết của kháng thể trực tiếp chống lại 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 EC50	Gắn kết hANG-2 EC50
<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 3. Gắn kết với ANG-2 nhờ Biacore

Ái lực để gắn kết với ANGPT2 người được kiểm tra bằng thử nghiệm Biacore như được mô tả ở trên. Một cách vắn tắt, trong thử nghiệm này kháng thể giữ (kháng Fc) được cố định trên bề mặt của chip Biacore, kháng thể này giữ và thể hiện kháng thể tương ứng (ví dụ Ang2i-LC06). Phôi tử (ở đây ANGPT2) được giữ khỏi dung dịch. Ái lực đối với tương tác này được xác định với giả định là tương tác 1:1. Các chi tiết của thử nghiệm này có thể được thấy trong phần các phương pháp chung. Các ái lực được xác định đối với gắn kết ANGPT2 (KD) được tóm tắt trong bảng dưới đây.

hAng-2	Thử nghiệm 1			Thử nghiệm 2			Trung bình (từ 1+2)	
	KD (pM)	kd (1/giây)	t _(1/2) diss (phút)	KD (pM)	kd (1/giây)	t _(1/2) diss (phút)	kd (1/giây)	t _(1/2) diss (phút)
Ang2i-LC06	11	7,16E-05	161	21	1,14E-04	102	16	132
Ang2k-LC08	16	1,61E-04	72	27	2,28E-04	51	22	61
Mab536	29	1,44E-04	80	29	1,25E-04	92	29	86

Các kháng thể Ang2i-LC06 và Ang2k gắn kết với ái lực cao với ANGPT2.

Ví dụ 4. Trung hoà tương tác ANGPT1/2-Tie2 (người)

Phong bế tương tác ANGPT1/2/Tie2 của người được thể hiện bằng tương tác thụ thể ELISA. Các đĩa 384 giếng Maxisorp (Nunc) được phủ bằng 0,5 µg/ml Tie2 người (R&D Systems, UK, Cat.No.313-TI hoặc trong chất được tạo ra trong cơ sở thực nghiệm) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và phong bế bằng PBS có bổ sung 0,2% Tween-20 và 2% BSA (Roche Diagnostics GmbH, DE) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng có lắc. Trong khi đó, các dung dịch chứa các kháng thể tinh khiết trong PBS được ủ với 0,2 µg/ml huAngiopoietin-1/2 (R&D Systems #923-AN/CF, R&D Systems,UK, Cat.No. 623-AN hoặc trong chất được tạo ra trong nhà máy) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa hỗn hợp của 0,5 µg/ml dòng vô tính biotin hoá kháng Angiopoietin-1/2 (R&D Systems #BAF923, 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 đệm #204 530 001, các thẻ #11 112 422 001) trong 30 phút ở RT. Hệ số hấp thụ được xác định ở 405 nm.

Các nồng độ ức chế thu được được tóm tắt trong bảng dưới đây.

Kháng thể	ELISA tương tác ANGPT1/Tie2	ELISA tương tác ANGPT2/Tie2
Ang2i-LC06	> 100 nM	0,1 nM
Ang2k-LC08	11 nM	0,17 nM
MAb536	Không phát hiện	0,15 nM

Bảng trên thể hiện các profil chọn lọc khác nhau đối với hai kháng thể Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08. Ang2i-LC06 là ANGPT2 chọn lọc, trong khi Ang2k-LC08 là phản ứng chéo ANGPT1/2 để ức chế đối với tương tác ANGPT1/2 Tie2.

Ví dụ 5. Quá trình phosphoryl hóa Tie2

Ái lực của các kháng thể nhận dạng ANGPT2 để ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 do ANGPT2 và ANGPT1 tạo ra được kiểm tra trong các thử nghiệm phosphoryl hóa Tie2 do ANGPT2 và ANGPT1 gây ra như được mô tả ở trên. Việc biểu diễn dưới dạng sơ đồ của cấu trúc thử nghiệm được mô tả trên Fig.3.

Cả hai kháng thể Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 có sự ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 phụ thuộc liều lượng với các giá trị IC50 so sánh được như được thể hiện trên Fig.4. Ang2i-LC06 ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC50 khoảng 508 ng/ml và Ang2k-LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giá trị IC50 khoảng 499 ng/ml. Trái lại, chỉ Ang2k-LC08 ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 được kích thích bởi ANGPT1 với giá trị IC50 khoảng 391 ng/ml trong khi Ang2i-LC06 không ngăn cản quá trình phosphoryl hóa Tie2 được kích thích bởi ANGPT2 với giới hạn nồng độ thử nghiệm tương tự (Fig.5).

Ví dụ 6. Hiệu quả *in vivo*

Hiệu quả của các kháng thể kháng ANGPT đối với sự sinh trưởng của kiểu mô ghép khác loài Colo205

Hiệu quả *in vivo* của các kháng thể <ANGPT2> Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 so sánh với kiểu mô ghép khác loài dưới da <ANGPT2> Mab536 theo giai đoạn.

Các kháng thể tinh khiết Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 được so sánh với kháng thể Mab536 ở kiểu mô ghép khác loài dưới da Colo205 theo giai đoạn (Ang2_PZ_Colo205_006) ở chuột cái Scid màu be.

Các kháng thể: Mab536 được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc đông lạnh (c = 4,5 mg/mL), Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 được cung cấp dưới dạng dung

dịch gốc đông lạnh ($c = 1 \text{ mg/mL}$) 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 nếu cần và PBS được sử dụng làm chất mang. Kháng thể IgG1 kháng IgE được làm tương thích với người Xolair (Omalizumab) được sử dụng làm đối chứng dương tính và được mua từ phòng dược.

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 nhân nhanh được lưu giữ ở ngân hàng tế bào nội địa Roche Penzberg. Dòng tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (PAA, Laboratories, Austria) 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 3 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật thử nghiệm: chuột cái màu be SCID (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 tới, 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 12-14 tuần.

Theo dõi: Động vật thử nghiệm thử nghiệm được kiểm tra hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để theo dõi suốt quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể con 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 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, cấy vào sườn phải mỗi con chuột thử nghiệm 100 μ l huyền phù, tương ứng với $2,5 \times 10^6$ tế bào/con.

Điều trị cho động vật thử nghiệm: 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_006) với thể tích khối u trung bình tương ứng là 178 mm³.

Chế độ liều của thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_006:

Nhóm	Số lượng	Hợp chất	Liều lượng mg/kg	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy (mg/kg)
1	10	Chất dẫn		Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	
2	10	Xolair	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
5		Ang2k-LC08	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
6	10	MAB536	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50

Mức độ ức chế sự phát triển khối u cho tới ngày 50 được thể hiện trong Fig.6. Dữ liệu này chứng tỏ rằng kháng thể ANGPT2 chọn lọc Ang2i-LC06 là kháng thể hoạt hoá nhất (giá trị tỷ lệ khối u đối chứng (TCR) 0,39). Ang2i-LC06 ức chế sự phát triển khối u hữu hiệu hơn kháng thể MAb536 (giá trị TCR 0,47) và kháng thể ANGPT1 phản ứng chéo Ang2k-LC08, chọn lọc (giá trị TCR 0,46).

Hiệu quả của kháng thể kháng ANGPT đối với sự sinh trưởng của kiểu mô ghép khác loài KPL-4

Hiệu quả *in vivo* của các kháng thể <ANGPT2> Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 so sánh với <ANGPT2> Mab536 ở kiểu mô ghép khác loài đúng vị trí KPL-4 theo giai đoạn

Các kháng thể tinh khiết Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 được so sánh với kháng thể Mab536 ở ở kiểu mô ghép khác loài đúng vị trí KPL-4 theo giai đoạn (Ang2_PZ_Colo205_006) ở chuột cái Scid màu be.

Các kháng thể: Mab536 được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc đông lạnh ($c = 4,5$ mg/mL), Ang2i-LC06 và Ang2k-LC08 được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc đông lạnh ($c = 1$ 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 nếu cần thiết và PBS được sử dụng làm chất mang.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy: các tế bào ung thư vú KPL-4 của người trước được thu được nhận từ bệnh nhân ung thư vú bị tràn dịch màng phổi ác tính với biểu hiện di căn viêm da. Các tế bào KPL-4 dòng được cung cấp bởi Prof. J. Kurebayashi (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan). Các tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường DMEM (PAN Biotech, Germany) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAN Biotech, Germany) và 2 mM L-glutamin (PAN Biotech, Germany) ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Lần cấy chuyển được tiến hành có tách bằng trypsin/EDTA 1x (PAN) ba lần/tuần.

Các động vật thử nghiệm: chuột cái màu be SCID (được mua của Charles River Germany) được nuôi trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn chuẩn (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi được chuyển tới, động vật thử nghiệm thử nghiệm này 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 tùy ý. Tuổi chuột khi bắt đầu nghiên cứu khoảng 12 tuần.

Theo dõi: Động vật thử nghiệm được kiểm tra hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để theo dõi suốt thử nghiệm, trọng lượng cơ thể con 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 u được thu gom (trypsin-EDTA) từ các bình nuôi cấy (Greiner TriFlask) và được chuyển vào 50 ml môi trường nuôi cấy, rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS và lọc (bộ lọc tế bào; Falcon™; 100µm) độ chuẩn cuối cùng được điều chỉnh tới $1,5 \times 10^8/\text{ml}$. Huyền phù tế bào u được trộn kỹ bằng pipett chuyển để tránh kết tụ tế bào. Việc gây mê được tiến hành nhờ sử dụng thiết bị xông Stephens cho động vật thử nghiệm nhỏ với buồng ủ sơ bộ (plexiglas), mặt nạ mũi chuột riêng biệt (silicon) và không có hợp chất gây mê dễ cháy hoặc dễ nổ Isoflurane (Pharmacia-Upjohn, Germany) trong hệ thống tuần hoàn đóng kín. Hai ngày trước khi tiêm lông của động vật thử nghiệm được cạo. Để tiêm i.m.f.p. các tế bào được tiêm đúng vị trí với thể tích 20 µl ($3 \times 10^6/\text{con vật}$) vào đệm mỡ vú bên gần cuối của từng con chuột đã được gây mê. Để cấy ghép đúng vị trí, huyền phù tế bào được tiêm qua da dưới núm vú nhờ sử dụng bơm tiêm µl Hamilton và kim 30Gx1/2".

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm được bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên với kích cỡ khối u khoảng từ 60 đến 180 mm³, 35 ngày sau khi cấy ghép tế bào (thử nghiệm Ang2_PZ_KPL-4_002) với thể tích khối u trung bình tương ứng là 90 mm³.

Chế độ liều lượng của thử nghiệm Ang2_PZ_KPL-4_002:

Nhóm	Số lượng	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 một tuần một lần	5	
2	10	Xolair	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
3	10	Ang2i-LC06	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
5		Ang2k-LC08	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
6	10	MAB536	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50

Mức độ ức chế sự phát triển khối u cho tới ngày 64 được thể hiện trong Fig.7. Dữ liệu này chứng tỏ rằng kháng thể ANGPT2 chọn lọc Ang2i-LC06 là kháng thể hoạt hoá nhất (giá trị TCR 0,55) ở kiểu KPL-4. Ang2i-LC06 ức chế sự phát triển khối u hữu hiệu hơn kháng thể MAb536 (giá trị TCR 0,57) và kháng thể ANGPT2 phản ứng chéo Ang2k-LC08, chọn lọc (giá trị TCR 0,57).

Ví dụ 7. Gắn kết với ANG-1 nhờ Biacore

Ái lực để gắn kết với ANG-1 của người được kiểm tra bằng thử nghiệm Biacore: huAng-1 được làm bất động trên biosensorchip CM5 bằng cách sử dụng hoá học kết hợp amin. Protein được tiêm trong 20 phút trong natri axetat độ pH 4,5 với 10 µg/ml với tốc độ truyền 5 µl/phút. Nó tạo ra mật độ bề mặt khoảng 20000 RU. Dựa vào tế bào dòng tham chiếu BSA được làm cố định trong các điều kiện tương tự. Kháng thể được pha loãng trong HBS-P tới 100 nM và tiêm trong 3 phút (pha kết hợp). Sau khi rửa bằng chất đệm thao tác trong 3 phút (pha phân ly), bề mặt được tái tạo lại bằng cách tiêm 10 mM natri hydroxit trong 1 phút với 5 µl/phút. Kết quả được thể hiện trên Fig. 8:

Ang2k_LC08 có thời gian ngừng phân ly phức hợp khoảng 50 giây, Ang2i_LC06 khoảng 5 giây và Ang2i_LC10 thể hiện không gắn kết với ANG-1.

Ví dụ 8. Ngăn ngừa sự di căn/các khối u thứ phát *in vivo* trong các khối u nguyên phát sinh sản

a) Ngăn ngừa sự di căn/thứ phát ở chuột được ghép mô khác loài với các khối u nguyên phát Colo205

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy

Tế bào ung thư ruột kết trực tràng Colo205 người được thu nhận từ ATCC và sau khi nhân nhanh được lưu giữ ở ngân hàng tế bào nội địa Roche Penzberg. 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 3 được sử dụng để cấy ghép.

Động vật thử nghiệm

Chuột cái màu be SCID; 4-5 tuần tuổi (được mua của Charles River Germany) được nuôi trong điều kiện không có nguồn bệnh đặc hiệu trong các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các chỉ dẫn chuẩn (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương. Sau khi tới, 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 u Colo205 được thu gom (trypsin-EDTA) từ các bình nuôi cấy (Greiner TriFlask) và được chuyển vào 50 ml môi trường nuôi cấy, rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS và

lọc (bộ lọc tế bào; Falcon ϕ 100 μ m) độ chuẩn cuối cùng được điều chỉnh tới $2,5 \times 10^7$ /ml. Huyền phù tế bào u được trộn kỹ bằng pipet chuyển để tránh kết tụ tế bào. Sau đó, huyền phù tế bào nào được làm đầy bơm tiêm tuberculin 1,0 ml (Braun Melsungen) nhờ sử dụng kim tiêm (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 thiết bị xông Stephens cho động vật thử nghiệm nhỏ với buồng ủ sơ bộ (plexiglas), mặt nạ mũi chuột riêng biệt (silicon) và không có hợp chất gây mê dễ cháy hoặc dễ nổ Isoflurane (Pharmacia-Upjohn, Germany) trong hệ thống tuần hoàn đóng kín. Hai ngày trước khi tiêm lông của động vật thử nghiệm được cạo và để tiêm tế bào, da 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. Quá trình sinh trưởng u của các khối u nguyên phát được theo dõi (thông số không được thể hiện).

Theo dõi các khối u thứ phát, ví dụ ở phổi bằng cách xác định số lượng trình tự Alu của người

Khi kết thúc thử nghiệm (ngày 103) tiến hành thu gom phổi từ tất cả các nhóm. Một cách vắn tắt, các mẫu được chuyển ngay vào nitơ lỏng. Sau đó, toàn bộ AND được phân lập từ các mẫu bằng thiết bị MagNA Pure LC Instrument theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn khởi đầu đặc hiệu Alu của người được chọn để khuếch đại chọn lọc các trình tự Alu bằng PCR định lượng (LightCycler instrument). (T. Schneider et. al., Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582).

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm bằng Avastin (10 mg/kg tiêm trong màng bụng tuần một lần) được bắt đầu 14 ngày sau khi cấy ghép tế bào (thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_008) với thể tích khối u trung bình là 340 mm³. Sau 7 tuần chuột được chọn ngẫu nhiên để tiến hành điều trị lần thứ hai tiếp theo bắt

đầu vào ngày 51 với các hợp chất nêu trong bảng dưới đây. Quá trình điều trị lần thứ hai bắt đầu vào ngày 51 của thử nghiệm Ang2_PZ_Colo205_008.

Nhóm	Số lượng	Hợp chất	Liều (mg/kg)	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy (mg/kg)
1	10	Avastin	10 mg/kg	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	11	110
2	10	LC06+	10 mg/kg	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	6	60
		Avastin	10 mg/kg	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	11	110
3	10	LC06	10 mg/kg	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	6	60

Kết quả ức chế sự di căn/các khối u thứ phát (ở phổi) được nêu trong bảng dưới đây và thể hiện trong Fig.9A

Bảng 1: xác định số lượng ADN ALU người ở phổi của chuột bắt đầu mang các khối u Colo205 nguyên phát, sau khi điều trị bằng các kháng thể khác nhau

	Avastin		Avastin + Ang2i-LC06		Ang2i_LC06	
	101	0,0264	201	0,0042	301	0,0047
	102	5,6740	202	0,0044	302	0,0055
	103	0,0307	203	0,0065	303	0,0050
	104	0,0203	204	0,0081	304	0,0064
	105	0,0215	205	0,0063	305	0,0062
	106	0,0338	206	0,0061	306	0,0066
	107	0,0075	207	0,0053	307	0,0250
	108	0,0113	208	0,0506	308	0,0062
	109	0,0087	209	0,0065	309	0,0067
	110	0,0587	210	0,0160	310	0,0064
Trung bình		0,5893		0,0114		0,0079
Số trung vị		0,0240		0,0064		0,0063

Kết quả thể hiện hiệu quả ngăn ngừa cải thiện một cách rõ ràng các khối u thứ phát/sự di căn bằng ANG2i-LC06 so với Avastin.

b) Hiệu quả ngăn ngừa sự di căn/thứ phát ở chuột ghép mô khác loài với các khối u KPL-4 nguyên phát

Các dòng tế bào u

Các tế bào ung thư vú KPL-4 người trước tiên thu được từ bệnh nhân ung thư vú bị tràn dịch màng phổi ác tính với sự di căn viêm da (vốn được cung cấp bởi Prof. J. Kurebayashi). Các tế bào u thường được nuôi cấy trong môi trường DMEM (PAN Biotech, Germany) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (PAN Biotech, Germany) và 2 mM L-glutamin (PAN Biotech, Germany) ở 37°C trong môi trường bão hoà nước với 5% CO₂. Lần cấy chuyển được tiến hành có tách bằng trypsin/EDTA 1x (PAN) ba lần/tuần.

Chuột

Sau khi được chuyển tới, chuột cái màu be SCID (10-12 tuần tuổi; trọng lượng cơ thể 18-20 g; Charles River, Sulzfeld, Germany) động vật thử nghiệm thử nghiệm được nuôi trong 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. Chuột được giữ trong các điều kiện SPF theo các chỉ dẫn quốc tế (GV-Solas; Felasa; TierschG) với các chu trình ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối. Khẩu phần ăn kiêng (Provimi Kliba 3337) và nước (đã lọc) được cung cấp tùy ý. Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và chấp thuận bởi chính quyền địa phương (Regierung von Oberbayern; số đăng ký: 211.2531.2-22/2003).

Cấy tế bào khối u

Vào ngày cấy, các tế bào u được thu gom (trypsin-EDTA) từ các bình nuôi cấy (Greiner TriFlask) và được chuyển vào 50 ml môi trường nuôi cấy, rửa một lần và tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi rửa thêm bằng PBS và lọc (bộ lọc tế bào; Falcon ϕ 100 μ m) độ chuẩn cuối cùng được điều chỉnh tới 1,5 x 10⁸/ml. Huyền phù tế bào u được trộn kỹ bằng pipet chuyển để tránh kết tụ tế bào. Việc gây mê được tiến hành nhờ sử dụng thiết bị xông Stephens cho động vật thử

nghiệm nhỏ với buồng ủ sơ bộ (plexiglas), mặt nạ mũi chuột riêng biệt (silicon) và không có hợp chất gây mê dễ cháy hoặc dễ nổ Isoflurane (Pharmacia-Upjohn, Germany) trong hệ thống tuần hoàn đóng kín. Hai ngày trước khi tiêm lông của động vật thử nghiệm được cạo. Để tiêm i.m.f.p. các tế bào được tiêm đúng vị trí với thể tích 20 μ l (3×10^6 /con vật) vào đệm mỡ vú bên gần cuối của từng con chuột đã được gây mê. Để cấy ghép đúng vị trí, huyền phù tế bào được tiêm qua da dưới núm vú nhờ sử dụng bơm tiêm μ l Hamilton và kim 30Gx1/2". Quá trình sinh trưởng u của các khối u nguyên phát được theo dõi (thông số không được thể hiện).

Theo dõi các khối u thứ phát, ví dụ ở phổi bằng cách xác định số lượng các trình tự Alu người

Khi kết thúc thử nghiệm (ngày 103) phổi thu gom từ động vật thử nghiệm của tất cả các nhóm. Một cách vắn tắt, các mẫu được chuyển ngay vào nitơ lỏng. Tiếp đó, toàn bộ ADN được phân lập từ các mẫu bằng thiết bị MagNA Pure LC Instrument theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn khởi đầu đặc hiệu Alu người được chọn để khuếch đại chọn lọc các trình tự Alu bằng PCR định lượng (LightCycler instrument). (T. Schneider et. al., Clin. Exp. Metas. 2002; 19: 571-582).

Điều trị cho động vật thử nghiệm

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm sau 35 ngày cấy ghép tế bào với thể tích khối u trung bình là 60-1600 mm³. Các hợp chất và phác đồ liều được nêu trong bảng dưới đây.

Nhóm	Số lượng	Hợp chất	Liều (mg/kg)	Chu trình/ cách sử dụng	Số lần điều trị	Liều tích lũy (mg/kg)
4	10	Chất dẫn	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	
5	10	Xolair	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	5	50
6		Ang2i_LC06	10	Tiêm trong màng	4	40

				bụng một tuần một lần		
7	10	Ang2i_LC07	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	4	40
8	10	Ang2k_LC08	10	Tiêm trong màng bụng một tuần một lần	4	40

Các kết quả ức chế sự di căn/các khối u thứ phát (ở phổi) được nêu trong bảng dưới đây và thể hiện trong Fig.9B

Bảng 2: xác định số lượng ADN ALU người ở phổi của chuột bắt đầu mang các khối u KPL4 nguyên phát, sau khi điều trị bằng các kháng thể khác nhau

	Chất dẫn		Xolair		Ang2i_LC06		Ang2i_LC07		Ang2i_LC08	
	101	0,0098	201	0,0157			401	0,0273	501	0,0069
	102	0,0090	202	0,0516	302	0,0076	402	0,0060	502	0,0261
	103	0,0119	203	0,0108	303	0,0413	403	0,0046	503	0,0067
	104	0,0405	204	0,0148	304	0,0042	404	0,0164	504	0,0044
			205	0,0020	305	0,0041	405	0,0040	505	0,0039
	106	0,0381	206	0,0340	306	0,0093	406	0,0044	506	0,0051
	107	0,0281	207	0,0141	307	0,0038	407	0,0060	507	0,0037
			208	0,0422	308	0,0044	408	0,0174	508	0,0037
	109	0,0121	209	0,0227	309	0,0036	409	0,0314	509	0,0051
	110	0,0143	210	0,0383	310	0,0094	410	0,0083	540	0,0200
Số trung vị		0,0132		0,0192		0,0044		0,0072		0,0051
Trung bình		0,0205		0,0246		0,0098		0,0126		0,0086

Các kết quả thể hiện hiệu quả ngăn ngừa các khối u thứ phát/sự di căn hữu hiệu bằng ANG2i-LC06, ANG2i-LC07, ANG2k-LC08.

Ví dụ 9: Hiệu quả điều trị bệnh vồng mạc

Các phương pháp

Chó con C57/Bl6 được nuôi dưỡng chéo bởi chó mẹ CD1 đang cho bú và được tiếp xúc với 75% oxy từ P7 đến P12 (bộ điều chỉnh buồng oxy PRO-OX 110, Biospherix Ltd, Redfield, NY) để kích thích quá trình phá hủy mạch và làm ngừng các mao mạch ở tâm vồng mạc. Các con chó con và chó mẹ được đặt trong không khí bình thường khiến giảm oxy huyết và kích thích quá trình tạo

mạch mới. Đối với P13, các con chó con được gây mê nhờ sử dụng isofluran (kích thích 5%, duy trì 3% kết hợp với 1,5% oxy) và mắt được tiếp xúc và các lần tiêm trong mắt 1 μ l bằng bơm tiêm Nanofil gắn kim tiêm cỡ 35 (WPI, Sarasota, FL) vào mắt trái được tiến hành. Đối P17, cả hai mắt được phẫu thuật, cố định trong 4% paraformaldehyt trong 4 giờ ở 4°C và các võng mạc được phẫu thuật. Các võng mạc được thẩm thấu trong PBS chứa 0,5% Triton X-100 và 1% albumin huyết thanh bò, nhuộm bằng 20 μ g/ml isolectin B4 biotinyli hoá (Sigma Aldrich, Gillingham, UK) trong PBS pH 6,8, 1% Triton-X100, 0,1 mM CaCl_2 , 0,1 mM MgCl_2 , tiếp theo là 20 μ g/ml ALEXA 488-streptavidin (Molecular Probes, Eugene, OR) và tạo tiêu bản phẳng trong Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Các võng mạc được tạo ảnh nhờ sử dụng kính hiển vi huỳnh quang Nikon epi với độ khuếch đại 4x. Quá trình định lượng sự tạo mạch mới và các vùng thiếu máu cục bộ được tiến hành theo kiểu mù nhờ sử dụng Photoshop CS3 cùng với ảnh J (NIH) và biểu hiện là tỷ lệ vùng võng mạc tổng (=bình thường+thiếu máu cục bộ+tạo mạch mới).

Kết quả

Fig.10A thể hiện các võng mạc gắn tiêu bản phẳng đại diện với hệ mạch võng mạc hiển thị hoá bằng cách nhuộm isolectin. Các vùng thiếu máu cục bộ tâm kích thích quá trình tạo mạch mới và tái sinh trưởng các mạch võng mạc bằng cách điều chỉnh tăng các tác nhân gây kích thích sự hình thành mạch. Mặt trước mạch mới tăng sinh quá mức làm cho các mạch ngoằn ngoèo ở mẫu mạch bất thường. Các vùng ngoài cùng nhất chứa các mạch bình thường không bị tác động. Việc định lượng các tiêu bản võng mạc phẳng chứng tỏ rằng mức ức chế VEGF bằng Avastin làm giảm quá trình hình thành mạch mới võng mạc (xem fig.10B, $36,7 \pm 1,8\%$ không tiêm đến $22,4 \pm 3,0\%$ đã tiêm) như mong đợi. Quá trình ức chế Ang2 nhờ sử dụng các kháng thể LC06 hoặc LC08 cũng làm giảm sự hình thành mạch mới ($31,5 \pm 1,1\%$ đến $18,8 \pm 1,3\%$ và $34,0 \pm 3,1\%$ đến $25,4 \pm 3,4\%$). Quá trình tiêm có kiểm soát Ig G người không tác động đến sự hình thành mạch mới (xem fig.10B, $38,3 \pm 1,1\%$ đến $38,3 \pm 0,8\%$).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc phần kháng thể gắn kết đặc hiệu với angiotensin-2 (ANG-2) người, trong đó kháng thể hoặc phần kháng thể này bao gồm:

a) miền biến đổi chuỗi nặng gồm có vùng CDR3 của SEQ ID NO: 33, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 34, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 35, và

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ gồm có vùng CDR3 của SEQ ID NO: 36, vùng CDR2 của SEQ ID NO: 37, và vùng CDR1 của SEQ ID NO: 38.

2. Kháng thể hoặc phần kháng thể theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc phần kháng thể này còn bao gồm:

a) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 39; và

b) miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 40.

3. Kháng thể hoặc phần kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này không gắn kết với Angiotensin 1 (ANG-1) người.

4. Kháng thể hoặc phần kháng thể theo các điểm 1 đến 3, trong đó kháng thể này là của lớp phụ IgG4 ở người hoặc là của lớp phụ IgG1 người.

5. Dược phẩm khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa kháng thể hoặc phần kháng thể theo các điểm 1 đến 3.

6. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của kháng thể gắn kết đặc hiệu với angiotensin-2 (ANG-2) người, khác biệt ở chỗ kháng thể này gồm có miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ theo điểm 1.

7. Vector biểu hiện, trong đó vector này bao gồm axit nucleic theo điểm 9 để biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với angiotensin-2 (ANG-2) ở người trong tế bào chủ chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình.

Fig. 1A

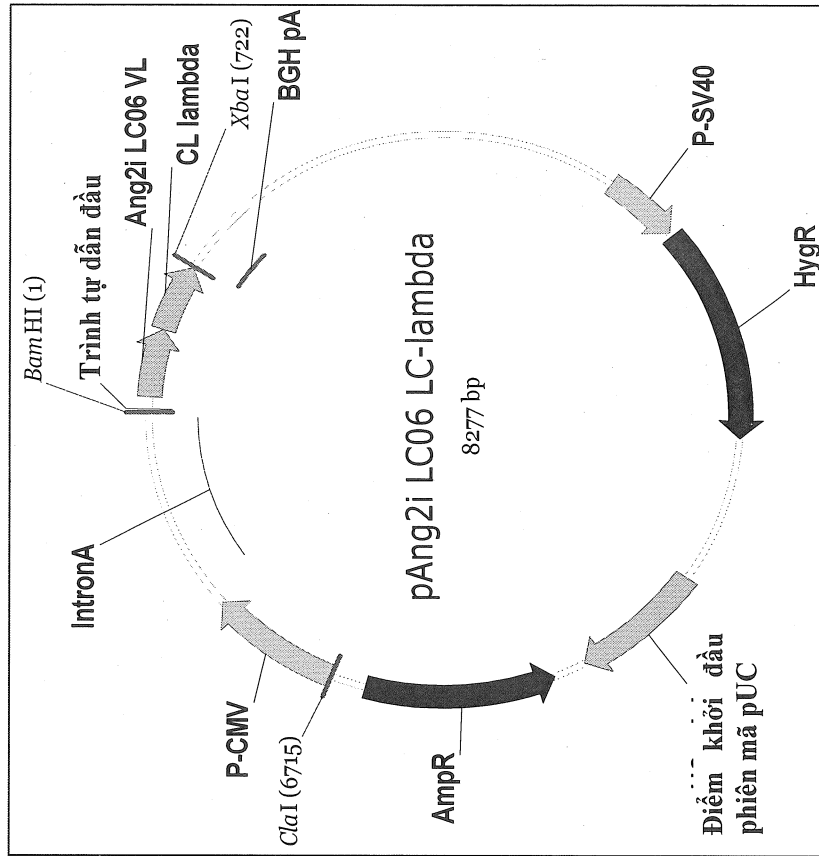
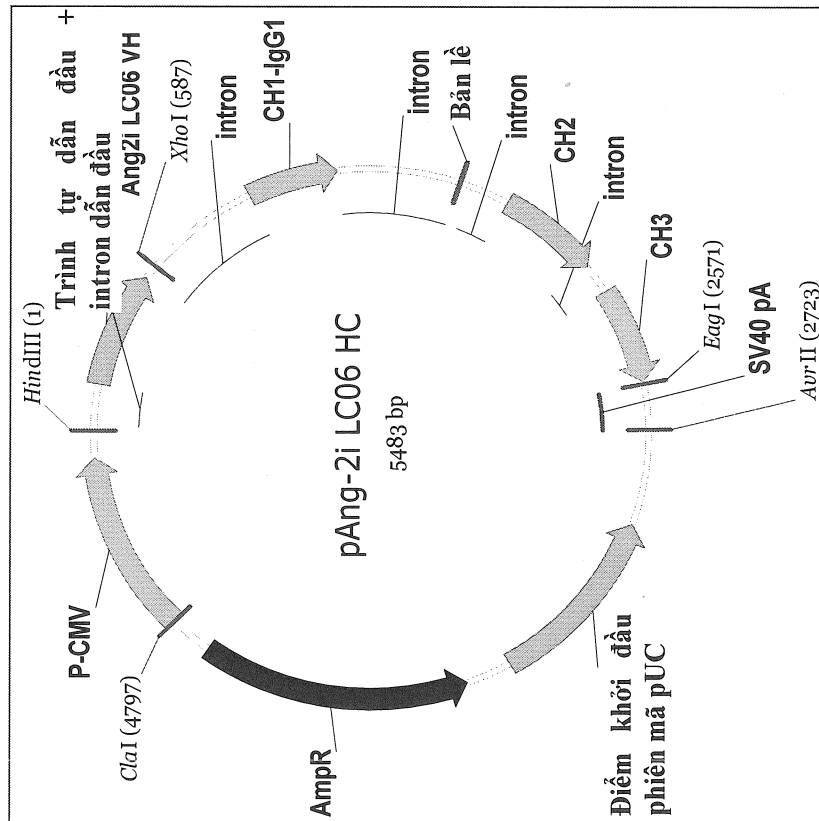


Fig. 1B



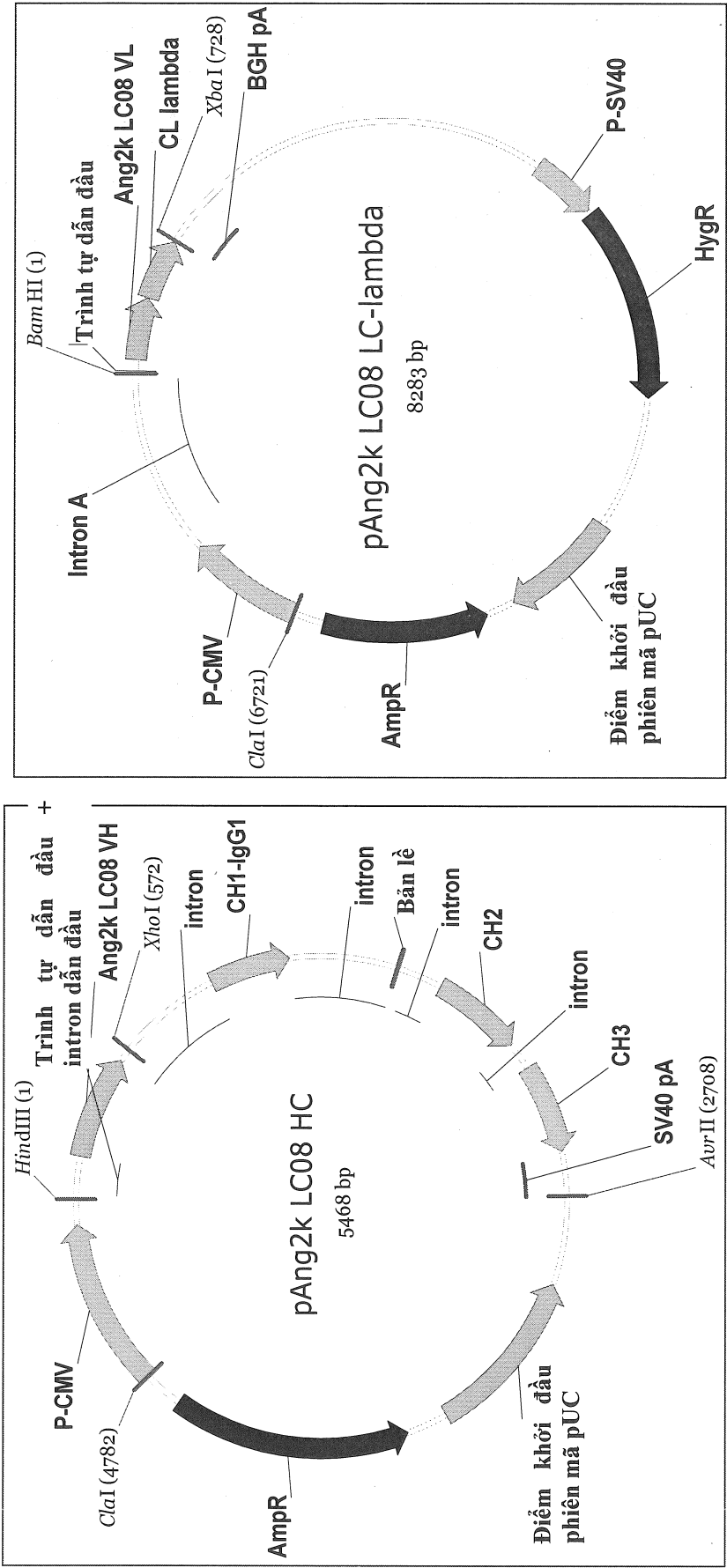


Fig. 2

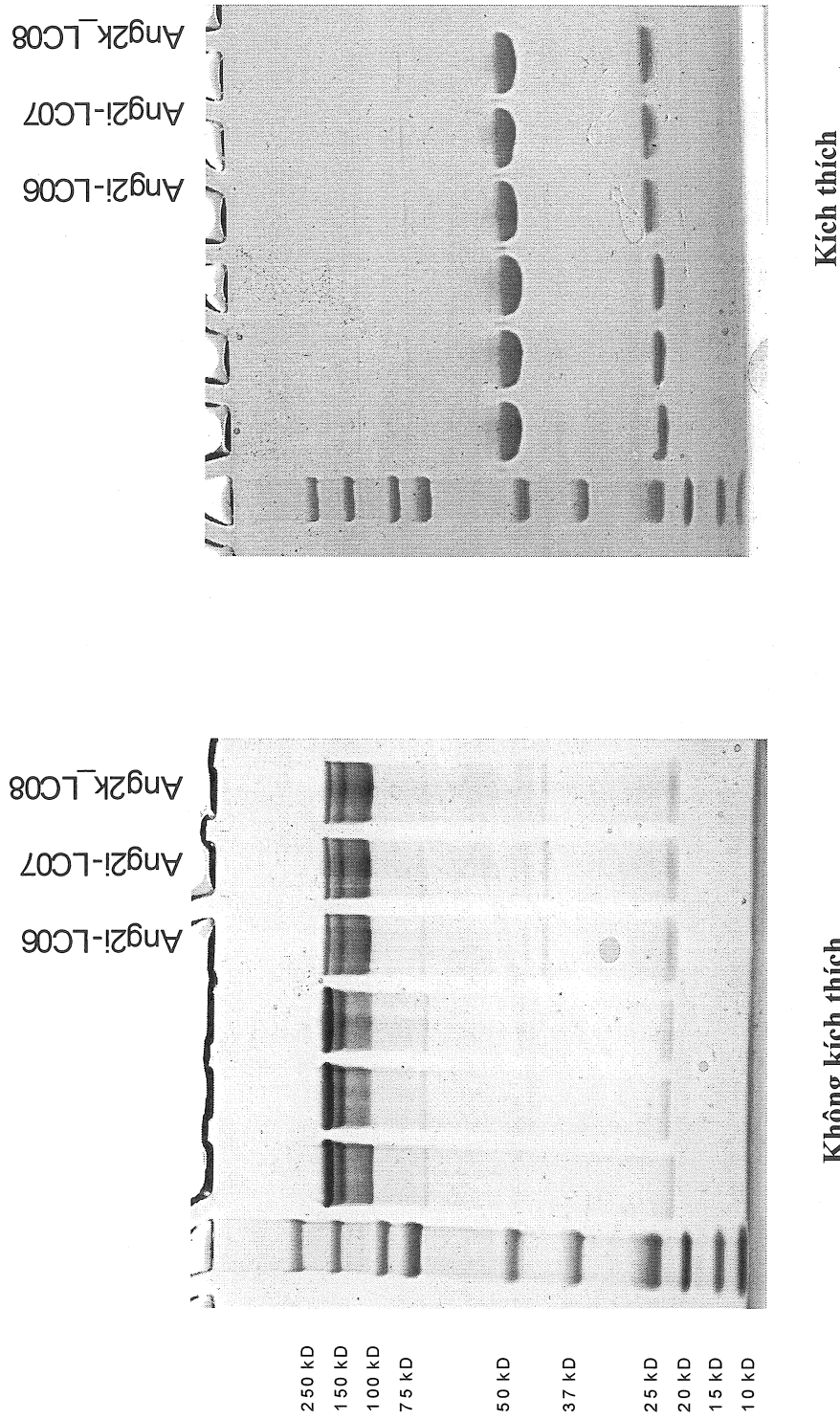


Fig. 3

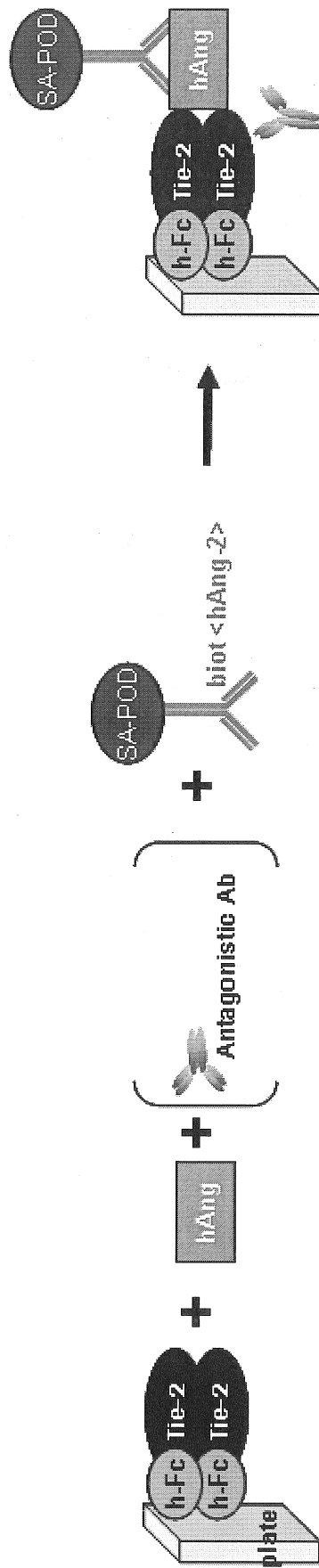


Fig. 4

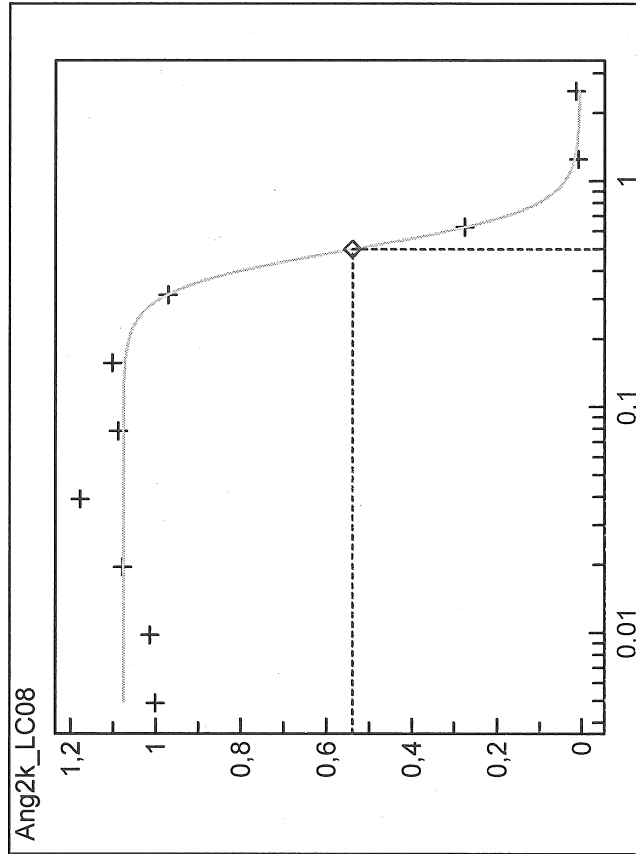
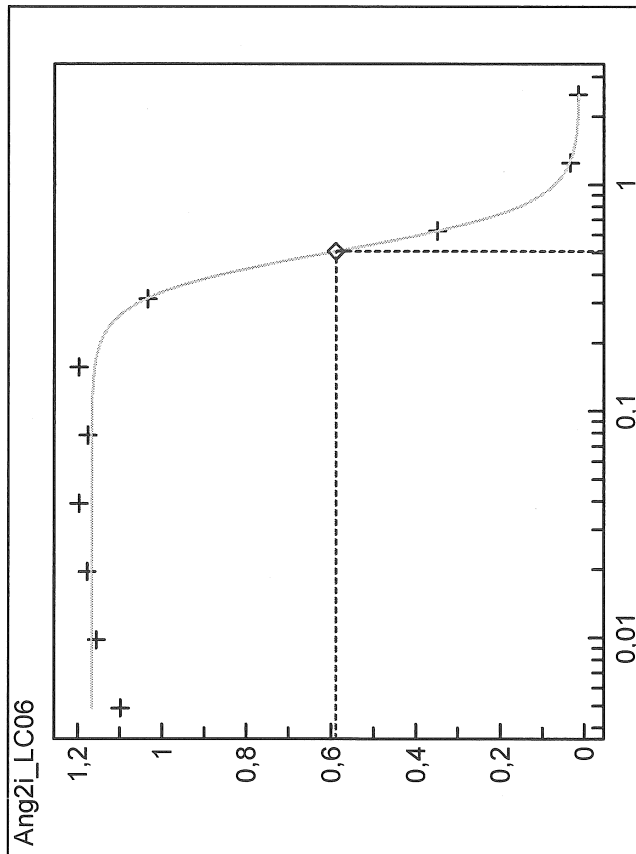


Fig. 5



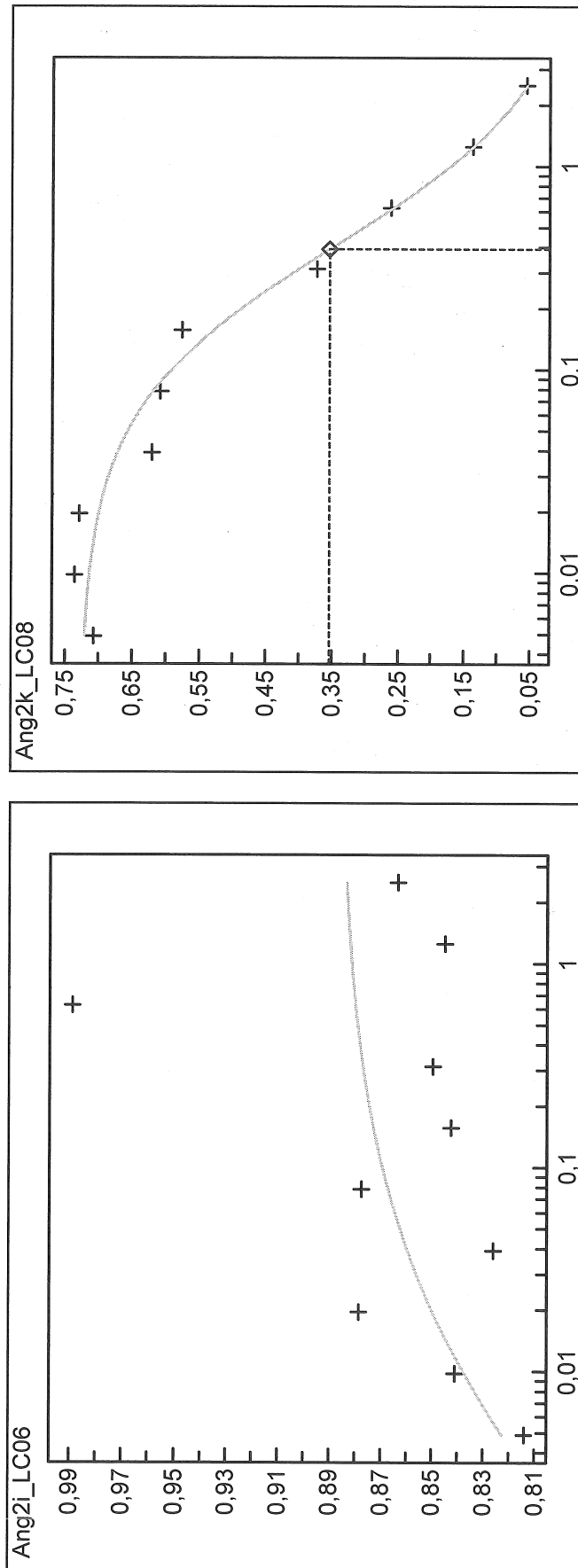


Fig. 6

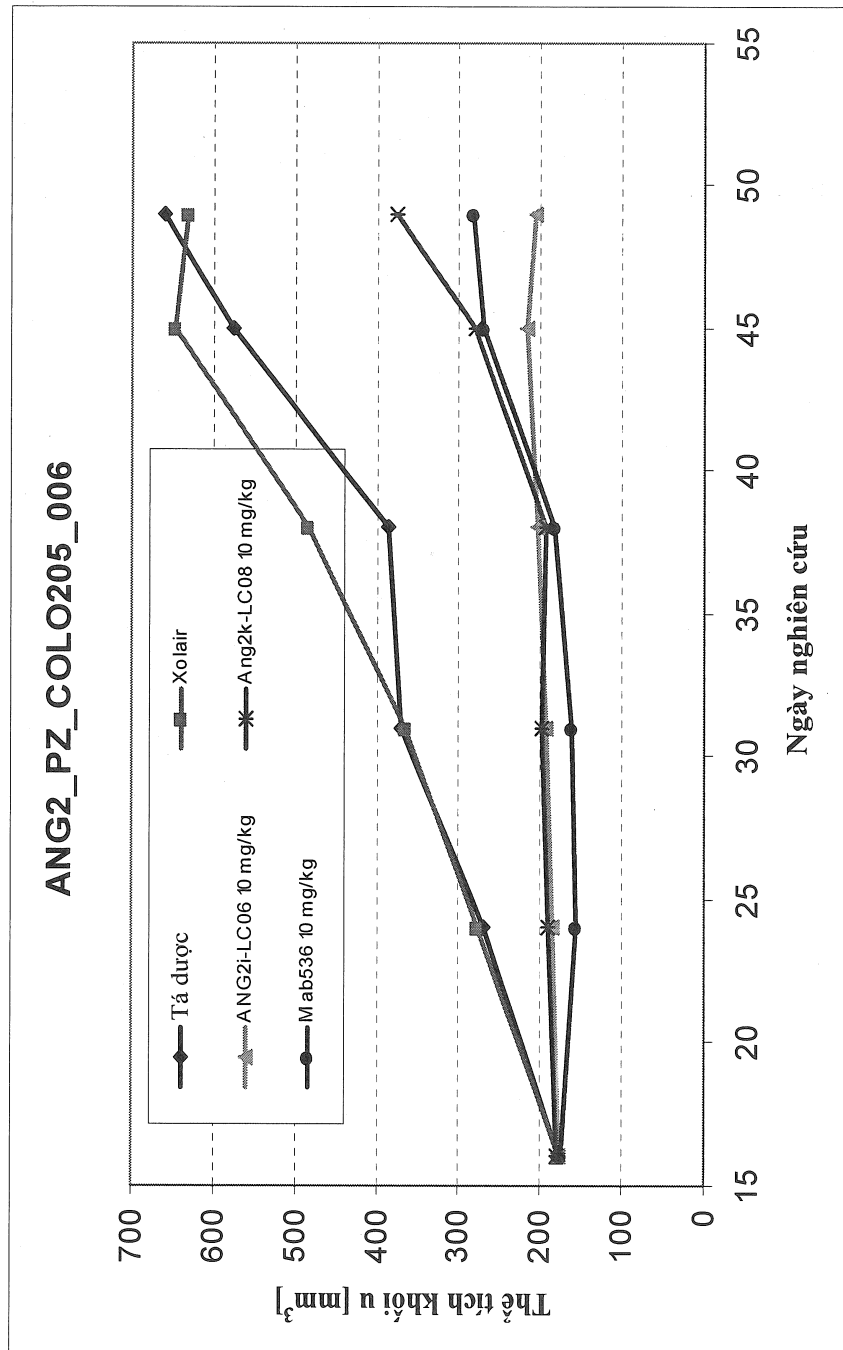


Fig. 7

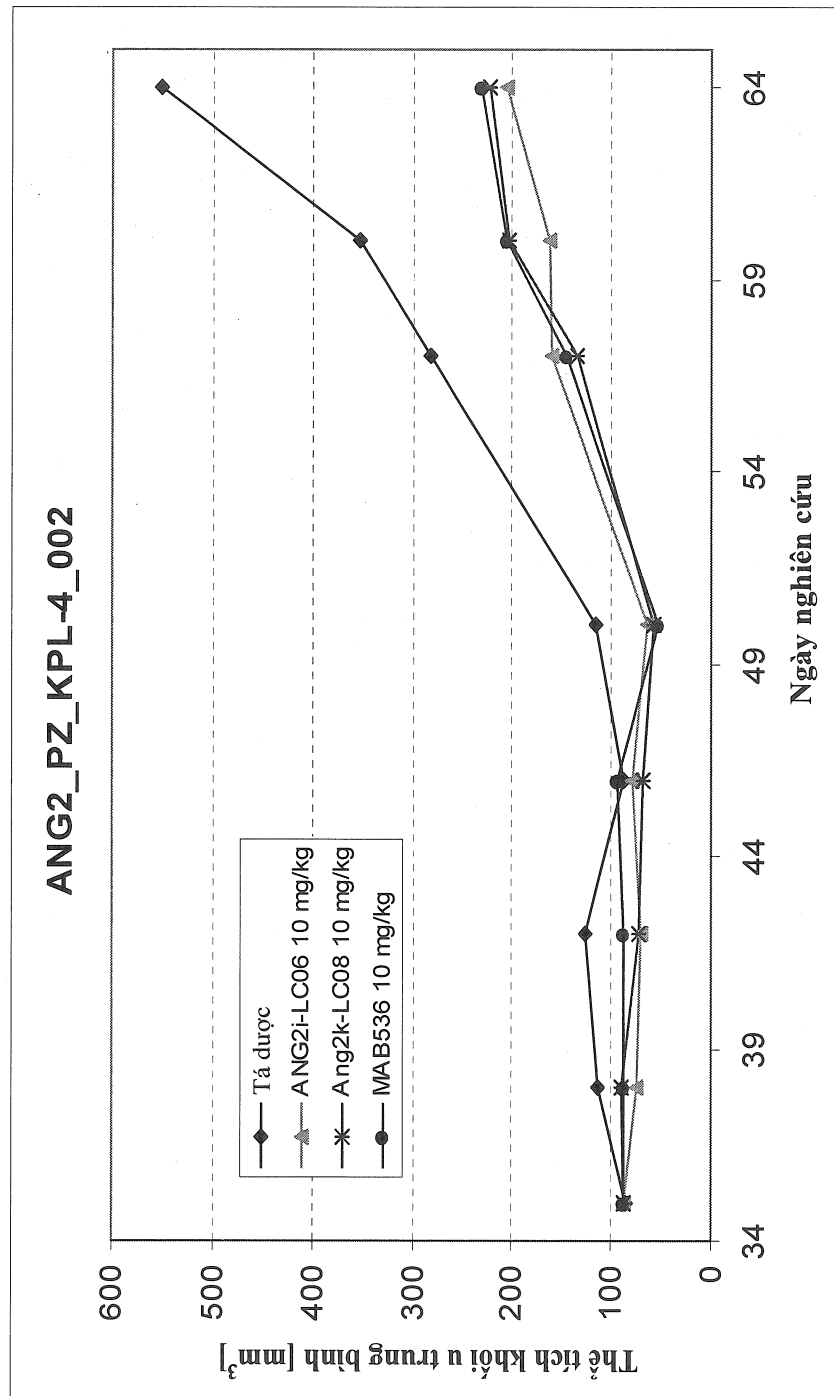
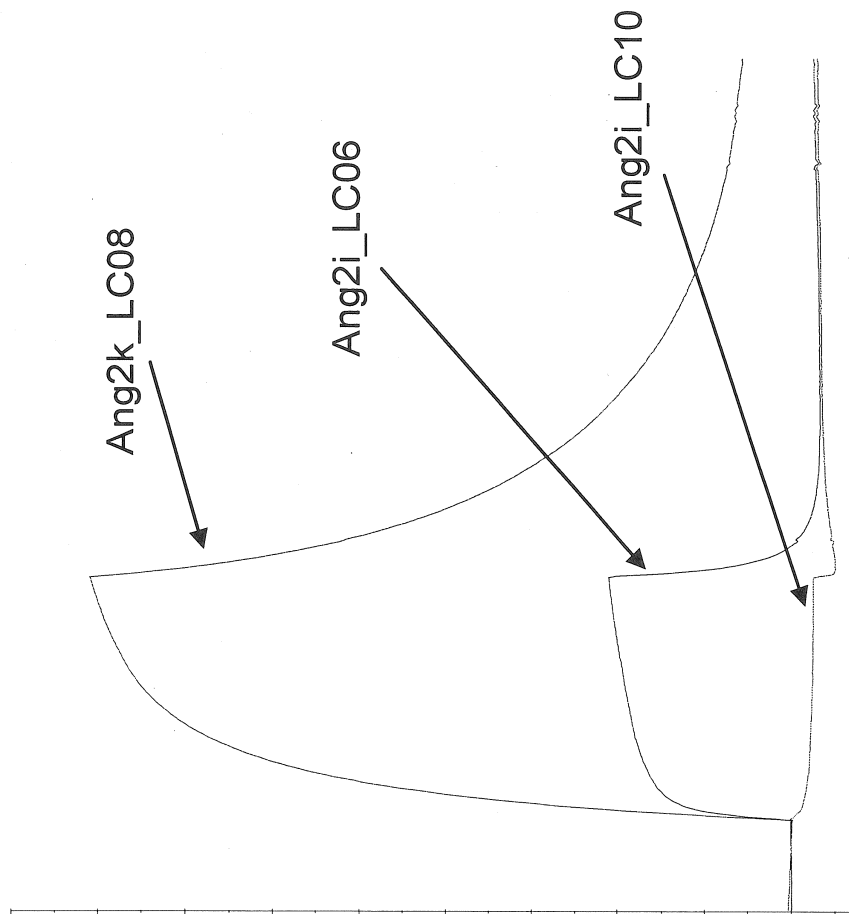


Fig. 8

**Fig. 9A**

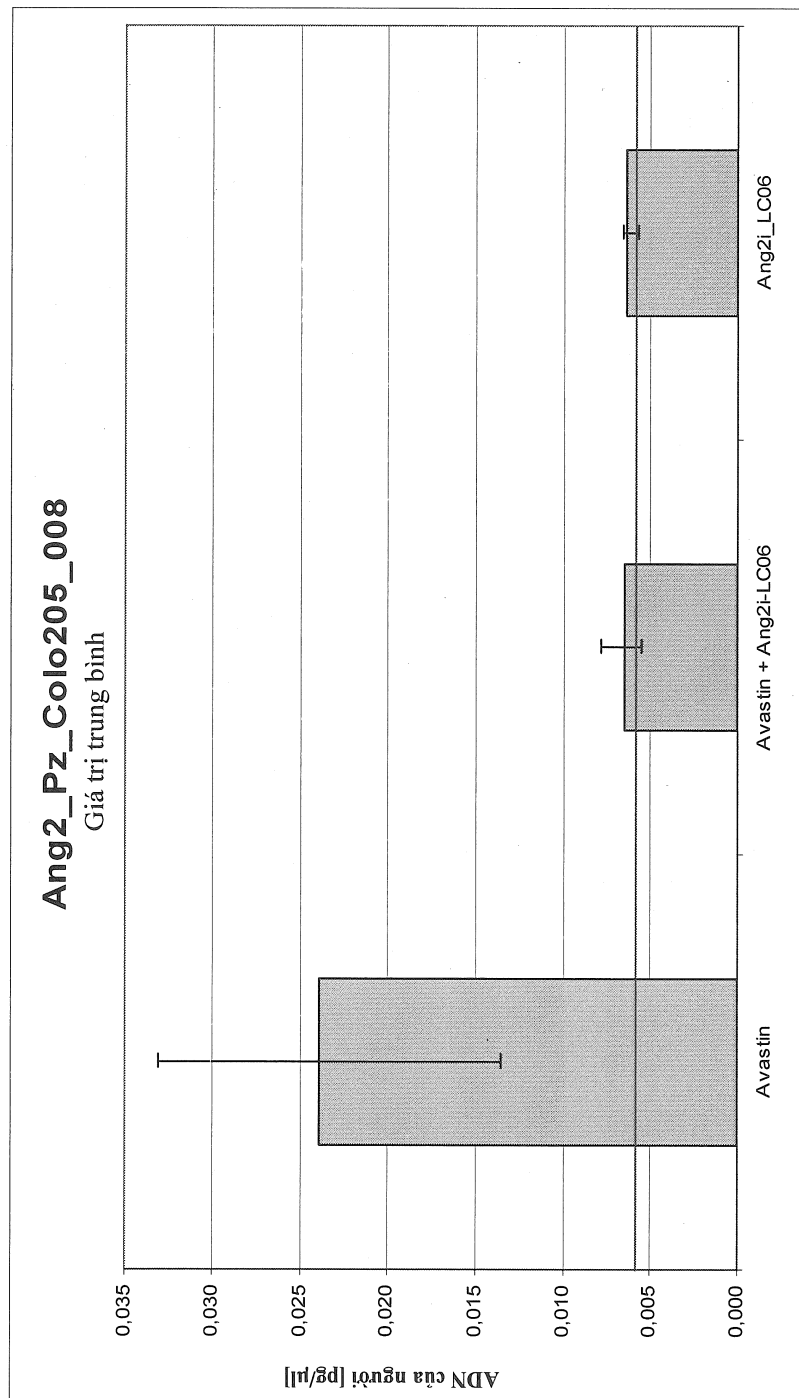


Fig. 9B

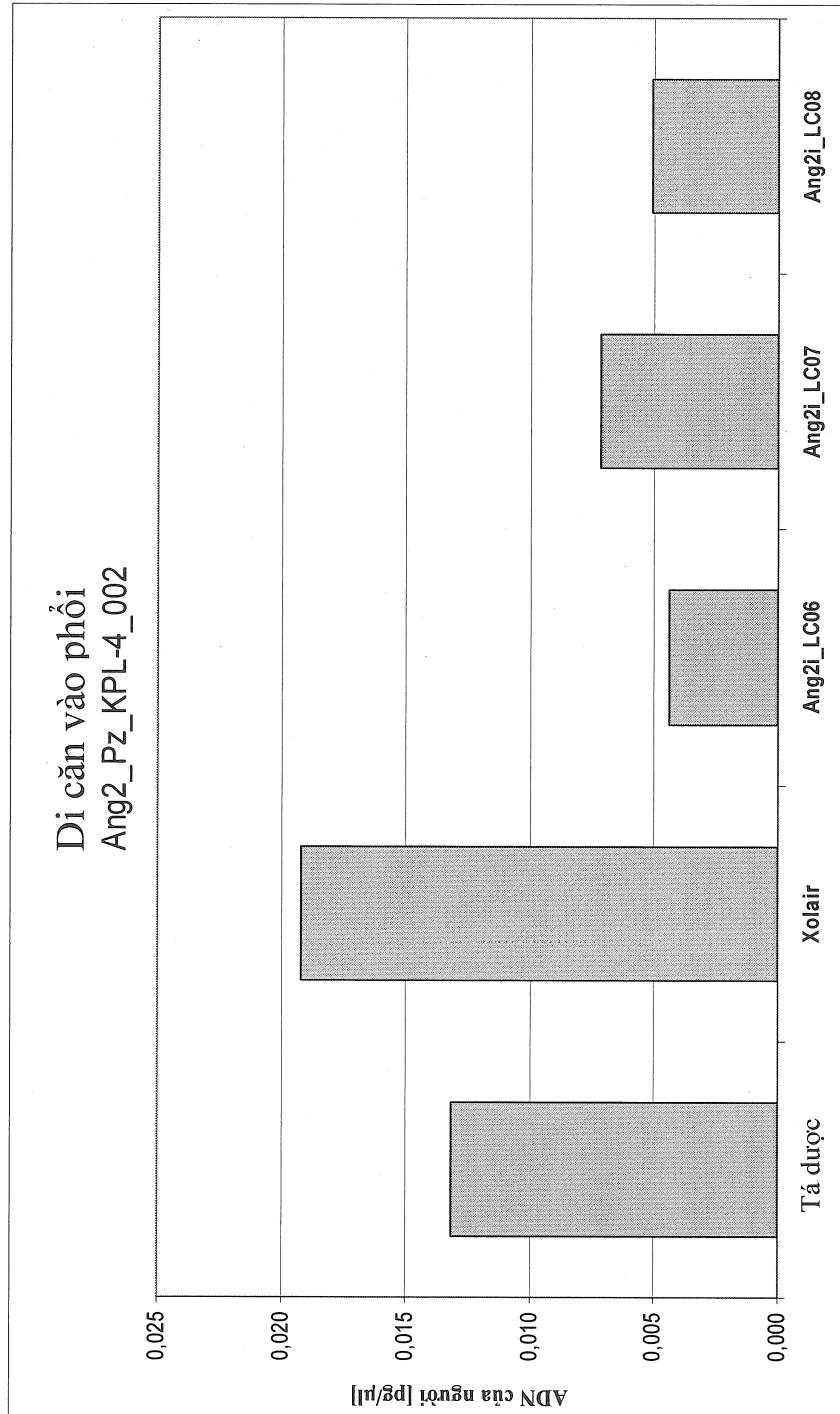


Fig. 10A

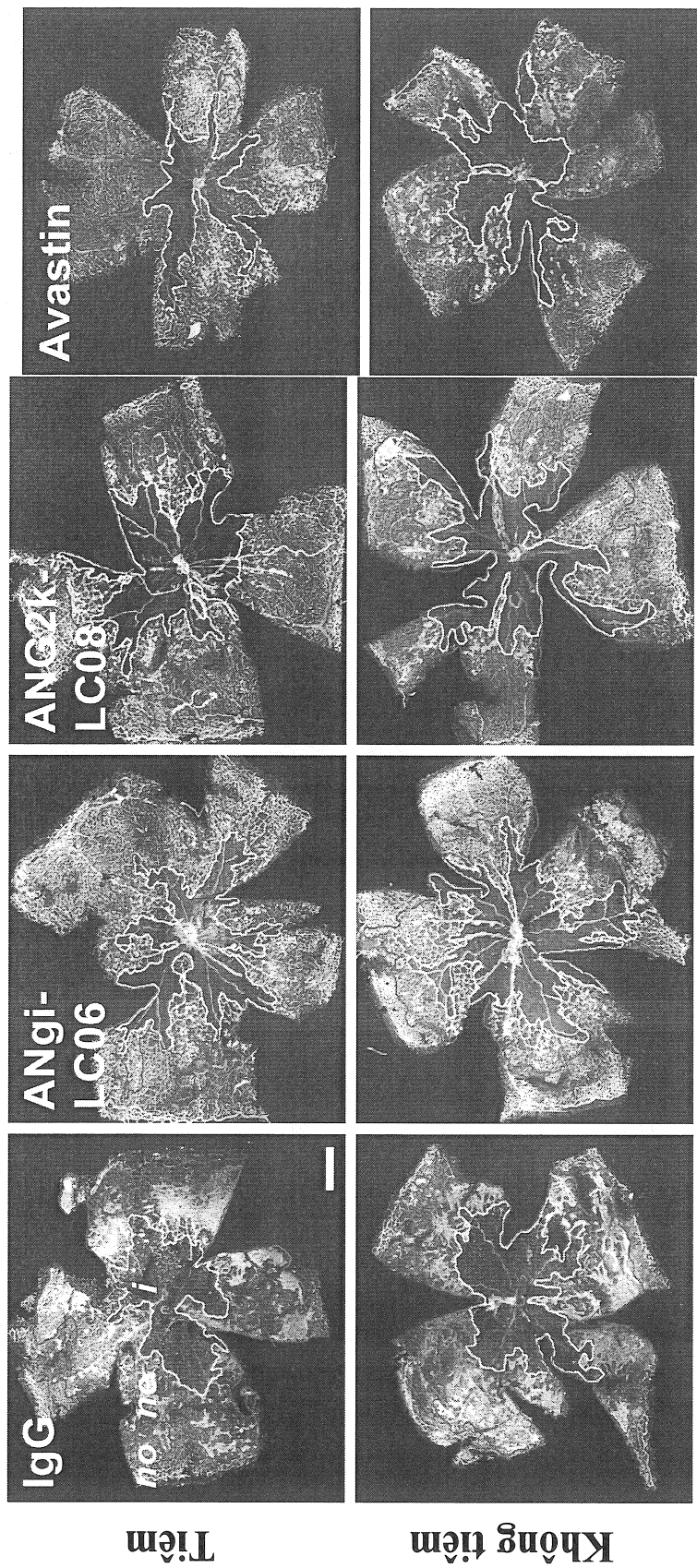
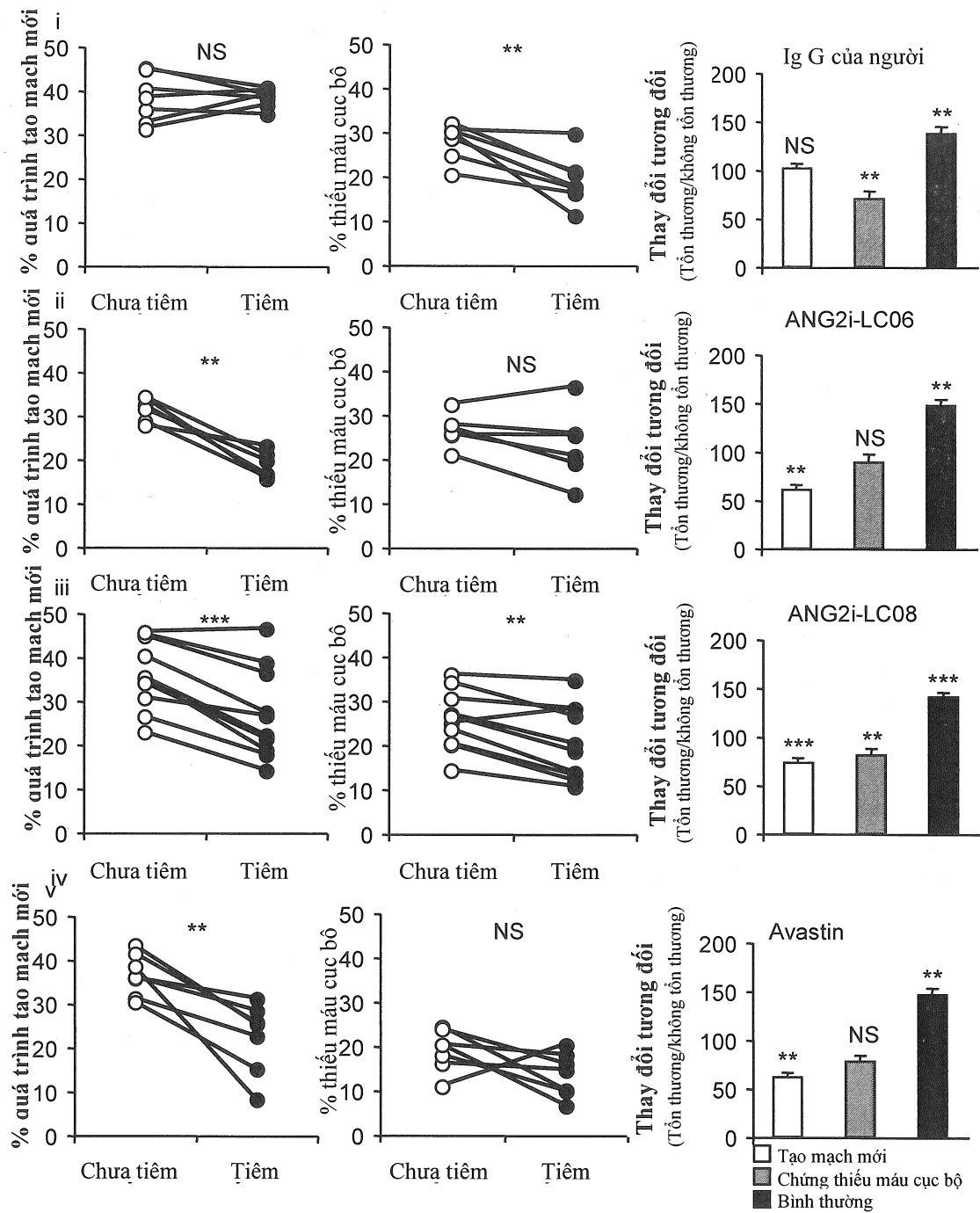


Fig. 10B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Kháng thể kháng angiotensin 2 và dược phẩm chứa kháng thể này
 <130> 25688
 <150> EP 08021835.7
 <151> 2008-12-16
 <160> 63
 <170> Patent phiên bản 3.2
 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 1
 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> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 2
 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 3
 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 4
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Tyr Val
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 5
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 6
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 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> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC06
 <400> 8
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 9

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

Ala Phe Asp Ile
20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 10

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

Gly

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 11

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 12
 Gln Val Trp Asp Ser Asp Ser Asp Gln Gly Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 13
 Asp Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 14
 Gly Gly Asn Phe Ile Gly Gly Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 15
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 15
 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> 16
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miễn biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2>Ang2i_LC07
 <400> 16
 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> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 17
 Pro Thr Leu Asp Ile Tyr Met Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 18
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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, <ANG-2>Ang2k_LC08
 <400> 19
 Ser Tyr Gly Met His

```

1                               5

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2>Ang2k_LC08
<400> 20
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1                               5                               10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2>Ang2k_LC08
<400> 21
Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1                               5

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2>Ang2k_LC08
<400> 22
Ser Gly Phe Ala Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ser Val Asn
1                               5                               10

<210> 23
<211> 124
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC08
<400> 23
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> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 24

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> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 25

Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09

<400> 26

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

Val Lys Gly

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

```

<220>
<223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_LC09
<400> 27
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_LC09
<400> 28
Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_LC09
<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> Ang2s_LC09
<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> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_LC09
<400> 31
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> 32
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_LC09
 <400> 32
 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> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 33
 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> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 34
 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 35
 Gly Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 36
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 37
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 38
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 39
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2i_LC10
 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 40

<211> 105

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 40

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> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<400> 41

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

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 42
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 43
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 44
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Pro Gly Val
 1 5 10
 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 46
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2k_LC11
 <400> 47
 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> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

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

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (98)..(98)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (102)..(102)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên

<400> 48

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 Pro Gly Val Phe Gly
85 90 95

Gly Xaa Thr Lys Leu Xaa Val Leu Gly Gln
100 105

<210> 49

```

<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nặng CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 49
Asp Leu Gly Tyr Asp Tyr Val
1 5

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nặng CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 50
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nặng CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 51
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR3, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 52
Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR2, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 53
His Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> chuỗi nhẹ CDR1, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 54
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Arg Leu Asn

```

1 5 10

<210> 55
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> miền biến đổi chuỗi nặng, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 55
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> 56
<211> 110
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> miền biến đổi chuỗi nhẹ, <ANG-2> Ang2s_R3_LC03
<400> 56
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>	57		
<211>	330		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	57		
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> 58
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 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> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

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

<210> 60
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 60

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> 61

<211> 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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 545	Pro	Arg	Gly	Leu	Asn 550	Leu	Leu	Pro	Lys	Ser 555	Gln	Thr	Thr	Leu	Asn 560
Leu	Thr	Trp	Gln	Pro 565	Ile	Phe	Pro	Ser	Ser 570	Glu	Asp	Asp	Phe	Tyr	Val 575
Glu	Val	Glu	Arg 580	Arg	Ser	Val	Gln	Lys 585	Ser	Asp	Gln	Gln	Asn	Ile	Lys 590
Val	Pro	Gly 595	Asn	Leu	Thr	Ser	Val 600	Leu	Leu	Asn	Asn	Leu	His	Pro	Arg 605
Glu	Gln	Tyr	Val	Val	Arg	Ala	Arg 615	Val	Asn	Thr	Lys	Ala	Gln	Gly	Glu 620
Trp 625	Ser	Glu	Asp	Leu	Thr	Ala	Trp 630	Thr	Leu	Ser	Asp	Ile	Leu	Pro	Pro 640
Gln	Pro	Glu	Asn	Ile 645	Lys	Ile	Ser	Asn	Ile 650	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Val 655
Ile	Ser	Trp	Thr	Ile 660	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ser 665	Ile	Ser	Ser	Ile	Thr	Ile 670
Arg	Tyr	Lys 675	Val	Gln	Gly	Lys	Asn 680	Glu	Asp	Gln	His	Val	Asp	Val	Lys 685
Ile	Lys 690	Asn	Ala	Thr	Ile	Thr	Gln 695	Tyr	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro 700
Glu	Thr	Ala	Tyr	Gln	Val	Asp	Ile 710	Phe	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser 720
Ser	Asn	Pro	Ala	Phe 725	Ser	His	Glu	Leu	Val 730	Thr	Leu	Pro	Glu	Ser	Gln 735
Ala	Pro	Ala	Asp	Leu 740	Gly	Gly	Gly	Lys 745	Met	Leu	Leu	Ile	Ala	Ile	Leu 750
Gly	Ser	Ala	Gly	Met 755	Thr	Cys	Leu 760	Thr	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile 765
Ile	Leu	Gln	Leu	Lys 770	Arg	Ala	Asn 775	Val	Gln	Arg	Arg	Met	Ala	Gln	Ala 780
Phe	Gln	Asn	Val	Arg	Glu	Glu	Pro 790	Ala	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Gly	Thr 800
Leu	Ala	Leu	Asn	Arg 805	Lys	Val	Lys	Asn	Asn 810	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Tyr 815
Pro	Val	Leu	Asp	Trp 820	Asn	Asp	Ile	Lys	Phe 825	Gln	Asp	Val	Ile	Gly	Glu 830
Gly	Asn	Phe	Gly	Gln	Val	Leu	Lys 840	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys 845	Asp	Gly	Leu

```

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> 62
<211> 504
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>

```

<223> Angiopoietin-2 (ANG-2) người có đoạn dẫn đầu và His-tag
 <400> 62
 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> 63

<211> 506

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Angiopoietin-1 (ANG-1) người có đoạn dẫn đầu và His-tag

<400> 63

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
	420				
Ala	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys
	425				
Asp	Ala	Asp	Asn		
	430				
Asp	Asn	Cys	Met	Cys	Lys
	435				
Cys	Ala	Leu	Met	Leu	Thr
	440				
Gly	Gly	Trp	Trp		
	445				
Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro
	450				
Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met
	455				
Phe	Tyr	Thr	Ala		
	460				
Gly	Gln	Asn	His	Gly	Lys
	465				
Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp
	470				
His	Tyr	Phe	Lys		
	475				
Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu
	485				
Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met
	490				
Ile	Arg	Pro	Leu		
	495				
Asp	Phe	Ser	Gly	His	His
	500				
His	His	His	His	His	His
	505				