



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

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

(11)



1-0032691

(51)⁸ A61K 39/00; C07K 16/46; C07K 16/28; (13) B
A61P 35/00; C07K 16/18

(21) 1-2018-02195

(22) 02/12/2016

(86) PCT/EP2016/079575 02/12/2016

(87) WO2017/093478 08/06/2017

(30) 15197999.4 04/12/2015 EP

(45) 25/07/2022 412

(43) 25/09/2018 366A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Germany

(72) ZINZALLA, Vittoria (IT); KUENKELE, Klaus-Peter (DE); BUYSE, Marie-Ange (GB); CROMIE, Karen (BE); STAELENS, Stephanie (BE); STRUBBE, Beatrijs (BE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) POLYPEPTIT GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI LRP5 VÀ LRP6, VECTƠ BIỂU HIỆN CHỨA AXIT NUCLEIC MÃ HÓA POLYPEPTIT NÀY, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế cập đến các polypeptit gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic mới, và cụ thể hơn là các cấu trúc miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic mới mà có thể ức chế các con đường truyền tín hiệu Wnt. Sáng chế còn đề cập đến các trình tự cụ thể của các polypeptit này, các phương pháp sản xuất chúng, các dược phẩm chứa các polypeptit này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit này, vectơ biểu hiện chứa axit nucleic này và tế bào chủ mang vectơ biểu hiện này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các polypeptit gắn kết protein 5 giống thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein receptor-like protein 5 - LRP5) và protein 6 giống thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein receptor-like protein 6 -LRP6) mới. Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic mã hóa các polypeptit này; các phương pháp điều chế các polypeptit này; các tế bào chủ biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện các polypeptit này; các chế phẩm chứa các polypeptit này; và sử dụng các polypeptit hoặc các chế phẩm này, đặc biệt cho các mục đích điều trị trong lĩnh vực bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu Wnt yêu cầu sự gắn kết của các phối tử Wnt ngoại bào với thụ thể Frizzled và với đồng thụ thể LRP5 (số truy cập: UniProtKB -O75197 / LRP5_HUMAN) hoặc chất tương đồng liên quan mật thiết với nó là LRP6 (số truy cập: UniProtKB - O75581 / LRP6_HUMAN). Có 19 protein Wnt và 10 thụ thể Frizzled trong các tế bào của động vật có vú. Khi không có phối tử Wnt, beta-catenin thuộc tế bào chất được phosphoryl hóa bằng phức hợp protein bao gồm các protein khung Axin và APC và các kinaza GSK3beta và CK1a. Sự nhận diện tiếp theo bởi ubiquitin ligaza beta-TrcP dẫn đến sự thoái biến của beta-catenin qua trung gian ubiquitin. Khi có mặt phối tử Wnt, sự gắn kết của Wnt với Frizzled và LRP5 hoặc LRP6 dẫn đến sự bổ sung protein tác động thuộc tế bào chất Dvl và sự phosphoryl hóa đuôi thuộc tế bào chất LRP5 hoặc LRP6, điều này tạo ra vị trí nổi cho Axin. Sự cang hóa Axin bằng LRP5 hoặc LRP6 dẫn đến sự vô hoạt của phức hợp Axin-APC-GSK3beta và, do đó, dẫn đến sự ổn định hóa và sự tích tụ beta-catenin nội bào. Do đó, các mức beta-catenin thuộc tế bào chất tăng, và beta-catenin di chuyển vào nhân và tạo phức hợp với các thành viên của họ yếu tố tế bào T (T-cell factor - TCF)/yếu tố gắn kết yếu tố tăng cường lympho (Lymphoid enhancer-binding factor - LEF) gồm các yếu tố phiên mã. Cơ

cấu phiên mã cơ sở và các chất đồng hoạt hóa phiên mã sau đó được bổ sung, gồm protein gắn kết (CBP)-protein gắn kết yếu tố đáp ứng cAMP (CREB) hoặc chất tương đồng p300 của nó, dẫn đến sự biểu hiện của các gen đích khác nhau, bao gồm Axin2, cyclin D1 và c-Myc.

Mức bổ sung điều hòa con đường Wnt phụ thuộc phối tử được dàn xếp bằng E3 ligaza RNF43, và chất tương đồng liên quan mật thiết với nó ZNRF3, và bằng các protein R-Spondin được tiết ra (de Lau *et al.* “The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength”. *Genes Dev.* 2014; 28(4):305-16). RNF43 dàn xếp sự ubiquitin hóa của phức hợp Frizzled/thụ thể LRP5 hoặc LRP6 ở bề mặt tế bào, dẫn đến sự thoái biến của nó và, do đó, ức chế hoạt tính con đường Wnt phụ thuộc phối tử. Hoạt tính của RNF43 được trung hòa bằng các thành viên họ R spondin (các phối tử R-spondin 1 đến 4). Nếu phối tử R-Spondin có mặt, nó sẽ loại bỏ RNF43 ra khỏi bề mặt tế bào, cho phép sự tích tụ phức hợp Frizzled/LRP5 hoặc LRP6 và tăng cường sự truyền tín hiệu Wnt với sự có mặt của các phối tử Wnt.

LRP5 và LRP6 có tác dụng như là các chất gác cổng của sự hoạt hóa sự truyền tín hiệu Wnt phụ thuộc phối tử và, do đó, có thể được xem như là đích để đạt được sự phong bế hoàn toàn con đường được dàn xếp bằng tất cả 19 phối tử Wnt và 10 thụ thể Frizzled và được tăng cường bằng các phối tử R-spondin. Cụ thể là, các phối tử Wnt có thể được phân chia thành nhóm Wnt1 và nhóm Wnt3a, mỗi nhóm gắn kết với các epitop/các vùng khác nhau của LRP5 và LRP6 để truyền tín hiệu. Miền ecto của LRP5 và LRP6 bao gồm bốn đơn vị lặp lại của cánh quạt beta được nối với miền giống như EGF, sau đó là ba đoạn lặp LDLR-kiểu A. Các phân tích cấu trúc và chức năng kết hợp đối với LRP5 và LRP6 đã gợi ý rằng Wnt1 (phối tử nhóm Wnt1) gắn kết với mảnh chứa cánh quạt beta 1 và 2 và Wnt3a gắn kết với mảnh chứa cánh quạt beta 3 và 4 của LRP6. Cho đến nay, chỉ có hình ảnh với độ phân giải thấp của miền ecto LRP6 chứa cánh quạt beta từ các vùng 1 đến 4 được báo cáo (Ahn *et al.* “Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6”. *Dev Cell.* 2011; 21(5):862-73). Tuy nhiên, sự không chắc chắn của các hình ảnh dựng lại với độ phân giải thấp (40 Å) và sự không có dữ liệu cấu trúc của miền ecto LRP6 trong phức hợp với các phối tử Wnt không cho phép xác định các epitop chính xác có liên quan đến sự gắn kết phối tử Wnt1 hoặc Wnt3a.

Sự tăng hoạt hóa sự truyền tín hiệu Wnt có liên quan đến sinh bệnh học của các loại bệnh ung thư khác nhau. Trong một số loại bệnh ung thư, các đột biến thường xuyên trong các phân tử truyền tín hiệu xuôi chiều góp phần vào con đường Wnt được hoạt hóa chủ yếu (ví dụ, sự đột biến APC ở bệnh ung thư đại trực tràng; sự đột biến hoạt hóa beta-catenin ở bệnh caxinom tế bào gan). Ngược lại, ở bệnh ung thư vú âm tính ba (Triple Negative Breast Cancer - TNBC), bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC), caxinom tuyến tụy tạng và ở phân nhóm bệnh ung thư đại-trực tràng (Colo-Rectal Cancer - CRC) và các bệnh ung thư niêm mạc tử cung, sự hoạt hóa sự truyền tín hiệu Wnt được dẫn dắt bởi cơ chế phụ thuộc phối tử (tức là bằng sự hoạt hóa Wnt tự tiết/cận tiết), như được phát hiện bởi sự tích tụ beta-catenin nội bào. Ở NSCLC, TNBC và caxinom tuyến tụy tạng, sự hoạt hóa Wnt phụ thuộc phối tử được dàn xếp bằng nhiều cơ chế, bao gồm sự biểu hiện gia tăng của các phối tử Wnt và/hoặc của các thụ thể LRP5 và LRP6, hoặc sự bất hoạt chất điều hòa DKK1 âm tính với LRP5 và LRP6 (TNBC: Liu *et al.* “LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(11):5136-41; Khramtsov *et al.* “Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome”. *Am J Pathol.* 2010; 176(6): 2911-20; NSCLC: Nakashima *et al.* “Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients”. *Oncol Rep.* 2008; 19(1):203-9; Pancreatic cancer: Zhang *et al.* “Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis”. *Cancer Res.* 2013; 73(15):4909-22). Cụ thể là, dữ liệu công bố đã chỉ ra rằng ở các mô khỏe mạnh (ví dụ, biểu mô vú và phổi), beta-catenin được khu biệt chỉ ở màng huyết tương. Ngược lại, phần lớn các mẫu lâm sàng nguyên phát TNBC, NSCLC và caxinom tuyến tụy tạng thể hiện sự tích tụ beta-catenin nội bào (tức là, trong tế bào chất/nhân; dấu chuẩn sinh học của sự hoạt hóa sự truyền tín hiệu Wnt), do sự truyền tín hiệu Wnt bất thường. Các công bố gần đây đã chỉ ra rằng sự hoạt hóa sự truyền tín hiệu Wnt phụ thuộc phối tử được dàn xếp bằng RNF43 đột biến/vô hoạt (Giannakis *et al.* “RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers”. *Nat Genet.* 2014; 46(12):1264-6) hoặc bằng sự hoạt hóa các sản phẩm phiên mã dung hợp R-Spondin (mã hóa các protein R-spondin2 hoặc R-spondin3 được dẫn dắt bởi các promoter mạnh hoạt tính chủ yếu; Seshagiri *et al.* “Recurrent R-spondin fusions in colon

cancer”. *Nature* 2012; 488(7413):660-4) ở phân nhóm bệnh CRC và ung thư niêm mạc tử cung. Các thể đột biến RNF43 vô hoạt và các sản phẩm phiên mã dung hợp R-Spondin đều được chỉ ra là làm tăng thêm sự truyền tín hiệu Wnt phụ thuộc phối tử *in vitro* bằng sự gia tăng mức độ phong phú của Frizzled trên bề mặt tế bào. Sự hoạt hóa Wnt phụ thuộc phối tử ở các khối u đã được chỉ ra là dẫn dắt sự tăng trưởng khối u và sự kháng lại liệu pháp hóa trị hoặc liệu pháp miễn dịch, và có liên quan đến sự tái phát ở các mô hình tiền lâm sàng.

Một số phân tử gắn kết LRP5 hoặc LRP6, có khả năng điều biến con đường truyền tín hiệu Wnt, là đã được biết trong lĩnh vực này:

Dickkopf-1 (DKK1) là chất ức chế LRP5 và LRP6. DKK1 kết hợp với cả hai đồng thụ thể Wnt, LRP5 và 6, và protein xuyên màng, Kremen, ức chế sự truyền tín hiệu Wnt và dẫn đến sự nội nhập hóa LRP5 và LRP6 nhanh chóng. DKK1 đã được thể hiện là làm ức chế cả sự truyền tín hiệu qua trung gian Wnt1 và Wnt3a. Các nghiên cứu mô hình hóa cấu trúc chỉ ra rằng phân tử DKK1 đơn gắn kết một cách hợp tác với vùng kéo dài của miền ecto LRP6 (từ cánh quạt beta 1 đến 3). Các phân tích cấu trúc gợi ý có sự tương tác-gắn kết hợp tác DKK1 với LRP6 với sự gắn kết ban đầu vào vùng cánh quạt beta 3 mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác/gắn kết với vùng cánh quạt beta 1 và 2 thông qua sự thay đổi cấu tạo của miền ecto LRP6. Tuy nhiên lại thiếu sự giải thích các epitop đã xác định trong các miền cánh quạt beta 1, 2 và 3 mà liên quan đến sự gắn kết DKK1 với LRP6 do độ phân giải thấp của các hình ảnh cấu trúc dựng lại của miền ecto LRP6 đầy đủ được gắn kết với DKK1, như nêu trên.

Việc điều trị DKK1 *in vivo* đã được chỉ ra rằng gây ra độc tính nặng ở đường tiêu hóa. Cụ thể là, sự biểu hiện qua trung gian adenovirus của DKK1 ở chuột nhắt trưởng thành được chỉ ra rằng làm ức chế một cách rõ rệt sự tăng sinh ở ruột non và ruột kết, đi kèm với sự thoái biến cấu trúc tiến triển, sự giảm khối lượng cơ thể trầm trọng và sự tử vong do viêm ruột kết và sự nhiễm trùng toàn thân. Cụ thể là, LRP5 và LRP6 được biểu hiện ở ruột trong các tế bào biểu mô tăng sinh và là cần thiết cho sự tăng sinh của biểu mô ruột, điều này gợi ý rằng sự ức chế LRP5 và LRP6 có thể là độc hại cho biểu mô này và các mô thông thường khác (Zhong *et al.* "Lrp5 and Lrp6 play compensatory roles in mouse intestinal development". *J Cell Biochem.* 2012; 113(1):31-8). Điều này khiến có nghi ngờ liệu các tác nhân mà ức chế LRP5 và LRP6, hoặc các tác nhân mà ức chế con

đường truyền tín hiệu Wnt (Wnt1 và Wnt3a) nói chung, có thể sử dụng được cho các mục đích trị liệu hay không, ví dụ, có thể được phát triển làm các thuốc chống ung thư hay không.

WO2009/056634 đề cập đến các phân tử gắn kết LRP6 mà có thể hoặc là tương tác với con đường truyền tín hiệu Wnt1 hoặc là với con đường truyền tín hiệu Wnt3/3a, các phân tử này có thể là đối kháng hoặc chủ vận, và có thể được sử dụng nhằm mục đích chẩn đoán hoặc để điều trị “các rối loạn liên quan đến sự truyền tín hiệu Wnt”, như bệnh viêm xương khớp, bệnh thận đa nang, hoặc bệnh ung thư. Các ví dụ cụ thể về các phân tử gắn kết như vậy, được xác định bằng trình tự axit amin của chúng không được cung cấp trong tài liệu này.

WO2011/138391 và WO2011/138392 bộc lộ các kháng thể gắn kết LRP6 đa hóa trị. WO2011/138391 đang yêu cầu bảo hộ các kháng thể mà phong bế một con đường truyền tín hiệu Wnt (Wnt1 hoặc Wnt3) mà không có tiềm năng đối với con đường còn lại (tương ứng là Wnt3 hoặc Wnt1). WO2011/138392, trong số các công bố khác, đề xuất các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể mà có tiềm năng đối với sự truyền tín hiệu Wnt bằng sự kết chùm thụ thể LRP6.

WO2011/138391 giải thích rằng để đạt được tác dụng mong muốn, các phân tử gắn kết LRP6 cần được định dạng thành các kháng thể IgG có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các phân tử biparatopic (biparatopic: hướng đích hai epitop khác nhau trên cùng một đích) LRP6 được cung cấp mà bao gồm phân tử IgG, có tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất, kết hợp với phần Fv chuỗi đơn, có tính đặc hiệu gắn kết thứ hai. Một số định dạng được nêu là có độ ổn định nhiệt giảm đáng kể (Tm bằng từ 50 đến 52°C). Phần Fc có thể truyền các chức năng tác động tên phân tử IgG, như tính độc hại tế bào phụ thuộc phần bổ sung (complement-dependent cytotoxicity - CDC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular toxicity - ADCC).

WO2013/067355 bộc lộ các cấu trúc globulin miễn dịch scFv gắn kết LRP6 biparatopic được kéo dài thời gian bán thải, thu được từ các phân tử IgG được bộc lộ trong WO2011/138391.

WO2011/119661 bộc lộ các kháng thể mà gắn kết với LRP6 và ức chế sự truyền tín hiệu cảm ứng bởi isoform Wnt thứ nhất, đặc biệt là bởi Wnt3 hoặc Wnt3a, nhưng các

kháng thể này lại khiến sự truyền tín hiệu có tiềm năng bị cảm ứng bởi isoform Wnt thứ hai, mà có thể là isoform Wnt1, 2, 2b, 4, 6, 7a, 7b, 8a, 9a, 9b, 10a hoặc 10b. Các phân tử đặc hiệu kép được bộc lộ mà gắn kết với vùng E1-E2 của LRP6 cũng như với vùng E3-E4 của LRP6. Kỹ thuật gắn nút vào lỗ (knob-in-hole) được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép.

Sự nhận diện các epitop gắn kết (các gốc axit amin đã định trong miền ecto / các vùng cánh quạt beta LRP6) liên quan đến sự gắn kết của các kháng thể LRP6 không được đề xuất trong WO2009/056634, cũng như trong WO2011/138391 hoặc trong WO2013/067355, và chỉ được đề xuất một phần trong WO2011/119661. Cụ thể là, các kháng thể gắn kết LRP6 có thể ức chế sự truyền tín hiệu Wnt thông qua các cơ chế khác nhau theo sự gắn kết với các vùng khác nhau của LRP6, bao gồm trực tiếp cạnh tranh với các Wnt hoặc ức chế sự tạo thành các phức hợp thụ thể bộ ba (Wnt-LRP6-Frizzled), trong khi đó các cơ chế khác làm tăng cường sự truyền tín hiệu, có thể là bằng sự kết chùm thụ thể (Ahn *et al.* "Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6". *Dev Cell*. 2011; 21(5):862-73).

Tuy nhiên, cho đến nay, không có phân tử gắn kết nào được mô tả trong lĩnh vực này đã được cấp phép bởi các cơ quan y tế có thẩm quyền để sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh bất kỳ. Cụ thể là, việc sử dụng như vậy đòi hỏi các tính chất gắn kết rất đặc hiệu, tính đặc hiệu đúng đắn, sao cho các phân tử như vậy gắn kết hoặc không gắn kết, hoạt hóa hoặc không hoạt hóa, hoặc ức chế hoặc không ức chế các đích khác (ví dụ, dẫn đến sự hoạt hóa hoặc ức chế không mong muốn các con đường truyền tín hiệu khác, hoặc thiếu sự hoạt hóa hoặc ức chế đối với các isoform đích), trong trường hợp các tác nhân đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, cân bằng đúng đắn giữa hai hoặc nhiều tính đặc hiệu gắn kết, các tính chất được động học và dược lực học thích hợp, biên dạng độc tính chấp nhận được, và tất nhiên là cả hiệu quả *in vivo*.

Từ những điều nêu trên, cần có các tác nhân trị liệu mới mà cho phép điều trị có hiệu quả một số loại bệnh ung thư và khối u. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất các tác nhân có hoạt tính được lý như vậy mà có thể được sử dụng để điều trị một số bệnh ung thư, bao gồm NSCLC và TNBC.

Cụ thể là, mục đích của sáng chế là đề xuất các tác nhân có hoạt tính được lý như vậy, các chế phẩm và/hoặc các phương pháp điều trị mà cung cấp các lợi ích nhất định so với các tác nhân, các chế phẩm và/hoặc các phương pháp hiện được sử dụng và/hoặc được biết trong lĩnh vực này. Các lợi ích này bao gồm hiệu quả *in vivo*, các tính chất được lý và trị liệu được cải thiện, ít tác dụng phụ, và các tính chất có lợi khác như cải thiện khả năng dễ điều chế hoặc giảm chi phí hàng hóa, đặc biệt là so với các thuốc ứng viên đã được biết trong lĩnh vực này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề xuất các polypeptit mà gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 hoặc LRP6, trong đó polypeptit theo sáng chế bao gồm miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất (a) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (i) đến (iii) được xác định bằng việc có các trình tự CDR dưới đây:

(i):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(ii):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(iii):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9),

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai (b) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (iv) và (v) được xác định bằng việc có các trình tự CDR dưới đây:

(iv):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12)

(v):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Các thuật ngữ “thứ nhất” và “thứ hai” liên quan đến các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch này chỉ được dự tính là để chỉ ra rằng các miền này là hai miền khác nhau (vì chúng sẽ ít nhất là gồm các trình tự CDR khác nhau). Do đó, các thuật ngữ này sẽ không được hiểu là để chỉ thứ tự hoặc trình tự chính xác của các miền này trong chuỗi polypeptit.

Các polypeptit theo sáng chế tùy ý gồm miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ ba, đặc biệt là như miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin, chẳng hạn như miền Alb11, bao gồm các CDR dưới đây:

CDR1(Alb11): SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2(Alb11): SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3(Alb11): GGSLSR (= SEQ ID NO:18).

Theo phương án cụ thể hơn, các polypeptit theo sáng chế chứa các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà là các miền VHH, và tốt hơn là các miền VHH được làm giống như của người.

Theo phương án cụ thể hơn, các polypeptit theo sáng chế chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất (a) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (i) đến (iii) có các trình tự dưới đây:

(i):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREF
 VAAIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAADTRTVALLQYRYDYWGQGTLLTVSS
 (= SEQ ID NO:19)

(ii):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 FVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGTLVTVSS
 (= SEQ ID NO:20)

(iii):

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKERE
 VAAIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAADRRGRGENYILLYSSGRYEWGQGTLVTVSS
 (= SEQ ID NO:21),

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai (b) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (iv) và (v) có các trình tự dưới đây:

(iv):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 VAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAASPIPYGSLRRRNNDYWGQGTLVTVSS
 (= SEQ ID NO:22), và

(v):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
 FVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVY
 YYCAADPRGYGVAYVSAYYEWGQGTLVTVSS
 (= SEQ ID NO:23).

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, các polypeptit theo sáng chế còn chứa gốc kéo dài thời gian bán thải, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải này được liên kết cộng hóa trị với polypeptit đã nêu và tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm gốc gắn kết albumin, như peptit gắn kết albumin hoặc miền globulin miễn dịch gắn kết albumin, tốt hơn là miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin, tốt hơn nữa là miền Alb11,

gốc gắn kết transferrin, như miền globulin miễn dịch kháng transferrin, phân tử polyetylen glycol, albumin huyết thanh người, và mảnh của albumin huyết thanh người.

Được ưu tiên cụ thể là các polypeptit mà gồm, ngoài hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (a) và (b) như nêu trên đây, miền Alb11 có trình tự dưới đây:

EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWV
SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSRSSQGTLVTVSS

(= SEQ ID NO:24)

Theo phương án thêm nữa, sáng chế đặc biệt gồm các polypeptit chứa hoặc gồm chuỗi polypeptit bất kỳ trong số ba chuỗi polypeptit dưới đây:

F13500575, có trình tự SEQ ID NO:25,

F13500571, có trình tự SEQ ID NO:26, và

F13500720, có trình tự SEQ ID NO:27.

Theo các khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic, các vector biểu hiện, các tế bào chủ, và các phương pháp sản xuất được sử dụng trong việc sản xuất polypeptit theo sáng chế. Các phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng, dưới dạng được phân lập, để xây dựng các vector biểu hiện tương ứng, các vector này sau đó có thể được chuyển nhiễm vào các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất sinh được phẩm các polypeptit theo sáng chế. Phương pháp sản xuất này thường bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện mà cho phép sự biểu hiện của polypeptit, thu hồi polypeptit và tinh chế nó theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Các khía cạnh, các phương án, các ứng dụng và các phương pháp khác liên quan đến các polypeptit theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây và từ các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Sáng chế đề xuất các phân tử mới mà cho phép điều trị hiệu quả hơn đối với một số loại bệnh ung thư, như TNBC, CRC, và NSCLC, với ít tác dụng phụ hơn. Các polypeptit theo sáng chế tạo ra tác dụng trị liệu bất ngờ (tức là hiệu quả) trong điều trị cho các bệnh nhân ung thư, ở chỗ chúng có thể cảm ứng sự thoái triển khối u dẫn đến sự đáp ứng hoàn toàn về bệnh lý (pathological complete response - pCR). Điều này được

mong đợi là dẫn đến sự cải thiện đáng kể sự sống không có sự tiến triển của bệnh và sự sống nói chung, đặc biệt là ở các chỉ định nhu cầu chữa trị không đáp ứng cao ví dụ như bệnh ung thư vú. Do đó, các polypeptit theo sáng chế cung cấp các lựa chọn trị liệu mới trong điều trị một số loại bệnh ung thư, đặc biệt là các bệnh ung thư thể hiện con đường truyền tín hiệu Wnt bị mất điều hòa và sự tích tụ beta-catenin.

Hơn nữa, các polypeptit theo sáng chế có thể sản xuất được một cách dễ dàng, có độ ổn định cao và tính kháng nguyên thấp, và cung cấp nhiều lựa chọn liên quan đến các đường dùng, ngoài việc tiêm và truyền.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự biểu diễn bằng sơ đồ các polypeptit biparatopic đối kháng sự truyền tín hiệu Wnt1 và Wnt3a. Chúng gồm ba miền, với hai miền gắn kết với các epitop riêng biệt của LRP5 và LRP6 (chất phong bế Wnt1 và Wnt3a) và một miền để kéo dài thời gian bán thải (chất gắn kết albumin huyết thanh người).

Fig.2 thể hiện sự thiếu tương quan giữa các thử nghiệm ELISA và FACS gắn kết đối với một số lượng đại diện các VHH gắn kết LRP6 thu được từ sự tạo miễn dịch ở lạc đà không bướu. Panen số “1” của các VHH được đặc trưng bằng ái lực cao đối với các tế bào biểu hiện LRP6 trên màng huyết tương, như được phát hiện bằng các thử nghiệm gắn kết FACS (các giá trị MCF được báo cáo trên trục y). Panen số “2” của các VHH được đặc trưng bằng ái lực cao đối với miền ecto LRP6 tái tổ hợp của người (rhLRP6-Fc), như được phát hiện bằng các thử nghiệm gắn kết ELISA (các giá trị OD405 được báo cáo trên trục x).

Fig.3 thể hiện sự gắn kết của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic được kéo dài thời gian bán thải với các dòng tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 của người (Fig.3A) và LRP6 của người (Fig.3B) khi so với đối chứng âm tính chứa chất gắn kết không hướng đích (cấu trúc VHH mà gắn kết với protein vi khuẩn mà không được biểu hiện ở các tế bào HEK293).

Fig.4 thể hiện sự cạnh tranh DKK1 hoàn toàn của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải trong việc gắn kết với cả dòng tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người (Fig.4A) và dòng tế bào HEK293 biểu

hiện quá mức LRP6 người (Fig.4B), như được phát hiện bởi thử nghiệm cạnh tranh DKK1 trên cơ sở FACS.

Fig.5 thể hiện sự ức chế hoàn toàn con đường Wnt1 và Wnt3a của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (Fig.5A) và sự so sánh với các phân tử gắn kết LRP6 khác (Fig.5B: Knob HC YW210.09 và MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; Fig.5C: 802T) trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp.

Fig.6 thể hiện sự ức chế sự truyền tín hiệu Wnt ở các tế bào ung thư, như được phát hiện bằng sự ức chế sự biểu hiện mRNA Axin2 tương đối (Fig.6A), và sự tăng sinh tế bào (Fig.6B) như được phát hiện bằng phần trăm (%) số tế bào có thể tồn tại giảm, sau khi xử lý với ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (nồng độ cuối cùng là 1mM) và bằng cách xử lý với 802T, so với các tế bào được xử lý bằng F013500571 và không được xử lý (đối chứng) (biểu đồ phía tay trái / phía tay phải của Fig.6B); các đường cong đáp ứng liều được thể hiện đối với việc xử lý bằng một cấu trúc LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (Fig.6C) và 802T (Fig.6D).

Fig.7 thể hiện hiệu quả *in vivo* của cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (F013500571 trong Fig.7A và F013500720 trong Fig.7B) và của Knob HC YW210.09 (Fig.7C) trong các mô hình khối u được dẫn dắt bởi Wnt (mô hình ghép khác loài MMTV-Wnt1).

Fig.8 thể hiện sự ức chế con đường Wnt ở các khối u được xử lý bằng các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải F013500571 và F013500720, như được phát hiện bằng sự giảm sự biểu hiện mRNA Axin2 so với nhóm đối chứng.

Fig.9 thể hiện tác dụng của sự ức chế truyền tín hiệu dẫn dắt bởi Wnt3a đối với sự giải phóng TNFalpha xytokin tiền viêm bởi các tế bào đuôi gai (Fig.9A) và tác dụng đối với sự hoạt hóa tế bào T, như được xác định bằng sự giải phóng interferon-gama (Fig.9B) khi xử lý với cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải. Mỗi ký hiệu thể hiện một mẫu cho tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) duy nhất. Các dữ liệu thể hiện được chuẩn hóa đến mức TNFalpha của đối chứng

không được xử lý (Fig.9A) và mỗi ký hiệu thể hiện cặp mẫu cho duy nhất đối với tế bào DC và tế bào T (Panen B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Phân định nghĩa

Các khía cạnh và các phương án nêu trên và các khía cạnh và các phương án khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả thêm ở đây, trong đó:

a) Trừ khi được thể hiện rõ hoặc định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ được sử dụng đều có nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực này, mà sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc tham khảo được thực hiện, ví dụ, đối với các sổ tay hướng dẫn chuẩn, như Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), và Roitt *et al.*, "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), cũng như đến tình trạng kỹ thuật chung được nêu ở đây. Hơn nữa, trừ khi được thể hiện rõ theo cách khác, tất cả các phương pháp, các bước, các kỹ thuật và các thao tác mà không được mô tả chi tiết một cách cụ thể có thể được thực hiện và đã được thực hiện theo cách mà thực chất đã biết, như sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc tham khảo cũng được thực hiện, ví dụ, đối với các sổ tay hướng dẫn chuẩn, đối với tình trạng kỹ thuật chung được nêu trên và đối với các tài liệu tham khảo khác được nêu trong đó.

b) Trừ khi được thể hiện rõ theo cách khác, các thuật ngữ "globulin miễn dịch" và "trình tự globulin miễn dịch" - dù là được sử dụng ở đây để đề cập đến kháng thể chuỗi nặng hay đến kháng thể 4 chuỗi thông thường - được sử dụng như là các thuật ngữ chung bao gồm cả kháng thể có kích cỡ đầy đủ, các chuỗi riêng lẻ của nó, cũng như tất cả các phần, các miền hoặc các mảnh của nó (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các miền gắn kết kháng nguyên hoặc các mảnh lần lượt như các miền VHH hoặc các miền VH/VL). Ngoài ra, thuật ngữ "trình tự" như được sử dụng ở đây (ví dụ trong các thuật ngữ như "trình tự globulin miễn dịch", "trình tự kháng thể", "trình tự miền biến đổi (đơn)", "trình tự VHH" hoặc "trình tự protein"), sẽ thường được hiểu là bao gồm cả trình

tự axit amin có liên quan cũng như các trình tự axit nucleic hoặc các trình tự nucleotit mã hóa chúng, trừ khi văn cảnh yêu cầu cách hiểu giới hạn hơn;

c) Thuật ngữ "miền" (của polypeptit hoặc protein) như được sử dụng ở đây chỉ cấu trúc protein gấp nếp mà có khả năng giữ lại cấu trúc bậc ba của nó độc lập với phần còn lại của protein. Thông thường, các miền chịu trách nhiệm cho các tính chất chức năng riêng biệt của các protein, và trong nhiều trường hợp, các miền có thể được bổ sung, loại bỏ hoặc truyền sang các protein khác mà không mất đi chức năng của phần còn lại của protein và/hoặc của miền.

d) Thuật ngữ "miền globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây chỉ vùng hình cầu của chuỗi kháng thể (ví dụ như một chuỗi của kháng thể 4 chuỗi thông thường hoặc của kháng thể chuỗi nặng), hoặc chỉ polypeptit mà đặc biệt bao gồm vùng hình cầu như vậy. Các miền globulin miễn dịch được đặc trưng ở chỗ chúng giữ lại cuộn globulin miễn dịch đặc trưng của các phân tử kháng thể, mà bao gồm phần kẹp 2 lớp của khoảng 7 chuỗi beta đối song được sắp xếp thành hai tấm beta, tùy ý được làm ổn định bằng liên kết disulphua bảo tồn.

e) Thuật ngữ "miền biến đổi globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây có nghĩa là miền globulin miễn dịch đặc biệt bao gồm bốn "vùng khung" mà được nêu trong lĩnh vực kỹ thuật này và dưới đây lần lượt là "vùng khung 1" hay "FR1"; "vùng khung 2" hay "FR2"; "vùng khung 3" hay "FR3"; và "vùng khung 4" hay "FR4"; các vùng khung này được làm ngắt quãng bằng ba "vùng quyết định bổ cứu" hay "CDR", mà được đề cập trong lĩnh vực này và dưới đây lần lượt là "vùng quyết định bổ cứu 1" hoặc "CDR1"; "vùng quyết định bổ cứu 2" hay "CDR2"; và "vùng quyết định bổ cứu 3" hay "CDR3". Do đó, cấu trúc hoặc trình tự chung của miền biến đổi globulin miễn dịch có thể được thể hiện như sau: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Đó là (các) miền biến đổi globulin miễn dịch mà truyền tính đặc hiệu đối với kháng nguyên cho kháng thể bằng cách mang điểm gắn kết kháng nguyên.

f) Thuật ngữ "miền biến đổi đơn globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây có nghĩa là miền biến đổi globulin miễn dịch mà có khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với epitop của kháng nguyên mà không bắt cặp với miền globulin miễn dịch biến đổi bổ sung. Một ví dụ về các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch trong phạm vi ý nghĩa

của sáng chế là "các kháng thể miễn", như các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch VH và VL (các miền VH và các miền VL). Ví dụ quan trọng khác về các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch là "các miền VHH" (hoặc đơn giản là "VHH") từ lạc đà, như được xác định sau đây.

Xét trên định nghĩa nêu trên, miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể 4- chuỗi thông thường (như phân tử IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE; đã biết trong lĩnh vực này) hoặc của mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fv như mảnh Fv được liên kết disulphua hoặc mảnh scFv, hoặc diabody (tất cả đều đã được biết trong lĩnh vực này) thu được từ kháng thể 4 chuỗi thông thường, sẽ thường không được đề cập là miền biến đổi đơn globulin miễn dịch, vì, trong các trường hợp này, sự gắn kết với epitop tương ứng của kháng nguyên thường không diễn ra bởi một (duy nhất) miền globulin miễn dịch mà bởi cặp (kết hợp) các miền globulin miễn dịch như các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tức là, bởi cặp VH-VL của các miền globulin miễn dịch, mà cùng gắn kết với epitop của kháng nguyên tương ứng.

f1) "Các miền VHH", còn được biết như là VHH, các miền V_HH, các mảnh kháng thể VHH, và các kháng thể VHH, đã được mô tả ban đầu là miền (biến đổi) globulin miễn dịch gắn kết kháng nguyên của "các kháng thể chuỗi nặng" (tức là, của "các kháng thể không có các chuỗi nhẹ"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). Thuật ngữ "miền VHH" đã được chọn để phân biệt các miền biến đổi này với các miền biến đổi chuỗi nặng khác mà có mặt trong các kháng thể 4 chuỗi thông thường (mà được đề cập ở đây là "các miền V_H" hoặc "các miền VH") và với các miền biến đổi chuỗi nhẹ mà có mặt trong các kháng thể 4 chuỗi thông thường (mà được đề cập ở đây là "các miền V_L" hoặc "các miền VL"). Các miền VHH có thể gắn kết một cách đặc hiệu với epitop mà không cần miền gắn kết kháng nguyên bổ sung (ngược lại với các miền VH hoặc VL trong kháng thể 4 chuỗi thông thường, trong đó epitop được nhận diện bằng miền VL cùng với miền VH). Các miền VHH là các đơn vị nhỏ, nhận diện kháng nguyên một cách mạnh mẽ và hiệu quả được tạo thành bằng miền globulin miễn dịch đơn.

Trong văn cảnh của sáng chế, các thuật ngữ miền VHH, VHH, miền V_HH, mảnh kháng thể VHH, kháng thể VHH, cũng như "Nanobody[®]" và "miền Nanobody[®]"

("Nanobody" là nhãn hiệu của công ty Ablynx N.V.; Ghent; Belgium) được sử dụng thay thế nhau và là đại diện cho các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (có cấu trúc: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 và gắn kết một cách đặc hiệu với epitop mà không cần sự có mặt của miền biến đổi globulin miễn dịch thứ hai), và cũng có thể được phân biệt với các miền VH bằng cái gọi là "các gốc xác nhận tiêu chuẩn", như được định nghĩa, ví dụ, trong WO2009/109635, Fig.1.

Các gốc axit amin của miền VHH được đánh số theo cách đánh số thông thường đối với các miền V_H được đưa ra bởi Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), như được áp dụng đối với các miền VHH từ lạc đà, như được thể hiện, ví dụ, trong Fig.2 của bài báo của Riechmann và Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). Theo cách đánh số này,

- FR1 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 1-30,
- CDR1 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 31-35,
- FR2 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 36-49,
- CDR2 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 50-65,
- FR3 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 66-94,
- CDR3 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 95-102, và
- FR4 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 103-113.

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng - như được biết rõ trong lĩnh vực này đối với các miền V_H và đối với các miền VHH - tổng số lượng gốc axit amin trong mỗi CDR có thể thay đổi và có thể không tương ứng với tổng số gốc axit amin được thể hiện bằng cách đánh số Kabat (tức là, một hoặc nhiều vị trí theo cách đánh số Kabat có thể không có gốc axit amin trong trình tự thực tế, hoặc trình tự thực tế có thể chứa nhiều gốc axit amin hơn số lượng cho phép bằng sự đánh số Kabat). Điều này có nghĩa là, nói chung, việc đánh số theo Kabat có thể hoặc có thể không tương ứng với việc đánh số thực tế các gốc axit amin trong trình tự thực tế.

Các phương pháp khác để đánh số các gốc axit amin của các miền V_H, các phương pháp này cũng có thể được áp dụng theo cách thức tương tự đối với các miền VHH, là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, trong phần mô tả, yêu cầu bảo hộ, và

hình vẽ của sáng chế, việc đánh số theo Kabat và được áp dụng cho các miền VHH như được mô tả trên đây sẽ được tuân theo, trừ khi được nêu rõ theo cách khác.

Tổng số gốc axit amin trong miền VHH sẽ luôn nằm trong khoảng từ 110 đến 120, thường nằm trong khoảng từ 112 đến 115. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng các trình tự nhỏ hơn và dài hơn cũng có thể là thích hợp đối với các mục đích được nêu ở đây.

Các đặc tính về cấu trúc và các tính chất chức năng khác của các miền VHH và các polypeptit chứa miền này có thể được tổng kết như sau:

các miền VHH (mà bản chất đã được "thiết kế" để gắn kết về mặt chức năng với kháng nguyên mà không có sự có mặt của, và không có tương tác bất kỳ với, miền biến đổi chuỗi nhẹ) có thể có tác dụng như là miền, polypeptit hoặc đơn vị cấu trúc gắn kết kháng nguyên có chức năng, tương đối nhỏ, đơn lẻ. Điều này phân biệt các miền VHH với các miền VH và VL của các kháng thể 4 chuỗi thông thường, mà bản thân chúng thường không thích hợp cho các ứng dụng thực tiễn để làm các protein đơn gắn kết kháng nguyên hoặc các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, mà cần phải được kết hợp trong một số dạng hoặc với dạng khác để tạo ra đơn vị gắn kết kháng nguyên chức năng (như trong, ví dụ, các mảnh kháng thể thông thường như các mảnh Fab; trong scFv's, mà bao gồm miền VH được liên kết cộng hóa trị với miền VL).

Vì các tính chất duy nhất này nên việc sử dụng các miền VHH - hoặc là một mình hoặc là dưới dạng một phần của polypeptit lớn hơn - sẽ cung cấp một số ưu điểm đáng kể so với việc sử dụng các miền VH và VL thông thường, scFv's hoặc các mảnh kháng thể thông thường (như các mảnh Fab hoặc F(ab')₂):

- chỉ cần một miền đơn để gắn kết kháng nguyên với ái lực cao và với độ chọn lọc cao, do đó không cần phải có hai miền riêng rẽ, cũng không cần đảm bảo rằng hai miền này là có mặt trong cấu tạo và cấu hình không gian phù hợp (tức là thông qua việc sử dụng các tác nhân liên kết được thiết kế đặc biệt, như với scFv's);
- các miền VHH có thể được biểu hiện từ gen duy nhất và không cần sự cải biến hoặc cuộn gập sau dịch mã;
- các miền VHH có thể dễ dàng được xử lý di truyền thành các dạng đa hóa trị và đa đặc hiệu (như được bàn luận tiếp ở đây);

- các miền VHH có độ hòa tan cao và không có xu hướng kết tụ (như với các miền gắn kết kháng nguyên thu được từ chuột được mô tả bởi Ward *et al.*, Nature 341: 544-546 (1989));
- các miền VHH có độ ổn định cao đối với nhiệt độ, độ pH, các proteaza và các tác nhân hoặc các điều kiện làm biến tính khác và do đó có thể được điều chế, bảo quản hoặc vận chuyển mà không cần các thiết bị làm lạnh, nhờ đó tiết kiệm thời gian, chi phí, và bảo vệ môi trường;
- các miền VHH có thể điều chế được một cách dễ dàng và tương đối rẻ, thậm chí cả trên quy mô lớn. Ví dụ, các miền VHH và các polypeptit chứa các miền này có thể được sản xuất bằng cách sử dụng sự lên men vi sinh (ví dụ, như được mô tả thêm dưới đây) và không cần việc sử dụng hệ biểu hiện trên động vật có vú, như là đối với, ví dụ, các mảnh kháng thể thông thường;
- các miền VHH là tương đối nhỏ (khoảng 15 kDa, hoặc nhỏ hơn 10 lần so với IgG thông thường) so với các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và do đó
 - thể hiện sự xuyên thấu cao (hơn) vào các mô và
 - có thể được dùng với liều lượng cao hơn
 so với các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng;
- các miền VHH có thể thể hiện cái gọi là các tính chất gắn kết khoang (trong số các cái khác do vòng CDR3 kéo dài của chúng, so với các miền VH thông thường) và do đó có thể còn tiếp cận được các đích và các epitop mà không thể tiếp cận đối với các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Các phương pháp để thu các miền VHH gắn với kháng nguyên hoặc epitop đặc hiệu đã được mô tả sớm hơn, ví dụ, trong WO2006/040153 và WO2006/122786. Như cũng được mô tả chi tiết ở đây, các miền VHH thu được từ lạc đà có thể được "làm giống như của người" bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự axit amin của trình tự VHH ban đầu bằng một hoặc nhiều gốc axit amin mà tìm thấy ở (các) vị trí tương ứng trong miền VH từ kháng thể 4 chuỗi thông thường của người. Miền VHH được làm giống như của người có thể chứa một hoặc nhiều trình tự vùng khung đầy đủ của người, và, trong phương án cụ thể hơn, có thể chứa các trình tự vùng khung của

người thu được từ DP-29, DP-47, DP-51, hoặc các phần của chúng, tùy ý được kết hợp với các trình tự JH, như JH5.

f2) "Các kháng thể miền", còn được biết như là "Dab", "Domain Antibodies", và "dAbs" (các thuật ngữ "Domain Antibodies" và "dAbs" được sử dụng như là nhãn hiệu bởi tập đoàn GlaxoSmithKline) đã được mô tả trong, ví dụ, Ward, E.S., *et al.*: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*"; *Nature* 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy"; *TRENDS in Biotechnology* 21(11): 484-490 (2003); và WO2003/002609.

Các kháng thể miền đặc biệt tương ứng với các miền VH hoặc VL của động vật có vú không phải lạc đà, cụ thể là các kháng thể 4 chuỗi của người. Để gắn kết epitop dưới dạng miền gắn kết kháng nguyên đơn, tức là không cần phải cặp đôi tương ứng với miền VL hoặc VH, sự chọn lọc đặc hiệu đối với các tính chất gắn kết kháng nguyên như vậy là cần thiết, ví dụ, bằng cách sử dụng các thư viện về các trình tự miền VH hoặc VL đơn của người.

Các kháng thể miền có, giống như các VHH, khối lượng phân tử khoảng 13 đến khoảng 16 kDa và, nếu thu được từ các trình tự đầy đủ của người, thì không cần làm giống như của người để, ví dụ, cho các ứng dụng trị liệu đối với người. Như trong trường hợp các miền VHH, chúng còn được biểu hiện rõ ràng ở các hệ biểu hiện nhân sơ, tạo ra sự giảm đáng kể về chi phí sản xuất nói chung.

Các kháng thể miền, cũng như các miền VHH, có thể được làm hoàn thiện về ái lực bằng cách đưa vào một hoặc nhiều biến đổi ở trình tự axit amin của một hoặc nhiều CDR, các biến đổi này dẫn đến sự cải thiện ái lực của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thu được đối với kháng nguyên tương ứng của nó, so với phân tử gốc tương ứng. Các phân tử miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch được hoàn thiện về ái lực này theo sáng chế có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả bởi Marks *et al.*, 1992, *Biotechnology* 10:779-783, hoặc Barbas, *et al.*, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813.; Shier *et al.*, 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, *Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9; và Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226(3): 889 896; KS

Johnson and RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

f3) Hơn nữa, cũng sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là có thể "ghép" một hoặc nhiều CDR nêu trên vào "các khung" khác, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các khung của người hoặc các khung không thuộc globulin miễn dịch. Các khung và các kỹ thuật thích hợp để ghép CDR như vậy là đã biết trong lĩnh vực này.

g) Các thuật ngữ "epitop" và "yếu tố quyết định kháng nguyên", mà có thể được sử dụng thay thế cho nhau, được dùng để chỉ một phần của đại phân tử, như polypeptit, mà được nhận diện bằng các phân tử gắn kết kháng nguyên, như các kháng thể thông thường hoặc các polypeptit theo sáng chế, và cụ thể hơn là bằng vị trí gắn kết kháng nguyên của các phân tử này. Các epitop xác định vị trí gắn kết tối thiểu đối với globulin miễn dịch, và do đó thể hiện đích đặc hiệu của globulin miễn dịch.

Phần của phân tử gắn kết kháng nguyên (như kháng thể thông thường hoặc polypeptit theo sáng chế) mà nhận diện epitop này được gọi là paratop.

h) Thuật ngữ phân tử gắn kết (kháng nguyên) "biparatopic" hoặc polypeptit "biparatopic" như được sử dụng ở đây sẽ chỉ polypeptit gồm miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai như được định nghĩa ở đây, trong đó hai miền biến đổi này có thể gắn kết với hai epitop khác nhau của một kháng nguyên, các epitop này không thường được gắn kết đồng thời bởi một globulin miễn dịch đặc hiệu đơn, như, ví dụ, kháng thể thông thường hoặc một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch. Các polypeptit biparatopic theo sáng chế bao gồm các miền biến đổi mà có tính đặc hiệu với epitop khác nhau, và không chứa các cặp miền biến đổi bổ cứu lẫn nhau mà gắn kết với cùng một epitop. Do đó, chúng không cạnh tranh với nhau để gắn kết với LRP5 hoặc LRP6.

i) Polypeptit (như globulin miễn dịch, kháng thể, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, polypeptit theo sáng chế, hoặc nói chung là phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc mảnh của nó) mà có thể "gắn kết", "gắn kết với", "gắn kết đặc hiệu", hoặc "gắn kết một cách đặc hiệu với", mà "có ái lực với" và/hoặc "có tính đặc hiệu đối với" epitop, kháng nguyên hoặc protein nhất định (hoặc đối với ít nhất một phần, một mảnh hoặc

epitop của nó) được gọi là "đối kháng" hoặc "được định hướng đối kháng" epitop, kháng nguyên hoặc protein này hoặc là phân tử "gắn kết" với epitop, kháng nguyên hoặc protein này.

k) Nói chung, thuật ngữ "độ đặc hiệu" chỉ số lượng các loại kháng nguyên hoặc epitop khác nhau mà phân tử gắn kết kháng nguyên cụ thể hoặc protein gắn kết kháng nguyên cụ thể (như globulin miễn dịch, kháng thể, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, hoặc polypeptit theo sáng chế) có thể gắn kết. Độ đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên có thể được xác định dựa vào ái lực và/hoặc khả lực. Ái lực, được biểu thị bằng hằng số cân bằng của sự phân ly giữa kháng nguyên và protein gắn kết kháng nguyên (K_D), là số đo lực bền gắn kết giữa epitop và vị trí gắn kết kháng nguyên trên protein gắn kết kháng nguyên: giá trị K_D càng nhỏ thì lực bền gắn kết này giữa epitop và phân tử gắn kết kháng nguyên càng mạnh (nói cách khác, ái lực có thể còn được biểu hiện dưới dạng hằng số ái lực (K_A), mà bằng $1/K_D$). Như sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, trên cơ sở các bộ lọc khác ở đây), ái lực có thể được xác định theo cách thức mà thực chất đã biết, tùy thuộc vào kháng nguyên đặc hiệu cần quan tâm. Khả lực là số đo lực bền gắn kết giữa phân tử gắn kết kháng nguyên (như globulin miễn dịch, kháng thể, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, hoặc polypeptit theo sáng chế) và kháng nguyên phù hợp. Khả lực có liên quan đến cả ái lực giữa epitop và vị trí gắn kết kháng nguyên của nó trên phân tử gắn kết kháng nguyên và số lượng vị trí gắn kết thích hợp trên phân tử gắn kết kháng nguyên.

Diễn hình là, các protein gắn kết kháng nguyên (như các polypeptit theo sáng chế) sẽ gắn kết với hằng số phân ly (K_D) là từ $10E-5$ đến $10E-14$ mol/lít (M) hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn là từ $10E-7$ đến $10E-14$ mol/lít (M) hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là từ $10E-8$ đến $10E-14$ mol/lít, và thậm chí tốt hơn nữa là từ $10E-11$ đến $10E-13$ (như được đo, ví dụ, trong thử nghiệm Kinexa; đã biết trong lĩnh vực này), và/hoặc với hằng số kết hợp (K_A) ít nhất là $10E7$ ME-1, tốt hơn nếu ít nhất là $10E8$ ME-1, tốt hơn nữa nếu ít nhất là $10E9$ ME-1, như ít nhất là $10E11$ ME-1. Giá trị K_D bất kỳ lớn hơn $10E-4$ M thường được xem như là thể hiện sự gắn kết không đặc hiệu. Tốt hơn là, polypeptit theo sáng chế sẽ gắn kết với kháng nguyên mong muốn với K_D nhỏ hơn 500 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 200 nM, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10 nM, chẳng hạn như nhỏ hơn 500 pM. Sự gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên hoặc epitop có thể được xác định

theo cách thích hợp bất kỳ mà thực chất đã biết, bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm được mô tả ở đây, phân tích Scatchard và/hoặc các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, như các thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassays - RIA), các thử nghiệm miễn dịch enzyme (enzyme immunoassays - EIA) và các thử nghiệm cạnh tranh kẹp, và các biến thể khác nhau của chúng mà thực chất đã biết trong lĩnh vực này.

l) Thuật ngữ “phản ứng chéo” liên quan đến các phân tử gắn kết mà có thể gắn kết với LRP5 cũng như với LRP6 (“phản ứng chéo *LRP5/LRP6*”) được dự tính là để chỉ rằng các phân tử gắn kết này có thể gắn kết một cách đặc hiệu với epitop có trong phân tử LRP5, và có thể, cách khác, còn gắn kết một cách đặc hiệu với epitop có trong phân tử LRP6. Thông thường, sự phản ứng chéo này có thể nảy sinh trong trường hợp mà các epitop của các protein khác nhau mà được gắn kết bằng phân tử gắn kết như vậy có cấu trúc tương tự và/hoặc trình tự tương tự nhau, ví dụ, thể hiện là các epitop được bảo tồn, ví dụ, được chia sẻ bởi các protein thuộc cùng một họ protein (ví dụ LRP5 và LRP6, thuộc họ protein LRP).

m) Các gốc axit amin sẽ được thể hiện theo mã axit amin một chữ cái hoặc ba chữ cái chuẩn, như thường được biết và được chấp nhận trong lĩnh vực này. Khi so sánh hai trình tự axit amin, thuật ngữ "sự khác biệt axit amin" chỉ sự chèn, sự xóa bỏ hoặc sự thay thế một số lượng xác định các gốc axit amin ở vị trí của trình tự đối chứng, so với trình tự thứ hai. Trong trường hợp thay thế, sự thay thế như vậy sẽ tốt hơn là sự thay thế axit amin bảo tồn, mà có nghĩa là gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có cấu trúc hóa học tương tự và có ảnh hưởng nhỏ hoặc về cơ bản là không có ảnh hưởng đối với chức năng, hoạt tính hoặc các tính chất sinh học khác của polypeptit. Sự thay thế axit amin bảo tồn như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ từ WO 98/49185, trong đó sự thay thế axit amin bảo tồn tốt hơn là các thay thế trong đó một axit amin trong các nhóm (i) - (v) dưới đây được thay thế bằng gốc axit amin khác trong cùng nhóm: (i) các gốc béo nhỏ, không phân cực hoặc phân cực nhẹ: Ala, Ser, Thr, Pro và Gly; (ii) các gốc phân cực, mang điện tích âm và các amit (không mang điện tích) của chúng: Asp, Asn, Glu và Gln; (iii) các gốc phân cực, có điện tích dương: His, Arg và Lys; (iv) các gốc béo lớn, không phân cực: Met, Leu, Ile, Val và Cys; và (v) các gốc thơm: Phe, Tyr và Trp. Các sự thay thế axit amin bảo tồn được đặc biệt ưu tiên là như sau:

Ala thành Gly hoặc thành Ser;
 Arg thành Lys;
 Asn thành Gln hoặc thành His;
 Asp thành Glu;
 Cys thành Ser;
 Gln thành Asn;
 Glu thành Asp;
 Gly thành Ala hoặc thành Pro;
 His thành Asn hoặc thành Gln;
 Ile thành Leu hoặc thành Val;
 Leu thành Ile hoặc thành Val;
 Lys thành Arg, thành Gln hoặc thành Glu;
 Met thành Leu, thành Tyr hoặc thành Ile;
 Phe thành Met, thành Leu hoặc thành Tyr;
 Ser thành Thr;
 Thr thành Ser;
 Trp thành Tyr;
 Tyr thành Trp hoặc thành Phe;
 Val thành Ile hoặc thành Leu.

n) Axit nucleic hoặc phân tử polypeptit được xem như là "(ở) (dạng) về cơ bản là được phân lập" - ví dụ, khi so với nguồn sinh học tự nhiên của nó và/hoặc môi trường phản ứng hoặc môi trường nuôi cấy mà nó thu được từ đó - khi nó đã được tách ra từ ít nhất một thành phần khác mà nó thường được kết hợp với trong nguồn hoặc môi trường đã nêu, như axit nucleic khác, protein/polypeptit khác, thành phần sinh học khác hoặc đại phân tử hoặc ít nhất một tạp chất, chất bẩn hoặc thành phần nhỏ. Cụ thể là, axit nucleic hoặc phân tử polypeptit được xem như là "về cơ bản là được phân lập" nếu nó đã được tinh chế ít nhất 2 lần, cụ thể là ít nhất 10 lần, cụ thể hơn là ít nhất 100 lần, và lên tới 1000 lần hoặc hơn nữa. Axit nucleic hoặc phân tử polypeptit mà "về cơ bản là ở dạng được phân lập" tốt hơn là về cơ bản là đồng nhất, như được xác định bằng cách sử dụng

dụng kỹ thuật thích hợp, như kỹ thuật sắc ký thích hợp, như phương pháp điện di trên gel polyacrylamit;

o) "Độ giống nhau về trình tự" giữa, ví dụ, hai trình tự miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thể hiện phần trăm số axit amin mà là giống nhau giữa hai trình tự này. Giá trị này có thể được tính hoặc được xác định như được mô tả trong đoạn f) ở trang 49 và 50 của WO2008/020079. "Độ tương đồng về trình tự" thể hiện phần trăm số axit amin mà là giống nhau hoặc thể hiện sự thể axit amin bảo tồn.

Tính đặc hiệu đối với đích

Các polypeptit theo sáng chế có tính đặc hiệu đối với LRP5 cũng như LRP6, ở chỗ chúng chứa các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết một cách đặc hiệu với các epitop có trong cả hai phân tử này (các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6).

Các phân tử theo sáng chế sẽ gắn kết với các dạng của người của LRP5 và LRP6, và tốt hơn là còn cả với các bản sao ở các loài khác có liên quan để phát triển thuốc, tức là LRP5 và LRP6 của khỉ cynomolgus và của chuột nhắt.

Các polypeptit theo sáng chế

Với nghĩa rộng nhất, sáng chế đề xuất các tác nhân có hoạt tính được lý mới để điều trị bệnh ung thư. Các tác nhân theo sáng chế thuộc nhóm các phân tử gắn kết mới, cụ thể là, các polypeptit biparatopic phản ứng chéo LRP5/LRP6, chứa một hoặc nhiều miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết với LRP5 và/hoặc LRP6 ở các epitop khác nhau. Các thuật ngữ "phản ứng chéo" và "biparatopic" được giải thích trên đây, qua đó các phân tử biparatopic phản ứng chéo LRP5/LRP6 có thể được định nghĩa như là các phân tử có khả năng gắn kết với LRP5 ở hai epitop khác nhau có trong protein LRP5, và cũng có thể gắn kết với LRP6 ở hai epitop tương ứng có trong protein LRP6.

Cụ thể hơn là, các polypeptit theo sáng chế bao gồm:

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất mà có khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 cũng như với LRP6 (phản ứng chéo LRP5/LRP6) thông qua epitop / theo cách thức mà dẫn đến sự ức chế của con đường truyền tín hiệu Wnt1, nhờ đó sự phiên mã gen đích được dẫn dắt bởi Wnt1 được ức chế, và
- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai mà có khả năng gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 cũng như với LRP6 (phản ứng chéo LRP5/LRP6) thông qua epitop / theo cách thức mà dẫn đến sự ức chế của con đường truyền tín hiệu Wnt3a, nhờ đó sự phiên mã gen đích được dẫn dắt bởi Wnt3a được ức chế.

Do hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch này có mặt trong polypeptit như vậy, trong đó hai miền này sẽ gắn kết với các epitop khác nhau (liên quan đến việc truyền tín hiệu Wnt1 / Wnt3a) nên các phân tử này là các phân tử gắn kết biparatopic. Cách thức gắn kết biparatopic này được thể hiện bằng biểu đồ trên Fig.1.

Trong trường hợp này, cần lưu ý là giả định rằng các polypeptit theo sáng chế có thể gắn kết với một phân tử LRP5 hoặc LRP6 duy nhất thông qua cả hai miền gắn kết LRP5/LRP6 của nó, như được thể hiện trên Fig.1 (cách thức gắn kết nội phân tử). Tuy nhiên, các cách thức gắn kết khác cũng có thể diễn ra.

Cuối cùng là, giả định rằng, các polypeptit theo sáng chế có khả năng cạnh tranh với DKK1 – phối tử tự nhiên của LRP5 và LRP6, và can thiệp vào sự truyền tín hiệu Wnt1 và Wnt3a – để gắn kết với LRP5 và LRP6, nhờ đó ức chế con đường truyền tín hiệu Wnt1 cũng như con đường truyền tín hiệu Wnt3a. Tuy nhiên, giả thuyết này không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Cụ thể hơn, các polypeptit theo sáng chế gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 hoặc LRP6, trong đó các polypeptit này bao gồm miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất (a) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (i) đến (iii) được xác định bằng việc có các trình tự CDR dưới đây:

(i):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

[= các CDR của miền Wnt1-333E06mod]

(ii):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

[= các CDR của miền Wnt1-333G06]

(iii):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYDY (= SEQ ID NO:9)

[= các CDR của miền Wnt1-332D03mod],

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai (b) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (iv) và (v) được xác định bằng việc có các trình tự CDR dưới đây:

(iv):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12)

[= các CDR của miền Wnt3a-093A01]

(v):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15)

[= các CDR của miền Wnt3a-367B10].

Việc sử dụng các thuật ngữ “thứ nhất” và “thứ hai” liên quan đến các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch này chỉ được dự tính là để chỉ ra rằng các miền này là các miền khác nhau, vì chúng sẽ là gồm các trình tự CDR khác nhau và sẽ gắn kết với các epitop khác nhau. Do đó, các thuật ngữ này sẽ không được hiểu là để chỉ thứ tự hoặc trình tự chính xác của các miền này trong chuỗi polypeptit. Nói cách khác, các miền

biến đổi đơn của globulin miễn dịch (a) và (b) nêu trên có thể được sắp xếp theo thứ tự (a) – (b) hoặc theo thứ tự (b) – (a) trong polypeptit theo sáng chế.

Thuật ngữ “gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 hoặc LRP6” được dự tính để chỉ ra rằng các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (a) và (b) là phản ứng chéo với LRP5 và LRP6. Tất nhiên là, các tính chất gắn kết này của các phân tử như vậy được xác định bằng trình tự (CDR) của chúng, do đó dấu hiệu “gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 hoặc LRP6” nêu trên và nêu trong phần yêu cầu bảo hộ chỉ được dự tính là nhằm minh họa tính hữu dụng của sáng chế, và không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thường về cơ bản là bao gồm bốn vùng khung (lần lượt từ FR1 đến FR4) và ba vùng quyết định bổ cứu (lần lượt từ CDR1 đến CDR3). Để đặt vào trong một polypeptit, hoặc một chuỗi polypeptit, các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai này cần được liên kết cộng hóa trị, một cách trực tiếp hoặc qua peptit liên kết.

Do đó, cấu trúc chung của các phân tử theo sáng chế cũng có thể được mô tả như sau:

FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 – [peptit liên kết]
- FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4

trong đó

FR(a) biểu thị vùng khung của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất,

FR(b) biểu thị vùng khung của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai,

CDR(a) biểu thị CDR của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất,

CDR(b) biểu thị CDR của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai,

[peptit liên kết] biểu thị peptit liên kết mà có thể tùy ý có mặt,

trong đó các CDR có trình tự như được nêu trên đây.

Tương tự, cần hiểu rằng (a) và (b) có thể được trao đổi cho nhau, tức là, các phân tử có cấu trúc chung

FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4 – [peptit liên kết]
 - FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4
 sẽ cũng được bao hàm bởi sáng chế.

Peptit liên kết tùy ý chứa hoặc bao gồm miền thứ ba, ví dụ như miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin, như miền Alb11, chứa các CDR dưới đây:

CDR(Alb11)1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR(Alb11)2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR(Alb11)3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18)

Điều này dẫn đến nhóm các polypeptit theo sáng chế có cấu trúc chung dưới đây:
 FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 – [peptit liên kết]
 - FR(Alb11)1 - CDR(Alb11)1 - FR(Alb11)2 - CDR(Alb11)2 - FR(Alb11)3 -
 CDR(Alb11)3 - FR(Alb11)4 - [peptit liên kết] - FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 -
 CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4.

Tương tự, thứ tự của ba miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (a), (b), và Alb11 không được cố định mà các polypeptit trong đó các miền nêu trên được sắp xếp theo thứ tự:

(b) – Alb11 – (a)

sẽ cũng được bao hàm bởi sáng chế.

Hơn nữa, các polypeptit có miền Alb11 ở đầu tận cùng N hoặc C của polypeptit (ví dụ, Alb11 – (a) – (b), Alb11 – (b) – (a), (a) – (b) – Alb11, hoặc (b) – (a) – Alb11) cũng sẽ được bao hàm bởi sáng chế.

Trong ba phương án được ưu tiên, các polypeptit theo sáng chế chứa các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch được xác định như sau:

Phương án được ưu tiên thứ nhất: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12).

Phương án được ưu tiên thứ hai: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Phương án được ưu tiên thứ ba: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

Tất nhiên là, các biến thể như được nêu trên – tức là tùy ý chứa các peptit liên kết và/hoặc các miền khác, đặc biệt là chứa miền Alb11, các thứ tự khác nhau của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch – cũng sẽ áp dụng cho ba phương án được ưu tiên này.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin được đặt giữa hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết LRP5/LRP6. Do đó, ba phương án được đặc biệt ưu tiên có thể được dự tính như sau:

Phương án được đặc biệt ưu tiên thứ nhất: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12);

theo thứ tự này, hoặc thứ tự của các miền nêu trên được thay đổi.

Phương án được đặc biệt ưu tiên thứ hai: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6);

miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15);

theo thứ tự này, hoặc thứ tự của các miền nêu trên được thay đổi.

Phương án được đặc biệt ưu tiên thứ ba: Các polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9);

miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SFGMS (= SEQ ID NO:16)

CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= SEQ ID NO:17)

CDR3: GGSLSR (= SEQ ID NO:18);

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15);

theo thứ tự này, hoặc thứ tự của các miền nêu trên được thay đổi.

Các trình tự CDR được nêu trên đây được tổng kết trong các bảng IA, IB, và IC:

BẢNG IA: Các trình tự CDR của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch can thiệp vào sự truyền tín hiệu Wnt1:

	Wnt1-333E06mod	Wnt1-333G06	Wnt1-332D03mod
--	----------------	-------------	----------------

CDR 1	TYTVG (SEQ ID NO:1)	SYAMG (SEQ ID NO:4)	RVTMG (SEQ ID NO:7)
CDR 2	AIRRRGSSTYYADS VKG (SEQ ID NO:2)	AIRRSGRRTYYADSV KG (SEQ ID NO:5)	AIVRSGGSTYYAD SVKG (SEQ ID NO:8)
CDR 3	DTRTVALLQYRYD Y (SEQ ID NO:3)	ARRVRSSTRYNTGT WWWEY (SEQ ID NO:6)	DRRGGRGENYILLY SSGRYEY (SEQ ID NO:9)

BẢNG IB: Các trình tự CDR của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch can thiệp vào sự truyền tín hiệu Wnt3a:

	Wnt3a-093A01	Wnt3a-367B10
CDR1	SYAMG (SEQ ID NO:10)	SYAMG (SEQ ID NO:13)
CDR2	AISWSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:11)	AISWRSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:14)
CDR3	SPIPYGSLRRRNNDY (SEQ ID NO:12)	DPRGYGVAYVSAYYEY (SEQ ID NO:15)

BẢNG IC: Các trình tự CDR của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn với albumin huyết thanh (miền Alb11):

	miền Alb11
CDR1	SFGMS (SEQ ID NO:16)
CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO:17)
CDR3	GGSLSR (SEQ ID NO:18)

Ngoài các trình tự CDR như nêu trên, các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch có trong các polypeptit theo sáng chế còn chứa các trình tự vùng khung (FR) globulin miễn dịch. Các trình tự này tốt hơn là không gây miễn dịch ở người, và do đó tốt hơn là các trình tự FR của người hoặc được làm giống như của người. Các trình tự FR của người hoặc được làm giống như của người thích hợp đã được biết trong lĩnh vực này. Các trình tự FR được đặc biệt ưu tiên có thể lấy từ các phương án được thể hiện

dưới đây, thể hiện các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch đầy đủ và do đó là các trình tự CDR cũng như là các trình tự FR.

Theo phương án cụ thể hơn, các polypeptit theo sáng chế chứa các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà là các miền VHH, và tốt hơn là các miền VHH được làm giống như của người.

Theo phương án cụ thể hơn, các polypeptit theo sáng chế chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất (a) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (i) đến (iii) có các trình tự dưới đây:

(i)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA
AIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DTRTVALLQYRYDYWGQGTLVTVSS

[= miền Wnt1-333E06mod = SEQ ID NO:19]

(ii)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGTLVTVSS

[= miền Wnt1-333G06; = SEQ ID NO:20], và

(iii)

AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA
AIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DRRGRGENYILLYSSGRYEWGQGTLVTVSS

[= miền Wnt1-332D03mod; = SEQ ID NO:21]

và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai (b) được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (iv) và (v) có các trình tự dưới đây:

(iv)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA

AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
SPIPYGSLLRRRN NYDYWGQGTLVTVSS

[= miền Wnt3a-093A01; = SEQ ID NO:22], và

(v)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
AISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
DPRGYGVAYVSAYYEYWGQGTLVTVSS

[= miền Wnt3a-367B10; = SEQ ID NO:23].

Các phương án được ưu tiên là các polypeptit chứa

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:19 và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:22; hoặc
- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20 và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23; hoặc
- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21 và miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23.

Do đó, các phương án nêu trên có thể được thể hiện bằng sơ đồ dưới dạng isvd(a) – [peptit liên kết] – isvd(b),

trong đó “isvd” biểu thị miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch tương ứng, và ngoài ra, trong đó các định nghĩa và các biến thể giống như vậy sẽ áp dụng như đã được nêu trên đây, đặc biệt là về sự có mặt của các peptit liên kết tùy ý và/hoặc các miền khác, đặc biệt là miền Alb11, và về các thứ tự khác nhau của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các polypeptit nêu trên có thể còn chứa gốc kéo dài thời gian bán thải, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải này được liên kết cộng hóa trị với polypeptit đã nêu và tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm gốc gắn kết

albumin, như peptit gắn kết albumin hoặc miền globulin miễn dịch gắn kết albumin, tốt hơn là miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin, tốt hơn nữa là miền Alb11, gốc gắn kết transferrin, như miền globulin miễn dịch kháng transferrin, phân tử polyetylen glycol, albumin huyết thanh, tốt hơn là albumin huyết thanh người, và mảnh của albumin huyết thanh (người).

Trình tự của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch Alb11 nêu trên là như sau:

EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSSFGMSWVRQAPGKGLEWV
 SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
GGSLSRSSQGTLVTVSS

(= miền Alb11; = SEQ ID NO:24)

Các ví dụ khác về các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết với albumin huyết thanh người đã được biết trong lĩnh vực này, và được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, các công bố đơn quốc tế số WO2006/122787 và WO2008/028977. Các peptit khác gắn kết với albumin huyết thanh người được mô tả, ví dụ, trong WO2008/068280, WO2009/127691, và WO2011/095545.

Do đó, ba phương án cụ thể được ưu tiên theo sáng chế là như sau:

Phương án cụ thể được ưu tiên thứ nhất: các polypeptit chứa

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:19;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:24;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:22;
- theo thứ tự này, hoặc thứ tự của ba miền nêu trên được thay đổi.

Phương án cụ thể được ưu tiên thứ hai: các polypeptit chứa

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:24;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23;
- theo thứ tự này, hoặc thứ tự của ba miền nêu trên được thay đổi.

Phương án cụ thể được ưu tiên thứ ba: các polypeptit chứa

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ nhất có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:24;
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (gắn kết LRP5/LRP6) thứ hai có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23;
- theo thứ tự này, hoặc thứ tự của ba miền nêu trên được thay đổi.

Theo các phương án được đặc biệt ưu tiên hơn nữa, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin được đặt giữa hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết LRP5/LRP6.

Các trình tự của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch nêu trên được tổng kết trong các bảng IIA, IIB, và IIC:

BẢNG IIA: Các trình tự của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch can thiệp vào sự truyền tín hiệu Wnt1:

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt1- 333E06 mod	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS	TYTVG	WFRQAPG KEREFVA	AIRRRGS STYYADS VKG	RFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA	DTRTV LLQYRY DY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:19							

Wnt1-333G06 SEQ ID NO:20	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFS	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AIRRSGR RTYYADS VKG	RFTISRDN SKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA	ARRVRS STRYNT GTWW WEY	WGQGT LTVSS
Wnt1-332D03 mod SEQ ID NO:21	AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGLTFS	RYTMG	WFRQAPG KEREFVA	AIVRSGG STYYADS VKG	RFTISRDN SKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA	DRRGR GENYILL YSSGRY EY	WGQGT LTVSS

BẢNG IIB: Các trình tự của các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch can thiệp vào sự truyền tín hiệu Wnt3a:

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Wnt3a-093A01 SEQ ID NO:22	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AISWSGG STYYADS VKG	RFTISRDN SKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA	SPIPYGS LLRRRN NYDY	WGQGT LTVSS
Wnt3a-367B10 SEQ ID NO:23	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFS	SYAMG	WFRQAPG KEREFVA	AISWRSG STYYADS VKG	RFTISRDN SKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA	DPRGY GVAYVS AYY EY	WGQGT LTVSS

BẢNG IIC: Trình tự của miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn với albumin huyết thanh (miền Alb11):

VHH ID SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Alb11 SEQ ID NO:24	EVQLVESG GGLVQPG NSLRLSCA ASGFTFS	SFGMS	WVRQAPG KGLEWVS	SISGSGSD TLYADSV KG	RFTISRDN AKTTLYL QMNSLRPEDTAVYY CTI	GGSLSR	SSQGT LTVSS

Như được nêu trên đây, các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ít nhất hai miền) có trong polypeptit theo sáng chế có thể được liên kết với nhau một cách trực tiếp, mà không sử dụng tác nhân liên kết, hoặc thông qua tác nhân liên kết. Tác nhân liên kết này tốt hơn là peptit liên kết và sẽ, theo sáng chế, được chọn lọc sao cho cho phép sự gắn kết của ít nhất hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch khác nhau với mỗi epitop trong số các epitop đích của chúng.

Các nhóm liên kết thích hợp sẽ phụ thuộc vào, trong số những cái khác, các epitop và, cụ thể là, khoảng cách giữa các epitop trên các phân tử đích mà các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch sẽ gắn kết. Điều này sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào phần bộc lộ ở đây, tùy ý mức độ hạn chế nhất định của thử nghiệm thông thường.

Do đó, các tác nhân liên kết thích hợp có thể gồm trình tự axit amin, ví dụ, có độ dài 9 axit amin hoặc nhiều hơn, tốt hơn là ít nhất là 17 axit amin, như khoảng 20 đến 40 axit amin. Trình tự liên kết có thể là trình tự có trong tự nhiên hoặc trình tự không có trong tự nhiên. Nếu được sử dụng nhằm mục đích chữa bệnh, tác nhân liên kết tốt hơn là không gây miễn dịch ở đối tượng mà sẽ dùng polypeptit theo sáng chế.

Một nhóm trình tự tác nhân liên kết hữu dụng là các tác nhân liên kết thu được từ vùng bản lề của các kháng thể chuỗi nặng như được mô tả trong WO1996/34103 và WO1994/04678. Các ví dụ khác là các trình tự tác nhân liên kết poly-alanin như Ala-Ala-Ala.

Các ví dụ được ưu tiên khác về các trình tự tác nhân liên kết này là các tác nhân liên kết Gly/Ser có độ dài khác nhau như các tác nhân liên kết $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$, gồm, ví dụ, $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_5$, $(\text{gly}_4\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser})_3$, $(\text{gly}_3\text{ser})_5$, $(\text{gly}_3\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_5$, và $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_7$.

Các khác, hoặc ngoài tác nhân liên kết polypeptit, ít nhất hai miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch có mặt trong polypeptit theo sáng chế có thể được liên kết với nhau thông qua gốc khác, như polypeptit khác mà, theo phương án được ưu tiên nhưng không giới hạn, có thể là miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch khác như đã được mô tả trên đây. Gốc này có thể về cơ bản là vô hoạt hoặc có thể có tác dụng sinh học như cải thiện các tính chất mong muốn của polypeptit hoặc có thể truyền một hoặc nhiều tính chất mong muốn bổ sung cho polypeptit. Như đã được nêu trên đây, miền polypeptit bổ sung được ưu tiên sẽ gia tăng thời gian bán thải của polypeptit, như miền gắn kết albumin huyết tương (người), như miền Alb11.

Do đó, theo phương án khác, sáng chế đặc biệt gồm các polypeptit chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự sau, trong đó các trình tự axit amin chính xác có thể lấy từ bảng III dưới đây:

SEQ ID NO:25 (= trình tự polypeptit F013500575),

SEQ ID NO:26 (= trình tự polypeptit F013500571),

và

SEQ ID NO:27 (= trình tự polypeptit F013500720).

Theo phương án cụ thể hơn nữa, các polypeptit theo sáng chế được chọn từ nhóm các phân tử dưới đây:

Polypeptit F013500575, có trình tự SEQ ID NO:25,

Polypeptit F013500571, có trình tự SEQ ID NO:26, và

Polypeptit F013500720, có trình tự SEQ ID NO:27.

Bảng III: Các trình tự của ba phương án cụ thể về các polypeptit theo sáng chế

ID SEQ ID NO:	Trình tự axit amin (các trình tự CDR được gạch chân)
F013500575 SEQ ID NO:25	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF <u>STYTVGW</u> FRQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYYA <u>DSVKGR</u> FTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTV SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLLRRRN NYDYWGQGLTVTVSSA
F013500571 SEQ ID NO:26	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYW GQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAP GKEREFVAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRG YGVAYVSAYEYWGQGLTVTVSSA

F013500720	<u>AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKERE</u> <u>FVAAIVRSGGSTYY</u> <u>ADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYILLYSSGRYEYWGQ</u>
SEQ ID NO:27	GTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GNSLRLSCAASGFTFS <u>SFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTL</u> <u>YADSVKGRFTISR</u> <u>DNA</u> KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT <u>IGGSLRSSQ</u> <u>TLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u> GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYAMGWFRQAPGK</u> ERE <u>FVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRGYG</u> <u>VAYVSAYEYWGQTLTVSSA</u>

Như được giải thích trên đây, trừ khi được nêu rõ theo cách khác, các polypeptit theo sáng chế có thể chứa các gốc khác và/hoặc các miền polypeptit bổ sung, miễn là sự gắn kết của chúng với LRP5/LRP6 sẽ không bị ngăn chặn bởi gốc hoặc miền bổ sung này.

Các polypeptit theo sáng chế có thể tùy ý chứa các dạng cải biến như các gốc glycosyl hoặc các chuỗi bên axit amin được cải biến, và chúng có thể được PEGyl hóa để gia tăng thời gian bán thải và các tính chất khác của phân tử này. Các kỹ thuật và các chất phản ứng hữu dụng cho các cấu trúc miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch biparatopic PEGyl hóa có thể được lấy từ WO2011/107507.

Các polypeptit theo sáng chế có thể có trình tự đầu tận cùng N được cải biến, ví dụ, xóa bỏ một hoặc nhiều axit amin đầu tận cùng N, hoặc thay thế, ví dụ, axit amin đầu tiên ở đầu tận cùng N (ví dụ glutamat thành alanin), để tối ưu hóa phân tử để được biểu hiện bằng cách sử dụng các hệ biểu hiện nhất định (như các vectơ hoặc các tế bào chủ cụ thể), hoặc để được biểu hiện dưới dạng các thể vùi hoặc dưới dạng hòa tan, hoặc để được tiết vào môi trường hoặc không gian tế bào chất hoặc để được chứa trong tế bào, hoặc để tạo ra sản phẩm đồng nhất hơn. Các polypeptit theo sáng chế có thể có trình tự đầu tận cùng C được cải biến, như alanin bổ sung (như được thể hiện cho ba phương án được thể hiện trong bảng III trên đây), và/hoặc các trao đổi axit amin khác ở phần đầu tận cùng C hoặc ở các vị trí được xác định khác trong vùng bất kỳ trong số các vùng khung, như được giải thích, ví dụ, trong WO2012/175741, WO2011/075861, hoặc WO2013/024059, để, ví dụ, tăng cường hơn nữa độ ổn định hoặc giảm tính gây miễn dịch của các polypeptit này.

Hơn nữa, thời gian bán thải của các polypeptit theo sáng chế có thể được tăng cường bằng cách bổ sung miễn albumin, tức là bằng cách chuyển hóa chúng thành các protein dung hợp albumin. Các ví dụ về các gốc albumin hữu dụng, và cách bổ sung chúng vào các phân tử gắn kết, được cung cấp, ví dụ, trong WO2001/079271 và WO2003/059934.

Tốt hơn là, các polypeptit theo sáng chế có các giá trị gắn kết (EC_{50}), đo được trong thử nghiệm gắn kết FACS như được mô tả trong ví dụ 7.1 dưới đây, là trong khoảng từ 10^{-6} mol/lít hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10^{-9} mol/lít hoặc nhỏ hơn, và thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10^{-10} đến 10^{-13} mol/lít, hoặc có giá trị IC_{50} như đo được trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp được nêu trong ví dụ 7.3 dưới đây, là 10^{-9} mol/lít hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn là trong khoảng từ 5×10^{-10} mol/lít đến 10^{-12} mol/lít.

Các polypeptit theo sáng chế cho phép điều trị hiệu quả hơn một số loại bệnh ung thư, như TNBC, CRC, và NSCLC. Chúng có các đặc tính *in vitro* được cải thiện (tức là, hiệu quả ức chế con đường Wnt cao hơn), xem, ví dụ, các ví dụ 7 và 8 dưới đây, và các tính chất ức chế sự phát triển khối u *in vivo* đáng kể, dẫn đến hiệu quả *in vivo* cao hơn so với các phân tử gắn kết LRP6 khác được mô tả trong lĩnh vực này, như được thể hiện, ví dụ trong các ví dụ 9 và 10 dưới đây.

Cụ thể là, như được thể hiện *in vivo* trong mô hình khối u được dẫn dắt bởi Wnt, các cấu trúc VHH được làm giống như của người biparatopic kéo dài thời gian bán thải phản ứng chéo LRP5/LRP6 có thể ức chế sự truyền tín hiệu Wnt và sự phát triển khối u *in vivo*, và thậm chí được đề xuất để làm co ngót khối u đáng kể (tức là, ức chế sự phát triển khối u cao hơn 100%), tác dụng này không thể đạt được trong thử nghiệm tương tự với chất gắn kết LRP6 đã biết trong lĩnh vực này. Tất nhiên là sự co ngót khối u (tức là sự thoái triển khối u) là tác dụng trị liệu mong muốn (tức là hiệu quả) đối với việc điều trị cho các bệnh nhân ung thư. Hơn nữa, sự thoái triển khối u, dẫn đến đáp ứng hoàn toàn về bệnh lý (pathological complete response - pCR), là điểm nút lâm sàng được thừa

nhận, thể hiện sự cải thiện đáng kể của sự sống không có sự tiến triển của bệnh hoặc sự sống nói chung.

Trong các thử nghiệm *in vivo* tương tự, sự thay đổi khối lượng cơ thể đáng kể không được thấy (< 10%), và kết quả từ các phân tích mô bệnh học dạ dày ruột không chỉ ra tác động độc hại bất kỳ của các polypeptit nêu trên theo sáng chế. Điều này là đặc biệt đáng ngạc nhiên xét trên các nghiên cứu biểu hiện DKK1 *in vivo* được bàn luận trên đây (tức là dẫn đến sự loét niêm mạc ruột và sự giảm khối lượng cơ thể).

Do đó, các polypeptit theo sáng chế thực tế đang cung cấp các lựa chọn trị liệu mới để điều trị các bệnh ung thư, và thậm chí đặc biệt là để sử dụng trong các chỉ định nhu cầu chữa trị không đáp ứng cao như bệnh ung thư vú (âm tính ba).

Ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã đi đến được giải pháp này không bằng cách đi theo con đường thông thường, tức là cố gắng phát triển các chất ức chế hoặc các phân tử gắn kết có độ đặc hiệu/độ chọn lọc cao đối với một đích được đưa ra, như LRP6 (được nêu như là đích để điều trị “các bệnh qua trung gian sự truyền tín hiệu Wnt” ví dụ, trong WO2009/056634). Ngược lại, các tác giả sáng chế đã phát triển các phân tử hướng đích hai protein liên quan đồng thời – LRP6 và LRP5 – và nhờ đó đạt được các tác dụng *in vitro* và *in vivo* được cải thiện đáng kể như trên, các tác dụng này không thể mong đợi được từ lĩnh vực này.

Cơ chế phân tử cơ sở cho tính ưu việt này không hoàn toàn rõ ràng, nhưng nó có thể được suy xét – không mong muốn bị bó buộc ở giả thuyết cụ thể – rằng các phân tử phản ứng chéo này có thể có các tác dụng bổ sung, và do đó mạnh hơn đối với các tầng truyền tín hiệu có tính phức tạp cao của con đường truyền tín hiệu Wnt.

Các tác dụng thuận lợi trên đây sẽ được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ dưới đây và bằng các dữ liệu so sánh có trong đó.

Hơn nữa, các polypeptit theo sáng chế là dễ dàng để sản xuất và dễ hòa tan hơn, điều này có nghĩa là chúng có thể được bảo quản và/hoặc dùng với nồng độ cao hơn so

với các kháng thể thông thường. Chúng cũng ổn định ở nhiệt độ trong phòng và có độ ổn định kéo dài thậm chí ở độ pH rất cao, do đó chúng có thể được điều chế, bảo quản và/hoặc vận chuyển mà không cần sử dụng các thiết bị làm lạnh, tiết kiệm chi phí vận chuyển, thời gian và bảo vệ môi trường. Do các lợi ích trên và do tính gây miễn dịch thấp của chúng, chúng còn cung cấp nhiều lựa chọn về đường dùng ngoài đường tiêm và truyền, cũng như về các chế độ dùng và về việc sử dụng các dụng cụ cụ thể.

Axit nucleic, vectơ, tế bào chủ

Theo các khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến các phân tử axit nucleic và các vectơ biểu hiện mã hóa các polypeptit theo sáng chế, cũng như các tế bào chủ biểu hiện chúng. Các axit nucleic, vectơ và tế bào chủ này là hữu dụng để sản xuất các polypeptit theo sáng chế, và các khía cạnh khác và các phương án khác của chúng sẽ được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các nét chính về các phương pháp sản xuất các polypeptit theo sáng chế.

Ứng dụng trị liệu

Do các tính chất sinh học của chúng, các polypeptit theo sáng chế là thích hợp để điều trị các bệnh được đặc trưng bằng sự tăng sinh tế bào quá mức hoặc bất thường, như bệnh ung thư và xơ hóa phổi tự phát (idiopathic pulmonary fibrosis - IPF).

Ví dụ, các bệnh ung thư, các khối u, và các bệnh tăng sinh khác dưới đây có thể được điều trị bằng các polypeptit theo sáng chế, nhưng không chỉ giới hạn ở đó:

Các bệnh ung thư đầu và cổ; Các bệnh ung thư phổi, ví dụ như bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC) và bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ (small cell lung cancer - SCLC); Các bệnh ung thư trung thất, ví dụ như các khối u thần kinh và các khối u trung mô; Các bệnh ung thư đường tiêu hóa (gastrointestinal - GI), ví dụ như các bệnh ung thư thực quản, dạ dày (ung thư dạ dày), tuyến tụy, gan và đường mật (gồm, ví dụ, caxinom tế bào gan (hepatocellular carcinoma - HCC)), và ruột non và ruột già (gồm, ví dụ, bệnh ung thư đại trực tràng); Các bệnh ung

thư tuyến tiền liệt; Các bệnh ung thư tinh hoàn; Các bệnh ung thư vùng phụ, ví dụ như các bệnh ung thư buồng trứng; Các bệnh ung thư vú, ví dụ như caxinom vú, ung thư vú dương tính với thụ thể hormon, ung thư vú dương tính với Her2, và ung thư vú âm tính ba; Các bệnh ung thư hệ nội tiết; Sacom mô mềm, ví dụ như sacom xơ, sacom cơ vân, sacom mạch, sacom Kaposi; Các bệnh sacom ở xương, ví dụ như u tủy, sacom xương, khối u Ewing, sacom xơ, u xương sụn, u nguyên bào xương, và u nguyên bào sụn; Các bệnh u trung biểu mô; Các bệnh ung thư da, ví dụ như caxinom tế bào đáy, caxinom tế bào vảy, caxinom tế bào Merkel, và u hắc tố; Các khối u tân tạo của hệ thần kinh trung ương và não, ví dụ như u tế bào hình sao, u nguyên bào đệm, u nguyên bào thần kinh đệm, và u nguyên bào võng mạc; Các u lympho và bệnh bạch huyết ví dụ như u lympho không Hodgkin tế bào B (non-Hodgkin lymphomas -NHL), u lympho không Hodgkin tế bào T, bệnh bạch cầu lympho bào tế bào B mạn tính (chronic B-cell lymphocytic leukemia - B-CLL), bệnh bạch cầu lympho bào tế bào T mạn tính (chronic T-cell lymphocytic leukemia - T-CLL), bệnh Hodgkin (Hodgkin's disease - HD), bệnh bạch cầu lympho bào hạt lớn (large granular lymphocyte leukemia - LGL), bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh bạch cầu tủy bào/sinh tủy cấp (acute myelogenous/myeloid leukemia - AML), bệnh bạch cầu lympho bào cấp (acute lymphatic/lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh đa u tủy (multiple myeloma - MM), u tương bào, và các hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndromes - MDS); và các bệnh ung thư ở vị trí tiên phát không biết.

Tất cả các bệnh ung thư, các khối u, các khối u tân tạo, v.v., được nêu trên đây mà được đặc trưng bằng vị trí/nguồn gốc cụ thể của chúng trong cơ thể đều có nghĩa là gồm cả các khối u tiên phát và các khối u di căn bắt nguồn từ đó.

Cụ thể hơn là, các polypeptit theo sáng chế là hữu dụng để điều trị các bệnh, và đặc biệt là các bệnh ung thư trong đó sự tăng sinh tế bào bất thường bị gây ra bởi, hoặc có liên quan đến sự truyền tín hiệu Wnt (được hoạt hóa) bất thường.

Do đó, các polypeptit theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để điều trị các khối u rắn, và cụ thể hơn là để điều trị các bệnh ung thư phổi, gan, ruột kết, não, tuyến giáp, tuyến tiền liệt, vú, buồng trứng, và tuyến tiền liệt, và thậm chí cụ thể hơn là để điều trị bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh ung thư vú âm tính ba (TNBC), và bệnh ung thư đại trực tràng (CRC). Cụ thể là, các polypeptit theo sáng chế có thể

được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân bị TNBC tăng cường cục bộ hoặc di căn, các bệnh nhân bị NSCLC di căn hoặc bị CRC tăng cường cục bộ hoặc di căn, dưới dạng tác nhân đơn hoặc dưới dạng kết hợp, để kéo dài sự sống không có tiến triển bệnh (progression free survival - PFS) và sự sống nói chung (overall survival - OS). Hơn nữa, các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng làm tác nhân điều trị tân hỗ trợ cho các bệnh nhân bị ung thư vú để đạt được đáp ứng hoàn toàn về bệnh lý (pCR; được xác định là không có sự xâm lấn sót lại và không có sự ung thư *in situ* bằng đánh giá mô bệnh học đối với mẫu vú được cắt hoàn toàn và tất cả các hạch bạch huyết vùng được lấy mẫu sau khi hoàn thành liệu pháp tân bổ trợ toàn thân).

Các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng trong các chế độ trị liệu trong trường hợp điều trị dòng thứ nhất, dòng thứ hai, hoặc dòng bất kỳ khác.

Các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngừa, điều trị trong thời gian ngắn hoặc thời gian dài các bệnh nêu trên, tùy ý còn kết hợp với liệu pháp xạ trị và/hoặc phẫu thuật.

Tương tự, các polypeptit theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để điều trị các bệnh khác gây ra bởi sự tăng sinh tế bào bất thường liên quan đến con đường truyền tín hiệu Wnt, như xơ hóa phổi tự phát (IPF) (Königshoff *et al.* “Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis”. *PLoS One* 2008;3(5):e2142; Lam *et al.* “Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis”. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(2):185-95).

Hơn nữa, các polypeptit theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để điều trị các bệnh võng mạc, và đặc biệt là để điều trị bệnh võng mạc do tiểu đường, do sự hoạt hóa Wnt bất thường ở các tế bào võng mạc bên trong, gây ra sự tăng sự tạo thành mạch máu võng mạc mới bất thường dẫn đến sự phát triển và sự tiến triển của bệnh võng mạc do tiểu đường (Chen, Y., *et al.* “Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models” *The Am J Pathol.* 2009; 175(6):2676-85., Gao *et al.* “Elevated LRP6 levels correlate with vascular endothelial growth factor in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy” *Mol Vis.* 2015;21:665-72).

Cuối cùng là, vì có thể thấy rằng sự ức chế các con đường truyền tín hiệu Wnt1/Wnt3a có thể còn có tác dụng đối với các tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) và chức năng của tế bào đuôi gai, nên các polypeptit theo sáng chế có thể còn hữu dụng để điều trị các bệnh miễn dịch và nhiễm trùng, cũng như để tác động lên vi môi trường khối u trong các bệnh ung thư khác nhau đã nêu trên đây. Các khối u tích cực ngăn chặn tính miễn dịch chống khối u, và các DC đóng vai trò quan trọng trong cơ chế trốn thoát miễn dịch của bệnh ung thư. Cụ thể, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các phối tử Wnt trong vi môi trường khối u có thể còn khởi động sự truyền tín hiệu cận tiết trong các tế bào miễn dịch và điều hòa tính miễn dịch chống khối u của vật chủ (Hong *et al.* “beta-catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells”. *Cancer Res.* 2015;75(4):656-65).

Tất nhiên, phần trên còn gồm việc sử dụng các polypeptit theo sáng chế trong các phương pháp khác nhau điều trị các bệnh trên bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị dùng liệu có tác dụng chữa bệnh, cũng như việc sử dụng các polypeptit này để sản xuất các thuốc để điều trị các bệnh này, cũng như các dược phẩm chứa các polypeptit theo sáng chế, cũng như việc điều chế và/hoặc sản xuất các thuốc chứa các polypeptit theo sáng chế, và các đối tượng tương tự.

Các kết hợp với các hoạt chất khác

Các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất có hoạt tính dược lý khác, như các hợp chất chuẩn chăm sóc hoặc được nêu trong lĩnh vực này, ví dụ như các chất kìm tế bào hoặc gây độc tế bào, các chất ức chế tăng sinh tế bào, các chất chống tạo mạch, các steroid, các chất điều biến miễn dịch / chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch, và các chất tương tự.

Các hoạt chất kìm tế bào và/hoặc gây độc tế bào mà có thể được dùng kết hợp với các hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hormon, các chất tương tự hormon và các chất chống hormon, các chất ức chế aromataza, các chất chủ vận và các chất đối kháng LHRH, các chất ức chế yếu tố sinh trưởng (các yếu tố sinh trưởng như, ví dụ, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (platelet derived

growth factor - PDGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (fibroblast growth factor - FGF), yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor - VEGF), yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor - EGF), yếu tố sinh trưởng giống insulin (insuline-like growth factor - IGF), yếu tố sinh trưởng biểu bì người (human epidermal growth factor - HER, ví dụ, HER2, HER3, HER4) và yếu tố sinh trưởng tế bào gan (hepatocyte growth factor - HGF)), các chất ức chế ví dụ là các kháng thể yếu tố (chống) sinh trưởng, các kháng thể thụ thể yếu tố (chống) sinh trưởng và các chất ức chế tyrosin kinaza, ví dụ như cetuximab, gefitinib, afatinib, nintedanib, imatinib, lapatinib, bosutinib và trastuzumab; các chất chống chuyển hóa (ví dụ antifolates như methotrexate, raltitrexed, các chất tương tự pyrimidin như 5-fluorouracil (5-FU), capecitabin và gemcitabin, các chất tương tự purin và adenosin như mercaptopurin, thioguanin, cladribin và pentostatin, cytarabin (ara C), fludarabin); các chất kháng sinh chống khối u (ví dụ, các anthracyclin); các dẫn xuất platin (ví dụ, cisplatin, oxaliplatin, carboplatin); các chất alkyl hóa (ví dụ, estramustin, meclorethamin, melphalan, chlorambucil, busulphan, dacarbazin, cyclophosphamid, ifosfamid, temozolomid, các nitrosoure ví dụ như carmustin và lomustin, thiotepa); các chất chống gián phân (ví dụ, Vinca alkaloid như vinblastin, vindesin, vinorelbin và vincristin; và taxan như paclitaxel, docetaxel); các chất ức chế tạo mạch, các chất ức chế tubulin; các chất ức chế tổng hợp ADN, các chất ức chế PARP, các chất ức chế topoisomeraza (ví dụ các epipodophyllotoxin như etoposid và etopophos, teniposid, amsacrin, topotecan, irinotecan, mitoxantron), các chất ức chế serin/threonin kinaza (ví dụ, các chất ức chế PDK1, các chất ức chế Raf, các chất ức chế A-Raf, các chất ức chế B-Raf, các chất ức chế C-Raf, các chất ức chế mTOR, các chất ức chế mTORC1/2, các chất ức chế PI3K, các chất ức chế PI3K α , các chất ức chế mTOR/PI3K kép, các chất ức chế STK33, các chất ức chế AKT, các chất ức chế PLK1 (như volasertib), các chất ức chế CDK, các chất ức chế Aurora kinaza), các chất ức chế tyrosin kinaza (ví dụ, các chất ức chế PTK2/FAK), các chất ức chế tương tác protein protein, các chất ức chế MEK, các chất ức chế ERK, các chất ức chế FLT3, các chất ức chế BRD4, các chất ức chế IGF-1R, các chất chủ vận TRAILR2, các chất ức chế Bcl-xL, các chất ức chế Bcl-2, các chất ức chế Bcl-2/Bcl-xL, các chất ức chế thụ thể ErbB, các chất ức chế BCR-ABL, các chất ức chế ABL, các chất ức chế Src, các chất tương tự rapamycin (ví dụ, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, sirolimus), các chất

ức chế tổng hợp androgen, các chất ức chế thụ thể androgen, các chất ức chế DNMT, các chất ức chế HDAC, các chất ức chế ANG1/2, các chất ức chế CYP17, các dược chất phóng xạ, các tác nhân miễn dịch trị liệu như các chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch (ví dụ các phân tử/các globulin miễn dịch gắn kết CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3, và TIM3, như ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab), các vaccin ung thư như vaccin khối u truyền thống (vaccin trên cơ sở tế bào, ví dụ Sipuleucel-T để điều trị ung thư tuyến tiền liệt), các vaccin kháng nguyên mới được làm tương thích với người, và các virus hủy u, và các tác nhân hóa trị liệu khác nhau như amifostin, anagrelid, clodronat, filgrastin, interferon, interferon alpha, leucovorin, rituximab, procarbazine, levamisole, mesna, mitotan, pamidronat và porfimer.

Đặc biệt được ưu tiên là các phương pháp điều trị bao gồm việc sử dụng các polypeptit theo sáng chế kết hợp với thuốc được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) các kháng thể kháng VEGF (bevacizumab và các chất chống tạo mạch khác) cùng hoặc không cùng với kết hợp hóa trị (gồm kết hợp doxorubicin / cyclophosphamid và/hoặc kết hợp capecitabin / docetaxel trong bộ tân hỗ trợ điều trị; chế độ taxan / platin đối với việc điều trị dòng thứ nhất và dòng muộn) ở các bệnh nhân ung thư vú;
- (ii) EGFR TKIs đối với NSCLC đột biến EGFR hoặc crizotinib đối với NSCLC hoán vị ALK cùng hoặc không cùng với sự kết hợp hóa trị liệu (liệu pháp kết hợp gây độc tế bào trên cơ sở platin, gồm gemcitabin / cisplatin trong điều trị dòng thứ nhất; docetaxel hoặc pemetrexed trong điều trị dòng thứ hai ở các bệnh nhân ung thư phổi;
- (iii) các kháng thể kháng EGFR (cetuximab và panitumumab ở các khối u kiểu đại *KRAS*) cùng hoặc không cùng với sự kết hợp hóa trị liệu (gồm irinotecan), sự kết hợp kháng thể kháng VEGF (bevacizumab và các chất chống tạo mạch khác) hoặc sự kết hợp regorafenib, ví dụ, để điều trị các bệnh nhân CRC;
- (iv) các tác nhân trị liệu miễn dịch, gồm các tác nhân kháng PD-1, như pembrolizumab và nivolumab, các tác nhân kháng PD-L1, các tác nhân kháng CTLA4, các tác nhân kháng BTLA, các tác nhân kháng LAG3, và các tác nhân kháng TIM3, như các kháng thể kháng PDL1 v.v., ví dụ, để điều trị bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi và các bệnh nhân CRC;
- (v) các tác nhân hóa trị liệu, như các tác nhân chống ung thư trên cơ sở platin, hoặc kết hợp với chế độ hóa trị liệu FOLFOX, gồm axit folinic, 5'-fluorouracil, và oxaliplatin,

hoặc kết hợp với chế độ hóa trị liệu FOLFOXIRI, gồm axit folinic, 5'-fluorouracil, oxaliplatin, và irinotecan, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư vú hoặc các bệnh nhân CRC.

Khi hai hoặc nhiều chất hoặc nguyên tắc được sử dụng là một phần của chế độ điều trị kết hợp, chúng có thể được dùng thông qua cùng một đường dùng hoặc qua các đường dùng khác nhau, ở thời điểm về cơ bản giống nhau (tức là đồng thời, cùng lúc) hoặc ở các thời điểm khác nhau (ví dụ, liên tục, lần lượt, liên tiếp, luân phiên, hoặc theo dạng khác của chế độ thay đổi).

Khi các chất hoặc các nguyên tắc được dùng một cách đồng thời thông qua cùng đường dùng, chúng có thể được dùng ở các dạng bào chế được phẩm khác nhau hoặc các chế phẩm khác nhau hoặc dưới dạng một phần của dạng bào chế hoặc được phẩm kết hợp. Tương tự, khi hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc nguyên tắc được sử dụng là một phần của chế độ điều trị kết hợp, mỗi chất hoặc nguyên tắc có thể được dùng với cùng lượng và theo cùng chế độ như được sử dụng khi chính hợp chất hoặc nguyên tắc được sử dụng, và sự sử dụng kết hợp như vậy có thể hoặc không thể dẫn đến tác dụng hiệp đồng. Tuy nhiên, khi sự sử dụng kết hợp của hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc nguyên tắc dẫn đến hiệu quả hiệp đồng, nó cũng có thể làm giảm lượng của một, nhiều hoặc tất cả các chất hoặc nguyên tắc được sử dụng, trong khi vẫn đạt được tác dụng điều trị mong muốn. Điều này có thể, ví dụ, hữu dụng để tránh, hạn chế hoặc làm giảm bất kỳ tác dụng phụ không mong muốn nào mà liên quan đến việc dùng một hoặc nhiều chất hoặc nguyên tắc khi chúng được sử dụng với lượng thông thường của chúng, trong khi vẫn đạt được hiệu quả dược lý hoặc điều trị mong muốn.

Tất nhiên là, phần nêu trên còn bao gồm dạng bào chế, và các phương pháp bào chế, các polypeptit theo sáng chế để sử dụng kết hợp với các đối tác kết hợp nêu trên. Cũng bao gồm là dạng bào chế, và các phương pháp bào chế, các đối tác kết hợp nêu trên để sử dụng kết hợp với các polypeptit theo sáng chế. Do đó, sáng chế, ví dụ, đề xuất các phương pháp sử dụng, hoặc bào chế để sử dụng, chất điều biến miễn dịch / chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch, như kháng thể kháng PD1, như pembrolizumab hoặc nivolumab, để dùng kết hợp với polypeptit theo sáng chế, và cụ thể hơn là để dùng trong chế độ liệu pháp kết hợp với polypeptit theo sáng chế.

Hơn nữa, sáng chế còn bao gồm các kit chứa ít nhất một polypeptit theo sáng chế và một hoặc nhiều thành phần khác được chọn từ nhóm bao gồm các thuốc khác được sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn như được nêu trên đây, và các dụng cụ như được nêu dưới đây.

Dược phẩm, phương pháp dùng, và liều lượng

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các phương pháp điều trị bệnh trên đây bao gồm việc bào chế thuốc để điều trị bệnh này. Do đó, sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm để điều trị các bệnh được nêu trên đây, trong đó các dược phẩm này gồm ít nhất một polypeptit theo sáng chế.

Các polypeptit theo sáng chế và/hoặc các dược phẩm chứa chúng có thể được dùng cho bệnh nhân cần điều trị theo cách thức thích hợp bất kỳ, tùy thuộc vào dạng bào chế hoặc dược phẩm cụ thể được sử dụng. Do đó, các polypeptit theo sáng chế và/hoặc các dược phẩm chứa chúng có thể, ví dụ, được dùng trong tĩnh mạch (i.v.), dưới da (s.c.), trong cơ (i.m.), trong phúc mạc (i.p.), qua da, qua đường miệng, dưới lưỡi (ví dụ, dưới dạng viên nén dưới lưỡi, thuốc phun hoặc nhỏ giọt được đặt dưới lưỡi và được hấp thụ thông qua màng nhầy vào mạng mao mạch dưới lưỡi), (trong) mũi (ví dụ dưới dạng thuốc phun vào mũi và/hoặc dưới dạng khí dung), tại chỗ, bằng cách dùng thuốc đạn, bằng cách hít, hoặc cách thức thích hợp bất kỳ khác với lượng hoặc liều hữu hiệu.

Các polypeptit theo sáng chế và/hoặc các dược phẩm chứa chúng được dùng theo chế độ điều trị mà thích hợp để điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cần được điều trị hoặc làm thuyên giảm. Bác sỹ điều trị nói chung sẽ có thể xác định chế độ điều trị thích hợp, tùy thuộc vào các yếu tố như bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cần được điều trị hoặc làm thuyên giảm, độ nặng của bệnh, độ nặng của các triệu chứng bệnh, polypeptit cụ thể theo sáng chế được sử dụng, đường dùng cụ thể và dạng bào chế hoặc dược phẩm được sử dụng, tuổi tác, giới tính, khối lượng, chế độ ăn uống, tình trạng chung của bệnh nhân, và các yếu tố tương tự đã biết đối với bác sỹ điều trị. Nói chung, chế độ điều trị sẽ gồm việc dùng một hoặc nhiều

polypeptit theo sáng chế, dùng một hoặc nhiều dược phẩm chứa chúng, với các lượng hoặc liều hữu hiệu trong điều trị.

Nói chung, để điều trị và/hoặc làm thuyên giảm các bệnh, các rối loạn và các tình trạng bệnh lý được nêu ở đây và tùy thuộc vào bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể được điều trị, hiệu lực của polypeptit đặc hiệu theo sáng chế được sử dụng, đường dùng cụ thể và dạng bào chế hoặc dược phẩm cụ thể được sử dụng, các polypeptit theo sáng chế sẽ thường được dùng với lượng từ 0,005 đến 20,0 mg trên một kilogram thể trọng và liều lượng tốt hơn là từ 0,05 đến 10,0 mg/kg/liều, và tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 10 mg/kg/liều, liên tục (ví dụ, bằng cách truyền) hoặc tốt hơn nữa là dưới dạng các liều đơn (ví dụ như các liều dùng hai lần mỗi tuần, hàng tuần, hoặc hàng tháng; xem dưới đây), nhưng có thể thay đổi đáng kể, đặc biệt là tùy thuộc vào các thông số nêu trên. Do đó, trong một số trường hợp, có thể là đầy đủ khi sử dụng lượng ít hơn lượng tối thiểu nêu trên, trong khi ở những trường hợp khác, cần phải vượt trên giới hạn trên. Khi được dùng với lượng lớn nên chia chúng thành nhiều liều nhỏ để dùng trong ngày.

Tùy thuộc vào polypeptit cụ thể theo sáng chế và dược động học cụ thể của nó và các tính chất khác, nó có thể được dùng hàng ngày, mỗi ngày thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm hoặc thứ sáu, hàng tuần, hàng tháng, v.v.. Chế độ dùng có thể gồm việc điều trị hàng tuần, dài hạn. Thuật ngữ "dài hạn" ở đây có nghĩa là ít nhất hai tuần và tốt hơn là khoảng thời gian hàng tháng, hoặc hàng năm.

Hiệu quả của các polypeptit theo sáng chế, và các chế phẩm chứa chúng, có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro* thích hợp bất kỳ, thử nghiệm trên cơ sở tế bào, thử nghiệm *in vivo* và/hoặc mô hình động vật thực chất đã biết, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, tùy thuộc vào bệnh cụ thể có liên quan. Các thử nghiệm và các mô hình động vật thích hợp sẽ trở nên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, và ví dụ bao gồm các thử nghiệm và các mô hình động vật được sử dụng trong các ví dụ dưới đây.

Tốt hơn là, các polypeptit theo sáng chế có các đặc tính tốt hơn so với các kháng thể thông thường đã biết trong lĩnh vực này (như các chất gắn kết LRP6 được mô tả trong phần "Tình trạng kỹ thuật của sáng chế" nêu trên) trong ít nhất một trong số các

thử nghiệm hoặc các mô hình này, và tốt hơn là trong một hoặc nhiều trong số các mô hình *in vivo*.

Các chế phẩm

Đối với ứng dụng trong dược phẩm, các polypeptit theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng dạng bào chế dược chứa (i) ít nhất một polypeptit theo sáng chế và (ii) ít nhất một chất mang, chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất làm ổn định dược dụng, và (iii) tùy ý một hoặc nhiều polypeptit và/hoặc hợp chất có hoạt tính dược lý khác. Thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là vật chất tương ứng không thể hiện tác dụng sinh học hoặc cách khác là tác dụng không mong muốn khi được dùng cho đối tượng và không tương tác theo cách thức có hại với bất kỳ thành phần nào khác của dược phẩm (ví dụ như thành phần có hoạt tính dược lý) mà nó được chứa trong đó. Các ví dụ cụ thể có thể được thấy trong các Sổ tay hướng dẫn chuẩn, ví dụ như Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990). Ví dụ, các polypeptit theo sáng chế có thể được bào chế và được dùng theo cách thức bất kỳ thực chất đã biết đối với các kháng thể thông thường và các mảnh kháng thể và các protein có hoạt tính dược lý khác. Do đó, theo phương án khác, sáng chế cập đến dược phẩm hoặc dạng bào chế mà chứa ít nhất một polypeptit theo sáng chế và ít nhất một chất mang, chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất làm ổn định dược dụng, và tùy ý một hoặc nhiều chất có hoạt tính dược lý khác.

Các dạng bào chế dược để dùng ngoài đường tiêu hóa, như để tiêm trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da hoặc để truyền trong tĩnh mạch có thể là, ví dụ, các dung dịch, hỗn dịch, thể phân tán, nhũ dịch hoặc bột vô trùng mà chứa thành phần hoạt tính và là thích hợp, tùy ý sau bước hòa tan hoặc pha loãng tiếp theo, để truyền hoặc tiêm. Các chất mang hoặc các chất pha loãng thích hợp cho các dạng bào chế này ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước vô trùng và các dung dịch đệm và các dung dịch dược dụng như nước muối đệm phosphat sinh lý, dung dịch Ringer, dung dịch dextroza, và dung dịch Hank; dầu nước; glyxerol; etanol; các glycol như propylen glycol, cũng như các dầu khoáng, dầu động vật và dầu thực vật, ví dụ, dầu lạc, dầu đậu nành, cũng như các hỗn hợp của chúng.

Các dung dịch của các polypeptit theo sáng chế có thể còn chứa chất bảo quản để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật, như các chất kháng khuẩn và kháng nấm, ví dụ, p-hydroxybenzoat, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, thiomersal, (các muối với kim loại kiềm của) axit etylendiamin tetraaxetic, và các chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là dung dịch này chứa cả chất làm đẳng trương, ví dụ, đường, dung dịch đệm hoặc natri clorua. Tùy ý, các chất nhũ hóa và/hoặc các chất phân tán có thể được sử dụng. Tính chảy thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách tạo thành các liposom, bằng cách duy trì cỡ hạt mong muốn trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Các chất khác làm chậm sự hấp thu, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin, cũng có thể được bổ sung. Các dung dịch có thể được nạp vào các lọ tiêm, ống tiêm, chai truyền, và các vật tương tự.

Trong tất cả các trường hợp, dạng liều lượng cuối cùng phải là vô trùng, lỏng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Các dung dịch tiêm vô khuẩn có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng mong muốn trong dung môi thích hợp cùng với các thành phần khác như được liệt kê ở trên, khi cần thiết, tiếp theo là bước lọc khử trùng. Trong trường hợp bột vô khuẩn để điều chế dung dịch tiêm vô khuẩn, phương pháp điều chế được ưu tiên đó là kỹ thuật làm khô chân không và làm khô đông lạnh để tạo ra bột gồm thành phần hoạt tính cộng thêm thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ có trong dung dịch lọc khử trùng trước đó.

Thông thường, các dung dịch nước hoặc huyền phù nước sẽ được ưu tiên. Nói chung, các dạng bào chế thích hợp đối với các protein trị liệu như các polypeptit theo sáng chế là các dung dịch protein được đệm, như các dung dịch chứa protein với nồng độ thích hợp (như từ 0,001 đến 400 mg/ml, tốt hơn là từ 0,005 đến 200 mg/ml, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 200 mg/ml, tốt hơn nữa là 1,0 - 100 mg/ml, như 1,0 mg/ml (dùng trong tĩnh mạch) hoặc 100 mg/ml (dùng dưới da) và dung dịch đệm nước như:

- dung dịch nước muối đệm phosphat, độ pH bằng 7,4,
- các dung dịch đệm phosphat khác, độ pH bằng 6,2 đến 8,2,
- các dung dịch đệm axetat, độ pH bằng 3,2 đến 7,5, tốt hơn là độ pH bằng từ 4,8 đến 5,5
- các dung dịch đệm histidin, độ pH bằng từ 5,5 đến 7,0,
- các dung dịch đệm succinat, độ pH bằng từ 3,2 đến 6,6, và

- các dung dịch đệm xitrat, độ pH bằng từ 2,1 đến 6,2, và, tùy ý, các muối (ví dụ, NaCl) và/hoặc đường (ví dụ như sucroza và trehaloza) và/hoặc các rượu đa chức khác (ví dụ như manitol và glyxerol) để tạo tính đẳng trương cho dung dịch.

Các dung dịch protein được đệm được ưu tiên là các dung dịch chứa khoảng 0,05 mg/ml polypeptit theo sáng chế được hòa tan trong dung dịch đệm phosphat 25 mM, độ pH bằng 6,5, được điều chỉnh đến đẳng trương bằng cách bổ sung 220 mM trehaloza. Ngoài ra, các chất khác như chất tẩy, ví dụ, 0,02 % Tween-20 hoặc Tween-80, có thể được chứa trong các dung dịch này. Các dạng bào chế để dùng dưới da có thể chứa nồng độ cao hơn đáng kể của polypeptit theo sáng chế, như lên tới 100 mg/ml hoặc thậm chí trên 100 mg/ml. Tuy nhiên, sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là các thành phần và các lượng của chúng như được đưa ra trên đây chỉ thể hiện một lựa chọn được ưu tiên. Các cách khác và các biến thể của chúng sẽ lập tức là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc có thể dễ dàng hiểu được bắt đầu từ phần bộc lộ nêu trên.

Tương tự, so với các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể thông thường, một ưu điểm chính của việc sử dụng các polypeptit theo sáng chế là ở chỗ chúng có thể còn dùng được một cách dễ dàng thông qua các đường dùng khác ngoài cách dùng ngoài đường tiêu hóa và có thể dễ dàng bào chế được cho cách dùng như vậy. Ví dụ, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2004/041867, các polypeptit này có thể được bào chế để dùng qua đường miệng, trong mũi, trong phổi và qua da.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với dụng cụ hữu dụng để dùng polypeptit, như ống tiêm, bút tiêm, vi bơm, hoặc dụng cụ khác.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, các phương pháp này thường gồm các bước sau:

- nuôi cấy các tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế (dưới đây là "axit nucleic theo sáng chế") trong điều kiện mà cho phép sự biểu hiện của polypeptit theo sáng chế; và,
- thu hồi hoặc phân lập polypeptit được biểu hiện bởi các tế bào chủ ra khỏi môi trường nuôi cấy; và
- tùy ý tinh chế và/hoặc cải biến và/hoặc xử lý tiếp polypeptit theo sáng chế.

Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ, phân tử ADN chứa các trình tự mã hóa cũng như các trình tự điều hòa và tùy ý các intron tự nhiên hoặc nhân tạo, hoặc có thể là phân tử cADN. Nó có thể có các codon gốc của nó hoặc có thể có sự sử dụng codon được tối ưu hóa mà đã được làm thích nghi một cách cụ thể để biểu hiện trong tế bào chủ hoặc sinh vật chủ dự tính. Theo một phương án của sáng chế, axit nucleic theo sáng chế về cơ bản là ở dưới dạng được phân lập, như được định nghĩa trên đây.

Axit nucleic theo sáng chế cũng có thể ở dưới dạng, có mặt trong và/hoặc là một phần của vector, ví dụ như plasmid, cosmid hoặc YAC, mà có thể về cơ bản là cũng ở dạng được phân lập. Vector có thể đặc biệt là vector biểu hiện, tức là vector mà có thể tạo ra sự biểu hiện của polypeptit *in vitro* và/hoặc *in vivo* (ví dụ, trong tế bào chủ, sinh vật chủ và/hoặc hệ biểu hiện thích hợp). Vector biểu hiện này thường chứa ít nhất một axit nucleic theo sáng chế mà được liên kết bằng cách thao tác với một hoặc nhiều yếu tố điều hòa thích hợp, như (các) promotor, (các) yếu tố tăng cường, (các) yếu tố kết thúc, và các yếu tố tương tự. Các ví dụ cụ thể về các yếu tố điều hòa này và các yếu tố khác, như (các) yếu tố tích hợp, (các) dấu chuẩn chọn lọc, (các) trình tự đơn hoặc dẫn đầu, (các) gen thông báo, và các yếu tố tương tự, hữu dụng hoặc cần thiết để biểu hiện các polypeptit theo sáng chế, được bộc lộ, ví dụ, ở trang 131 đến 133 của WO2006/040153.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được điều chế hoặc được thu theo cách mà thực chất đã biết (ví dụ, bằng cách tổng hợp ADN tự động và/hoặc kỹ thuật ADN tái tổ hợp), dựa trên thông tin trên các trình tự axit amin đối với các polypeptit theo sáng chế được nêu ở đây.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến vật chủ hoặc tế bào chủ mà biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế; và/hoặc chứa axit nucleic mã hóa

polypeptit theo sáng chế. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, các tế bào chủ đã nêu là các tế bào vi khuẩn, các tế bào nấm men, các tế bào nấm hoặc các tế bào động vật có vú.

Để sản xuất trên quy mô công nghiệp, các vật chủ khác loại được ưu tiên để sản xuất (công nghiệp) các polypeptit miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch và các thuốc protein chứa chúng sẽ gồm các chủng *E. coli*, *Pichia pastoris*, và *S. cerevisiae* mà thích hợp để biểu hiện, sản xuất và lên men trên quy mô lớn, và cụ thể là để biểu hiện, sản xuất và lên men (sinh) được phẩm trên quy mô lớn.

Các polypeptit theo sáng chế được sản xuất trong tế bào như nêu trên có thể được sản xuất trong tế bào (ví dụ, trong dung dịch bào tương, trong chu chất hoặc trong các thể vùi) và sau đó có thể được phân lập từ các tế bào chủ và tùy ý được tinh chế tiếp; hoặc chúng có thể được sản xuất ngoại bào (tiết vào môi trường trong đó các tế bào chủ được nuôi cấy) và sau đó được phân lập ra khỏi môi trường nuôi cấy và tùy ý được tinh chế thêm.

Các phương pháp và các chất phản ứng khác được sử dụng để sản xuất tái tổ hợp các polypeptit, như các vectơ biểu hiện thích hợp, các phương pháp biến nạp hoặc chuyển nhiễm, các dấu chuẩn chọn lọc, các phương pháp cảm ứng sự biểu hiện protein, các điều kiện nuôi cấy, và các yếu tố tương tự, là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Tương tự, các kỹ thuật phân lập và tinh chế protein hữu dụng trong phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Sản xuất các polypeptit theo sáng chế thông qua sự lên men ở các sinh vật chủ tái tổ hợp thuận tiện như *E. coli* và nấm men là hiệu quả về mặt chi phí, so với các kháng thể thông thường mà luôn cần các hệ nuôi cấy tế bào động vật có vú đắt đỏ. Hơn nữa, các mức biểu hiện có thể đạt được là cao và hiệu suất của các polypeptit theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 1 đến 10 g/l (*E. coli*) và lên tới 10 g/l (nấm men) và nhiều hơn nữa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Gây miễn dịch cho lạc đà bằng LRP5 và LRP6 để cảm ứng các đáp ứng miễn dịch thể dịch

Một số phương thức để gây miễn dịch lạc đà cần được tiến hành và thực hiện để nhận diện các miền VHH gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6: Lạc đà ban đầu được gây miễn dịch bằng các miền ngoại bào tái tổ hợp của các protein LRP6 và LRP5 (của người và chuột nhắt). Tuy nhiên, các đặc trưng chức năng của protein tái tổ hợp LRP5 nêu trên đã tiết lộ rằng chỉ epitop gắn kết nhóm Wnt1 mới được cuộn gập một cách hợp lý. Ngược lại, không có dấu hiệu về việc cuộn gập hợp lý của miền gắn kết nhóm Wnt3a-LRP5. Do đó, công việc tiếp theo là cần phải phát triển các kháng nguyên thích hợp cho việc gây miễn dịch. Là một giải pháp thay thế, lạc đà được gây miễn dịch bằng các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm ổn định bằng LRP5 người hoặc LRP6 người. Tuy nhiên, tương tự, sau đó cũng chỉ có thể đạt được sự biểu hiện rất thấp của LRP5 người, bằng sự chuyển nhiễm tạm thời hoặc bằng sự chuyển nhiễm ổn định, và sử dụng các dòng tế bào khác nhau (các tế bào HEK293, CHO và NIH-3T3). Do đó, công việc tiếp theo là cần thiết để đạt được sự biểu hiện đủ của LRP5. Cuối cùng, và sau một số sai sót và thử nghiệm không thành công, điều này có thể đạt được bằng cách phát triển phương thức bao gồm sự đồng chuyển nhiễm ổn định của các tế bào HEK293 với MesDC-2, chaperone được dự tính để gia tăng sự biểu hiện LRP5 ngoại sinh. Thậm chí sau đó, tức là sau khi đồng biểu hiện MesDC-2 trong quá trình tạo ra dòng tế bào được chuyển nhiễm ổn định LRP5, tính không ổn định của sự biểu hiện protein được thấy một cách lặp lại. Điều này dẫn đến vấn đề là sự biểu hiện LRP5 có thể mất đi trong quá trình gây miễn dịch và chọn lọc. Để giải quyết vấn đề tiếp theo này, việc cấy chuyển các tế bào biểu hiện LRP5 được giới hạn càng nhiều càng tốt và sự phân loại tế bào bổ sung được thực hiện để làm giàu các tế bào biểu hiện LRP5.

Lạc đà được gây miễn dịch bổ sung bằng ADN mã hóa LRP5 và ADN mã hóa LRP6 cùng và không cùng với hMesDC-2 chaperone ở các sườn đối diện. Liều tăng cường bổ sung được phân phát đến một số con lạc đà trong nỗ lực để tăng cường đáp ứng miễn dịch phản ứng chéo, với mục đích gia tăng cơ hội nhận diện các miền VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6.

Các mẫu máu miễn dịch (PBL) được lấy ở các khoảng thời gian đều đặn, các đáp ứng huyết thanh được xác định, và ARN toàn bộ được chuẩn bị từ PBL được phân lập.

Các đáp ứng huyết thanh trung bình đối với LRP6 được thấy, ngược lại với các đáp ứng huyết thanh thấp đối với LRP5 khi gây miễn dịch bằng protein tái tổ hợp. Đáp ứng miễn dịch LRP5 trung bình được thấy đối với lạc đà được gây miễn dịch bằng ADN. Ngược lại, đáp ứng miễn dịch rất thấp được thấy đối với sự gây miễn dịch tế bào. Ngoài ra, các thư viện tổng hợp cũng được khảo sát. Tuy nhiên, cuối cùng là, tính đa dạng đủ của danh mục có thể đạt được để tiếp tục các bước tiếp theo, như được nêu trong ví dụ 2.

Ví dụ 2: Phân lập các miền VHH hóa trị một gắn kết LRP5 và LRP6 (các VHH)

Cấu trúc thư viện:

ARN toàn bộ được chiết ngay sau khi thu gom các mô miễn dịch, và tính toàn vẹn và nồng độ của ARN được kiểm tra. Các mẫu cADN được tạo ra từ các chế phẩm ARN này. Các trình tự nucleotit mã hóa các VHH được khuếch đại từ các mẫu cADN trong phản ứng RT-PCR một bước. Các amplicon 700bp đặc biệt được khuếch đại từ các cADN IgG2 và IgG3 trong mẫu được phân lập từ gel agarosa và sau đó được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR tổ (nested PCR). Các sản phẩm PCR sau đó được thủy phân bằng *SfiI* và *BstEII* và được nối vào các điểm giới hạn tương ứng của vector phagemid pAX50. Các hỗn hợp nối được điện chuyển vào *Escherichia coli* TG-1. Phân gộp các thể biến nạp thu được tạo thành tính đa dạng di truyền của thư viện thể hiện thể thực khuẩn.

pAX50 là vector biểu hiện thu được từ pUC119, chứa gen kháng ampicillin và promoter *lac* sau đó là trình tự mã hóa của peptit truyền tín hiệu protein pIII trong khung với điểm tách dòng miền VHH xuôi chiều. Trong khung với trình tự mã hóa miền VHH, vector mã hóa cho Myc đầu tận cùng C- và thẻ hexa-histidin và protein thực khuẩn thể *coli* pIII. Sau khi gây nhiễm các dòng thư viện *E. coli* TG-1 bằng thể thực khuẩn trợ giúp, sự có mặt của pAX50 cho phép sản sinh các hạt thể thực khuẩn từ các dòng này, thể hiện các miền VHH riêng rẽ dưới dạng protein dung hợp với protein pIII.

Chọn lọc:

Các thư viện miền VHH-phagemid được xây dựng và được sử dụng để chọn lọc. Với các loài có tính tương đồng giữa các loài rất cao (giữa LRP5 và LRP6 của người và của lạc đà) đưa ra này, không chắc chắn liệu rằng đáp ứng miễn dịch nảy sinh ở lạc đà

sẽ nảy sinh tính đa dạng đủ của các miền VHH. Do đó, hai thư viện tổng hợp được sử dụng song song với các thư viện miễn dịch trong quá trình chọn lọc.

Các chiến lược khác nhau được sử dụng trong quá trình chọn lọc như sau:

- Thay đổi các công cụ thu được từ LRP5 và LRP6 để tăng cường cơ hội nhận diện các miền VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6, ví dụ, các chọn lọc trên các thư viện từ các con lạc đà được gây miễn dịch LRP5 với các protein thu được từ LRP6 hoặc sử dụng cả hai protein LRP5 và LRP6 trong quá trình chọn lọc các thư viện tổng hợp.

- Thay đổi nguồn loài để chọn lọc các miền VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 người/chuột nhắt (tính phản ứng chéo chuột nhắt đối với chất đối kháng LRP5 và LRP6 như vậy cho phép đánh giá hiệu quả, tức là khả năng ức chế phát triển khối u, và biên dạng an toàn, cần thiết cho việc đánh giá phạm vi trị liệu, trong các mô hình tiền lâm sàng giống nhau (tức là, trong các mô hình chuột nhắt được ghép khối u ngoại lai)).

- Việc chọn lọc “trong dung dịch” bằng các protein tái tổ hợp để giữ các epitop ở cấu hình tự nhiên của chúng: Về sự trở ngại bổ sung, các protein tái tổ hợp LRP5 và LRP6 được phát hiện là mất khả năng cuộn gấp hợp lý của chúng nếu được trực tiếp phủ lên các đĩa gắn kết ELISA. Do đó, các protein tái tổ hợp này được biotinyl hóa và, sau khi xác nhận sự cuộn gấp hợp lý trong các thử nghiệm chức năng, được sử dụng để chọn lọc “trong dung dịch”.

- Các chọn lọc sử dụng các tế bào biểu hiện quá mức LRP5 hoặc LRP6, để có cấu tạo tự nhiên của các thụ thể. Điều này ngạc nhiên là đã trở thành mấu chốt quan trọng, đặc biệt cần thiết để cải thiện sự chọn lọc các tác nhân gắn kết với miền gắn kết nhóm Wnt3a của LRP5, vì dữ liệu chức năng của protein tái tổ hợp thể hiện là thiếu sự cuộn gấp hợp lý của epitop gắn kết Wnt3a.

Ví dụ 3: Sàng lọc các VHH hóa trị một

Sau khi chọn lọc, các dòng được phát triển trong các đĩa 96 lỗ sâu (thể tích 1 mL), và sự biểu hiện VHH được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG. Các phân chiết chu chất của các dòng đơn được chuẩn bị theo các phương pháp chuẩn, như, ví dụ, được báo cáo trong WO2011/107507, và được sàng lọc để gắn kết với LRP6 và LRP5 của người. Ban

đầu, các phần chiết chu chất được sàng lọc trong các thử nghiệm ELISA gắn kết sử dụng LRP5 và LRP6 tái tổ hợp, mà thể hiện là các thử nghiệm công suất cao, mạnh và nhạy, nếu so với các thử nghiệm gắn kết trên cơ sở FACS. Sau khi tinh chế, các VHH được nhận diện trong các thử nghiệm ELISA còn được đặc trưng bằng cách sử dụng thử nghiệm FACS gắn kết để xác nhận sự gắn kết của các VHH được tinh chế với các thụ thể LRP5 và LRP6 trong cấu tạo tự nhiên của chúng.

Thông thường, mối tương quan tốt giữa các thử nghiệm gắn kết ELISA và FACS được trông đợi. Tuy nhiên, trong trường hợp này, các VHH gắn kết LRP5 và LRP6 tốt nhất trong các thử nghiệm ELISA (tức là với ái lực cao đối với miền ecto LRP5 hoặc LRP6 tái tổ hợp) lại không thể hiện sự gắn kết nào hoặc thể hiện sự gắn kết rất yếu với LRP5 và LRP6 của người trong thử nghiệm gắn kết FACS, như được thể hiện trên Fig.2 cho panen các tác nhân gắn kết “2”. Việc sử dụng các dung dịch đệm phủ khác nhau (dung dịch đệm dPBS với dung dịch bicarbonat) và các dung dịch phong bế trong hệ thiết lập ELISA (Marvel với BSA) không giải quyết được sự không nhất quán đã thấy. Thay vào đó, đã phát hiện ra rằng các tác nhân gắn kết rất yếu trong ELISA thể hiện ái lực cao đối với LRP5 và LRP6 trong các thử nghiệm FACS gắn kết sử dụng các tế bào biểu hiện LRP5 và LRP6, như được thể hiện trong Fig.2 đối với panen các tác nhân gắn kết “1”. Do đó, các dữ liệu và các thử nghiệm thêm này cho phép chọn lọc các chất gắn kết ái lực cao nhận biết cấu tạo tự nhiên của hai thụ thể. Ngoài ra, nhờ đó thu được xác nhận rằng các tác nhân gắn kết ái lực cao này nhận biết được epitop phụ thuộc cấu tạo, và không phải là epitop tuyến tính trong các protein LRP5 và LRP6. Do đó dữ liệu và thử nghiệm không thông thường khác này cho phép chọn lọc các tác nhân gắn kết LRP5 và LRP6 có liên quan về mặt trị liệu, mà sẽ có ái lực cao đối với LRP5 và LRP6 được biểu hiện trên màng huyết tương dưới cấu tạo tự nhiên của chúng.

Do đó, mặc dù (i) công suất của các thử nghiệm gắn kết FACS là thấp, (ii) thiết lập thử nghiệm ít mạnh hơn, và (iii) các khó khăn nêu trên gặp phải do mất sự biểu hiện protein tái tổ hợp khi chuyển các tế bào biểu hiện quá mức LRP5, các thử nghiệm này được sử dụng sau đó cho việc chọn lọc và đặc trưng hóa tiếp đối với các tác nhân gắn kết VHH ái lực cao. Ngắn gọn là, các tế bào được ủ bằng các dịch pha loãng VHH được tinh chế (các dịch pha loãng theo chuỗi 1:5, nồng độ cuối cùng từ 1 μ M đến 1 pM) trong 1,5 giờ ở 4°C trên máy lắc đĩa. Sau khi rửa các tế bào 5 lần bằng dung dịch đệm FACS,

chứa 1x nước muối đệm phosphat (PBS) + 10% huyết thanh thai bò (fetal bovine serum - FBS) + 0,05% natri azit, chúng được ủ trong 30 phút đến 1 giờ ở 4°C bằng kháng thể chuột đa dòng mà gắn kết với các vùng khung của các VHH và, do đó, gắn kết với tất cả các tác nhân gắn kết LRP5 và/hoặc LRP6 được thử nghiệm. Sau khi rửa các tế bào 3 lần bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào được ủ trong 30 phút đến 1 giờ ở 4°C bằng kháng thể thứ cấp được đánh dấu (kháng PE chuột), sau đó là bước rửa 3 lần bằng dung dịch đệm FACS. Mức độ phát huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng máy FACS (BD).

Toàn bộ họ/cụm hàng trăm VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 được nhận diện từ các thư viện miễn dịch và từ nguồn gốc tổng hợp, dựa vào dữ liệu FACS gắn kết và sự phân tích trình tự. Các ví dụ đại diện của chúng được thể hiện, và được định nghĩa bằng trình tự của chúng, mô tả thêm ở dưới đây. Các VHH được biểu hiện trong *E.coli* và được tinh chế. Trong trường hợp sự biểu hiện trong *E.coli* được chứng minh là không đủ, các VHH được sản sinh trong *Pichia pastoris*. Mô tả vắn tắt sự biểu hiện và sự tinh chế của các VHH được báo cáo thêm dưới đây.

Biểu hiện di truyền của các VHH ở *E.coli*:

Các trình tự mã hóa được tách dòng thành vector biểu hiện pAX100 và được biểu hiện trong *E.coli* như là các protein được gắn thẻ c-Myc hexa-histidin. Các tế bào *E.coli* TG-1 chứa các cấu trúc VHH cần quan tâm được nuôi cấy (37°C, 250 vòng/phút) trong các bình lắc trong môi trường TB được bổ sung kanamycin và được cảm ứng bằng cách bổ sung 1mM IPTG để biểu hiện. Sau khi ly tâm các môi trường nuôi cấy tế bào, các phần chiết chu chất được tạo ra bằng cách làm vỡ đông viên kết và tái tạo huyền phù trong dPBS.

Biểu hiện di truyền của các VHH trong *Pichia (P.) pastoris*:

Các trình tự mã hóa được tách dòng thành vector biểu hiện pAX159 và được biểu hiện trong *P. pastoris* như là các protein được gắn thẻ c-Myc hexa-histidin. Các tế bào *P. pastoris* X-33 chứa các cấu trúc VHH cần quan tâm được nuôi cấy (30°C, 250 vòng/phút) trong BGCM (môi trường phức hợp glycerol được đệm: Buffered Glycerol-Complex Medium; của Invitrogen). Vào ngày thứ ba, môi trường này được chuyển thành môi trường BMCM (Môi trường phức hợp metanol được đệm: Buffered Methanol-

Complex Medium; của Invitrogen) và môi trường nuôi cấy được phát triển tiếp và được cảm ứng đều đặn bằng cách bổ sung 0,55 thể tích metanol (100%). Sau khi ly tâm môi trường nuôi cấy tế bào, dịch nổi (chứa VHH được tiết ra) được thu gom.

Tinh chế VHH:

Các VHH được gắn thẻ hexa-histidin được tinh chế trên Tecan EVO150 bằng cách sắc ký ái lực kim loại cố định (RoboColumns 100ul Nickel Sepharose™ 6 FF, Atoll), được rửa giải từ cột với 250mM imidazol và sau đó được khử muối theo dPBS. Độ tinh khiết và tính nguyên vẹn của các VHH được kiểm tra bằng SDS-PAGE và/hoặc thẩm tách western sử dụng cách phát hiện kháng Myc và kháng VHH.

Ví dụ 4: Đặc trưng hóa *in vitro* đối với các VHH hóa trị một được tinh chế

Sau khi sàng lọc VHH, các VHH được tinh chế có ái lực cao đối với các tế bào biểu hiện LRP5 và LRP6 được đặc trưng hóa bằng cách sử dụng một số thử nghiệm chức năng và sinh lý như được mô tả dưới đây:

4.1 Hiệu lực gắn kết và tính phản ứng chéo LRP5 và LRP6: Thử nghiệm cạnh tranh DKK1 trên cơ sở FACS

Trong quá trình đặc trưng hóa các VHH hóa trị một phản ứng chéo LRP5/LRP6, đã phát hiện ra rằng dữ liệu thu được trong thử nghiệm FACS gắn kết không luôn tương quan với hiệu lực quan sát được trong các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a, có thể nhất là do tốc độ phân ly nhanh của một số trong số các VHH. Do đó, thử nghiệm bổ sung này cần được thiết lập (tức là FACS cạnh tranh DKK1), thử nghiệm này chứng tỏ là đáng tin cậy hơn đối với việc xác định và so sánh độ chọn lọc và hiệu lực gắn kết giữa sự gắn kết LRP5 và LRP6. Mục đích là để chọn lọc các VHH chức năng mà gắn kết với LRP5 và LRP6 với hiệu lực tương tự nhau, để đạt được sự phong bế đối với cả hai thụ thể ở cùng nồng độ. Các VHH chức năng Wnt1 và Wnt3a được nhận diện do đó được đặc trưng trong FACS cạnh tranh DKK-1 như sau:

Đối với thử nghiệm cạnh tranh DKK1 trên cơ sở FACS, các tế bào HEK293 với sự biểu hiện ổn định quá mức LRP5 người hoặc LRP6 người được sử dụng. DKK1 tái

tổ hợp của người (rhDKK1 - R&D Systems, Cat 5439-DK/CF) được bổ sung vào các tế bào ở nồng độ cuối cùng không đổi là 1nM. Các tế bào được ủ bằng rhDKK1 và các dịch pha loãng tác nhân gắn kết LRP5 và/hoặc LRP6 (dịch pha loãng theo chuỗi 1:5 của các VHH đã tinh chế) trong 1,5 giờ ở 4°C trên máy lắc đĩa. Sau khi rửa các tế bào ba lần bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào được ủ bằng sản phẩm kháng DKK1 người của dê được biotinyl hóa (R&D Systems, Cat BAF1096) trong 30 phút ở 4°C trên máy lắc đĩa. Sau khi rửa các tế bào ba lần bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào được ủ bằng Streptavidin PE (BD Biosciences, Cat 554061) trong thời gian 30 phút đến 1 giờ ở 4°C trên máy lắc đĩa trong bóng tối. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và mức độ phát huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng máy FACS (BD) và các giá trị MCF được báo cáo.

Các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 được trông đợi là cạnh tranh với DKK1 người để gắn kết với HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người, cũng như để gắn kết với HEK293 biểu hiện quá mức LRP6 người. Ngược lại, VHH đặc hiệu với LRP5 sẽ cạnh tranh với DKK1 người trong việc gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người nhưng không, hoặc với hiệu lực rất thấp (>200nM) trong việc gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP6 người (và điều tương tự cũng áp dụng, theo hướng ngược lại, đối với các VHH đặc hiệu với LRP6). Kết quả của thử nghiệm này là, có thể thấy rằng các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 theo sáng chế cạnh tranh với DKK1 người để gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người, cũng như với các tế bào biểu hiện quá mức LRP6 người (tức là giảm giá trị MCF với sự tăng nồng độ của tác nhân gắn kết với sự ức chế hoàn toàn sự gắn kết DKK1 tương ứng với các giá trị $MCF \leq 60$ ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm).

4.2 Tính phản ứng chéo giữa các loài: chuột nhắt và khỉ cynomolgus

Để xác định liệu panen được chọn của các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 có khả năng gắn kết với LRP5 và LRP6 có nguồn gốc từ chuột nhắt và khỉ cynomolgus hay không, FACS cạnh tranh DKK1 được thực hiện như sau:

Các dịch pha loãng theo chuỗi của các VHH được ủ với các tế bào HEK293 biểu hiện một cách ổn định LRP5 của chuột nhắt, LRP5 của khỉ cyno, LRP6 của chuột nhắt, hoặc LRP6 của khỉ cyno với sự có mặt của 1 và 0,3 nM hDKK1 (nồng độ lần lượt dưới

giá trị EC50 của chuột nhắt và khi cyno). Sự gắn kết của DKK1 với các tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng DKK1 được biotinyl hóa với Streptavidin-PE là chất phát hiện thứ cấp như được mô tả trên đây. Kết quả là, tính phản ứng chéo này có thể được chứng minh.

4.3 Phân nhóm epitop

Các thử nghiệm phân nhóm được thực hiện đối với các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 phong bế sự truyền tín hiệu Wnt1 hiệu lực nhất, để nhận diện các nhóm epitop khác nhau. Cụ thể là, các VHH riêng rẽ được phân tích về khả năng của chúng trong việc cạnh tranh với các VHH được biotinyl hóa khác (được gọi là các VHH tham chiếu) đối với sự gắn kết thụ thể LRP5 và LRP6 sử dụng các thử nghiệm trên cơ sở FACS. Các dịch pha loãng theo chuỗi của các VHH riêng rẽ được ủ trên HEK293 biểu hiện ổn định LRP5 hoặc LRP6 của người cùng với 200pM hoặc 500pM VHH tham chiếu được biotinyl hóa (nồng độ dưới giá trị EC50). Sự gắn kết của VHH tham chiếu được biotinyl hóa với các tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin-PE. VHH cạnh tranh với các VHH tham chiếu trong việc gắn kết với LRP5 và LRP6 thể hiện sự giảm mức độ phát huỳnh quang đo được bằng cách sử dụng máy FACS.

Kết quả của các thử nghiệm này là các tác nhân phong bế Wnt1 có thể được phân loại thành ba nhóm. Đối với các tác nhân phong bế Wnt3a, ái lực thấp hơn của các VHH không cho phép thực hiện các thử nghiệm phân nhóm epitop.

4.4 Các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a

Khả năng của các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 trong việc ức chế sự truyền tín hiệu Wnt được kiểm tra trong các thử nghiệm Wnt1 và Wnt3a chức năng. Cũng về vấn đề này, phương thức được thiết lập không thể được sử dụng, nhưng một số nỗ lực cần thiết để cố gắng thiết lập các thử nghiệm chức năng sinh hóa, như các thử nghiệm phong bế Wnt1/Wnt3a – LRP5 / LRP6: Ngoài các khó khăn gặp phải với các protein LRP5 và LRP6 tái tổ hợp (xem ví dụ 1), phối tử Wnt1 tái tổ hợp chức năng (kể cả trên thị trường) là không có. Các protein Wnt chứa nhiều cysteine được bảo tồn và được cải biến bằng axit béo không bão hòa đơn (axit palmitoleic), được gắn vào serin được bảo tồn. Các cải biến sau dịch mã này là cần thiết cho việc truyền tín hiệu hiệu quả và cho việc tiết Wnt. Các phân tích cấu trúc chỉ ra rằng một trong số các miền, chứa lipid axit

palmitoleic, là cần thiết cho việc gắn kết với các thụ thể Frizzled, dẫn đến sự thay đổi cấu tạo mà cho phép sự tương tác của các phối tử Wnt với LRP5 và LRP6 trên bề mặt tế bào. Do đó, điều này chỉ ra rằng sự cải biến sau dịch mã là cần thiết cho các nghiên cứu chức năng liên quan đến protein này, nhưng đồng thời các cải biến sau dịch mã trên cơ sở lipid này lại khiến cho các protein này rất khó biểu hiện và tinh chế (độ hòa tan thấp). Do đó, điều này lại trở thành trở ngại chính cho các thử nghiệm sinh hóa.

Do đó, thử nghiệm chức năng trên cơ sở tế bào được phát triển để đặc trưng hóa các VHH được tinh chế: Thử nghiệm gen thông báo beta-lactamaza Wnt. Cụ thể đối với sự ức chế con đường Wnt1, các tế bào CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F (Invitrogen, Cat. K1677) được chuyển nhiễm bằng Wnt1 của người, và các dòng với sự biểu hiện quá mức ổn định của Wnt1 người được chọn lọc. Để thử nghiệm sự ức chế con đường Wnt3a, các tế bào CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F với sự biểu hiện quá mức ổn định Wnt3a người được tạo ra. Dòng tế bào CellSensor® LEF/TCF - bla FreeStyle™ 293 chứa gen thông báo beta-lactamaza dưới sự kiểm soát của promoter LEF/TCF có thể cảm ứng bởi Wnt, gen này được tích hợp ổn định vào các tế bào FreeStyle™ 293 (Invitrogen). Sự biểu hiện của Wnt1 hoặc Wnt3a trong các tế bào này do đó dẫn đến sự biểu hiện chủ yếu và, do đó dẫn đến hoạt tính enzym của beta-lactamaza. Việc điều trị bằng các VHH chức năng phản ứng chéo LRP5/LRP6 do đó được trông đợi là dẫn đến sự ức chế con đường Wnt1 và Wnt3a dẫn đến sự ức chế hoạt tính enzym beta-lactamaza.

Đối với thử nghiệm, 1E06 / ml tế bào biểu hiện quá mức Wnt1 hoặc Wnt3a được gieo cấy vào đĩa nuôi cấy mô 384 lỗ và được ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, các dịch pha loãng theo chuỗi của các dung dịch VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 khác nhau được chuẩn bị và được bổ sung vào các tế bào với sự có mặt của LiCl ở nồng độ cuối cùng là 10nM. DKK1, dưới dạng đối chứng dương, được bổ sung vào các tế bào ở nồng độ cuối cùng là 200nM. Việc xử lý DKK1 dẫn đến sự ức chế hoàn toàn con đường Wnt1 và Wnt3a, và do đó ức chế hoàn toàn hoạt tính enzym beta-lactamaza. Các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, hoạt tính enzym beta-lactamaza được đo theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen, Cat K1085). Đối với sự phát huỳnh quang, các giá trị ở bước sóng 460 nm và 530 nm được thu nhận bằng cách sử dụng máy đọc đĩa huỳnh quang chuẩn và tỷ lệ phát huỳnh quang 460/530 nm được dựng biểu đồ cho

việc xử lý được chỉ định. Hiệu quả được tính so với đối chứng dương (DKK1; nồng độ cuối cùng 200nM).

Tổng số mười hai tác nhân phong bế Wnt1 phản ứng chéo LRP5/LRP6 với hiệu lực và tính hiệu quả đầy đủ tốt hơn 50nM được chọn lọc. Mười bốn tác nhân phong bế Wnt3a phản ứng chéo, chủ yếu với hiệu lực thấp, được xác định. Chỉ có một tác nhân phong bế Wnt3a thể hiện hiệu lực tốt (dưới 5nM).

4.5 Các thử nghiệm phosphoryl hóa Wnt1 và Wnt3a

Các tác nhân phong bế dẫn đầu có hiệu lực và hiệu quả nhất từ mỗi nhóm tác nhân phong bế Wnt1 và các tác nhân phong bế Wnt3a hiệu lực và hiệu quả nhất lần lượt được kiểm tra trong các thử nghiệm phosphoryl hóa LRP5 và LRP6 phụ thuộc Wnt1 và Wnt3a. Các tế bào Cellsensor LEF/TCF 293F từ Invitrogen (cat K1677), được đồng chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện mã hóa cho Wnt1 hoặc Wnt3a, được sử dụng trong các thử nghiệm phosphoryl này. Vì sự tạo thành phức hợp Wnt-Frizzled-LRP5 hoặc -LRP6 dẫn đến sự phosphoryl hóa LRP5 hoặc LRP6 và sự truyền tín hiệu xuôi chiều tiếp theo, nên sự định lượng mức phosphoryl hóa có thể được sử dụng để đo mức truyền tín hiệu này. Để thu được số liệu đọc ra đặc hiệu với LRP5 và LRP6, các tế bào được dung giải và sự kết tủa miễn dịch được thực hiện với kháng thể chọn lọc LRP6 hoặc LRP5 (định hướng kháng miễn dịch nội bào của hai thụ thể). Trong thử nghiệm thấm tách Western, LRP6 hoặc LRP5 được phosphoryl hóa được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng phospho-LRP6 đa dòng (Ser1490)(Cell Signaling Technology), kháng thể này phát hiện được cả hai protein phosphoryl hóa LRP6 và LRP5. Panen được chọn của các VHH phong bế Wnt1 và Wnt3a đã tinh chế, chứa ít nhất một VHH đại diện từ mỗi nhóm, được kiểm tra ở nồng độ cuối cùng từ 10 đến 100nM. Cụ thể là, các tế bào được ủ qua đêm với sự có mặt của các VHH phong bế trước khi dung giải tế bào và kết tủa miễn dịch LRP5 và LRP6. Hiệu quả của các VHH phong bế Wnt1 và Wnt3a trong việc phong bế sự phosphoryl hóa LRP5 và LRP6 được tính thông qua việc định lượng các dải thấm tách Western so với đối chứng dương (DKK1, nồng độ cuối cùng là 1 uM).

4.6 Đặc trưng sinh lý

Các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 còn được đặc trưng về sự biểu hiện và tinh chế trong *E. coli* và trong *Pichia pastoris*, như được báo cáo trong ví dụ 3. Cụ thể là,

hiệu suất biểu hiện đối với các VHH panen dẫn đầu hóa trị một được xem như là chấp nhận được nếu chúng là trên 0,1 mg/L. Các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 được chọn thể hiện mức biểu hiện nằm trong khoảng từ 0,1 đến 8,2 mg/L trong *E.coli* và cao hơn trong *Pichia pastoris* (> 1mg/L). Mức biểu hiện này được tính bằng cách phân tích SDS-PAGE.

Độ ổn định nhiệt của các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 hóa trị một được xác định trong thử nghiệm biến đổi nhiệt trên cơ sở huỳnh quang (TSA) sử dụng Lightcycler (Roche). Các VHH được ủ ở các độ pH khác nhau với sự có mặt của Sypro Orange và gradien nhiệt độ được áp dụng. Khi duỗi ra do nhiệt, các phần kỵ nước của các protein được bộc lộ để Sypro Orange gắn kết vào đó dẫn đến sự tăng cường độ huỳnh quang ($Ex/Em = 465/580nm$). Điểm uốn của đạo hàm thứ nhất của đường cong cường độ huỳnh quang có tác dụng là số đo nhiệt độ nóng chảy (T_m). Đối với tất cả các VHH, T_m gia tăng với sự gia tăng độ pH và đạt cực đại ở độ pH bằng 6, mô hình T_m điển hình được thấy đối với các VHH. Trung bình 82°C ở độ pH bằng 7 thu được đối với các VHH phong bế Wnt1 và các VHH phong bế Wnt3a phản ứng chéo LRP5/LRP6.

Tiềm năng xảy ra sự kết tụ và multimer hóa đối với các VHH LRP5 và LRP6 được nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ phân tích (size exclusion chromatography - SEC). Nhằm mục đích này, 8ug mẫu VHH đã tinh chế ở mức 0,5 mg/mL được tiêm vào qua thiết bị Dionex Ultimate 3000 trên cột Agilent SEC-3. Dung dịch đệm L-arginin (10mM phosphat, 300mM Arg-HCl, pH 6,0) được sử dụng làm pha động và lưu lượng áp dụng là 1mL/phút. Không có VHH nào trong số các VHH LRP5/LRP6 thể hiện vấn đề kết tụ lớn trong quá trình phân tích SEC: các biên dạng thể hiện trên 95% monome đối với hầu hết các mẫu.

Ví dụ 5: Hình thành và đặc trưng hóa các cấu trúc biparatopic được kéo dài thời gian bán thải

Các VHH Wnt1 và Wnt3a phản ứng chéo LRP5/LRP6 được sử dụng làm các khối xây dựng để hình thành cấu trúc biparatopic như được minh họa trên Fig.1. Sự dung hợp di truyền đối với VHH gắn kết albumin huyết tương được sử dụng làm phương pháp kéo dài thời gian bán thải. Ba khối xây dựng (tác nhân phong bế Wnt1, tác nhân phong

bể Wnt3a, và tác nhân gắn kết albumin) được liên kết với nhau thông qua tác nhân liên kết linh hoạt. Các VHH được sản sinh trong *P. pastoris* và được tinh chế như được mô tả trong ví dụ 3. Các cấu trúc thu được, tức là các cấu trúc VHH biparatopic phản ứng chéo LRP5/LRP6 được kéo dài thời gian bán thải, được tách dòng trong vectơ biểu hiện pAX159 của *P. pastoris*, ở dưới dạng các cấu trúc VHH được gắn thẻ cMyc-hexahistidin ở đầu tận cùng C, theo quy trình chuẩn như, ví dụ, được báo cáo trong WO2012/131078. Sự định hướng khác nhau của các khối xây dựng và các tác nhân liên kết khác nhau, đặc biệt là các tác nhân liên kết GS, được khảo sát. Tác nhân liên kết GS tương đối dài được chọn lọc, dựa vào dữ liệu mô hình hóa phản ánh diện tích bề mặt được kéo dài giữa các điểm gắn kết Wnt1 và Wnt3a tiềm năng ở LRP6 (tức là các vùng cánh quạt beta 1 và 2 không gần với vùng cánh quạt beta 3). Các kết quả tốt nhất liên quan đến hiệu lực trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp đã thu được bằng cách đặt VHH gắn kết HSA/albumin huyết thanh người (human serum albumin) ở giữa. Tác nhân gắn kết 35 GS được sử dụng, và các tác nhân phong bế VHH Wnt1 và Wnt3a được sắp xếp theo thứ tự được ưu tiên.

Để chọn lọc các tác nhân gắn kết VHH tối ưu và các kết hợp tác nhân gắn kết tối ưu, thư viện được hình thành trong đó VHH gắn kết albumin huyết thanh người (HSA) được đặt ở giữa các tác nhân phong bế Wnt1-Wnt3a LRP5/LRP6. Cụ thể là, panen các tác nhân gắn kết ái lực cao với hiệu lực và hiệu quả cao trong các thử nghiệm Wnt1 hoặc Wnt3a (các thử nghiệm thông báo và phosphoryl hóa) được sử dụng trong thư viện để hình thành các cấu trúc biparatopic được kéo dài thời gian bán thải như được mô tả trên Fig.1. Sau bước biểu hiện trong *Pichia pastoris* (như được báo cáo trong ví dụ 3) mà sau đó là bước tinh chế, các cấu trúc biparatopic được kéo dài thời gian bán thải được sàng lọc trong các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a (được mô tả trong ví dụ 4) với sự có mặt của 30uM HSA ở ba tỷ lệ pha loãng (1/100, 1/1000, 1/7000), để đánh giá hiệu quả và hiệu lực tương đối. Nói chung, thấy có sự tương quan tốt giữa các dữ liệu trong các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a và đo được hiệu quả cao đối với nhiều dạng thức. Tổng cộng 11 cấu trúc biparatopic LRP5 và LRP6 kéo dài thời gian bán thải được chọn để đặc trưng hóa tiếp, tính đến hiệu quả trong cả hai thử nghiệm thông báo và tính đa dạng của các tác nhân phong bế Wnt1 và Wnt3a. Các thử nghiệm đặc trưng hóa tiếp này được mô tả dưới đây.

Các thử nghiệm thông báo Wnt1 / Wnt3a:

Các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 4.4, với sự có mặt của nồng độ HSA cuối cùng là 30uM. Các cấu trúc biparatopic LRP5/LRP6 đã tinh chế được kiểm tra ở 12 mức pha loãng, bắt đầu từ 2,5 uM.

Phần lớn của các cấu trúc này thể hiện hiệu lực cao - nằm trong khoảng từ 1,7 nM đến 0,16 nM - và hiệu quả đầy đủ trong cả hai thử nghiệm thông báo, như được thể hiện trong bảng IV dưới đây. Các trình tự của các miền VHH ức chế Wnt1 và Wnt3a riêng rẽ được cung cấp trong bảng V dưới đây:

Bảng IV: Hiệu lực và hiệu quả của các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải được chọn trong các thử nghiệm thông báo với sự có mặt của HSA

			Thử nghiệm thông báo Wnt1		Thử nghiệm thông báo Wnt3a	
Cấu trúc	Đầu tận cùng N	Đầu tận cùng C	IC ₅₀ (M)	% ức chế	IC ₅₀ (M)	% ức chế
F013500053	F0129093A01	F0130333G06	2,3E-10	102	4,1E-10	97
F013500039	F0129093A03	F0130333E06	1,7E-09	102	1,6E-09	82
F013500046	F0130332D03	F0129093A01	5,1E-10	102	6,0E-10	96
F013500016	F0130332D03	F0130367B10	3,1E-10	102	2,7E-10	99
F013500018	F0130332D03	F0130378B05	7,4E-10	102	1,3E-09	98
F013500047	F0130333E06	F0129093A01	8,8E-10	102	9,1E-10	94
F013500026	F0130333E06	F0130367B10	3,3E-10	102	2,6E-10	100
F013500021	F0130333G06	F0130367B10	1,6E-10	102	1,8E-10	102
F013500032	F0130378A04	F0130333G06	2,4E-10	102	4,3E-10	94
F013500033	F0130378B05	F0130333G06	1,8E-10	102	2,5E-10	88
F013500030	F0130378B05	F0130372C08	1,4E-09	102	1,3E-09	96

Bảng V: Các trình tự của các miền VHH được nêu trong bảng IV

VHH ID Độ đặc hiệu	Trình tự axit amin	SEQ ID NO:
F0129093A01 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLLRRRN YDYWGQGTLVTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHH <u>H</u>	28

F0130333G06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWF RQAPGKEREFLVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGT WWWEYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHH <u>HHH</u>	29
F0129093A03 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWF RQAPGKEREFLVAAINWSGSRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASRSSYAGRTYYELY DYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH	30
F0130333E06 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWF RQAPGKEREFLVAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDY WGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH	31
F0130332D03 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWF RQAPGKEREFLVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYSLLYS SNRYEYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHH <u>HHH</u>	32
F0130367B10 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWF RQAPGKEREFLVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAYVSAY YEYWGQGTLLTVSSGAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH	33
F0130378B05 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREFLVAAISRSGGRRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRVYSTLPPTTSR YNYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHH <u>H</u>	34
F0130378A04 Wnt3a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREFLVAAITRTGRRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGYYYYDSSFY DYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH	35
F0130372C08 Wnt1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYGMGWF RQAPGKEREFLVAAISWSGGRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAKRRGRGVSPPNSSS RYNYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHH <u>HH</u>	36

F013500016	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWF RQAPGKEREFFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYSLLYS SNRYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLLYQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAISWRSGST YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTAVYY CAADPRGYGVAYVSAYYEYWGQGTLLTVSSGAAEQK <u>LISEEDLNAAHHHHH</u>	37
F013500018	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWF RQAPGKEREFFVAAINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYSLLYS SNRYEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLLYQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAISRSGGRT YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGTLLTVSSGAAEQK <u>LISEEDLNAAHHHHH</u>	38
F013500021	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGT WWEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLLYQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAISWRSGST YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTAVYY CAADPRGYGVAYVSAYYEYWGQGTLLTVSSGAAEQK <u>LISEEDLNAAHHHHH</u>	39

F013500026	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWF RQAPGKEREVFAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL RSSQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGG TFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWRSGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEGTAVYYCAADPR GYGVAYVSAYYEWGQGTLLTVSSGAAEQKLISEEDL <u>NGAAHHHHH</u>	40
F013500030	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREVFAAISRSGGRTYYADSVKGRFTISRDNK KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRVYSTLPPTTSR YNYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAD SVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFSDYGMGWFRQAPGKEREVFAAISWSGGRTYYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA KRRGRGSVSPNSSRYNYWGQGTLLTVSSGAAEQKLIS <u>EEDLNGAAHHHHH</u>	41
F013500032	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREVFAAITRTGRRYYADSVKGRFTISRDNK KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGYYYDYSSFY DYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GGTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAIRRSGRRTYYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA RRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGTLLTVSSGAAEQKL <u>ISEEDLNGAAHHHHH</u>	42

F013500033	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREVFAAISRSRGRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADDRVYSTLPPTSR YNYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAIRSRGR RTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLVTVSS GAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH	43
F013500039	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWF RQAPGKEREVFAAINWSGSRTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASRSSYAGRTYYELY DYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREVFAAIRRRGS STYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAADRTVALLQYRYDYWGQGLVTVSSGAAEQKL ISEEDLNGAAHHHHHH	44
F013500046	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWF RQAPGKEREVFAAINRSRGGSTYYSDSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADDRGRGENYSL LYSNSRYEYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSRSSQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSGG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAASPIPYGSLRRRNNDYWGQGLVTVSSGAAEQ KLISEEDLNGAAHHHHHH	45

F013500047	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWF RQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL RSSQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPI YGSLRRRRNNYDYWGQGTLLTVSSGAAEQKLISEEDL <u>NGAAHHHHH</u>	46
F013500053	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWF RQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLRRRN YDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAD SVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLRSSQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGGTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGTLLTVSSGAAEQ <u>KLISEE DLNGAAHHHHH</u>	47

(Lưu ý: Các phân tử được mô tả trong bảng V này chứa thẻ myc-hexa-histidin (được gạch chân), để cho phép tinh chế dễ hơn các polypeptit được biểu hiện tái tổ hợp; thẻ này là không cần thiết đối với - cũng không luôn can thiệp vào - sự gắn kết của các phân tử vào các đích của chúng)

Ví dụ 6: Tối ưu hóa trình tự của các VHH và các cấu trúc VHH

Tối ưu hóa trình tự là quy trình trong đó trình tự gốc được đột biến để khiến nó giống hơn với trình tự liên ứng dòng mầm IGHV3-IGHJ của người. Ví dụ, các axit amin đặc hiệu trong các vùng khung (với sự ngoại lệ của cái gọi là các gốc xác nhận tiêu chuẩn) được trao đổi cho các phần tương ứng của người của chúng, theo cách mà cấu trúc protein, hoạt tính và độ ổn định sẽ được bảo quản.

Các đột biến này có thể được phân loại như sau:

1. Chuẩn: Sự tối ưu hóa trình tự của các vị trí này không được trông đợi là làm thay đổi một cách đột ngột độ ổn định hoặc hoạt tính hoặc ái lực của VHH và do đó chúng được thay đổi cùng một lúc, tạo ra biến thể cơ sở.
2. Tính đơn nhất: Không biết rằng liệu sự tối ưu hóa trình tự của các vị trí này có ảnh hưởng đến độ ổn định hoặc hoạt tính hoặc ái lực của VHH hay không và do đó chúng được khảo sát trên cơ sở riêng rẽ bên cạnh biến thể cơ sở.

Các gốc xác nhận tiêu chuẩn đã được biết là có tính quyết định đối với độ ổn định, hoạt tính và ái lực của VHH và do đó không được đột biến.

Ngoài ra, các axit amin có trong các CDR mà có bằng chứng thử nghiệm là chúng nhạy với các biến đổi sau dịch mã (post-translational modifications - PTM) được thay đổi theo cách sao cho vị trí PTM được vô hoạt trong khi cấu trúc protein, hoạt tính và độ ổn định sẽ vẫn giữ nguyên. Các biến đổi sau dịch mã thông thường nhất được mô tả đối với các kháng thể và các VHH được liệt kê trong bảng VI dưới đây. Độ nhạy của các VHH đối với các biến đổi sau dịch mã được phân tích trong các nghiên cứu áp lực tăng cường, áp dụng một số điều kiện chuẩn gồm xử lý H_2O_2 để phân tích sự oxy hóa methionin, nhiệt độ cao, pH cao và thời gian bảo quản dài để nghiên cứu sự khử amit của asparagin và sự đồng phân hóa của aspartat. Phần trăm oxy hóa, khử amit, và đồng phân hóa được đo theo các quy trình chuẩn và được so sánh với các mẫu đối chứng (các VHH được bảo quản ở $-20^{\circ}C$). Phân tích protein toàn bộ trong phương pháp sắc ký pha đảo (Reverse Phase Chromatography - RPC) và lập bản đồ peptit sử dụng phương pháp phổ khối (Mass spectrometry - MS) được thực hiện để nhận diện các gốc nhạy tiềm năng. Trong trường hợp các biến đổi sau dịch mã được quan sát ở các VHH sau thử nghiệm áp lực, (các) axit amin tương ứng bị đột biến.

Bảng VI: Các biến đổi sau dịch mã tiềm năng, và các motif có tiềm năng gây ra các biến đổi này

Motif	Biến đổi
M	Oxy hóa Met
N-S/G/H/N/A	Khử amit Asn
D-S/G/H	Đồng phân hóa Asp
N-X-S/T-X ($X \neq P$)	Glycosyl hóa Asn
Q/E	Pyroglutamat

Kết quả là, một số đột biến được đưa vào trong các cấu trúc nêu trên, dẫn đến, trong số những yếu tố khác, ba cấu trúc được thể hiện trong bảng III trên đây, các cấu trúc này được chọn để đặc trưng hóa tiếp *in vitro* và *in vivo*, như được nêu trong các ví dụ tiếp theo dưới đây.

Ví dụ 7: Đặc trưng hóa *in vitro* của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải; So sánh với các phân tử gắn kết LRP6 khác

Sau khi tối ưu hóa trình tự VHH, ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải được biểu hiện tái tổ hợp và được tinh chế, và được đặc trưng hóa bằng cách sử dụng một số thử nghiệm chức năng và sinh lý như được mô tả dưới đây.

7.1 Các thử nghiệm gắn kết FACS

Sự gắn kết với LRP5 và LRP6 người được xác định trên các tế bào bằng phân tích FACS, như được báo cáo trong các Fig.3A và 3B. Cụ thể là, sự gắn kết với LRP5 người được thử nghiệm trên các tế bào HEK293 với sự biểu hiện quá mức một cách ổn định của LRP5 người. Đối với gắn kết LRP6 người, các tế bào HEK293 với sự biểu hiện quá mức một cách ổn định của LRP6 người được sử dụng. Các tế bào được ủ với dịch

pha loãng tác nhân gắn kết LRP5 và LRP6 (dịch pha loãng theo chuỗi tỷ lệ 1:5 của các tác nhân gắn kết tương ứng với nồng độ cuối cùng được thể hiện trên Fig.3A và Fig.3B) trong 1,5 giờ ở 4°C trên máy lắc đĩa. Sau khi rửa các tế bào 5 lần với dung dịch đệm FACS (1x PBS (Invitrogen cat.no.141190-094) + 10% FBS (Sigma cat.no. F7524) + 0,05% natri azit), chúng được ủ trong 1 giờ ở 4°C với kháng thể chuột nhất đa dòng mà gắn kết với các vùng khung của các VHH. Sau khi rửa các tế bào 3 lần bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào được ủ trong 1 giờ ở 4°C với kháng thể thứ cấp được dán nhãn (kháng PE chuột nhất (115-116-071), sau đó là bước rửa 3 lần bằng dung dịch đệm FACS. Mức độ phát huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng máy FACS (BD). Sự gắn kết với LRP5 và LRP6 người tương ứng với các trị số MCF ≥ 600 ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm. Đối chứng âm tính bao gồm tác nhân gắn kết không hướng đích (cấu trúc VHH mà gắn kết với protein vi khuẩn mà không được biểu hiện trong các tế bào HEK293). Như được thể hiện lần lượt trên Fig.3A và Fig.3B, sự gắn kết với LRP5 và LRP6 người lần lượt tương ứng với giá trị MCF ≥ 600 và MCF ≥ 1600 , ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải. Các dữ liệu này xác nhận rằng các phân tử gắn kết được định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về trình tự này gắn kết với cả LRP5 người và LRP6 người trong cấu tạo tự nhiên của chúng trong hệ thử nghiệm tế bào. Các giá trị EC₅₀ của sự gắn kết với hLRP5 và hLRP6 được báo cáo trong bảng VII dưới đây.

Bảng VII: Các giá trị EC₅₀ của sự gắn kết với LRP5 và LRP6 người được xác định bằng các thử nghiệm gắn kết FACS

Thử nghiệm gắn kết trên cơ sở FACS	-F013500571	-F013500575	-F013500720
hLRP5, EC ₅₀ (nM)	0,01	0,001	0,02
hLRP6, EC ₅₀ (nM)	0,02	0,01	0,02

7.2 Thử nghiệm cạnh tranh DKK1-FACS

Hiệu lực và hiệu quả của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 được phân tích tiếp bằng cách sử dụng thử nghiệm cạnh tranh DKK1 trên cơ sở FACS, như được mô tả trong ví dụ 4.1. Các tế bào HEK293 với sự biểu hiện quá mức ổn định của LRP5

người hoặc LRP6 người được ủ với dịch pha loãng theo chuỗi của các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 (dịch pha loãng theo chuỗi tỷ lệ 1:5 tương ứng với nồng độ cuối cùng được thể hiện trên Fig.4A và Fig.4B). Các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 cạnh tranh với DKK1 người để gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người, cũng như để gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP6 người, như được thể hiện lần lượt trên Fig.4A và Fig.4B. Sự ức chế hoàn toàn sự gắn kết DKK1 đạt được ở nồng độ thử nghiệm cao nhất (≥ 10 nM) và tương ứng với giá trị $MCF \leq 60$. Ngược lại, VHH đặc hiệu với LRP5 sẽ cạnh tranh với DKK1 người trong việc gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người nhưng không, hoặc với hiệu lực rất thấp (>200 nM) trong việc gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP6 người (và điều tương tự cũng áp dụng, theo hướng ngược lại, đối với các VHH đặc hiệu với LRP6). Kết quả của thử nghiệm này là, có thể thấy rằng các VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 theo sáng chế cạnh tranh với DKK1 người để gắn kết với các tế bào HEK293 biểu hiện quá mức LRP5 người, cũng như với các tế bào biểu hiện quá mức LRP6 người (tức là giảm giá trị MCF với sự tăng nồng độ của tác nhân gắn kết với sự ức chế hoàn toàn sự gắn kết DKK1 tương ứng với các giá trị $MCF \leq 60$ ở nồng độ cao nhất được thử nghiệm). Các giá trị IC_{50} của thử nghiệm cạnh tranh DKK1 để gắn kết với hLRP5 và hLRP6 của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 được báo cáo trong bảng VIII dưới đây. Dữ liệu này xác nhận sự gắn kết của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 với LRP5 người và LRP6 người và thể hiện ái lực rất tương tự nhau (được định nghĩa ở đây bằng các giá trị hiệu lực IC_{50} trong thử nghiệm cạnh tranh DKK1) giữa hai thụ thể. Hơn nữa, dữ liệu này củng cố khái niệm rằng các phân tử gắn kết được định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về mặt trình tự gắn kết với LRP5 người cũng như với LRP6 người dưới cấu tạo tự nhiên của chúng.

Bảng VIII: Các giá trị IC_{50} của sự cạnh tranh DKK1 để gắn kết với LRP5 và LRP6 người được xác định bằng các thử nghiệm gắn kết FACS

Thử nghiệm cạnh tranh DKK1	F013500571	F013500575	F013500720
hLRP5, IC_{50} (nM)	0,03	0,03	0,3
hLRP6, IC_{50} (nM)	0,01	0,1	0,2

7.3 Thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp

Hiệu lực và hiệu quả của các phân tử gắn kết được định dạng, biparatopic, và tối ưu hóa về trình tự được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp để cho phép kiểm tra chức năng của cả hai tác nhân phong bế Wnt1 và Wnt3a trong cùng một thử nghiệm. Thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp được dựa trên cơ sở thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 4.4 với các thay đổi dưới đây về phương thức. 1E06 / ml tế bào với sự biểu hiện quá mức Wnt1, được gieo cấy vào đĩa nuôi cấy mô 384 lỗ được xử lý bằng Wnt3a người tái tổ hợp (rec.human Wnt3a: R&D #5036-WN/CF) ở nồng độ cuối cùng là 500ng/ml và sau đó các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, các dịch pha loãng theo chuỗi của các dung dịch VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic khác nhau được chuẩn bị và bổ sung vào các tế bào với sự có mặt của LiCl ở nồng độ cuối cùng là 10nM. DKK1, dưới dạng đối chứng dương, được bổ sung vào các tế bào ở nồng độ cuối cùng là 200nM. Việc xử lý DKK1 dẫn đến sự ức chế hoàn toàn con đường Wnt1 và Wnt3a kết hợp, và do đó ức chế hoàn toàn hoạt tính enzym beta-lactamaza. Các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, hoạt tính enzym beta-lactamaza được đo theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Như được báo cáo trong ví dụ 4.4, đối với sự phát huỳnh quang, các giá trị ở bước sóng 460 nm và 530 nm được thu nhận bằng cách sử dụng máy đọc đĩa huỳnh quang chuẩn và tỷ lệ phát huỳnh quang 460/530 nm được dựng biểu đồ cho việc xử lý được chỉ định. Giá trị của tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] được báo cáo dưới dạng “đường cơ sở” trên Fig.5A tương ứng với sự ức chế hoàn toàn con đường Wnt1 và Wnt3a, được xác định bằng sự xử lý với đối chứng dương (DKK1; nồng độ cuối cùng 200nM). Giá trị của tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] được báo cáo dưới dạng “Wnt1” tương ứng với sự hoạt hóa chỉ của con đường Wnt1, được xác định từ các tế bào biểu hiện quá mức Wnt1 (tức là không có sự xử lý với Wnt3a người tái tổ hợp). Giá trị của tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] được báo cáo dưới dạng “Wnt1 + Wnt3a” tương ứng với sự hoạt hóa kết hợp của các con đường Wnt1 và Wnt3a, được xác định bằng sự xử lý các tế bào biểu hiện quá mức Wnt1 với Wnt3a người tái tổ hợp. Như được thể hiện trên Fig.5A, sự ức chế hoàn toàn (tức là tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] tương đương với đường cơ sở) đạt được bằng cách xử lý với ba phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6, được

định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về trình tự. Hơn nữa, hiệu lực cao cũng được báo cáo, như được thể hiện trong bảng IX dưới đây bằng các giá trị IC₅₀.

Bảng IX: Các giá trị IC₅₀ của sự ức chế con đường Wnt1 và Wnt3a trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp

Thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp	F013500571	F013500575	F013500720
IC ₅₀ (nM)	0,05	0,2	0,06

Tiếp theo, hiệu lực và hiệu quả của các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6, được định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về trình tự được so sánh với các phân tử gắn kết LRP6 đã được bộc lộ được báo cáo trong WO2011/138391 và WO2011/119661:

Trong WO2011/138391, các kháng thể đa hóa trị gắn kết với LRP6 và ức chế cả sự tương tác phối tử vùng cánh quạt 1 (ví dụ, Wnt1) và vùng cánh quạt 3 (ví dụ, Wnt 3) được bộc lộ. Các kháng thể gắn kết LRP6 đa hóa trị này là các phân tử gắn kết biparatopic LRP6 gồm kháng thể IgG là miền gắn kết thụ thể thứ nhất và gồm mảnh scFv là miền gắn kết thụ thể thứ hai, trong đó kháng thể IgG và mảnh scFv được liên kết với nhau bằng tác nhân liên kết. Trong WO2011/138391, đã có báo cáo rằng tất cả các phân tử gắn kết LRP6 có hiệu lực gần tương tự nhau trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a (Fig.18 của WO2011/138391). Do đó, phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết LRP6 đa hóa trị đó có thể được chọn cho các thử nghiệm so sánh. Do đó, cấu trúc "901" (được gọi là MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; cũng được thể hiện trong Fig.27 của WO2011/138391) đã được quyết định sử dụng làm hợp chất so sánh thứ nhất.

Các dẫn xuất của cấu trúc "901" này được thể hiện trong WO2013/067355. Cụ thể là, các hợp chất có tên là 801T và 802T được bộc lộ (xem phần bộc lộ ở trang 132 của bản mô tả), cả hai hợp chất này đều có hai miền scFv gắn kết LRP6, cộng với gốc kéo dài thời gian bán thải. Vì 801T và 802T thể hiện là có hiệu lực và các đặc tính sinh lý như nhau in vitro nên chỉ một trong hai hợp chất này - biến thể 802T - được đưa vào các thử nghiệm được mô tả dưới đây.

Trong WO2011/119661, các kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với LRP6 và ức chế sự truyền tín hiệu bằng nhiều isoform Wnt được bộc lộ. Các kháng thể kháng LRP6 đặc hiệu kép này gắn kết với hai vùng khác nhau của LRP6 và ức chế sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi các isoform Wnt, trong số chúng là Wnt1 và Wnt3a. Kỹ thuật gắn nút vào lỗ (knobs-into-holes) (Atwell *et al.* “Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library”. *J Mol Biol.* 1997; 270(1):26-35) được sử dụng để xây dựng các kháng thể đặc hiệu kép kháng LRP6 này. Ví dụ 11 của WO2011/119661 đã bộc lộ dạng lai IgG với các heterodime chuỗi nặng YW211.31.62 và YW210.09. Do đó, nhằm mục đích so sánh, hai kháng thể lai IgG đặc hiệu kép với các heterodime chuỗi nặng YW211.31.62 và YW210.09 được tạo ra với thao tác kỹ thuật gắn nút vào lỗ, tức là với các thay đổi axit amin được thiết kế để tạo ra nút trên CH3 của chuỗi nặng YW210.09 và lỗ trên CH3 của chuỗi nặng YW211.31.62 hoặc ngược lại, và được đề cập ở đây lần lượt là Nút HC YW210.09 và Nút HC YW211.31.62. Hai cấu trúc này được đặc trưng trong các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a theo ví dụ 4.4. Như được trình bày, hai dạng lai IgG đặc hiệu kép với các heterodime chuỗi nặng YW211.31.62 và YW210.09 thể hiện hiệu lực tương tự trong các thử nghiệm Wnt1 và Wnt3a, như được báo cáo trong bảng X dưới đây. Do đó, đối với các ví dụ so sánh được thể hiện tiếp dưới đây, Nút HC YW210.09 được chọn làm hợp chất so sánh thứ hai.

Bảng X: Các giá trị IC_{50} của sự ức chế con đường Wnt1 và Wnt3a trong các thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a

Thử nghiệm thông báo Wnt	Nút HC YW210.09	Nút HC YW211.31.62
Wnt1, IC_{50} (nM)	4,8	4,6
Wnt3a, IC_{50} (nM)	0,7	0,9

Hiệu lực và hiệu quả của các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải được so sánh với phân tử gắn kết LRP6 biparatopic MOR08168IgG1LALA 6475 scfv, với phân tử kháng LRP6 đặc hiệu kép Nút HC YW210.09 và với phân tử kháng LRP6 đặc hiệu kép 802T sử dụng thử nghiệm thông

báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp. Như được thể hiện trên Fig.5B, sự ức chế hoàn toàn (tức là tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] tương ứng với đường cơ sở trên Fig.5B) đã đạt được bằng cách xử lý với Nút HC YW210.09 (kháng thể lai IgG đặc hiệu kép với các heterodime chuỗi nặng YW211.31.62 và YW210.09) tương tự như phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6, được định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về trình tự F013500571. Tuy nhiên, F013500571 thể hiện hiệu lực cao hơn, như được báo cáo trong bảng XI dưới đây. Để thay thế, các phân tử gắn kết LRP6 biparatopic MOR08168IgG1LALA 6475 scfv và 802T thể hiện sự thiếu sự ức chế hoàn toàn Wnt1 và Wnt3a (tức là tỷ lệ phát huỳnh quang [460/535nm] cao hơn đáng kể lần lượt so với đường cơ sở trên Fig.5B và Fig.5C). Các dữ liệu này thể hiện rằng cả hai phân tử gắn kết LRP6 biparatopic MOR08168IgG1LALA 6475 scfv và 802T đều có hiệu quả thấp hơn đáng kể trong việc ức chế con đường Wnt1 và Wnt3a khi so với F013500571. Do đó, Nút HC YW210.09 được chọn làm hợp chất so sánh đối với các thử nghiệm *in vivo* như được mô tả thêm dưới đây (Ví dụ 9; hiệu quả *in vivo*)

Bảng XI: Các giá trị IC₅₀ của sự ức chế con đường Wnt1 và Wnt3a trong thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp

Thử nghiệm thông báo Wnt1 và Wnt3a kết hợp	F013500571	Nút HC YW210.09	MOR08168IgG1LALA 6475 scfv	802T
IC ₅₀ (nM)	0,05	1,15	0,19	0,01

Ví dụ 8: Các tác dụng của ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải đối với sự truyền tín hiệu Wnt và khả năng sống sót trên các dòng tế bào ung thư

Khả năng của các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải trong việc ức chế sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính sẽ được đặc trưng tiếp bằng cách sử dụng các dòng tế bào ung thư với sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính, như đã được mô tả (Bafico *et al.* "An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells". *Cancer Cell* 2004;6(5):497-506; DeAlmeida *et al.*

“The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo”. *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9); Akiri *et al.* “Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma”. *Oncogene.* 2009; 28(21):2163-72). Ngắn gọn là, các dòng tế bào ung thư với sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính, PA-1 và PA-TU-8988S, được gieo cấy vào các đĩa 12 lỗ và được xử lý trong hai ngày bằng các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 ở nồng độ cuối cùng là 1 μ M. Khả năng ức chế sự truyền tín hiệu Wnt được phát hiện bằng sự ức chế sự biểu hiện mRNA của Axin2, gen đích Wnt nội sinh. Phân tích biểu hiện qPCR được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật ARN chuẩn: Việc phân lập ARN được thực hiện bằng cách sử dụng QIAGEN RNeasy Mini Kit theo phương thức được cung cấp bởi QIAGEN; tổng hợp cADN sử dụng kit tổng hợp cADN SuperScript VILO (Invitrogen, Cat. No. 11754050) và qPCR sử dụng thử nghiệm biểu hiện gen TaqMan với các đoạn mồi/đoạn dò Axin2 TaqMan (Hs00610344_m1 AXIN2 FAM, Life Technologies) và với đối chứng nội sinh nhân chuẩn 18s VIC-MGB (4319413E-1307061, Applied Biosystems).

Như được thể hiện trên Fig.6A, cả các tế bào ung thư PA-TU8988S và PA-1 được xử lý bằng ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải đều thể hiện các mức mRNA liên quan đến Axin2 giảm đáng kể (tức là được chuẩn hóa đến đối chứng nội sinh) khi so với các tế bào (Đối chứng) không được xử lý. Các dữ liệu này chứng minh khả năng của cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải trong việc ức chế sự truyền tín hiệu Wnt ở các dòng tế bào ung thư với sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính. Hơn nữa, tác dụng của sự phong bế sự truyền tín hiệu Wnt đối với khả năng sống sót của tế bào được khảo sát trong các dòng tế bào ung thư PA-TU8988S và YAPC, mà sự tăng sinh của nó đã được báo cáo là phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính (Jiang *et al.* “Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma”. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(31):12649-54). Khả năng sống sót tế bào được đo bằng cách thực hiện thử nghiệm Alamar Blue (Invitrogen, Cat.# DAL1100) sau mười ngày xử lý với cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (nồng độ cuối cùng là 1 μ M) hoặc với hợp chất so sánh 802T (nồng độ cuối cùng 1 μ M). Như được thể hiện trên Fig.6B, các tế bào ung thư PA-TU8988S được xử

lý bằng ba cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải thể hiện phần trăm số tế bào sống được giảm đáng kể (mức giảm $\geq 75\%$) khi so với các tế bào (đối chứng) không được xử lý. Khi xử lý bằng 802T, không phát hiện được tác dụng đối với khả năng sống sót của tế bào (Fig.6B, biểu đồ phía tay phải). Các dữ liệu này chứng minh khả năng của cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải trong việc ức chế sự tăng sinh tế bào của các tế bào ung thư mà phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính, và còn thể hiện tác dụng ưu việt của các cấu trúc này so với 802T.

Hơn nữa, tính phụ thuộc liều của sự sống sót tế bào được đánh giá đối với F013500571 so với 802T, trên các dòng tế bào ung thư PA-TU8988S (Fig.6C) và YAPC (Fig.6D), như được mô tả trên đây. Sự giảm khả năng sống sót tế bào phụ thuộc liều được phát hiện thấy khi xử lý bằng F013500571. Ngược lại, không thấy có tác dụng đối với khả năng sống sót tế bào khi xử lý bằng hợp chất so sánh 802T trên cả hai dòng tế bào ung thư PA-TU8988S và YAPC. Các dữ liệu này chỉ ra rằng cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải có tác dụng ưu việt hơn so với 802T.

Ví dụ 9: Hiệu quả *In vivo*

Các phân tử gắn kết/các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải được đặc trưng hóa thêm *in vivo* trên mô hình khối u được dẫn dắt bởi Wnt. Các thử nghiệm được thực hiện để xác định liệu các phân tử gắn kết này có ức chế sự phát triển khối u *in vivo* hay không. Hiệu quả của hợp chất so sánh Nút HC YW210.09 cũng được xác định bằng cách sử dụng mô hình khối u dẫn dắt bởi Wnt tương tự. Sự biểu hiện chuyển gen của các phối tử Wnt sử dụng tác nhân tăng cường LTR virus khối u vú của chuột (promotor MMTV) dẫn đến sự tăng sản ống dẫn sữa quá mức ở chuột sau đó là caxinom tuyến vú ở các con chuột nhất chuyển gen (transgenic - TG) khoảng 6 tháng tuổi. Các khối u vú này được dẫn dắt bởi sự biểu hiện quá mức của các phối tử Wnt cảm ứng bởi glucocorticoid và có các đặc tính tương tự với các khối u TNBC, gồm sự biểu hiện của các dấu chuẩn biểu mô và trung mô (kiểu hình như cơ sở) và sự truyền tín hiệu Wnt hoạt tính như được đánh giá bằng sự định vị beta-catenin nội bào. Cụ thể là, các khối u vú bắt nguồn từ các con chuột nhất chuyển gen MMTV-Wnt-1 là phụ thuộc Wnt1. Thực vậy, việc phong bế hoạt tính Wnt sử dụng thụ thể Wnt hòa

tan chứa miền giàu xystein Frizzled8 (cysteine-rich domain - CRD) được dung hợp với miền Fc của người (F8CRDhFc) (DeAlmeida *et al.* “The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo”. *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9) được báo cáo là ức chế sự phát triển khối u *in vivo*. Do đó, các khối u được phân lập từ các con chuột nhắt chuyển gen MMTV-Wnt1 được cấy dưới da dưới dạng các mẫu khối u vào các con chuột trụi lông trong 2 đến 5 lần cấy trước khi bắt đầu thử nghiệm hiệu quả. Từ 14 đến 21 ngày sau khi cấy, khi các khối u đạt đến thể tích trung bình khoảng 150 đến 250 mm³, các con chuột nhắt được xếp ngẫu nhiên vào các nhóm với 7 con chuột trên một nhóm và được dùng liều các hợp chất vào trong tĩnh mạch. Các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải được dùng trong tĩnh mạch cho các con chuột nhắt hai lần mỗi tuần, với các liều lượng được thể hiện trên Fig.7A đối với F013500571 và trên Fig.7B đối với F013500720. Hợp chất so sánh Nút HC YW210.09 cũng được dùng liều trong tĩnh mạch hai lần mỗi tuần, nhưng với liều cao hơn, tức là 30 và 45mg/kg (Fig.7C), do dữ liệu thu được với hợp chất này trong các thử nghiệm *in vitro* được giải thích trên đây. Thể tích khối u và khối lượng kháng thể được theo dõi trong thử nghiệm hiệu quả và các thể tích khối u trung bình được báo cáo trong các Fig. 7A đến 7C. Khả năng ức chế phát triển khối u (Tumor growth inhibition - TGI) được xác định tại cuối thử nghiệm hiệu quả. Cụ thể là, TGI được xác định cho mỗi nhóm điều trị như được so sánh với nhóm đối chứng (xử lý các con chuột nhắt bằng dung dịch đệm histidin - 20mM Histidin độ pH bằng 6,5 - trong thử nghiệm được thể hiện trên các Fig. 7A và 7B, hoặc với dịch đệm xitrat đối với thử nghiệm được thể hiện trên Fig.7C). Hơn nữa, phân tích mô bệnh học dạ dày-ruột (gastro-intestinal - GI) (thông qua việc nhuộm H&E các phần của đường GI từ tá tràng đến trực tràng) được thực hiện tại cuối thử nghiệm hiệu quả để đánh giá độc tính tiềm năng của các chất đối kháng LRP5 và LRP6. Khả năng ức chế phát triển khối u (TGI), kết quả của phân tích mô bệnh học GI tại cuối quá trình nghiên cứu hiệu quả *in vivo*, tỷ lệ tử vong mà tương ứng với số các con chuột nhắt mà cần phải hy sinh do sự giảm khối lượng cơ thể đáng kể (giảm khối lượng cơ thể >18% so với khối lượng cơ thể tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm hiệu quả) và số lượng con có sự thoái triển khối u (thể tích khối u tại cuối quá trình thử nghiệm là nhỏ hơn thể tích khối u tại thời điểm bắt đầu điều trị) được báo cáo đối với mỗi nhóm điều trị trong các bảng XIIA, XIIB, và XIIC, liên

quan đến các thử nghiệm và dữ liệu cũng được thể hiện lần lượt trong các Fig.7A, 7B và 7C.

Bảng XIIA: Hiệu quả *in vivo* của F013500571 được dùng trong tĩnh mạch hai lần mỗi tuần. Kết quả của thử nghiệm này cũng được thể hiện trên Fig.7A

	Liều [mg/kg]	TGI [%]	Tỷ lệ thoái triển [x/7]	Tỷ lệ tử vong [x/7]	Đánh giá mô bệnh học GI
Đối chứng	Dung dịch đệm histidin	-	-	-	-
F013500571	10	128	7	0	Không phát hiện
	4	113	7	0	Không phát hiện
	2	61	0	0	Không xác định

Bảng XIIB: Hiệu quả *in vivo* của F013500720 được dùng trong tĩnh mạch hai lần mỗi tuần. Kết quả của thử nghiệm này cũng được thể hiện trên Fig.7B

	Liều [mg/kg]	TGI [%]	Tỷ lệ thoái triển [x/7]	Tỷ lệ tử vong [x/7]	Đánh giá mô bệnh học GI
Đối chứng	Dung dịch đệm histidin	-	-	-	-
F013500720	1	128	7	0	Không phát hiện
	0,4	60	0	0	Không phát hiện
	0,2	17	0	0	Không xác định

Bảng XIIC: Hiệu quả *in vivo* của Nút HC YW210.09 được dùng trong tĩnh mạch hai lần mỗi tuần. Kết quả của thử nghiệm này cũng được thể hiện trên Fig.7C

Trong tĩnh mạch	Liều [mg/kg]	TGI [%]	Tỷ lệ thoái triển [x/7]	Tỷ lệ tử vong [x/7]	Đánh giá mô bệnh học GI
Đối chứng	Dung dịch đệm xitrat	-	-	-	-
Nút HC YW210.09	30	80	0	0	-
	45	85	0	0	Không phát hiện

Như có thể thấy từ các Fig. 7A đến 7C và các bảng XIIA đến XIIC trên đây, việc điều trị bằng các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải (F013500571 ở mức liều 4 và 10 mg/kg và F013500720 ở mức liều 1mg/kg trong phác đồ dùng 2 lần/tuần) thực chất đã dẫn đến sự thoái triển khối u (tức là khả năng ức chế sự phát triển khối u (TGI) > 100% mà tương ứng với sự co ngót khối u; sự giảm thể tích khối u tại cuối quá trình thử nghiệm hiệu quả so với thể tích khối u tại thời điểm bắt đầu thử nghiệm), với các thay đổi khối lượng cơ thể không đáng kể (< 10%) và không có phát hiện nào được báo cáo sau phân tích mô bệnh học GI. Quan trọng là, ngược lại với điều trên, không thể thấy được sự thoái triển khối u khi điều trị với tác nhân gắn kết đặc hiệu LRP6 Nút HC YW210.09, ngay cả ở mức liều dùng/phác đồ trong tĩnh mạch ở mức tối đa có thể dùng trên các con chuột nhắt, mức này tương đương với 90 mg/kg với phác đồ 3 lần/tuần.

Để nghiên cứu thêm sự khác biệt về hiệu quả *in vivo* như được thấy trong thử nghiệm được giải thích trên đây, thử nghiệm tiếp theo được thiết lập cho phép cho các con chuột dùng thường xuyên hơn (ba lần/tuần) với liều lượng thậm chí cao hơn của hợp chất so sánh. Ngắn gọn là, để đạt được mức phơi nhiễm cao hơn như vậy, hợp chất so sánh được dùng trong phác mạc, như được thể hiện trong bảng XIID dưới đây:

Bảng XIID: Hiệu quả *in vivo* của Nút HC YW210.09 được dùng trong phác mạc hai lần hoặc ba lần mỗi tuần, như chỉ định.

Trong phác mạc	Liều [mg/kg]	Phác đồ	TGI [%]	Tỷ lệ thoái triển [x/5]	Tỷ lệ tử vong [x/5]
----------------	--------------	---------	---------	-------------------------	---------------------

Đối chứng	Dung dịch đệm xitrat	Ba lần/tuần	-	-	-
Nút HC YW210.09	45	Hai lần/tuần	55	1	0
	90	Hai lần/tuần	85	0	0
	90	Ba lần/tuần	87	0	0

Như có thể thấy từ dữ liệu được thể hiện trên bảng XIID, cũng trong kiểu thử nghiệm này, không thu được tác dụng mạnh đáng kể xét về mặt TGI. Nói cách khác, các thử nghiệm này, các dữ liệu và các kết quả đã thể hiện một cách rõ ràng hiệu quả cao hơn của các cấu trúc VHH biparatopic kéo dài thời gian bán thải khi so với Nút HC YW210.09, và khả năng chưa từng thấy của các polypeptit theo sáng chế không chỉ trong việc giảm sự phát triển khối u, mà còn trong việc làm co ngót khối u. Tất nhiên là, sự co ngót khối u (tức là sự thoái triển khối u) là tác dụng trị liệu mong muốn (tức là hiệu quả) đối với việc điều trị cho các bệnh nhân ung thư. Thực vậy, trong các nghiên cứu lâm sàng, việc điều trị mà gây ra sự thoái triển khối u dẫn đến đáp ứng hoàn toàn về bệnh lý (pCR) đã tích cực dẫn đến sự cải thiện đáng kể sự sống không có sự tiến triển bệnh và sự sống nói chung ở các chỉ định nhu cầu chữa trị không đáp ứng cao như bệnh ung thư vú.

Các ví dụ so sánh nêu trên còn thể hiện rằng các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải không chỉ ưu việt hơn về các đặc tính gắn kết của chúng, như ái lực hoặc các giá trị K_D , mà chúng còn có các tính chất có lợi và có tính ưu việt và thuận lợi cao trong việc thiết lập *in vivo*.

Tiếp theo là sự nghiên cứu liệu hợp chất MOR08168IgG1LALA 6475 scfv có thể cung cấp tác dụng có lợi tương tự. Nhằm mục đích này, nghiên cứu khả năng dung nạp *in vivo* được thực hiện trên các con chuột nhắt như sau: Hợp chất MOR08168IgG1LALA 6475 scfv được dùng trong tĩnh mạch ở liều lượng 3 mg/kg, hai lần mỗi tuần (2qw); ở liều lượng/chế độ dùng liều giống như liều lượng/chế độ dùng liều mà tại đó hiệu quả *in vivo* được phát hiện trong mô hình khối u ghép khác loại trong

công bố đơn WO2011/138391, như được mô tả ở Fig.22 trong công bố đơn này. Việc điều trị thứ nhất bằng MOR08168IgG1LALA 6475 scfv được thực hiện ở ngày 1 và bắt đầu từ ngày 6 phát hiện thấy sự giảm khối lượng cơ thể ở chuột. Ở ngày 10, một số con chuột nhất được điều trị bằng hợp chất MOR08168IgG1LALA 6475 scfv thể hiện sự giảm khối lượng cơ thể đáng kể (>10%). Ở ngày 11, các con chuột được hy sinh và phân tích mô bệnh học dạ dày-ruột (GI) tiết lộ sự viêm với sự ăn mòn ở kết tràng và ở manh tràng của các con chuột. Dữ liệu này gợi ý rằng MOR08168IgG1LALA 6475 scfv không được dung nạp ở mức liều lượng/chế độ dùng liều hiệu quả. Do đó, các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải là ưu việt hơn xét về mặt phạm vi trị liệu; tức là chúng gây ra sự thoái triển khối u mà không có sự thay đổi khối lượng cơ thể đáng kể (< 10%) và không có phát hiện nào được báo cáo sau khi phân tích mô bệnh học GI.

Ví dụ 10: Sự ức chế con đường Wnt *in vivo*

Đề đặc trưng hóa tiếp tác dụng của các phân tử gắn kết / các cấu trúc VHH phản ứng chéo LRP5/LRP6 biparatopic kéo dài thời gian bán thải đối với sự truyền tín hiệu Wnt, các khối u được phân lập ở cuối quá trình thử nghiệm hiệu quả, được mô tả trong ví dụ 9. Cụ thể là, các khối u được phân lập 16 giờ sau khi tiêm lần cuối cùng các hợp chất hoặc chất điều trị đối chứng. Khả năng ức chế sự truyền tín hiệu Wnt được xác định bằng sự giảm sự biểu hiện mRNA của Axin2 trong các khối u, được phân tích như được mô tả trong ví dụ 8. Số lần thay đổi sự biểu hiện mRNA Axin2 so với nhóm đối chứng được báo cáo trong Fig.8A đối với hiệu quả *in vivo* với F013500571 và trong Fig.8B về hiệu quả *in vivo* với F013500720. Định lượng mức giảm mRNA Axin2 đối với mỗi nhóm điều trị được báo cáo trong các bảng XIIIA và XIIIB dưới đây.

Bảng XIIIA: Sự giảm biểu hiện mRNA Axin2 trong các khối u bằng cách xử lý với F013500571. Dữ liệu đề cập đến Fig.7A và 8A.

	Liều [mg/kg]	TGI [%]	Mức giảm Axin2 (%)
Đối chứng	Dung dịch đệm histidin	-	

F013500571	10	128	83
	4	113	77
	2	61	35

Bảng XIIB: Sự giảm biểu hiện mRNA Axin2 trong các khối u bằng cách xử lý với F013500720. Dữ liệu đề cập đến Fig.7B và 8B.

	Liều [mg/kg]	TGI [%]	Mức giảm Axin2 (%)
Đối chứng	Dung dịch đệm histidin	-	
F013500720	1	128	92
	0,4	60	-21
	0,2	17	35

Như có thể thấy từ các Fig.8A và 8B và các bảng XIA và XIIB, sự giảm đáng kể và sự giảm phụ thuộc liều lượng (cụ thể là đối với việc điều trị với F013500571) của sự biểu hiện mRNA Axin2 được quan sát ở các khối u được điều trị bằng các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6, so với nhóm đối chứng. Các kết quả này gợi ý rằng các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 thực chất là có thể ức chế sự phát triển khối u bằng cách ngăn chặn sự truyền tín hiệu Wnt ở các tế bào khối u.

Ví dụ 11: Quy trình sản xuất công nghiệp

11.1 Lên men:

Polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit được nêu trong các bảng III và V nêu trên có thể được biểu hiện trong tế bào chất của các chủng E. coli khác nhau như W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294 dưới sự kiểm soát của promoter có thể cảm ứng. Promotor này có thể được chọn từ lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB. Môi trường nuôi cấy tốt hơn là được định nghĩa đầy đủ theo Wilms *et al.*, 2001

(Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., and Altenbuchner, J.: High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the *Escherichia coli* rhaBAD Promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 95-103 (2001)), DeLisa *et al.*, 1999 (DeLisa, M. P., Li, J. C., Rao, G., Weigand, W. A., and Bentley, W. E.: Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 54–64.(1999)) hoặc tương đương. Tuy nhiên, việc bổ sung môi trường bằng các axit amin như isoleucin, leucin, lysin, methionin, phenylalanin, threonin, tryptophan và valin hoặc các thành phần môi trường phức hợp như pepton đậu nành hoặc chiết xuất nấm men có thể là có lợi. Quy trình lên men được thực hiện theo phương thức gián đoạn từng mẻ. Điều kiện: Nhiệt độ 30 – 40°C, độ pH 6 – 7,5, oxy hòa tan được giữ trên 20%. Sau khi tiêu thụ nguồn C ban đầu, môi trường nuôi cấy được nạp thêm môi trường thức ăn nêu trên (hoặc tương đương). Khi đạt đến khối lượng tế bào khô trong thùng lên men là 40 đến 90 g/L, môi trường nuôi cấy được cảm ứng bằng chất gây cảm ứng thích hợp tương ứng với hệ promoter được sử dụng (ví dụ, IPTG, lactoza, arabinoza). Sự cảm ứng có thể được thực hiện dưới dạng cảm ứng đầy đủ từng đợt hoặc dưới dạng cảm ứng một phần bằng cách cấp tác nhân cảm ứng tương ứng vào thùng lên men trong thời gian kéo dài. Pha sản xuất nên kéo dài ít nhất là 4 giờ. Các tế bào được thu hồi bằng cách ly tâm trong các máy ly tâm có rôto, máy ly tâm có rôto hình ống hoặc máy ly tâm kiểu đĩa, phân dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào được gạn bỏ.

11.2 Tinh chế:

Khối tế bào *E. coli* được tái tạo huyền phù trong lượng dung dịch đệm dung giải 6 đến 8 lần (dung dịch đệm phosphat hoặc Tris, độ pH bằng 7 đến 8,5). Sự dung giải tế bào tốt hơn là được thực hiện bằng cách đồng nhất áp suất cao sau đó là loại bỏ các mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm trong các máy ly tâm có rôto, máy ly tâm có rôto hình ống hoặc máy ly tâm kiểu đĩa. Dịch nổi chứa protein đích tùy ý được lọc bằng cách sử dụng máy lọc 0,22-10 μm và được tách thông qua phương pháp sắc ký trao đổi cation (ví dụ, Toyopearl MegaCap® II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF hoặc S HyperCel™) ở độ pH bằng 7 đến 8,5. Sự rửa giải được thực hiện bằng gradien NaCl gia tăng tuyến tính ở độ pH bằng 7 đến 8,5. Các phân đoạn

chứa protein đích được gộp lại và sau đó được ủ với 5-10 mM DTT để ngăn chặn sự dime hóa hoặc sự kết tụ qua trung gian bởi các gốc xystein tự do. Sau khi bổ sung tiếp 0,8-1M amoni sulfat hoặc 2-3M NaCl, dung dịch được tách thông qua sự tương tác ưa nước (ví dụ, Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Butyl Sepharose FF, Butyl Toyopearl 650 (S,M,C), Phenyl Toyopearl 650 (S,M,C)) ở độ pH bằng 7 đến 8,5. Việc rửa giải được thực hiện ở độ pH bằng 7 đến 8,5 bằng gradien amoni sulfat hoặc NaCl giảm tuyến tính với sự có mặt của 5mM DTT. Các phân đoạn chứa protein đích với mức tinh khiết tối thiểu 90% được gộp lại và được khử muối bằng cách lọc thẩm tách với sự có mặt của 5 mM DTT sau đó là cô đặc đến nồng độ khoảng 5 mg/ml. Sự cuộn gập lại tiếp theo được thực hiện bằng cách pha loãng dung dịch protein 1:5-1:20 bằng 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM Cystamin, 10 mM CHAPS ở độ pH bằng 8,5 đến nồng độ protein cuối cùng là 0,25-1 mg/ml. Dung dịch cuộn gập lại được ủ trong điều kiện khuấy trong 12 đến 36 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được tách bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (ví dụ, SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C)) ở độ pH bằng 7 đến 8,5. Sự rửa giải được thực hiện bằng gradien NaCl gia tăng tuyến tính ở độ pH bằng 7 đến 8,5. Các phân đoạn chứa protein đích monome được gộp lại và được bào chế trong 25 mM Na-phosphat, 220 mM trehaloza không có nội độc tố, độ pH bằng 7,5 bằng cách lọc thẩm tách. Dung dịch được khử trùng bằng cách lọc và được bảo quản ở 2 đến 8°C.

Ví dụ 12: Dược phẩm để dùng dưới da

Cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc polypeptit biparatopic nêu trên theo sáng chế có thể được chọn để sản xuất dược phẩm để dùng dưới da có thành phần như sau:

Dược chất: 100 mg/ml (1 đến 3 nmol/ml)

Dung dịch đệm axetat: 25 mM

Trehaloza: 220 mM

Tween-20: 0,02 %

Dược chất được bào chế trong dung dịch có thành phần nêu trên, khử trùng và bảo quản ở nhiệt độ 2 đến 8°C.

Ví dụ 13: Ứng dụng được phẩm cho người

Dung dịch như được bào chế trong ví dụ 11.2 trên đây được sử dụng cho bệnh nhân cần dùng, như người đang bị ung thư nhạy với các chất ức chế sự truyền tín hiệu Wnt, bằng cách truyền trong tĩnh mạch (liều lượng 100 đến 200 mg) mỗi hai đến bốn tuần.

Ví dụ 14: Tác dụng của việc ức chế sự truyền tín hiệu Wnt3a đối với sự giải phóng xytokin tiền viêm bởi các tế bào đuôi gai trong thử nghiệm *ex-vivo*

Các PBMC thu được từ các người cho khỏe mạnh đã thông báo chấp thuận. Các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân của người (monocyte-derived dendritic cell - Mo-DC) được tạo ra như sau: Các PBMC được nuôi cấy trong môi trường X-VIVO được bổ sung 50 ng/mL GM-CSF và 50 ng/mL IL-4. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nổi được loại bỏ một cách cẩn thận và được thay thế bằng môi trường X-VIVO được bổ sung GM-CSF và IL-4 giống như trên. Vào ngày thứ tư, dịch nổi được cẩn thận loại bỏ và thay thế bằng môi trường X-VIVO với sự có mặt chỉ của LPS hoặc kết hợp với Wnt3a người hoặc với Wnt3a người và các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6. Vào ngày tiếp theo, dịch nổi được thu gom và đem đi phân tích TNF-alpha bằng phương pháp ELISA theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Như đã được báo cáo (Oderup *et al.* "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". *J Immunol.* 2013;190(12): 6126-34), và được thể hiện trên Fig.9A, Wnt3a trực tiếp ức chế sự tiết xytokin tiền viêm (tức là sự giải phóng TNF-alpha) bởi các tế bào đuôi gai biệt hóa (DC). Sự ức chế giải phóng TNF-alpha từ các DC được dẫn dắt bởi Wnt3a được khôi phục bằng cách bổ sung các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6.

Dữ liệu này chỉ ra rằng các phân tử gắn kết được định dạng, biparatopic, và được tối ưu hóa về trình tự có thể khôi phục sự tiết TNFalpha bởi các tế bào đuôi gai được xử lý Wnt3a, nhờ đó ngăn chặn tác dụng ức chế Wnt đối với các tế bào đuôi gai.

Quan trọng cần lưu ý rằng sự phong bế con đường Wnt ở các tế bào đuôi gai trong vi môi trường khối u có thể thể hiện sự tiếp cận trị liệu tiềm năng đối với việc phá

vỡ sự ức chế miễn dịch qua trung gian khối u và làm tăng thêm tính miễn dịch chống khối u.

Để nghiên cứu tác dụng của các DC đối với các tế bào T (các tế bào T thực hiện), các DC đã xử lý trước với Wnt3a cùng hoặc không cùng với các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 được nuôi cấy đồng thời với các tế bào T, được phân lập từ các PBMC, như đã được mô tả (Oderup et al. "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". J Immunol. 2013;190(12): 6126-34). Sau 3 ngày nuôi cấy đồng thời các tế bào DC/T, dịch nổi được thu gom và được đem phân tích IFN gamma bằng phương pháp ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sự tiết IFNgamma là dấu chuẩn của sự hoạt hóa tế bào T. Như được thể hiện trên Fig.9B, sự ức chế DC qua trung gian Wnt3a dẫn đến sự tiết IFNgamma bởi các tế bào T giảm (sự ức chế chức năng tế bào T), điều này hoàn toàn được phục hồi bằng cách xử lý với các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6.

Tóm lại, các dữ liệu này chỉ ra rằng các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 ngăn chặn tác dụng ức chế của Wnt đối với các tế bào đuôi gai, dẫn đến sự hồi phục của chức năng tế bào T.

Đã biết rằng sự hoạt hóa/kích thích liên tục các tế bào T gây cảm ứng sự biệt hóa cuối cùng, dẫn đến kiểu hình tế bào T cạn kiệt, sự mất chức năng tế bào T tiến triển. Do đó, đã dự tính rằng tác dụng của các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 đối với các tế bào T, qua trung gian sự hoạt hóa các DC, có thể bị hạn chế bởi sự cạn kiệt tế bào T. Do đó, việc điều trị kết hợp, kết hợp việc dùng các phân tử gắn kết phản ứng chéo LRP5/LRP6 với việc dùng chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch mà phong bế sự cạn kiệt tế bào T, được trông đợi là giúp hoạt hóa và duy trì chức năng tế bào T, nhờ đó thay đổi vi môi trường khối u, và nhờ đó hỗ trợ tác dụng trị liệu của các phân tử theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit mà gắn kết một cách đặc hiệu với LRP5 và LRP6, chứa:

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (i) đến (iii) được xác định bằng việc chứa các trình tự CDR dưới đây:

(i):

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

(ii):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

(iii):

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9),

và

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (iv) và (v) được xác định bằng việc chứa các trình tự CDR dưới đây:

(iv):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12)

(v):

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: TYTVG (= SEQ ID NO:1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= SEQ ID NO:3)

và trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:11)

CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= SEQ ID NO:12).

3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:4)

CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= SEQ ID NO:5)

CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= SEQ ID NO:6)

và trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: RYTMG (= SEQ ID NO:7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= SEQ ID NO:9)

và trong đó

- miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu chứa các trình tự CDR dưới đây:

CDR1: SYAMG (= SEQ ID NO:13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= SEQ ID NO:14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= SEQ ID NO:15).

5. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch đã nêu là các miền VHH, và tốt hơn là các miền VHH được làm giống như của người.
6. Polypeptit theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:19 và
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:22.
7. Polypeptit theo điểm 1 hoặc điểm 3, trong đó
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:20 và
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23.
8. Polypeptit theo điểm 1 hoặc điểm 4, trong đó
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:21 và
 - miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai đã nêu có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:23.

9. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai đã nêu được liên kết cộng hóa trị với nhau bằng peptit liên kết, trong đó peptit liên kết này tùy ý bao gồm hoặc chỉ bao gồm miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ ba.
10. Polypeptit theo điểm 9, trong đó miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ ba đã nêu là miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch gắn kết albumin, và tốt hơn là miền Alb11, được xác định bằng SEQ ID NO:24.
11. Polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm các polypeptit bao gồm hoặc chỉ bao gồm gồm SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, và SEQ ID NO:27.
12. Vector biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.
13. Tế bào chủ mang vector biểu hiện theo điểm 12.
14. Phương pháp sản xuất polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, gồm các bước:
 - nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 13 trong điều kiện mà cho phép sự biểu hiện của polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11; và
 - thu hồi và tùy ý tinh chế polypeptit này.
15. Dược phẩm chứa (i) polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 làm thành phần hoạt tính, và (ii) chất mang dược dụng, và tùy ý (iii) chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất làm ổn định.

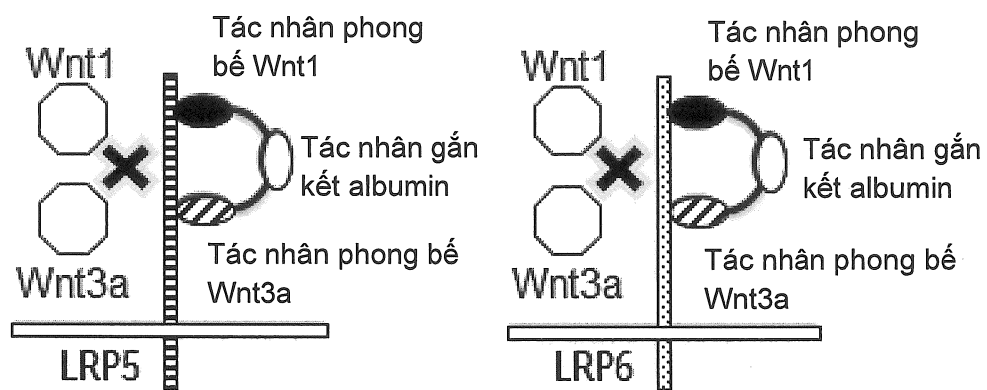
Fig.1

Fig.2

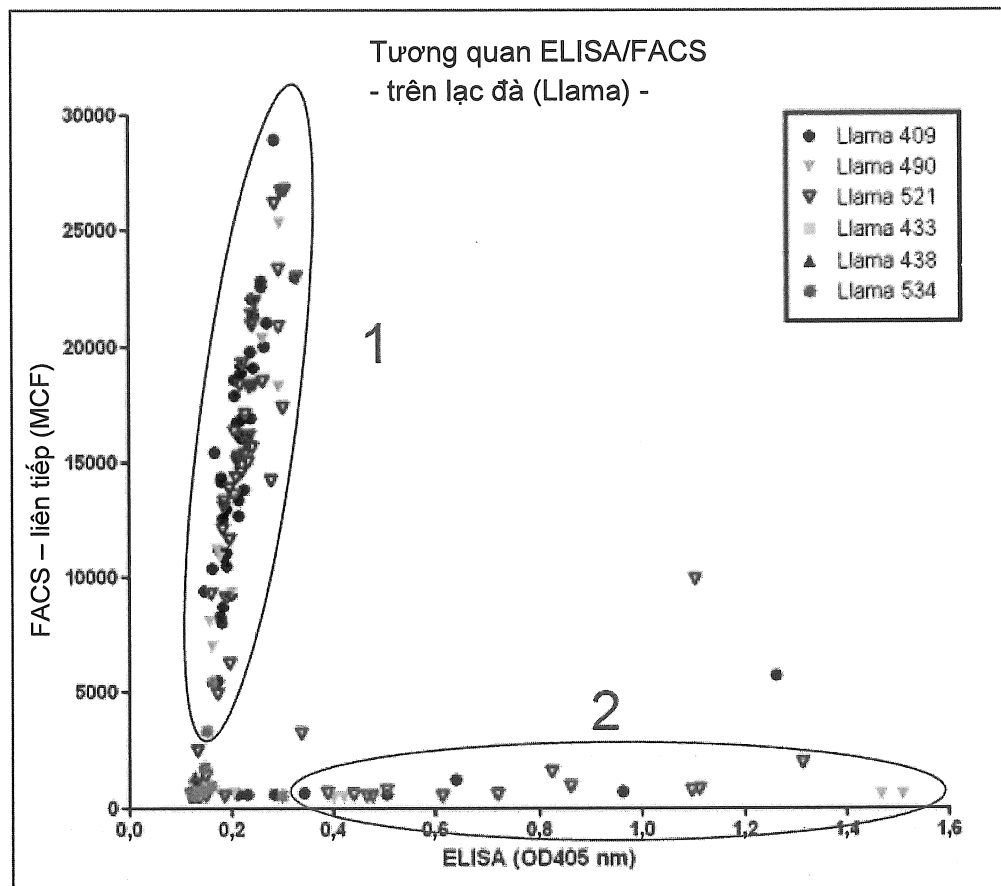


Fig.3A

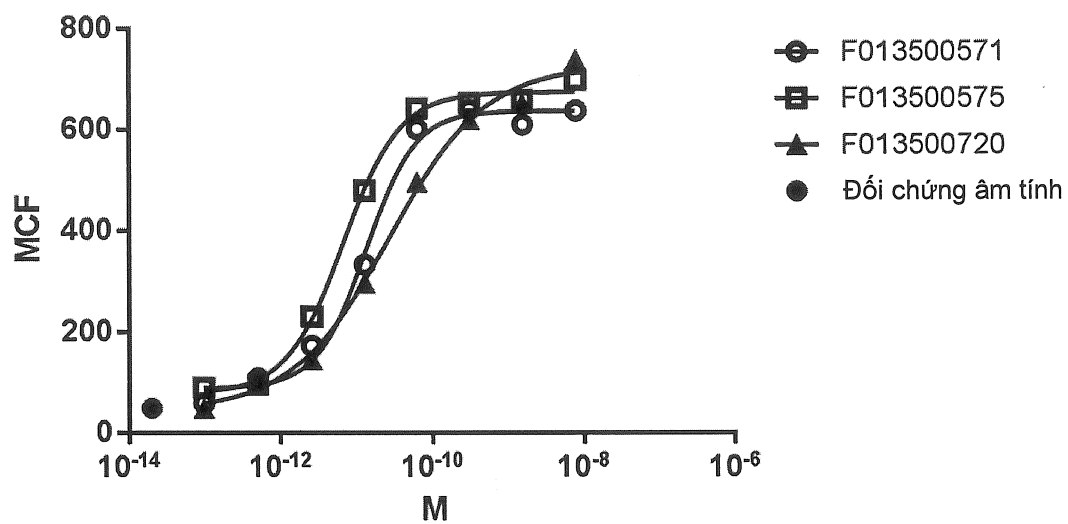


Fig.3B

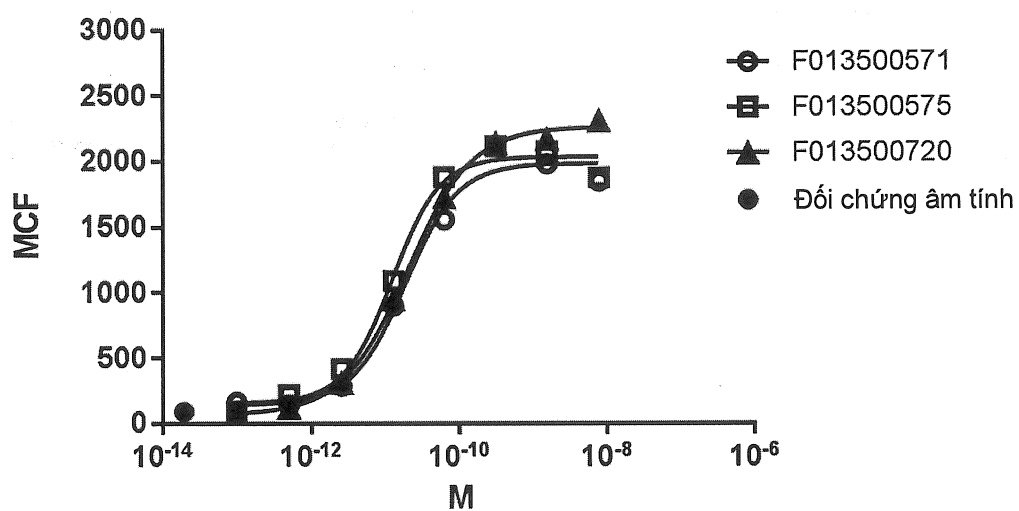


Fig.4A

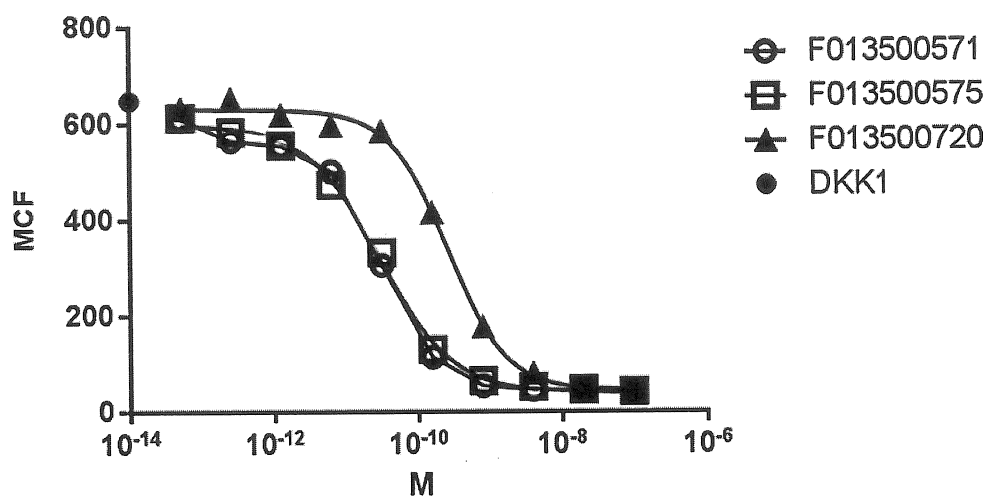


Fig.4B

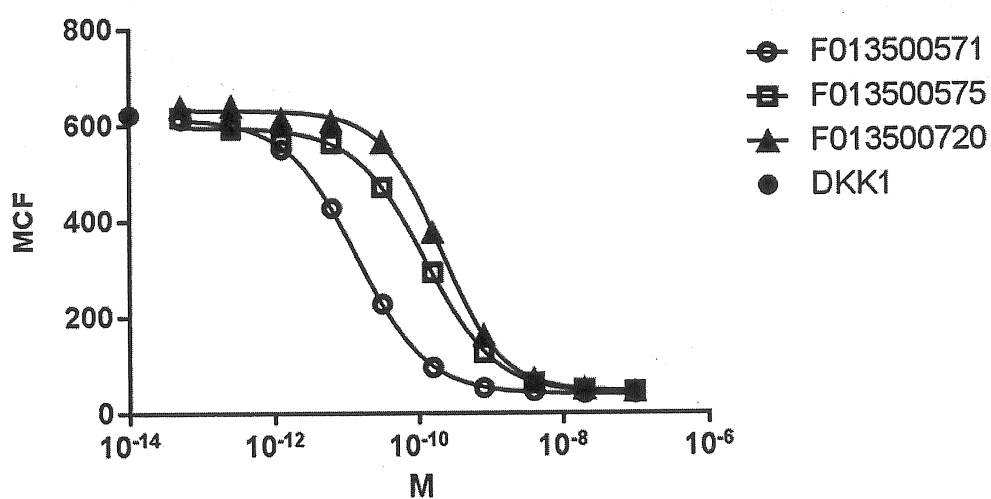


Fig.5A

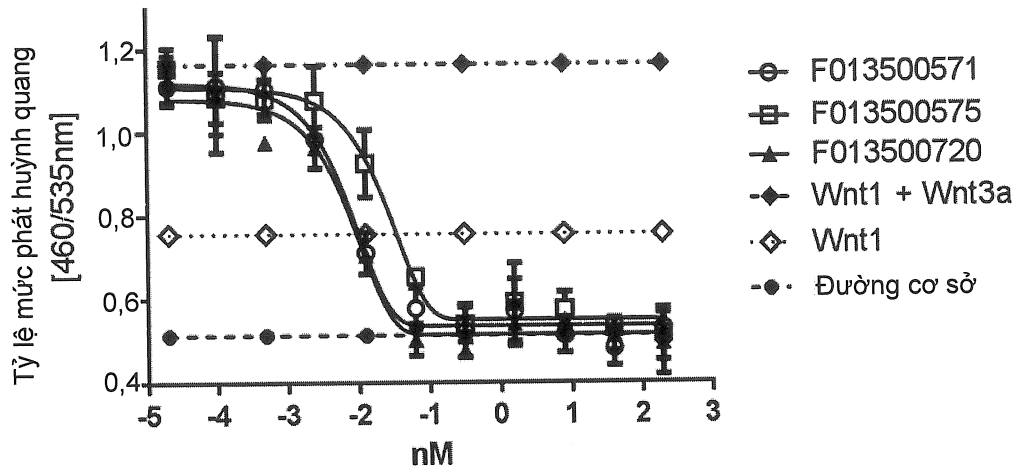


Fig.5B

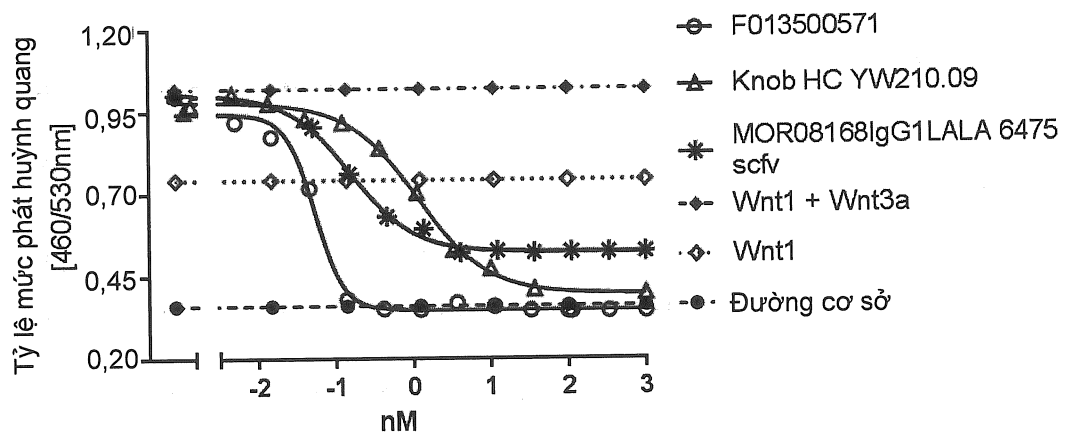


Fig.5C

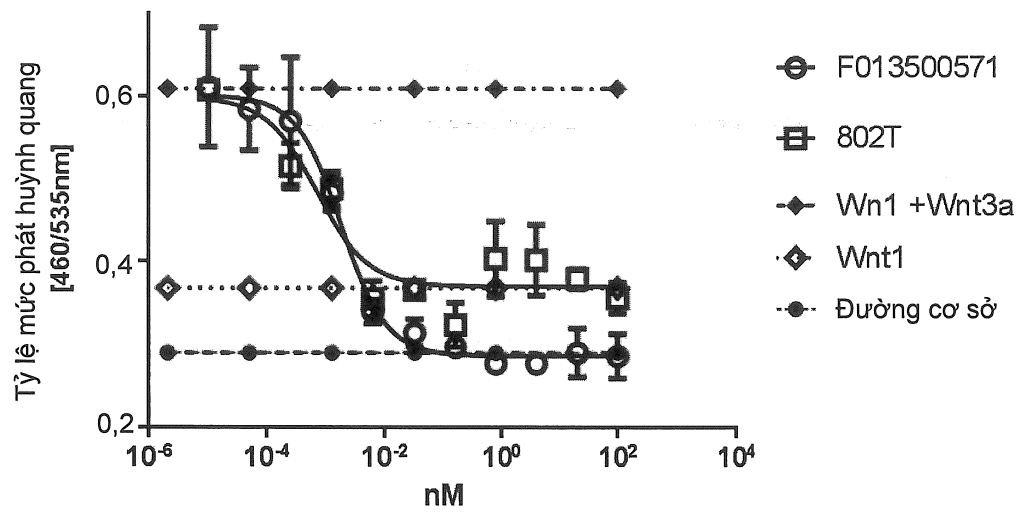


Fig.6A

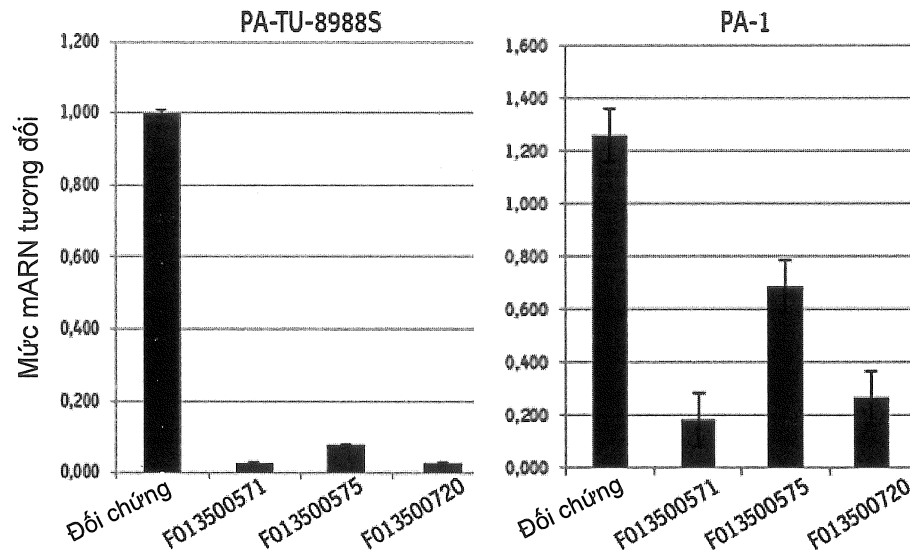


Fig.6B

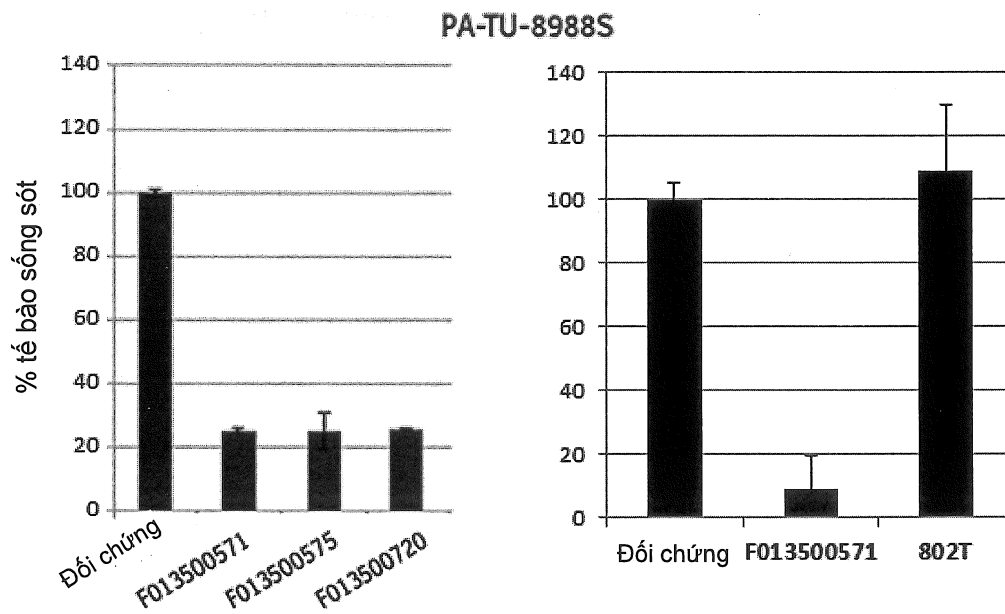


Fig.6C

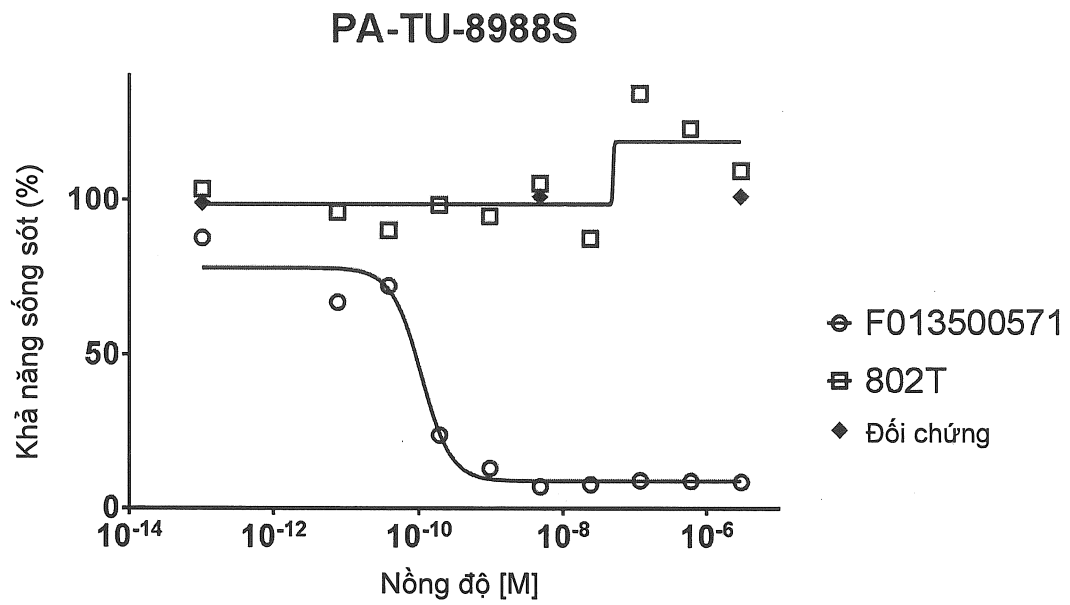


Fig.6D

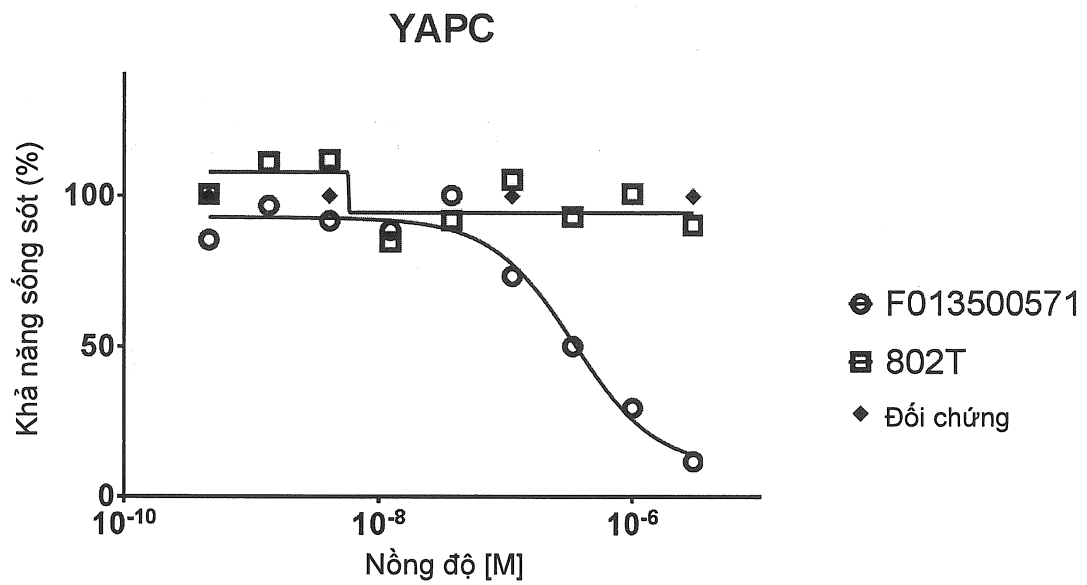


Fig.7A

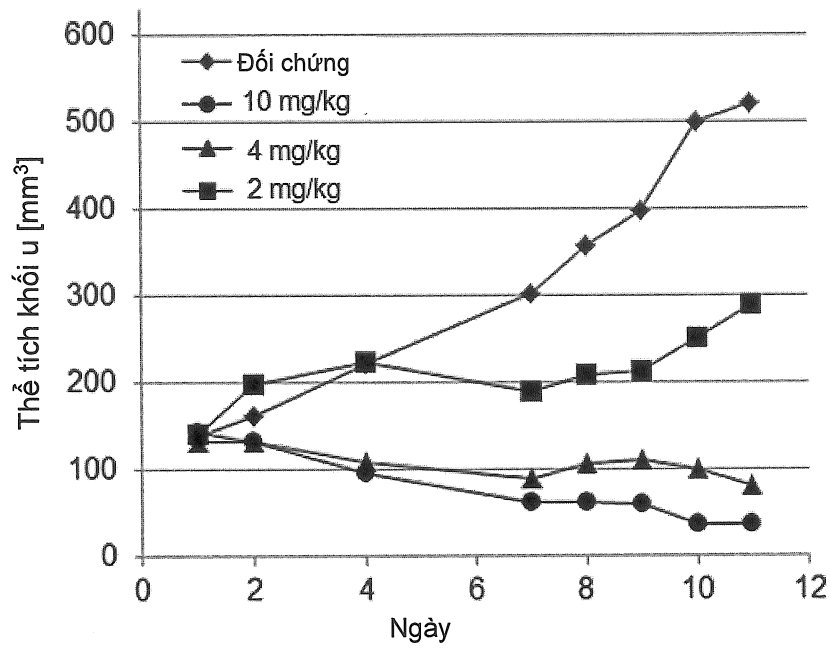


Fig.7B

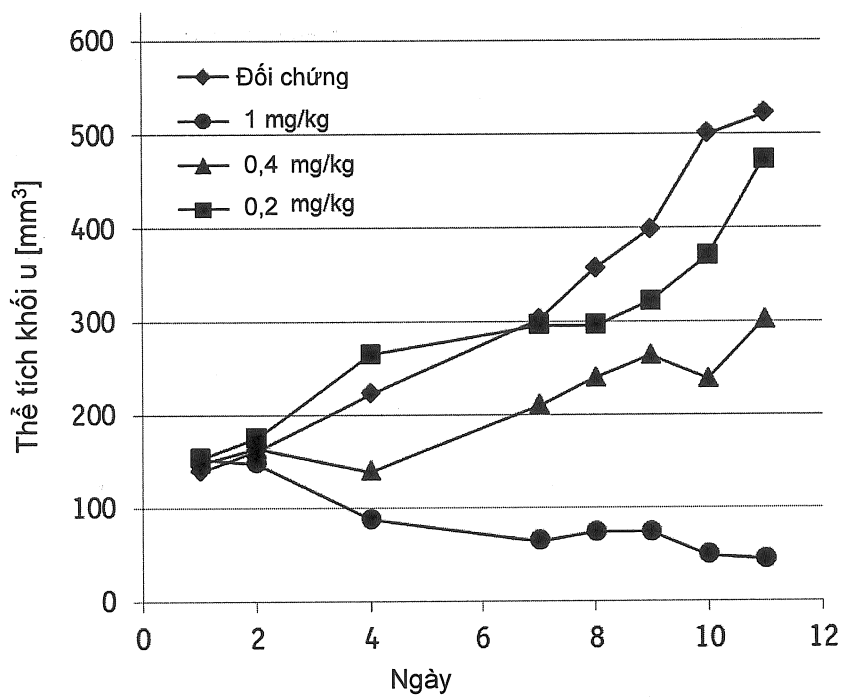


Fig.7C

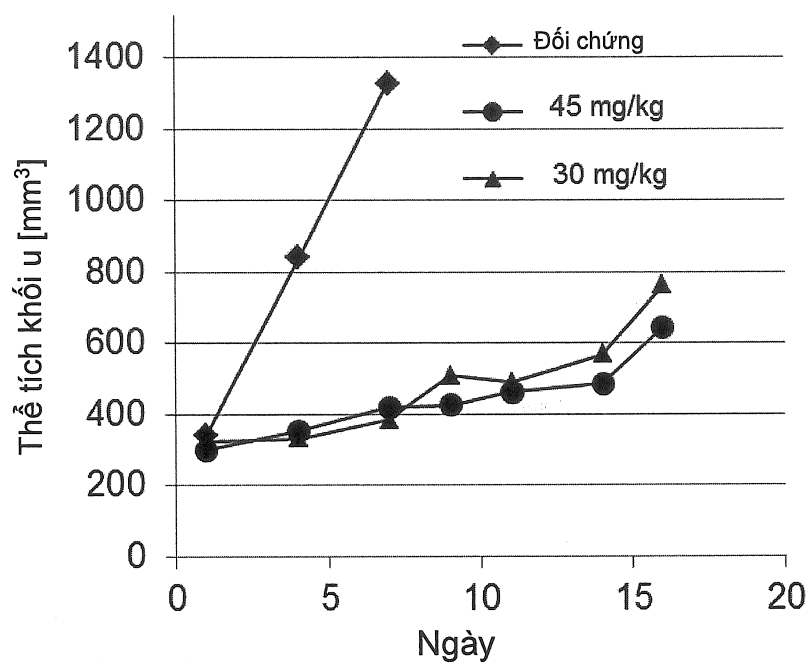


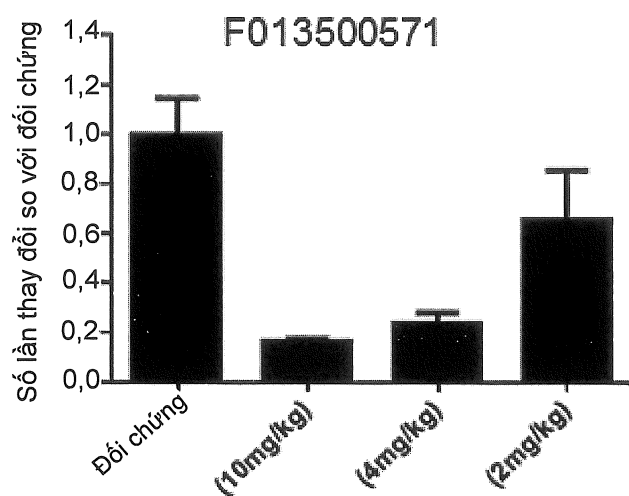
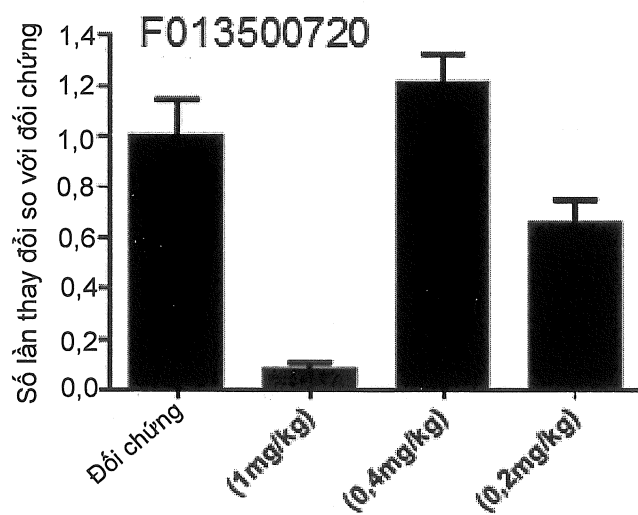
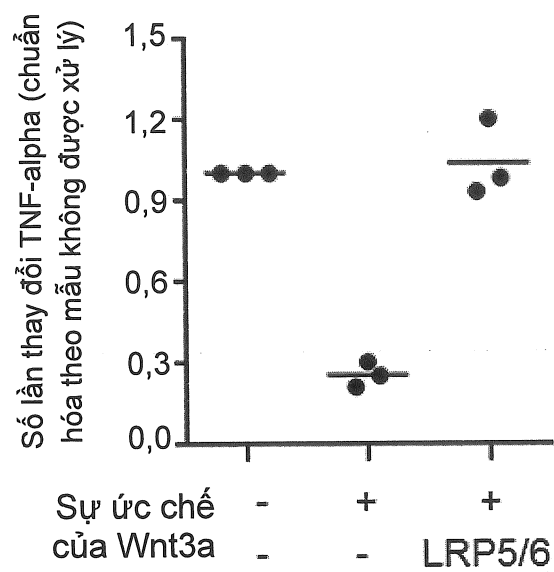
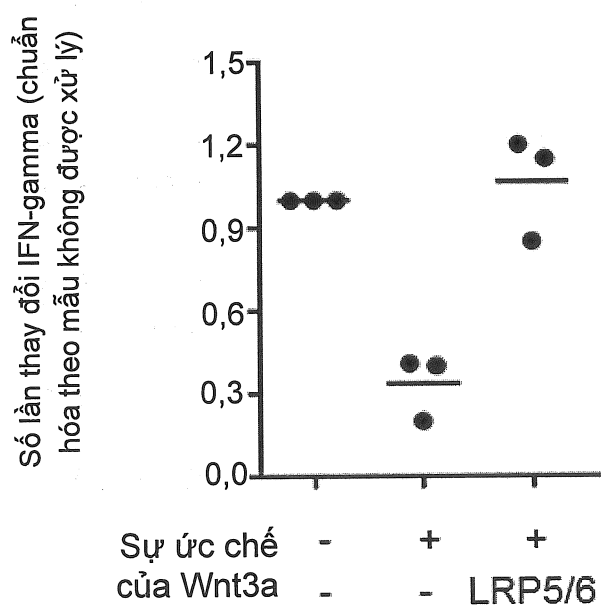
Fig.8A**Fig.8B**

Fig.9A**Fig.9B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

<120> POLYPEPTIT GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI LRP5 VÀ LRP6, VECTƠ BIỂU HIỆN CHỨA AXIT NUCLEIC MÃ HÓA POLYPEPTIT NÀY, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYPEPTIT NÀY

<130> P12-0401/WO/1

<160> 47

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR1 của Wnt1-333E06mod

<400> 1

Thr Tyr Thr Val Gly

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR2 của Wnt1-333E06mod

<400> 2

Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR3 của Wnt1-333E06mod

<400> 3

Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr

1

5

10

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 của Wnt1-333G06

<400> 4
 Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 của Wnt1-333G06

<400> 5
 Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 của Wnt1-333G06

<400> 6
 Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Trp
 1 5 10 15
 Trp Glu Tyr

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 của Wnt1-332D03mod

<400> 7
 Arg Tyr Thr Met Gly

1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 của Wnt1-332D03mod

<400> 8
 Ala Ile Val Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 của Wnt1-332D03mod

<400> 9
 Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Arg Tyr Glu Tyr
 20

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 của Wnt3a-093A01

<400> 10
 Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 của Wnt3a-093A01

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR3 của Wnt3a-093A01

<400> 12
 Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn Tyr Asp
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR1 của Wnt3a-367B10

<400> 13
 Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR2 của Wnt3a-367B10

<400> 14
 Ala Ile Ser Trp Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR3 của Wnt3a-367B10

<400> 15

Asp	Pro	Arg	Gly	Tyr	Gly	Val	Ala	Tyr	Val	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR1 của Alb11

<400> 16

Ser	Phe	Gly	Met	Ser
1			5	

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR2 của Alb11

<400> 17

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

Gly

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR3 của Alb11

<400> 18

Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg
1			5		

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH Wnt1-333E06mod

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 128

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH Wnt1-333G06

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 129

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH Wnt1-332D03mod

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH Wnt3a-093A01

<400> 22

```

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

```

<210> 23
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền VHH Wnt3a-367B10

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr
 100 105 110
 Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 24
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền VHH Alb11

<400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 25

$\langle 211 \rangle$ 435

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc VHH F013500575

<400> 25

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

Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr
				325					330	335					
Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu
340								345	350						
Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr
355								360	365						
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys
370								375	380						
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala
385				390				395						400	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser	Pro	Ile	Pro	Tyr	Gly	Ser	Leu	Leu	Arg
405								410				415			
Arg	Arg	Asn	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
420								425				430			
Ser	Ser	Ala													
435															

<210> 26

<211> 439

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc VHH F013500571

<400> 26

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

[illegible]

```
<210> 27
<211> 440
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Cấu trúc VHH F013500720

<400> 27															
Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
			20					25					30		
Thr	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val
		35					40					45			
Ala	Ala	Ile	Val	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80

```

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

```

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH F0129093A01

<400> 28

```

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

```

<210> 29

<211> 151

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH F0130333G06

<400> 29

```

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

```


Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
 130 135 140
 Ala His His His His His His
 145 150

<210> 30
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền VHH F0129093A03

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

<210> 31
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Miền VHH F0130333E06

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

```

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

```

```

<210> 32
<211> 152
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Miền VHH F0130332D03

```

```

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr
      20              25              30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35              40              45
Ala Ala Ile Asn Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser
      100              105              110
Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      115              120              125
Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly
      130              135              140
Ala Ala His His His His His His
145              150

```

```

<210> 33
<211> 148
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Miền VHH F0130367B10

```

<400> 33

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

<210> 34

<211> 149

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH F0130378B05

<400> 34

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

145

<210> 35

<211> 147

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH F0130378A04

<400> 35

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

<210> 36

<211> 150

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền VHH F0130372C08

<400> 36

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Lys Arg Arg Gly Arg Gly Ser Val Ser Pro Asn Ser Ser Ser
 100 105 110
 Arg Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 130 135 140
 His His His His His
 145 150

<210> 37

<211> 462

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500016

<400> 37

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

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

<210> 38

$\langle 211 \rangle$ 463

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc VHH F013500018

<400> 38

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

```

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

```

<210> 39

<211> 461

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500021

<400> 39

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
		35					40					45					
Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr		
65					70				75						80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85					90					95				
Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Thr	Arg	Tyr	Asn	Thr	Gly	Thr		
			100					105					110				
Trp	Trp	Trp	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120						125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
	130					135					140						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
145					150					155					160		
Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln		
			165					170					175				
Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe		
			180					185					190				
Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
		195					200					205					
Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala		
	210					215					220						
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr		
225					230					235					240		
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			245					250						255			
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr		
			260					265					270				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
		275					280					285					
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
	290					295					300						
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser		
305						310				315					320		
Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala		
			325					330						335			
Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln		
			340					345					350				
Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Arg	Ser		
		355					360					365					
Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser		
	370					375					380						


```

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

```

<210> 40

<211> 456

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500026

<400> 40

```

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

```

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

<210> 41

<211> 461

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc VHH F013500030

<400> 41

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

```

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

```

<210> 42

<211> 460

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500032

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 462

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500033

<400> 43

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

```

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

```

<210> 44

<211> 456

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500039

<400> 44

```

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

```

```

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

```

<210> 45

<211> 463

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500046

<400> 45

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr		
			20					25					30				
Thr	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
		35					40					45					
Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr		
65					70				75						80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85					90					95				
Ala	Ala	Asp	Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser		
			100					105					110				
Ser	Asn	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser		
		115					120					125					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	130					135					140						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
145					150				155						160		
Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val		
			165					170						175			
Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr		
			180					185					190				
Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly		
		195					200					205					
Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr		
	210					215					220						
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys		
225				230						235				240			
Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala		
			245					250					255				
Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly		
			260					265					270				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
		275					280					285					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	290					295					300						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu		
305					310				315						320		
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys		
			325					330					335				
Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg		
			340					345					350				
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser		
		355					360					365					
Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile		
	370					375					380						

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

<210> 46

<211> 457

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500047

<400> 46

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

```

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

```

<210> 47

<211> 462

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc VHH F013500053

<400> 47

```

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

```

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