



(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)



1-0044751

(51)^{2020.01} C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2020-05165

(22) 25/02/2013

(62) 1-2014-03027

(86) PCT/US2013/027580 25/02/2013

(87) WO 2013/130381 06/09/2013

(30) 61/603,622 27/02/2012 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/11/2020 392A

(71) Ablynx N.V. (BE)

Technologiepark 21, 9052 Ghent/Zwijnaarde, Belgium

(72) SINGH, Sanjaya (US); WATERMAN, Alisa K. (US); DEPLA, Erik (BE);
LAEREMANS, Toon (BE); VAN HOORICK, Diane (BE); VERVERKEN, Cedric
Jozef Néotère (BE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) POLYPEPTIT LIÊN KẾT CX3CR1, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA
POLYPEPTIT NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
POLYPEPTIT NÀY

(21) 1-2020-05165

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit liên kết CX3CR1, cụ thể là polypeptit bao gồm các vùng globulin miễn dịch đặc hiệu. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa polypeptit này; phương pháp sản xuất polypeptit này; tế bào chủ biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện polypeptit này; dược phẩm và kit chứa các polypeptit này để phòng ngừa, điều trị và chẩn đoán.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến polypeptit liên kết CX3CR1, cụ thể là polypeptit chứa các vùng của globulin miễn dịch đặc hiệu. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic mã hóa các polypeptit này; phương pháp tạo ra các polypeptit này; tế bào chủ biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện các polypeptit này; chế phẩm chứa các polypeptit này; và việc sử dụng các polypeptit hoặc chế phẩm này, cụ thể để phòng ngừa, điều trị và chẩn đoán.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CX3CR1 là protein màng đầy đủ kết hợp protein G, là thụ thể chemokin. Thụ thể này chủ yếu được biểu hiện trên các loại tế bào như bạch cầu đơn nhân, tế bào tua và tế bào T có liên quan đến sự hình thành và tiến triển của mảng xơ vữa động mạch. Protein này được điều chỉnh tăng trên bạch cầu đơn nhân do lipit bị oxy hóa và làm cho các tế bào này di chuyển vào và sống sót trong mảng bám. Phối tử đặc biệt của nó fractalkin (FKN) được biểu hiện trên bề mặt của màng trong mạch và tế bào cơ trơn ở vùng thương tổn, nơi nó điều biến sự gắn kết bạch cầu. Fractalkin cũng được giải phóng vào hệ tuần hoàn nhờ sự phân tách protein, tại đó chức năng của nó là tác nhân hóa hướng động.

Ở người, biến thể của CX3CR1 (V249I/T280M) với hoạt tính giảm đã thể hiện là có liên quan đến nguy cơ bệnh tim mạch thấp hơn (bệnh mạch vành, bệnh mạch não hoặc bệnh mạch ngoại biên) (McDermott, 2001; *Circ Res* 89:401), bệnh động mạch vành (bằng chứng chụp mạch của hẹp động mạch vành) (McDermott, 2003; *J. Clin. Invest.* 111:1241), và bệnh tắc động mạch cảnh (Ghilardi, 2004; *Stroke* 35:1276). CX3CR1 cùng khu trú với fractalkin mà cho thấy độ bắt màu miễn dịch tăng ở các kháng thể đa dòng trong mảng xơ vữa động mạch (Wong, 2002 *Cardiovasc. Path.* 11:332). Không quan sát thấy sự bắt màu fractalkin ở các vùng động mạch không có mảng bám.

Một số thử nghiệm di truyền độc lập trên chuột đã cho thấy tác dụng hữu ích của sự thiếu hụt CX3CR1 đối với bệnh xơ vữa động mạch. Đã gặp sự giảm diện tích

thương tổn ở cung động mạch chủ và động mạch chủ ngực cũng như sự giảm tích tụ bạch cầu đơn nhân/đại thực bào ở mảng bám ở hai giống chuột có nguồn gốc độc lập CX3CR1^{-/-} apoE^{-/-} được cho ăn bằng chế độ ăn giàu chất béo (Combadière, 2003; *Circulation*, 107:1009, Lesnik, 2003; *J. Clin. Invest.* 111:333).

Điều này cho thấy CX3CR1 có liên quan đến các bệnh tim mạch và sự điều biến hoạt tính của nó có thể tạo ra các liệu pháp hứa hẹn. Do đó, có nhu cầu về các phân tử đối vận kháng CX3CR1 với các đặc tính dược lý hữu ích mà có thể được sử dụng làm tác nhân điều trị bệnh, cụ thể là bệnh tim mạch ở người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất các phân tử đối vận kháng CX3CR1, cụ thể là phân tử đối vận kháng CX3CR1 mà có ái lực liên kết với CX3CR1 cao.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phân tử đối vận kháng CX3CR1 có độ đặc hiệu cao với CX3CR1.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chất đối kháng CX3CR1 có hoạt tính tiềm tàng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chất đối kháng CX3CR1, có độ sinh khả dụng và chu kỳ bán thải có lợi.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chất đối kháng CX3CR1 có các đặc tính sinh lý có lợi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là sự kết hợp của các mục đích trên đây.

Sáng chế đề xuất các polypeptit liên kết với CX3CR1 người và có khả năng ngăn chặn sự liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người. Theo một khía cạnh, polypeptit này là globulin miễn dịch bao gồm vùng liên kết kháng nguyên chứa ba vùng quyết định bổ trợ CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó globulin miễn dịch này liên kết với CX3CR1 người và có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người. Theo một phương án khác, polypeptit bao gồm một hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1, trong đó polypeptit này có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế đặc trưng bởi một hoặc nhiều đặc tính sau:

- Liên kết với CX3CR1 người với ái lực cao;

- Ngăn chặn liên kết của fractalkin hòa tan với CX3CR1 người;
- Ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra;
- Ức chế sự nhập nội của CX3CR1 người do fractalkin gây ra;
- Phản ứng chéo với CX3CR1 khỉ cynomolgus trong khoảng 10 lần E/IC₅₀ CX3CR1 người về liên kết và ức chế chức năng.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 và còn bao gồm gốc kéo dài thời gian bán thải, ví dụ, gốc liên kết albumin, phân tử polyetylen glycol hoặc vùng Fc. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1. Theo một khía cạnh, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 liên kết cộng hóa trị bằng peptit liên kết. Theo một khía cạnh, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có cùng trình tự axit amin. Theo khía cạnh khác, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có các trình tự axit amin khác nhau. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 và còn bao gồm gốc kéo dài thời gian bán thải, ví dụ, gốc liên kết albumin, phân tử polyetylen glycol hoặc vùng Fc.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 thứ nhất liên kết cộng hóa trị với gốc liên kết albumin bằng peptit liên kết thứ nhất, trong đó gốc liên kết albumin này còn liên kết cộng hóa trị với vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 thứ hai bằng peptit liên kết thứ hai.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 liên kết cộng hóa trị với vùng Fc bằng peptit liên kết. Theo một khía cạnh, polypeptit này bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 liên kết cộng hóa trị với vùng Fc bằng peptit liên kết được tạo ra dưới dạng dime, ví dụ, qua các cầu disulfua.

Các polypeptit theo sáng chế được sử dụng để ngăn ngừa, điều trị, làm thuyên giảm và/hoặc chẩn đoán các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến CX3CR1, cụ thể là các bệnh tim mạch, như xơ vữa động mạch.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất:

Phương án 1: Globulin miễn dịch bao gồm vùng liên kết kháng nguyên chứa ba vùng quyết định hỗ trợ CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó globulin miễn dịch này liên kết với CX3CR1 người và có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người.

Phương án 2: Polypeptit bao gồm một hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1, trong đó polypeptit này có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người.

Phương án 3: Polypeptit theo phương án 2, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 về cơ bản bao gồm 4 vùng khung (FR1, FR2, FR3 và FR4) và ba vùng quyết định bổ cứu (CDR1, CDR2 và CDR3).

Phương án 4: Polypeptit theo phương án 3, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 có cấu trúc FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Phương án 5: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 4, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 là vùng của kháng thể.

Phương án 6: Polypeptit theo phương án 5, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 là VH, VL, VHH, VH được làm tương thích với lạp đà, hoặc VHH được tối ưu hóa về độ ổn định, hiệu lực, khả năng sản xuất và/hoặc độ tương đồng với các vùng khung của người.

Phương án 7: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó polypeptit này có ái lực với CX3CR1 người ở mức:

a) EC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, như được xác định bằng phương pháp FACS liên kết tế bào; hoặc

b) IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, như được xác định bằng phương pháp FACS cạnh tranh.

Phương án 8: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 7, trong đó polypeptit này ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người ở IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 300nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn

hoặc bằng 20nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM.

Phương án 9: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 8, trong đó polypeptit này ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra qua trung gian CX3CR1 người với IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 500nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 75nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 50nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM.

Phương án 10: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9, trong đó polypeptit này ức chế sự nhập nội của fractalkin qua trung gian CX3CR1 người với IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM.

Phương án 11: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 10, trong đó CDR3 có trình tự axit amin Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 (SEQ ID NO. 197), trong đó:

- Xaa1 là Pro, Ala hoặc Gly;
- Xaa2 là Asp hoặc Asn;
- Xaa3 là Thr hoặc Ser;
- Xaa4 là Arg, Lys, Ala hoặc Gly; và
- Xaa5 là Tyr hoặc Phe.

Phương án 12: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 11, trong đó:

a)

- Xaa1 là Pro, Ala hoặc Gly;
- Xaa2 là Asp hoặc Asn;
- Xaa3 là Thr;
- Xaa4 là Arg hoặc Lys; và
- Xaa5 là Tyr,

và/hoặc

b) trong đó CDR3 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. từ 186 đến 190.

Phương án 13: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 12, trong đó CDR3 đã nêu có trình tự axit amin Asp-Pro-Arg-Arg-Gly-Trp-Asp-Thr-Arg-Tyr (SEQ ID NO. 186).

Phương án 14: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 10, trong đó:

i) CDR1 đã nêu:

a) Có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 141;

b) Có trình tự axit amin với độ tương đồng về axit amin ít nhất 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 141;

c) Có trình tự axit amin với 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 141, trong đó:

- tại vị trí số 2 S được chuyển thành T, hoặc G;
- tại vị trí số 6 S được chuyển thành R;
- tại vị trí số 7 N được chuyển thành T; và/hoặc
- tại vị trí số 9 M được chuyển thành K; hoặc

d) Có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 141-145 và 213;

ii) CDR2 đã nêu:

a) Có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 164;

b) Có trình tự axit amin với độ tương đồng về axit amin ít nhất 70% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 164;

c) Có trình tự axit amin có 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 164, trong đó:

- tại vị trí số 1 G được chuyển thành A, L, V hoặc S;
- tại vị trí số 3 N được chuyển thành D, S, Q, G hoặc T;
- tại vị trí số 4 S được chuyển thành T, K, G hoặc P;
- tại vị trí số 5 V được chuyển thành A;
- tại vị trí số 6 G được chuyển thành D;
- tại vị trí số 7 I được chuyển thành T, hoặc V;
- tại vị trí số 8 T được chuyển thành A; và/hoặc
- tại vị trí số 9 K được chuyển thành R; hoặc

d) Có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 162-175 và 214-221; và

iii) CDR3 đã nêu:

a) Có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 186;

b) Có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 70% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 186;

c) có trình tự axit amin với 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 186, trong đó:

- tại vị trí số 2 P được chuyển thành A, hoặc G;
- tại vị trí số 7 D được chuyển thành N; và/hoặc
- tại vị trí số 9 R được chuyển thành K; hoặc

d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 186-190.

Phương án 15: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 10, trong đó:

i) CDR1 đã nêu có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 146;

ii) CDR2 đã nêu có trình tự axit amin mà: a) có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 176 hoặc b) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 176 hoặc 177; và

iii) CDR3 đã nêu có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 191.

Phương án 16: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 10, trong đó:

i) CDR1 đã nêu:

a) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 147; hoặc

b) có trình tự axit amin với 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 147, trong đó:

- tại vị trí số 1 G được chuyển thành K, R, hoặc A;
- tại vị trí số 2 T được chuyển thành I, P, S hoặc L;
- tại vị trí số 3 I được chuyển thành V, hoặc T;
- tại vị trí số 4 F được chuyển thành L;
- tại vị trí số 5 S được chuyển thành R, hoặc D;
- tại vị trí số 6 N được chuyển thành S, T, hoặc D; và/hoặc

- tại vị trí số 7 N được chuyển thành T, hoặc Y; hoặc
- c) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 147-161;
- ii) CDR2 đã nêu:
 - a) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 179; hoặc
 - b) có trình tự axit amin với 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 179, trong đó:
 - tại vị trí số 3 S được chuyển thành T, hoặc G;
 - tại vị trí số 4 N được chuyển thành S, hoặc I;
 - tại vị trí số 5 S được chuyển thành T;
 - tại vị trí số 6 G được chuyển thành Y; và/hoặc
 - tại vị trí số 8 T được chuyển thành A; hoặc
 - c) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 178-185; và
- iii) CDR3 đã nêu:
 - a) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 192; hoặc
 - b) có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 192; hoặc
 - c) có trình tự axit amin với 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 192, trong đó:
 - tại vị trí số 2 A được chuyển thành G;
 - tại vị trí số 8 T được chuyển thành S;
 - tại vị trí số 9 A được chuyển thành G; và/hoặc
 - tại vị trí số 10 Y được chuyển thành F; hoặc
 - d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 192-196.

Phương án 17: Polypeptit theo phương án 3, trong đó các trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 đã nêu lần lượt được nêu trong:

- SEQ ID NO. 141, 162 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 163 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 164 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 166 và 186; hoặc

- SEQ ID NO. 141, 167 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 167 và 189; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 168 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 168 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 169 và 190; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 170 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 171 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 174 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 175 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 142, 165 và 188; hoặc
- SEQ ID NO. 142, 173 và 188; hoặc
- SEQ ID NO. 143, 164 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 144, 172 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 145, 172 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 214 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 215 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 216 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 217 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 218 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 219 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 220 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 214 và 186.

Phương án 18: Polypeptit theo phương án 3, trong đó các trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 đã nêu lần lượt được nêu trong:

- SEQ ID NO. 146, 176 và 191; hoặc
- SEQ ID NO. 146, 177 và 191.

Phương án 19: Polypeptit theo phương án 3, trong đó các trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 lần lượt được nêu trong:

- SEQ ID NO. 147, 178 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 147, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 147, 179 và 194; hoặc

- SEQ ID NO. 148, 179 và 193; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 180 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 181 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 183 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 185 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 150, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 150, 182 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 151, 179 và 193; hoặc
- SEQ ID NO. 151, 182 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 151, 184 và 196; hoặc
- SEQ ID NO. 152, 179 và 195; hoặc
- SEQ ID NO. 153, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 154, 182 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 155, 179 và 195; hoặc
- SEQ ID NO. 156, 181 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 157, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 158, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 159, 178 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 160, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 161, 179 và 194.

Phương án 20: Polypeptit theo phương án 3, trong đó các trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 đã nêu lần lượt được nêu trong: SEQ ID NO. 141, 164 và 186, hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Phương án 21: Polypeptit theo phương án 3, trong đó các trình tự axit amin CDR1, CDR2 và CDR3 đã nêu lần lượt được nêu trong: SEQ ID NO. 213, 214 và 186, SEQ ID NO. 213, 221 và 186, hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Phương án 22: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 10, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự được nêu trong:

- a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3;

b) các trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3;

c) các trình tự axit amin với 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3; hoặc

d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1-48, 121-140 hoặc 222-224.

Phương án 23: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 10, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự được nêu trong:

a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49;

b) trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49;

c) trình tự axit amin với 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49; hoặc

d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 49-52.

Phương án 24: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 10, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự được nêu trong:

a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67;

b) trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67;

c) trình tự axit amin với 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67; hoặc

d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 53-120.

Phương án 25: Polypeptit theo phương án 2, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu bao gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 3.

Phương án 26: Polypeptit theo phương án 2, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 121-140 hoặc SEQ ID NO. 222-224.

Phương án 27: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây, trong đó polypeptit này được làm tương thích với người và/hoặc tối ưu hóa về độ ổn định, hiệu lực, khả năng sản xuất và/hoặc độ tương đồng với các vùng khung của người.

Phương án 28: Polypeptit theo phương án 27, trong đó polypeptit này được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự ở một hoặc nhiều vị trí sau (theo cách đánh số Kabat): 1, 11, 14, 16, 74, 83, 108.

Phương án 29: Polypeptit theo phương án 28, bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau: E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K83R, Q108L.

Phương án 30: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3-29, trong đó:

- i) FR1 được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 198-204;
- ii) FR2 được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 205-208;
- iii) FR3 được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 209-210; và/hoặc
- iv) FR4 được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 211-212.

Phương án 31: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 30, trong đó polypeptit này được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự ở một hoặc nhiều vị trí sau (theo cách đánh số Kabat): 52, 53.

Phương án 32: Polypeptit theo phương án 31, trong đó polypeptit này bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau: N52S, S53T.

Phương án 33: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 3 đến 32, trong đó CDR2 được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 214-221.

Phương án 34: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 33, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 đã nêu bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 138-140 hoặc 222-224.

Phương án 35: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 26, trong đó vùng VHH đã nêu bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã nêu.

Phương án 36: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 35, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch đã nêu ngăn chặn chéo sự liên

kết của ít nhất một trong số các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch nêu trong SEQ ID NO. 1-120, 121-140 và 222-224 với CX3CR1.

Phương án 37: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 35, trong đó liên kết của vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch đã nêu với CX3CR1 bị ngăn chặn chéo bởi ít nhất một trong số các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 1-120, 121-140 và 222-224.

Phương án 38: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 37, trong đó polypeptit này còn bao gồm gốc kéo dài thời gian bán thải.

Phương án 39: Polypeptit theo phương án 38, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải đã nêu liên kết cộng hóa trị với polypeptit và được chọn từ nhóm gồm gốc liên kết albumin, như vùng globulin miễn dịch kháng albumin, gốc liên kết transferin, như vùng globulin miễn dịch kháng transferin, phân tử polyetylen glycol, phân tử polyetylen glycol tái tổ hợp, albumin huyết thành người, đoạn của albumin huyết thanh người, peptit liên kết albumin hoặc vùng Fc.

Phương án 40: Polypeptit theo phương án 38 hoặc 39, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng albumin.

Phương án 41: Polypeptit theo phương án 40, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch được chọn từ vùng VHH, vùng VHH được làm tương thích với người, vùng VH được làm tương thích với lạc đà, kháng thể vùng, kháng thể vùng đơn và/hoặc "dAb".

Phương án 42: Polypeptit theo phương án 41, trong đó vùng biến đổi của globulin miễn dịch kháng albumin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 230-232.

Phương án 43: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 2 đến 39, trong đó polypeptit này được liên kết với phần Fc (như Fc người, ví dụ, như được nêu trong SEQ ID NO. 252), tùy ý qua liên kết thích hợp hoặc vùng bản lề.

Phương án 44: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 39, trong đó polypeptit này còn được liên kết với một hoặc nhiều vùng hằng định (ví dụ, 2 hoặc 3 vùng hằng định mà có thể được sử dụng như một phần của/để tạo thành phần Fc), với phần Fc và/hoặc với một hoặc nhiều phần, đoạn hoặc vùng của kháng thể tạo ra một hoặc nhiều chức năng đáp ứng cho polypeptit theo sáng chế và/hoặc có

thể tạo ra khả năng liên kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc, tùy ý qua liên kết thích hợp hoặc vùng bản lề.

Phương án 45: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 37, trong đó polypeptit này còn bao gồm vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch, tốt hơn là vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1.

Phương án 46: Polypeptit theo phương án 45, trong đó các vùng biến đổi đơn thứ nhất và thứ hai của globulin miễn dịch được liên kết cộng hóa trị bằng peptit liên kết.

Phương án 47: Polypeptit theo phương án 45 hoặc 46, trong đó vùng các vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch về cơ bản bao gồm bốn vùng khung (FR1 đến FR4) và ba vùng quyết định bổ trợ (CDR1 đến CDR3).

Phương án 48: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 47, trong đó các vùng biến đổi đơn thứ nhất và thứ hai của globulin miễn dịch là vùng của kháng thể.

Phương án 49: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 48, trong đó các vùng biến đổi đơn thứ nhất và thứ hai của globulin miễn dịch là VH, VL, VHH, VH được làm tương thích với lạc đà, hoặc VHH được tối ưu hóa về độ ổn định, hiệu lực, khả năng sản xuất và/hoặc độ tương đồng với các vùng khung của người.

Phương án 50: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 49, trong đó CDR1 đến CDR3 đã nêu của vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ hai được nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ 11 đến 21.

Phương án 51: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 50, trong đó các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch thứ nhất và thứ hai bao gồm cùng CDR3.

Phương án 52: Polypeptit theo phương án 51, trong đó CDR3 được nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án 11 đến 13.

Phương án 53: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 53, trong đó các vùng biến đổi đơn thứ nhất và thứ hai của globulin miễn dịch bao gồm cùng CDR1, CDR2 và CDR3.

Phương án 54: Polypeptit theo phương án 53, trong đó CDR1 đến CDR3 đã nêu được nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án 11 đến 21.

Phương án 55: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 54, trong đó các vùng biến đổi đơn thứ nhất và thứ hai của globulin miễn dịch bao gồm cùng vùng VHH.

Phương án 56: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 55, trong đó vùng VHH được nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án 22 đến 37.

Phương án 57: Polypeptit bao gồm vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong SEQ ID NO. 141, 164 và 186 hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186 và vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch được nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án 2 đến 37.

Cụ thể, polypeptit này có thể là polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 45 đến 56.

Phương án 58: Polypeptit theo phương án 57, trong đó vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong SEQ ID NO. 213, 214 và 186, SEQ ID NO. 213, 221 và 186 hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Phương án 59: Polypeptit theo phương án 57 hoặc 58, trong đó vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch chứa CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong SEQ ID NO. 141, 164 và 186 hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Phương án 60: Polypeptit theo phương án 57 hoặc 58, trong đó vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong: SEQ ID NO. 213, 214 và 186, SEQ ID NO. 213, 221 và 186 hoặc SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Phương án 61: Polypeptit bao gồm vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch, trong đó vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch này là vùng VHH bao gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 3 và vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 2 đến 37.

Cụ thể, polypeptit này có thể là polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 45 đến 60.

Phương án 62: Polypeptit theo phương án 61, trong đó vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 121-140 hoặc 222-224.

Phương án 63: Polypeptit theo phương án 61 hoặc 62, trong đó vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 3.

Phương án 64: Polypeptit theo phương án 63, trong đó vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch đã nêu là vùng VHH bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 121-140 hoặc 222-224.

Phương án 65: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 64, trong đó polypeptit này còn bao gồm thêm gốc kéo dài thời gian bán thải.

Phương án 66: Polypeptit theo phương án 65, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải được liên kết cộng hóa trị với polypeptit này và được chọn từ nhóm gồm gốc liên kết albumin, như vùng của globulin miễn dịch kháng albumin, gốc liên kết transferin như vùng của globulin miễn dịch kháng transferin, phân tử polyetylen glycol, phân tử polyetylen glycol tái tổ hợp, albumin huyết thanh người, đoạn albumin huyết thanh người, peptit liên kết albumin hoặc vùng Fc.

Phương án 67: Polypeptit theo phương án 66, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng albumin.

Phương án 68: Polypeptit theo phương án 67, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch được chọn từ vùng VHH, vùng VHH được làm cho có đặc tính giống của người, vùng VH được làm tương thích với lạc đà, kháng thể vùng, kháng thể vùng đơn và/hoặc "dAb".

Phương án 69: Polypeptit theo phương án 68, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng albumin được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 230-232.

Phương án 70: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 64, trong đó polypeptit này được liên kết với phần Fc (như phần Fc người, ví dụ được nêu trong SEQ ID NO. 252), tùy ý qua liên kết thích hợp hoặc vùng bản lề.

Phương án 71: Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 45 đến 66, trong đó polypeptit này còn được liên kết với một hoặc nhiều vùng hằng định (ví dụ, 2 hoặc 3 vùng hằng định mà có thể được sử dụng như một phần của/để tạo ra

phần Fc), với phần Fc và/hoặc với một hoặc nhiều phân, đoạn hoặc vùng của kháng thể mà tạo ra một hoặc nhiều chức năng đáp ứng cho polypeptit theo sáng chế và/hoặc có thể tạo ra khả năng liên kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc, tùy ý qua liên kết thích hợp hoặc vùng bản lề.

Phương án 72: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 225-227.

Phương án 73: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 249 hoặc 277-281.

Phương án 74: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 257-262.

Phương án 75: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 253 hoặc 254.

Phương án 76: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 263 hoặc 266.

Phương án 77: Polypeptit bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 267-276 và 282.

Phương án 78: Phân tử axit nucleic bao gồm vùng mã hóa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77.

Phương án 79: Vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic theo phương án 78.

Phương án 80: Tế bào chủ mang vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic, phân tử axit nucleic này bao gồm vùng mã hóa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, trong đó tế bào chủ này có khả năng biểu hiện polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, và trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân điển hình.

Phương án 81: Dược phẩm chứa (i) một hoặc nhiều polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 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.

Phương án 82: Phương pháp sản xuất polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện để biểu hiện polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77,

trong đó tế bào chủ này mang vector biểu hiện bao gồm phân tử axit nucleic, phân tử axit nucleic này chứa vùng mã hóa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, và trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào có nhân điển hình;

- thu hồi polypeptit; và
- tinh chế polypeptit này.

Phương án 83: Phương pháp sử dụng polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 để điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý, cụ thể là ở người.

Phương án 84: Phương pháp theo phương án 83, trong đó trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến CX3CR1.

Phương án 85: Phương pháp theo phương án 83, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh xơ vữa động mạch.

Phương án 86: Dược phẩm tiêm được chứa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, dược phẩm này thích hợp để tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da cho người.

Phương án 87: Phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến CX3CR1, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng có tác dụng dược lý của ít nhất một polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 nếu cần.

Phương án 88: Phương pháp theo phương án 85, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng sử dụng tác nhân điều trị bổ sung được chọn từ nhóm gồm statin, chất chống tiểu cầu, chất chống đông, thuốc chống tiểu đường và thuốc chống cao huyết áp.

Phương án 89: Phương pháp ức chế sự liên kết của CX3CR1 với fractalkin trong tế bào động vật có vú, bao gồm việc đưa polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 vào tế bào này, nhờ đó việc truyền tín hiệu bởi fractalkin bị ức chế.

Phương án 90: Phương pháp phát hiện và/hoặc định lượng CX3CR1 trong mẫu sinh học bằng cách cho mẫu tiếp xúc với polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 và phát hiện liên kết của polypeptit này với CX3CR1.

Phương án 91: Phương pháp chẩn đoán rối loạn có liên quan đến CX3CR1 hoặc xác định xem đối tượng có nguy cơ phát triển rối loạn có liên quan đến CX3CR1 gia tăng, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho mẫu sinh học thu từ đối tượng tiếp xúc với polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 và phát hiện liên kết của polypeptit này với CX3CR1 để xác định mức biểu hiện hoặc nồng độ CX3CR1.

Phương án 92. Polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 để sử dụng trong việc điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở người.

Phương án 93. Polypeptit theo phương án 92, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến CX3CR1.

Phương án 94. Polypeptit theo phương án 92, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý được chọn từ các rối loạn xơ vữa động mạch ở tim và mạch não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh tái phát hẹp, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm thận tiểu cầu hình liềm ở người, bệnh thận IgA, bệnh màng thận, bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch bao gồm ban xuất huyết Henoch-Schonlein và bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, thải loại đoạn ghép, bệnh xơ cứng toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh và bệnh hủy myelin, bệnh xơ cứng rải rác (multiple sclerosis - MS), bệnh Alzheimer, các bệnh phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh hen, đau do căn nguyên thần kinh, đau do viêm, hoặc bệnh ung thư.

Phương án 95. Polypeptit theo phương án 92, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh xơ vữa động mạch.

Phương án 96. Sử dụng polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77 để sản xuất thuốc để điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý ở người.

Phương án 97. Phương pháp theo phương án 87, trong đó bệnh hoặc rối loạn được chọn từ các rối loạn xơ vữa động mạch ở tim và mạch não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh tái phát hẹp, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm thận tiểu cầu hình liềm ở người, bệnh thận IgA, bệnh màng thận, bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch bao gồm ban xuất huyết Henoch-Schonlein và bệnh u hạt

Wegener, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, thải loại đoạn ghép, bệnh xơ cứng toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh và bệnh hủy myelin, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh Alzheimer, bệnh phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh hen, đau do căn nguyên thần kinh, đau do viêm, hoặc bệnh ung thư.

Phương án 98. Phương pháp theo phương án 87, trong đó bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là bệnh xơ vữa động mạch.

Phương án 99. Kit chẩn đoán hoặc phương pháp chẩn đoán bao gồm polypeptit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 77, hoặc sử dụng chúng.

Phương án 100. Kit chẩn đoán hoặc phương pháp chẩn đoán theo phương án 99, để chẩn đoán ít nhất một trong số các rối loạn xơ vữa động mạch ở tim và mạch não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh tái phát hẹp, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm thận tiểu cầu hình liềm ở người, bệnh thận IgA, bệnh màng thận, bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch bao gồm ban xuất huyết Henoch-Schonlein và bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, thải loại đoạn ghép, bệnh xơ cứng toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh và bệnh hủy myelin, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh Alzheimer, bệnh phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh hen, đau do căn nguyên thần kinh, đau do viêm, hoặc bệnh ung thư.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Các phương án nêu trên cũng như các khía cạnh và phương án khác của sáng chế sẽ được mô tả rõ hơn trong phần mô tả chi tiết dưới đây, trong đó:

a) Trừ khi quy định hoặc định nghĩa khác, mọi thuật ngữ được sử dụng có nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực, nghĩa này đã rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, các tài liệu 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 các giải pháp kỹ thuật chung được viện dẫn ở đây; Hơn nữa, trừ khi được quy định khác, tất cả các phương pháp, bước, kỹ thuật và thao tác không đặc biệt được mô tả chi tiết có thể được thực hiện và đã được thực hiện theo cách đã biết về thực chất, như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết

rõ. Tham khảo, ví dụ, các tài liệu chuẩn, giải pháp kỹ thuật chung đã biết trên đây và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó;

b) Trừ khi được quy định khác, các thuật ngữ "globulin miễn dịch" và "trình tự globulin miễn dịch" – khi được sử dụng trong bản mô tả chỉ kháng thể chuỗi nặng hoặc kháng thể 4-chuỗi thông thường – được sử dụng làm thuật ngữ chung bao gồm cả kháng thể có kích cỡ đầy đủ, các chuỗi riêng rẽ của nó, cũng như tất cả các phần, vùng hoặc đoạn của nó (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các vùng hoặc đoạn liên kết kháng nguyên như lần lượt các vùng VHH hoặc vùng VH/VL). Ngoài ra, thuật ngữ "trình tự" theo sáng chế (ví dụ, trong thuật ngữ như "trình tự globulin miễn dịch", "trình tự kháng thể", "trình tự vùng biến đổi (đơn)", "Trình tự VHH" hoặc "trình tự protein"), cần được hiểu chung là bao gồm cả trình tự axit amin tương ứng cũng như trình tự axit nucleic hoặc trình tự nucleotit mã hóa chúng, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi cách hiểu hạn chế hơn;

c) Thuật ngữ "vùng" (của polypeptit hoặc protein) theo sáng chế chỉ cấu trúc protein gấp cuộn có khả năng giữ được cấu trúc bậc ba của nó độc lập với phần còn lại của protein. Nói chung, các vùng chịu trách nhiệm về các đặc tính chức năng riêng rẽ của protein, và trong nhiều trường hợp có thể được thêm vào, loại bỏ hoặc chuyển sang protein khác mà không làm mất chức năng của phần còn lại của protein và/hoặc của vùng.

d) Thuật ngữ "vùng globulin miễn dịch" theo sáng chế chỉ vùng hình cầu của chuỗi kháng thể (như ví dụ, chuỗi của kháng thể 4-chuỗi thông thường hoặc của kháng thể chuỗi nặng), hoặc chỉ polypeptit về cơ bản bao gồm các vùng hình cầu đó. Các vùng globulin miễn dịch đặc trưng ở chỗ chúng duy trì đặc tính gấp cuộn kiểu globulin miễn dịch của phân tử kháng thể mà bao gồm cấu trúc kiểu bánh kẹp hai lớp (2-layer sandwich) của khoảng 7 chuỗi beta đối song song trong hai tấm beta, tùy ý được làm ổn định bằng liên kết disulfua bảo toàn.

e) Thuật ngữ "vùng biến đổi của globulin miễn dịch" theo sáng chế chỉ vùng globulin miễn dịch về cơ bản bao gồm bốn "vùng khung" trong lĩnh vực này và dưới đây được gọi lần lượt là "vùng khung 1" hoặc "FR1"; "vùng khung 2" hoặc "FR2"; "vùng khung 3" hoặc "FR3"; và "vùng khung 4" hoặc "FR4"; các vùng khung này bị ngắt bởi ba "vùng quyết định bổ trợ" hoặc "CDR", trong lĩnh vực này và dưới đây được gọi lần lượt là "vùng quyết định bổ trợ 1" hoặc "CDR1"; "vùng quyết định bổ trợ

2" hoặc "CDR2"; và "vùng quyết định hỗ trợ 3" hoặc "CDR3". Do đó, cấu trúc hoặc trình tự tổng thể của vùng biến đổi của globulin miễn dịch có thể được mô tả như sau: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. (Các) vùng biến đổi của globulin miễn dịch tạo ra tính đặc hiệu của kháng thể đối với kháng nguyên nhờ có vị trí liên kết kháng nguyên.

f) Các thuật ngữ "vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch" và "vùng biến đổi đơn" theo sáng chế chỉ vùng biến đổi của globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop của kháng nguyên mà không bắt cặp với vùng biến đổi khác của globulin miễn dịch. Ví dụ về vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo nghĩa của sáng chế là "các kháng thể vùng", như các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch VH và VL (vùng VH và vùng VL). Ví dụ khác về các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch là "các vùng VHH" (hoặc đơn giản là các "VHH") từ lạc đà, như được định nghĩa dưới đây.

Theo các định nghĩa trên, vùng liên 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 đoạn Fab, đoạn F(ab')₂, đoạn Fv như đoạn Fv hoặc scFv được liên kết disulfua, hoặc diabody (tất cả đã biết trong lĩnh vực này) thu được từ kháng thể 4-chuỗi thông thường, thường không được xem là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, vì trong những trường hợp này, liên kết với epitop tương ứng của kháng nguyên thường không xảy ra bởi một vùng globulin miễn dịch (duy nhất) mà bởi cặp vùng globulin miễn dịch (có liên quan) như các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tức là bởi cặp VH-VL của các vùng globulin miễn dịch, mà liên kết với epitop của kháng nguyên tương ứng.

f1) "vùng VHH", còn gọi là VHH, vùng V_{HH}, đoạn kháng thể VHH, và kháng thể VHH, ban đầu được mô tả là vùng (biến đổi) globulin miễn dịch liên kết kháng nguyên của "kháng thể chuỗi nặng" (tức là của "kháng thể không có 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 "vùng VHH" được chọn để phân biệt vùng biến đổi này với các vùng biến đổi của chuỗi nặng có trong kháng thể 4-chuỗi thông thường (trong bản mô tả gọi là "vùng V_H" hoặc "vùng VH") và với các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trong kháng thể 4-chuỗi thông thường (trong bản mô tả gọi

là "vùng VL" hoặc "vùng VL"). Các vùng VHH có thể liên kết đặc hiệu với epitop mà không có vùng liên kết kháng nguyên bổ sung (trái với các vùng VH hoặc VL của kháng thể 4-chuỗi thông thường, trong trường hợp đó epitop được nhận biết bởi vùng VL cùng với vùng VH). Các vùng VHH nhỏ, đơn giản và là các đơn vị nhận diện kháng nguyên hữu hiệu được tạo ra bởi vùng globulin miễn dịch đơn.

Theo sáng chế, các thuật ngữ vùng VHH, VHH, vùng V_HH, đoạn kháng thể VHH, kháng thể VHH, cũng như "Nanobody®" và "vùng Nanobody®" ("Nanobody" là nhãn hàng của công ty Ablynx N.V.; Ghent; Belgium) được dùng thay thế cho nhau và đều chỉ các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch (có cấu trúc: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 và liên kết đặc hiệu với epitop mà không cần sự có mặt của vùng biến đổi thứ hai của globulin miễn dịch), và mà phân biệt với các vùng VH còn gọi là "các gốc tiêu chuẩn", như xác định trong ví dụ, WO2009/109635, Fig. 1.

Các gốc axit amin của vùng VHH được đánh số theo cách đánh số thông thường cho các vùng V_H của Kabat và cộng sự ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), như áp dụng cho các vùng VHH lạc đà, như nêu trong ví dụ, Fig.2 của tài liệu Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). Theo cách đánh số này,

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

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng – như đã biết rõ trong lĩnh vực này đối với các vùng V_H và các vùng VHH – tổng số gốc axit amin của mỗi CDR có thể thay đổi và có thể không tương ứng với tổng số gốc axit amin theo cách đánh số Kabat (tức là, một hoặc nhiều vị trí theo cách đánh số Kabat có thể không có trong trình tự thực tế, hoặc trình tự thực tế có thể chứa nhiều gốc axit amin hơn so với số được cho phép theo cách đánh số Kabat). Nói chung, điều này có nghĩa là cách đánh số theo Kabat có thể tương ứng hoặc không tương ứng với cách đánh số các gốc axit amin thực tế trong trình tự thực tế.

Các phương pháp khác để đánh số các gốc axit amin của vùng V_H, mà cũng có thể áp dụng theo cách tương tự trên các vùng V_HH, đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, trong phần mô tả, yêu cầu bảo hộ và các hình vẽ, cách đánh số là theo Kabat và như được áp dụng với các vùng V_HH theo mô tả trên đây, trừ khi được quy định khác.

Tổng số gốc axit amin trong các vùng V_HH thường nằm trong khoảng từ 110 đến 120, thường nằm trong khoảng từ 112 đến 115. Tuy nhiên cần lưu ý rằng các trình tự ngắn hơn và dài hơn cũng có thể thích hợp để mô tả trong bản mô tả này.

Các đặc điểm cấu trúc và đặc điểm chức năng khác của các vùng V_HH và các polypeptit chứa chúng có thể được tóm tắt như sau:

Các vùng V_HH (đã được "thiết kế" nhờ bản chất liên kết chức năng với kháng nguyên không có sự có mặt và không có tương tác với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ) có chức năng như một đơn vị, vùng hoặc polypeptit cấu trúc liên kết kháng nguyên chức năng đơn, tương đối nhỏ. Điều này làm cho các vùng V_HH khác với các vùng V_H và V_L của kháng thể 4-chuỗi thông thường, các vùng này thường không thích hợp để dùng như một protein liên kết kháng nguyên đơn lẻ hoặc vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, mà cần kết hợp ở một số hình thức để tạo ra đơn vị liên kết kháng nguyên chức năng (ví dụ như trong các đoạn kháng thể thông thường như đoạn Fab; chuỗi scFv bao gồm vùng V_H liên kết cộng hóa trị với vùng V_L).

Nhờ những đặc tính đặc biệt này, việc sử dụng các vùng V_HH – một mình hoặc kết hợp trong polypeptit lớn hơn – đem lại nhiều ưu điểm đáng chú ý so với việc sử dụng các vùng V_H và V_L thông thường, chuỗi scFv hoặc các đoạn kháng thể thông thường (các đoạn như Fab- hoặc F(ab')₂):

- chỉ cần một vùng đơn để liên kết kháng nguyên với ái lực cao và độ chọn lọc cao, do đó không cần sự có mặt của hai vùng riêng rẽ, cũng như đảm bảo rằng hai vùng đó có mặt trong cấu trúc không gian và cấu hình đúng (tức là thông qua các cầu nối được thiết kế đặc biệt, như với scFv);

- các vùng V_HH có thể được biểu hiện từ một gen duy nhất và không cần gấp cuộn hoặc cải biến sau khi dịch mã;

- các vùng V_HH có thể dễ dàng được thao tác di truyền thành các dạng đa giá và đa đặc hiệu (như sẽ được thảo luận tiếp trong bản mô tả);

- các vùng V_HH hòa tan tốt và không có xu hướng kết tụ (như các vùng liên kết kháng nguyên của chuột thu theo mô tả của Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989));

- các vùng VHH có độ ổn định cao với nhiệt độ, độ pH, các proteaza và các tác nhân hoặc điều kiện gây biến tính khác và, do đó, có thể được sản xuất, bảo quản hoặc vận chuyển mà không cần dùng các thiết bị lạnh, tiết kiệm được chi phí vận chuyển, thời gian và bảo vệ môi trường;

- việc tạo ra các vùng VHH dễ dàng và tương đối rẻ, ngay cả trong quy mô sản xuất. Ví dụ, các vùng VHH và polypeptit chứa chúng có thể được sản xuất bằng cách lên men vi sinh vật (ví dụ, như được mô tả thêm dưới đây) và không cần sử dụng hệ biểu hiện động vật có vú, như với, ví dụ, các đoạn kháng thể thông thường;

- các vùng VHH tương đối nhỏ (khoảng 15 kDa, hoặc nhỏ hơn IgG thông thường 10 lần) so với kháng thể 4-chuỗi thông thường và các đoạn liên kết kháng nguyên của nó, và do đó

-- thể hiện khả năng thâm nhập vào mô cao hơn và

-- có thể dùng được ở liều cao hơn

so với kháng thể 4-chuỗi thông thường và các đoạn liên kết kháng nguyên của nó;

- các vùng VHH có thể thể hiện các đặc tính liên kết vào hốc (nhờ vòng CDR3 kéo dài của chúng, bên cạnh các đặc tính khác, so với các vùng VH thông thường) và do đó có thể tiếp cận đích và epitop mà kháng thể 4-chuỗi thông thường và đoạn liên kết kháng nguyên có nó không tiếp cận được.

Các phương pháp tạo ra vùng VHH liên kết với kháng nguyên hoặc epitop đặc hiệu đã được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ, trong WO2006/040153 và WO2006/122786. Như cũng được mô tả chi tiết trong bản mô tả, các vùng VHH thu được từ lạc đà có thể được "làm cho có đặc tính giống của người" bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự axit amin của trình tự VHH gốc bằng một hoặc nhiều gốc axit amin có ở (các) vị trí tương ứng trong vùng VH từ kháng thể 4-chuỗi thông thường của người. Vùng VHH được làm tương thích với người có thể chứa một hoặc nhiều trình tự vùng khung của người, và, theo một phương án cụ thể hơn, vùng này có thể chứa các trình tự vùng khung của người thu được từ DP-29, DP-47, DP-51, hoặc từng phần của chúng, tùy ý kết hợp với các trình tự JH, như JH5.

f2) "Kháng thể vùng", còn gọi là "Dab", "Domain Antibodies", và "dAb" (các thuật ngữ "Domain Antibodies" và "dAb" được dùng làm nhãn hiệu của 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 vùng chủ yếu tương ứng với các vùng VH hoặc VL của động vật có vú không phải lạc đà, cụ thể là các kháng thể 4-chuỗi của người. Để liên kết với epitop dưới dạng vùng liên kết kháng nguyên duy nhất, tức là không kết cặp với lần lượt các vùng VL hoặc VH, cần phải chọn lọc đặc hiệu các đặc tính liên kết kháng nguyên, ví dụ, bằng cách sử dụng thư viện các trình tự vùng VH hoặc VL đơn của người.

Các kháng thể vùng, giống như các VHH, có phân tử lượng khoảng 13 đến 16 kDa và, nếu có nguồn gốc từ các trình tự đầy đủ của người thì không cần làm tương thích với người, ví dụ, để sử dụng trong trị liệu cho người. Cũng như trong các trường hợp vùng VHH, chúng cũng được biểu hiện tốt trong các hệ biểu hiện tế bào nhân sơ, làm giảm đáng kể chi phí sản xuất.

Các kháng thể vùng, cũng như các vùng VHH, có thể được làm tăng ái lực bằng cách đưa vào một hoặc nhiều thay đổi trong trình tự axit amin của một hoặc nhiều CDR, những thay đổi này dẫn đến sự cải thiện ái lực của vùng 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 vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch được làm tăng ái lực theo sáng chế có thể được tạo ra 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 và RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

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

g) Các thuật ngữ "epitop" và "quyết định kháng nguyên", mà có thể được dùng thay đổi cho nhau, chỉ một phần của phân tử lớn, như polypeptit, được nhận biết bởi các phân tử liên kết kháng nguyên, như các kháng thể thông thường hoặc các polypeptit theo sáng chế, và cụ thể hơn nhận biết bởi vị trí liên kết kháng nguyên của các phân tử này. Các epitop định ra vị trí liên kết tối thiểu cho globulin miễn dịch, và do đó là đích đặc hiệu của globulin miễn dịch.

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

h) Thuật ngữ phân tử liên kết (kháng nguyên-) "biparatop" hoặc polypeptit "biparatop" theo sáng chế chỉ polypeptit bao gồm vùng biến đổi đơn thứ nhất của globulin miễn dịch và vùng biến đổi đơn thứ hai của globulin miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả, trong đó hai vùng biến đổi này có khả năng liên kết với hai epitop khác nhau của một kháng nguyên, các epitop này thường không liên kết ở cùng thời điểm với một globulin miễn dịch đặc hiệu đơn, như ví dụ, kháng thể thông thường hoặc vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch. Các polypeptit biparatop có thể bao gồm các vùng biến đổi có tính đặc hiệu epitop khác nhau, và không chứa các cặp vùng biến đổi bổ sung chung mà liên kết với cùng một epitop. Do đó, hai vùng biến đổi này không bổ sung với nhau để liên kết với đích.

i) Polypeptit (như globulin miễn dịch, kháng thể, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, polypeptit theo sáng chế, hoặc nói chung là phân tử liên kết kháng nguyên hoặc đoạn của nó) mà có thể "liên kết với" hoặc "liên kết đặc hiệu với", mà "có ái lực với" và/hoặc "có tính đặc hiệu với" epitop, kháng nguyên hoặc protein nhất định (hoặc với ít nhất một phần, đoạn hoặc epitop của nó) được cho là "kháng" hoặc "hướng đến" epitop, kháng nguyên hoặc protein này hoặc phân tử "liên kết" tương ứng với epitop, kháng nguyên hoặc protein, hoặc được cho là "kháng"-epitop, "kháng"-kháng nguyên hoặc "kháng"-protein (ví dụ, kháng-CX3CR1).

k) Nói chung, thuật ngữ "độ đặc hiệu" chỉ số loại kháng nguyên hoặc epitop khác nhau mà phân tử liên kết kháng nguyên hoặc protein liên kết kháng nguyên cụ thể (như globulin miễn dịch, kháng thể, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, hoặc polypeptit theo sáng chế) có thể liên kết. Độ đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên có thể được xác định dựa trên ái lực và/hoặc ái tính của nó. Ái lực, biểu thị bằng hằng số cân bằng của quá trình phân tách kháng nguyên với protein liên kết

kháng nguyên (KD), là đại lượng đo độ bền liên kết giữa epitop và vị trí liên kết kháng nguyên trên protein liên kết kháng nguyên: hằng số KD càng thấp thì liên độ bền liên kết giữa epitop phân tử liên kết kháng nguyên càng cao (nói cách khác, ái lực cũng có thể biểu thị dưới dạng hằng số ái lực (KA), tức là $1/KD$). Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ (ví dụ, trên cơ sở của bản mô tả), ái lực có thể được xác định theo cách đã biết, tùy thuộc vào kháng nguyên cụ thể được quan tâm. Ái tính là đại lượng đo độ bền của liên kết giữa phân tử liên kết kháng nguyên (như globulin miễn dịch, kháng thể, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, hoặc polypeptit theo sáng chế) và kháng nguyên thích hợp. Ái tính liên quan đến cả ái lực giữa epitop và vị trí liên kết kháng nguyên của nó trên phân tử liên kết kháng nguyên và số vị trí liên kết kháng nguyên thích hợp có trên phân tử liên kết kháng nguyên.

1) Các gốc axit amin được biểu thị theo mã axit amin ba chữ cái hoặc một chữ cái chuẩn, như đã biết và đồng thuận trong lĩnh vực này. Khi so sánh hai trình tự axit amin, thuật ngữ "khác biệt về axit amin" chỉ việc thêm, bớt hoặc thế số các gốc axit amin xác định ở vị trí của trình tự đối chứng, so với trình tự thứ hai. Trong trường hợp thế, tốt hơn nếu các phép thế là các phép thế axit amin bảo tồn, nghĩa là gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có cấu trúc hóa học tương tự và ít hoặc gần như không ảnh hưởng đến chức năng, hoạt tính hoặc các đặc tính sinh học khác của polypeptit. Các phép thế axit amin bảo tồn đã được biết rõ trong lĩnh vực này, ví dụ từ WO 98/49185, trong đó các phép thế axit amin bảo tồn là các phép thế trong đó một axit amin thuộc các nhóm (i) - (v) sau được thế bằng một gốc axit amin khác trong cùng nhóm: (i) các gốc nhỏ, béo, không phân cực hoặc ít phân cực: Ala, Ser, Thr, Pro và Gly; (ii) các gốc phân cực, tích điện âm và các amit (không tích điện) của chúng: Asp, Asn, Glu và Gln; (iii) các gốc phân cực, tích điện dương: His, Arg và Lys; (iv) các gốc lớn, béo, không phân cực: Met, Leu, Ile, Val và Cys; và (v) các gốc thơm: Phe, Tyr và Trp. Đặc biệt ưu tiên, các phép thế axit amin bảo tồn sau:

Ala thế bằng Gly hoặc thế bằng Ser;

Arg thế bằng Lys;

Asn thế bằng Gln hoặc thế bằng His;

Asp thế bằng Glu;

Cys thế bằng Ser;

Gln thế bằng Asn;

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

m) Phân tử axit nucleic hoặc polypeptit được xem là "(ở dạng) gần như độc lập" - ví dụ, so với nguồn sinh học tự nhiên của nó và/hoặc môi trường phản ứng hoặc môi trường nuôi cấy mà từ đó thu được phân tử này – khi nó được tách ra khỏi ít nhất một thành phần khác mà nó thường có liên quan trong nguồn hoặc môi trường đó, như axit nucleic khác, protein/polypeptit khác, thành phần sinh học hoặc đại phân tử khác hoặc ít nhất một tác nhân gây nhiễm, tạp chất hoặc thành phần thứ yếu. Cụ thể, phân tử axit nucleic hoặc polypeptit được xem là "gần như độc lập" khi nó đã được tinh chế ít nhất 2 lần, đặc biệt là ít nhất 10 lần, đặc biệt hơn là ít nhất 100 lần, và lên tới 1000 lần hoặc hơn. Tốt hơn nếu, phân tử axit nucleic hoặc polypeptit "ở dạng gần như độc lập" là gần như tương đồng, như được xác định bằng kỹ thuật thích hợp, như kỹ thuật sắc ký thích hợp, như điện di trên gel polyacrylamit;

n) "Độ tương đồng về trình tự" giữa ví dụ, hai trình tự vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch chỉ tỷ lệ phần trăm các axit amin tương đồng giữa hai trình tự này. Có thể tính hoặc xác định độ tương đồng như được mô tả ở đoạn f) trang 49 và 50 của WO08/020079. "Độ tương đồng về trình tự" chỉ tỷ lệ phần trăm các axit amin tương đồng hoặc đại diện cho các phép thế axit amin bảo tồn.

Tính đặc hiệu đích

Các polypeptit theo sáng chế có tính đặc hiệu với CX3CR1 người. Do đó, tốt hơn nếu các polypeptit theo sáng chế liên kết với CX3CR1 người (SEQ ID NO. 255). Theo một khía cạnh, các polypeptit theo sáng chế cũng liên kết với khỉ cynomolgus CX3CR1 (SEQ ID NO. 256).

Các polypeptit theo sáng chế

Sáng chế đề xuất các tác nhân có hoạt tính được lý mới để ngăn ngừa, điều trị, làm thuyên giảm và/hoặc chẩn đoán các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến CX3CR1, các bệnh tim mạch. Cụ thể, sáng chế đề xuất các polypeptit liên kết với CX3CR1 người và có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người. Theo một khía cạnh, polypeptit này là globulin miễn dịch bao gồm vùng liên kết kháng nguyên gồm ba vùng quyết định bổ trợ CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó globulin miễn dịch này liên kết với CX3CR1 người và có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người. Theo một phương án khác, polypeptit này chứa một hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1, trong đó polypeptit này có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế đặc trưng bởi một hoặc nhiều đặc tính sau:

- Liên kết ái lực cao với CX3CR1 người, ví dụ ở EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, như được xác định bằng phương pháp FACS liên kết tế bào;
- Ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người, ví dụ ở IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 300nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 20nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM;
- Ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra qua trung gian CX3CR1 người, ví dụ ở IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 500nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 75nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 50nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM; hiệu quả ức chế thu được lớn hơn hoặc bằng 15%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 50%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 80%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 95%;

- Ước chế sự nhập nội do fractalkin gây ra qua trung gian CX3CR1 người, ví dụ ở IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM;
- Phản ứng chéo với CX3CR1 khi cynomolgus, ví dụ trong phạm vi 10 lần E/IC_{50} của CX3CR1 người về liên kết và ước chế chức năng.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế còn bao gồm gốc kéo dài thời gian bán thải, ví dụ gốc liên kết albumin, phân tử polyetylen glycol hoặc vùng Fc. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1. Theo một khía cạnh, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 được liên kết cộng hóa trị bằng peptit liên kết. Theo một khía cạnh, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có cùng trình tự axit amin. Theo khía cạnh khác, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có các trình tự axit amin khác nhau. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 và còn bao gồm gốc kéo dài thời gian bán thải, ví dụ gốc liên kết albumin, phân tử polyetylen glycol hoặc vùng Fc.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 thứ nhất liên kết cộng hóa trị với gốc liên kết albumin bằng peptit liên kết thứ nhất, trong đó gốc liên kết albumin này còn liên kết cộng hóa trị với vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 thứ hai bằng peptit liên kết thứ hai.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 liên kết cộng hóa trị với vùng Fc bằng peptit liên kết. Theo một khía cạnh, polypeptit này bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 liên kết cộng hóa trị với vùng Fc bằng peptit liên kết được tạo a dưới dạng dime, ví dụ qua các cầu disulfua.

Các polypeptit theo sáng chế thu được như được mô tả sau đây. Tóm lại, các vùng biến đổi đơn theo sáng chế được nhận dạng từ thư viện biểu hiện các vùng biến đổi đơn (VHH) thu được từ lạc đà không bướu được gây miễn dịch bằng AD mã hóa CX3CR1 người. Thư viện thể thực khuẩn được sàng lọc trên các tiểu thể giống virus hCX3CR1 và thể thực khuẩn liên kết được sàng lọc về khả năng cạnh tranh liên kết

thụ thể với fractalkin được đánh dấu Alexa-flo (AF-FKN). Các vùng biến đổi đơn đại diện theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả chi tiết hơn.

Theo một khía cạnh, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế về cơ bản bao gồm bốn vùng khung (FR1, FR2, FR3 và FR4) và ba vùng quyết định bổ trợ (CDR1, CDR2 và CDR3). Cụ thể, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có cấu trúc FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Theo một khía cạnh, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch là vùng kháng thể.

Theo một khía cạnh, CDR3 của polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế có trình tự axit amin Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 như trong SEQ ID NO. 197, trong đó:

- Xaa1 là Pro, Ala hoặc Gly;
- Xaa2 là Asp hoặc Asn;
- Xaa3 là Thr hoặc Ser;
- Xaa4 là Arg, Lys, Ala hoặc Gly; và
- Xaa5 là Tyr hoặc Phe.

Theo một khía cạnh, CDR3 của polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có trình tự axit amin Asp-Xaa1-Arg-Arg-Gly-Trp-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5 như nêu trong SEQ ID NO. 197, trong đó:

- Xaa1 là Pro, Ala hoặc Gly;
- Xaa2 là Asp hoặc Asn;
- Xaa3 là Thr;
- Xaa4 là Arg hoặc Lys; và
- Xaa5 là Tyr.

Theo một khía cạnh, CDR3 của polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có trình tự axit amin Asp-Pro-Arg-Arg-Gly-Trp-Asp-Thr-Arg-Tyr như nêu trong SEQ ID NO. 186.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 như sau:

- CDR1:
 - a) có trình tự axit amin GSIFSSNAMA (SEQ ID NO. 141); hoặc
 - b) có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 141; hoặc

c) có trình tự axit amin thay có 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 141, trong đó:

- tại vị trí số 2, S được chuyển thành T, hoặc G;
- tại vị trí số 6, S được chuyển thành R;
- tại vị trí số 7, N được chuyển thành T; và/hoặc
- tại vị trí số 9, M được chuyển thành K; hoặc

d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 141-145 và 213;

- CDR2:

a) có trình tự axit amin GINSVGITK (SEQ ID NO. 164); hoặc

b) có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 70% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 164; hoặc

c) có trình tự axit amin có 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 164, trong đó:

- tại vị trí số 1, G được chuyển thành A, L, V hoặc S;
- tại vị trí số 3, N được chuyển thành D, S, Q, G hoặc T;
- tại vị trí số 4, S được chuyển thành T, K, G hoặc P;
- tại vị trí số 5, V được chuyển thành A;
- tại vị trí số 6, G được chuyển thành D;
- tại vị trí số 7, I được chuyển thành T, hoặc V;
- tại vị trí số 8, T được chuyển thành A; và/hoặc
- tại vị trí số 9, K được chuyển thành R; hoặc

d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 162-175 và 214-221; và

- CDR3:

a) có trình tự axit amin DPRRGWDTRY (SEQ ID NO. 186); hoặc

b) có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 70% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 186; hoặc

c) có trình tự axit amin có 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 186, trong đó:

- tại vị trí số 2, P được chuyển thành A, hoặc G;
- tại vị trí số 7, D được chuyển thành N; và/hoặc

- tại vị trí số 9,R được chuyển thành K; hoặc

d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 186-190.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có các CDR1, CDR2 và CDR3 sau, trong đó:

- CDR1 có trình tự axit amin GRTFSSYAMG (SEQ ID NO. 146);
- CDR2 có trình tự axit amin mà a) có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin GISGSASRKY (SEQ ID NO. 176) hoặc b) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 176 hoặc 177; và
- CDR3 có trình tự axit amin SNSYPKVQFDY (SEQ ID NO. 191).

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có các CDR1, CDR2 và CDR3 sau:

- CDR1:

- a) có trình tự axit amin GTIFSNNAMG (SEQ ID NO. 147); hoặc
- b) có trình tự axit amin mà có 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 147, trong đó:

- tại vị trí số 1, G được chuyển thành K, R, hoặc A;
- tại vị trí số 2, T được chuyển thành I, P, S hoặc L;
- tại vị trí số 3, I được chuyển thành V, hoặc T;
- tại vị trí số 4, F được chuyển thành L;
- tại vị trí số 5, S được chuyển thành R, hoặc D;
- tại vị trí số 6, N được chuyển thành S, T, hoặc D; và/hoặc
- tại vị trí số 7, N được chuyển thành T, hoặc Y; hoặc

c) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 147-161;

- CDR2:

- a) có trình tự axit amin SISNSGSTN (SEQ ID NO. 179); hoặc
- b) có trình tự axit amin mà có 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 179, trong đó:

- tại vị trí số 3, S được chuyển thành T, hoặc G;
- tại vị trí số 4, N được chuyển thành S, hoặc I;
- tại vị trí số 5, S được chuyển thành T;

- tại vị trí số 6, G được chuyển thành Y; và/hoặc
- tại vị trí số 8, T được chuyển thành A; hoặc

c) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 178-185; và

- CDR3:

a) có trình tự axit amin DARRGWNTAY (SEQ ID NO. 192); hoặc

b) có trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 80% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 192; hoặc

c) có trình tự axit amin mà có 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 192, trong đó:

- tại vị trí số 2, A được chuyển thành G;
- tại vị trí số 8, T được chuyển thành S;
- tại vị trí số 9, A được chuyển thành G; và/hoặc
- tại vị trí số 10, Y được chuyển thành F; hoặc

d) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 192-196.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 lần lượt như sau:

- SEQ ID NO. 141, 162 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 163 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 164 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 166 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 167 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 167 và 189; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 168 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 168 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 169 và 190; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 170 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 171 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 174 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 175 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 142, 165 và 188; hoặc

- SEQ ID NO. 142, 173 và 188; hoặc
- SEQ ID NO. 143, 164 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 144, 172 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 145, 172 và 187; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 214 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 215 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 216 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 217 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 218 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 219 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 220 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 214 và 186.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 lần lượt như sau:

- SEQ ID NO. 146, 176 và 191; hoặc
- SEQ ID NO. 146, 177 và 191.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 lần lượt như sau:

- SEQ ID NO. 147, 178 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 147, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 147, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 148, 179 và 193; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 180 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 181 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 183 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 149, 185 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 150, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 150, 182 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 151, 179 và 193; hoặc
- SEQ ID NO. 151, 182 và 194; hoặc

- SEQ ID NO. 151, 184 và 196; hoặc
- SEQ ID NO. 152, 179 và 195; hoặc
- SEQ ID NO. 153, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 154, 182 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 155, 179 và 195; hoặc
- SEQ ID NO. 156, 181 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 157, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 158, 179 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 159, 178 và 192; hoặc
- SEQ ID NO. 160, 179 và 194; hoặc
- SEQ ID NO. 161, 179 và 194.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong:

- SEQ ID NO. 141, 164 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, có CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong:

- SEQ ID NO. 213, 214 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Các polypeptit đại diện theo sáng chế có các CDR được mô tả trên đây được nêu trong các Bảng 1, 2, 3 (các polypeptit đại diện lần lượt thuộc họ 101, 9 và 13) và 4 (các polypeptit đại diện của biến thể được tối ưu hóa của họ 101).

Bảng 1. Họ 101

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
CX3CR1BIIP MP66B02	1	GSIFSSNAM A	141	AINSVGVT K	162	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54A12	2	GSIFSSNAM A	141	VINSVGITK	163	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP54A3	3	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54A4	4	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186

CX3CR1BIIP MP54A5	5	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54A7	6	GTIFSSNAM A	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP54B1	7	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54B2	8	GTIFSSNAM A	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP54B3	9	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54B5	10	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54D5	11	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DGRRGWDTR Y	189
CX3CR1BIIP MP54D8	12	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54F6	13	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54G3	14	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP54H1	15	GTIFSSNAM A	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP54H4	16	GSIFSSNAM A	141	VINSVGITK	163	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP61F10	17	GTIFSSNAM A	142	GINSVDITK	165	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP61D1	18	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61D5	19	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61E2	20	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61F11	21	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61G2	22	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61G3	23	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61G4	24	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP61F4	25	GSIFSSNAM A	141	VINTVGITK	168	DARRGWDTR Y	187

CX3CR1BIIP MP61A11	26	GSIFSSNAM A	141	VINSVGITK	163	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP61B2	27	GSIFSSNAM A	141	VINTVGITK	168	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP61C9	28	GSIFSSNAM A	141	LIDSAGITK	169	DARRGWNTK Y	190
CX3CR1BIIP MP65H02	29	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65E11	30	GSIFSSNAM A	141	GINSVGIA K	170	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65E10	31	GSIFSSNAKA	143	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65E05	32	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65B11	33	GSIFSSNAM A	141	VINKVGIT K	171	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65B07	34	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP65B09	35	GSIFSRNAM A	144	SINSVGITK	172	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP65H01	36	GGIFSRNAM A	145	SINSVGITK	172	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP65G07	37	GTIFSSNAM A	142	GINSDITR	173	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP66H08	38	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66H04	39	GSIFSSNAM A	141	AINSVGITK	166	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66F02	40	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66E11	41	GSIFSSNAM A	141	AINSVGTT K	174	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66D10	42	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66D08	43	GSIFSSNAM A	141	GINSVGITK	164	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66A04	44	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DPRRGWDTR Y	186
CX3CR1BIIP MP66D04	45	GTIFSSNAM A	142	GINSDITK	165	DPRRGWNTR Y	188
CX3CR1BIIP MP66D02	46	GSIFSSNAM A	141	VINSVGITK	163	DARRGWDTR Y	187

CX3CR1BIIP MP66D06	47	GSIFSSNAM A	141	SIDSVGITK	175	DARRGWDTR Y	187
CX3CR1BIIP MP66G01	48	GSIFSSNAM A	141	LINSVGITK	167	DGRRGWDTR Y	189

* Các trình tự CDR được xác định theo tài liệu Antibody Engineering, tập 2, của Konettermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Số của trình tự trong bảng (SEQ) là số của trình tự trong danh mục trình tự kèm theo đơn.

Bảng 2. Họ 9

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR 2	CDR3*	SEQ CDR 3
CX3CR1B IIPMP11H 11	49	GRTFSS YAMG	146	GISGSAS RKY	176	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1B IIPMP12B 6	50	GRTFSS YAMG	146	GISGSAS RKY	176	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1B IIPMP12G 9	51	GRTFSS YAMG	146	GISGSGS RKY	177	SNSYPKV QFDY	191
CX3CR1B IIPMP15G 11	52	GRTFSS YAMG	146	GISGSGS RKY	177	SNSYPKV QFDY	191

* Các trình tự CDR được xác định theo tài liệu Antibody Engineering, tập 2, của Konettermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Số của trình tự trong bảng (SEQ) là số của trình tự trong danh mục trình tự kèm theo đơn.

Bảng 3. Họ 13

Nanobody	SEQ	CDR1*	SEQ CDR1	CDR2*	SEQ CDR2	CDR3*	SEQ CDR3
CX3CR1B IIPMP18E 6	53	GTIFSNN AMG	147	SISSSGS TN	178	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP12C 2	54	GTIFSNT AMG	148	SISNSGS TN	179	DARRG WNSGY	193
CX3CR1B IIPMP18A 10	55	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18A	56	GIIFSNN	149	SIGSTYS	180	DARRG	192

2		AMG		TN		WNTAY	
CX3CR1B IIPMP18A 8	57	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP18A 9	58	GIIFSNN AMG	149	SISSTYS TN	181	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18B 7	59	GTIFRSN AMG	151	SISNSGS TN	179	DARRG WNSGY	193
CX3CR1B IIPMP18B 9	60	GTIFSNN AMG	147	SISSSGS TN	178	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18C 6	61	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18C 9	62	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18D 1	63	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18D 10	64	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18D 12	65	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18F 1	66	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18F 5	67	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18F 6	68	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18F 9	69	GTIFRTN AMG	152	SISNSGS TN	179	DGRRG WNTGY	195
CX3CR1B IIPMP18G	70	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194

5							
CX3CR1B IIPMP18H 1	71	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18H 10	72	KTIFRSN AMG	153	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP18H 7	73	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP18H 9	74	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP20B 3	75	GIIFSNN AMG	149	SIGSTYS TN	180	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP20C 12	76	GTIFRSN AMG	151	SISNSGS TN	179	DARRG WNSGY	193
CX3CR1B IIPMP20C 3	77	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP20C 6	78	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP20D 8	79	GTIFRS NAMG	154	SITNSGS TN	182	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP20E 11	80	RTIFRSN AMG	150	SITNSGS TN	182	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP20E 5	81	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP20F 3	82	GTIFSNN AMG	147	SISSSGS TN	178	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP20F 4	83	ATIFRSN AMG	155	SISNSGS TN	179	DGRRG WNTGY	195
CX3CR1B IIPMP20F	84	ATIFRSN AMG	155	SISNSGS TN	179	DGRRG WNTGY	195

5							
CX3CR1B IIPMP21B 6	85	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP24A 12	86	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS AN	183	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP24A 6	87	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP24B 9	88	GTIFRSN AMG	151	SISISGST N	184	DARRG WNTGF	196
CX3CR1B IIPMP24D 3	89	GIIFSNN AMG	149	SISSTYS TN	181	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP24F 7	90	GLIFSNN AMG	156	SISSTYS TN	181	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP28B 4	91	ATIFRSN AMG	155	SISNSGS TN	179	DGRRG WNTGY	195
CX3CR1B IIPMP28F 1	92	GIIFSNN AMG	149	SIGSTYS TN	180	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP28F 6	93	GIIFSNN AMG	149	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP28F 9	94	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP29A 5	95	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP29D 5	96	GTIFRSN AMG	151	SISNSGS TN	179	DARRG WNSGY	193
CX3CR1B IIPMP29E 3	97	KTIFRSN AMG	153	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP29E	98	KTIFRSN AMG	153	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194

7							
CX3CR1B IIPMP29G 10	99	GTIFRSN AMG	151	SITNSGS TN	182	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP29G 7	100	GIIFSNN AMG	149	SITNTGS TN	185	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP29H 1	101	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP37A 8	102	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP37B 9	103	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP37C 12	104	GSIFRSN AMG	157	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP37C 7	105	RTIFSNN AMG	158	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP37D 9	106	GTVFSN NAMG	159	SISSSGS TN	178	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP37E 12	107	KPIFRSN AMG	160	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP41B 10	108	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP41B 11	109	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP41B 8	110	GIIFSNN AMG	149	SIGSTYS TN	180	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IIPMP41C 10	111	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IIPMP41F	112	GIIFSNN AMG	149	SIGSTYS TN	180	DARRG WNTAY	192

9							
CX3CR1B IPMP41H 10	113	GLTLDD YAMG	161	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP46B 5	114	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP46D 3	115	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP46H 5	116	GIIFSNN AMG	149	SISSTYS TN	181	DARRG WNTAY	192
CX3CR1B IPMP48B 8	117	KTIFRSN AMG	153	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP48D 11	118	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP48G 8	119	RTIFRSN AMG	150	SISNSGS TN	179	DARRG WNTGY	194
CX3CR1B IPMP48H 9	120	GTIFSNN AMG	147	SISNSGS TN	179	DARRG WNTAY	192

* Các trình tự CDR được xác định theo tài liệu Antibody Engineering, tập 2, của Konettermann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Số của trình tự trong bảng (SEQ) là số của trình tự trong danh mục trình tự kèm theo đơn.

Bảng 4. Các biến thể được tối ưu hóa

Nanobody	SEQ	CDR1	SEQ CDR 1	CDR2	SEQ CDR2	CDR3	SEQ CDR3
CX3CR1BII PMP66B02	1	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 43	121	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 45	122	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 47	123	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186

CX3CR1BII0 48	124	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 49	125	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 50	126	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 61	127	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 56	128	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 57	129	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 60	130	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 65	131	GSIFSSN AMA	141	AISSVGVT K	214	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 67	132	GSIFSSN AMA	141	AIQSVGVT K	215	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 68	133	GSIFSSN AMA	141	AIGSVGVT K	216	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII0 74	134	GSIFSSN AMA	141	AITSVGVT K	217	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII1 18	135	GSIFSSN AMA	141	AINTVGV TK	218	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII1 29	136	GSIFSSN AMA	141	AINGVGV TK	219	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII1 58	137	GSIFSSN AMA	141	AINPVGVT K	220	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII3 06	138	GSIFSST AMA	213	AISSVGVT K	214	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII3 07	139	GSIFSST AMA	213	AISTVGVT K	221	DPRRGW DTRY	186
CX3CR1BII3 08	140	GSIFSSN AMA	141	AINSVGVT K	162	DPRRGW DTRY	186

* Các trình tự CDR được xác định theo tài liệu Antibody Engineering, tập 2, của Koneternann & Dübel (Eds.), Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010. Số của trình tự trong bảng (SEQ) là số của trình tự trong danh mục trình tự kèm theo đơn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit có một hoặc nhiều vùng VHH.

Theo một khía cạnh, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự được nêu trong:

- a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3; hoặc
- b) các trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3; hoặc
- c) các trình tự axit amin có 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 3 hoặc
- d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1-48, hoặc SEQ ID NO. 121-140, hoặc SEQ ID NO. 222-224.

Theo một phương án khác, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự được nêu trong:

- a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49; hoặc
- b) trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 95% so với các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49; hoặc
- c) trình tự axit amin có 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 49;
- d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 49-52.

Theo một phương án khác, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự được nêu trong:

- a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67; hoặc
- b) trình tự axit amin có độ tương đồng về axit amin ít nhất 90% so với các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67; hoặc
- c) trình tự axit amin có 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin khác với các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 67; hoặc
- d) trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 53-120.

Theo một phương án khác, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 121-140, hoặc SEQ ID NO. 222-224.

Theo một phương án khác, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 138-140.

Theo một phương án khác, vùng VHH theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 222-224.

Các vùng VHH đại diện theo sáng chế được nêu trong Bảng 5 và các vùng VHH được tối ưu hóa đại diện theo sáng chế được nêu trong Bảng 6 dưới đây:

Bảng 5. Các vùng VHH

SEQ ID NO. 1-48 là các vùng VHH thuộc họ 101. SEQ ID NO. 49-52 là các vùng VHH thuộc họ 9. SEQ ID NO. 53-120 là các vùng VHH thuộc họ 13.

CX3CR1B IIPMP66B 02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	1
CX3CR1B IIPMP54A 12	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTIS GDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	2
CX3CR1B IIPMP54A 3	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	3
CX3CR1B IIPMP54A 4	EVQLVESGRGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	4
CX3CR1B IIPMP54A 5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	5
CX3CR1B IIPMP54A 7	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTIS RNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW NTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	6
CX3CR1B IIPMP54B 1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RNAKNTAYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	7
CX3CR1B IIPMP54B 2	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTIS RNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW NTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	8
CX3CR1B IIPMP54B	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS	SEQ ID	9

3	RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	NO.	
CX3CR1B IIPMP54B 5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTAYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	10
CX3CR1B IIPMP54D 5	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTI SSDNAKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11
CX3CR1B IIPMP54D 8	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12
CX3CR1B IIPMP54F 6	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13
CX3CR1B IIPMP54G 3	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	14
CX3CR1B IIPMP54H 1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTV SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WNTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	15
CX3CR1B IIPMP54H 4	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTIS GDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	16
CX3CR1B IIPMP61F 10	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW NTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	17
CX3CR1B IIPMP61D 1	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAFGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	18
CX3CR1B IIPMP61D 5	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAFGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	19
CX3CR1B IIPMP61E 2	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDMAVYYCTSDPRRGW	SEQ ID NO.	20

	DTRYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1B IIPMP61F 11	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQPPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIF RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	21
CX3CR1B IIPMP61G 2	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	22
CX3CR1B IIPMP61G 3	KVQLVESGGGSMQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMMSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	23
CX3CR1B IIPMP61G 4	KVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMMSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	24
CX3CR1B IIPMP61F 4	EVQLVESGGGSVQAGASLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINTVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	25
CX3CR1B IIPMP61A 11	EVQLVESRGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTIS GDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	26
CX3CR1B IIPMP61B 2	EVQLVESRGGGSVQAGASLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINTVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	27
CX3CR1B IIPMP61C 9	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQALGKQRDLVALIDSAGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNRLKPEDTAVYYCASDARRGW NTKYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	28
CX3CR1B IIPMP65H 02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVHLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	29
CX3CR1B IIPMP65E 11	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGIKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	30
CX3CR1B IIPMP65E 10	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAKA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	31

CX3CR1B IIPMP65E 05	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO.	32
CX3CR1B IIPMP65B 11	EVQLVKSGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINKVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	33
CX3CR1B IIPMP65B 07	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO.	34
CX3CR1B IIPMP65B 09	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSRNAMA WYRQAPGKQRDLVASINSVGITKYGDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO.	35
CX3CR1B IIPMP65H 01	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGGIFSRNAMA WYRQAPGKQRDLVASINSVGITKYGDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	36
CX3CR1B IIPMP65G 07	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITRYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW NTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	37
CX3CR1B IIPMP66H 08	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	38
CX3CR1B IIPMP66H 04	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMMSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO.	39
CX3CR1B IIPMP66F 02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYAGSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	40
CX3CR1B IIPMP66E 11	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAAINSVGTTKYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	41
CX3CR1B IIPMP66D 10	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQALGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	42
CX3CR1B	EVQLMESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA	SEQ	43

IIPMP66D 08	WYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	ID NO.	
CX3CR1B IIPMP66A 04	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQALGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	44
CX3CR1B IIPMP66D 04	KVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGTIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAGINSVDITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW NTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	45
CX3CR1B IIPMP66D 02	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTT SGDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDARRG WDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	46
CX3CR1B IIPMP66D 06	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVASIDSVGITKYRDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDARRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	47
CX3CR1B IIPMP66G 01	EMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	48
CX3CR1B IIPMP11H 11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM GWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRF TVSRDNARNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCAASNSY PKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	49
CX3CR1B IIPMP12B 6	EVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM GWFRQAPGRERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRF TVSRDNARNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCAASNSY PKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	50
CX3CR1B IIPMP12G 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMG WFRQAPGKEREFVAGISGSGSRKYYADSVKGRFTI SRDNARNTVYLMQNSLKPEDRAVYYCAASNSYPK VQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	51
CX3CR1B IIPMP15G 11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAM GWFRQAPGKEREFVAGISGSGSRKYYADSVKGRF TISRDNARNTVYLMQNSLKPEDRAVYYCAASNSY PKVQFDYYGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	52
CX3CR1B IIPMP18E 6	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLMQNSLKPEDTGVIYCTLDARRGW NTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO.	53
CX3CR1B IIPMP12C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNTAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV	SEQ ID	54

2	SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNSGYWGQGTQVTVSS	NO.	
CX3CR1B IIPMP18A 10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSAKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	55
CX3CR1B IIPMP18A 2	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASIGSTYSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPVTVSS	SEQ ID NO.	56
CX3CR1B IIPMP18A 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	57
CX3CR1B IIPMP18A 9	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASISSTYSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPVTVSS	SEQ ID NO.	58
CX3CR1B IIPMP18B 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNSGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	59
CX3CR1B IIPMP18B 9	EVQLVESRGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTLDARRGW NTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	60
CX3CR1B IIPMP18C 6	EVQLMESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	61
CX3CR1B IIPMP18C 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	62
CX3CR1B IIPMP18D 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKSTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	63
CX3CR1B IIPMP18D 10	EVQLVESGGGLVQPGGSLGLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	64
CX3CR1B IIPMP18D 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRG	SEQ ID NO.	65

	WNTAYWGQGTQVTVSS		
CX3CR1B IIPMP18F 1	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	66
CX3CR1B IIPMP18F 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	67
CX3CR1B IIPMP18F 6	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	68
CX3CR1B IIPMP18F 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRTNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDGRRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	69
CX3CR1B IIPMP18G 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRITFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	70
CX3CR1B IIPMP18H 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQALGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	71
CX3CR1B IIPMP18H 10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	72
CX3CR1B IIPMP18H 7	EVQLVESRGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	73
CX3CR1B IIPMP18H 9	EVQLVKSGGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	74
CX3CR1B IIPMP20B 3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGPGKKRDLVASIGSTYSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPVTVSS	SEQ ID NO.	75
CX3CR1B IIPMP20C 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNSGYWGQGTRVTVSS	SEQ ID NO.	76

CX3CR1B IIPMP20C 3	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	77
CX3CR1B IIPMP20C 6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	78
CX3CR1B IIPMP20D 8	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGTTFRSNAMG WYRQGP GKKRDLVASITNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMSSLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	79
CX3CR1B IIPMP20E 11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQGP GKKRDLVASITNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	80
CX3CR1B IIPMP20E 5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQVP GKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	81
CX3CR1B IIPMP20F 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTLDARRGW NTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	82
CX3CR1B IIPMP20F 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSATIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDGRRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	83
CX3CR1B IIPMP20F 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSATIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRSTV SRDNDKNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDGRRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	84
CX3CR1B IIPMP21B 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDMGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	85
CX3CR1B IIPMP24A 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSANYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	86
CX3CR1B IIPMP24A 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SGDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	87
CX3CR1B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAMG	SEQ	88

IIPMP24B 9	WYRQAPGKKRDLVASISISGSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRGW NTGFWGQGTQVTVSS	ID NO.	
CX3CR1B IIPMP24D 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASISSTYSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO.	89
CX3CR1B IIPMP24F 7	EVQLMESGGGMVQVGGSLRLSCTASGLIFSNNAM GWYRQGP GKKRDLVASISSTYSTNYADSVKGRFT VSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRG WNTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO.	90
CX3CR1B IIPMP28B 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAISATIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTAYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDGRRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	91
CX3CR1B IIPMP28F 1	EMQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASIGSTYSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO.	92
CX3CR1B IIPMP28F 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNHADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	93
CX3CR1B IIPMP28F 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQVPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	94
CX3CR1B IIPMP29A 5	EVQLVESRGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	95
CX3CR1B IIPMP29D 5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNSGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	96
CX3CR1B IIPMP29E 3	EVQLVESEGGLVQPGGSLRLPCATSKTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	97
CX3CR1B IIPMP29E 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAMG WYRQAPGKKRGLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	98
CX3CR1B IIPMP29G	EVQLMESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFRSNAMG WYRQGP GKKRDLVASITNSGSTNYADSVKGRFTV	SEQ ID	99

10	SRDNDKNTGYLQMSSLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	NO.	
CX3CR1B IIPMP29G 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASITNTGSTNYADSVKGRFTV SRDNDRNTVY LQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 0
CX3CR1B IIPMP29H 1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 1
CX3CR1B IIPMP37A 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSAKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 2
CX3CR1B IIPMP37B 9	EVQLVESGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMGW YRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTVSR DNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRGWN TAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 3
CX3CR1B IIPMP37C 12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 4
CX3CR1B IIPMP37C 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 5
CX3CR1B IIPMP37D 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTVFSNNAM GWYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFT VSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTLDARR GWNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 6
CX3CR1B IIPMP37E 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKPIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 7
CX3CR1B IIPMP41B 10	EVQLVESEGGLVQPGGSLRLSCTTSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNNLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 8
CX3CR1B IIPMP41B 11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSPKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	10 9
CX3CR1B IIPMP41B 8	EVQLVESEG GVVQPGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASIGSTYSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW	SEQ ID NO.	11 0

	NTAYWGQGTPTVTVSS		
CX3CR1B IIPMP41C 10	EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKSTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 1
CX3CR1B IIPMP41F 9	EVQLVESGGGVVQPGESLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASIGSTYSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO.	11 2
CX3CR1B IIPMP41H 10	KVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCAASGLTLDDYAM GWYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFT VSRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 3
CX3CR1B IIPMP46B 5	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 4
CX3CR1B IIPMP46D 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQVPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLRMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 5
CX3CR1B IIPMP46H 5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVTSGIIFSNNAMG WYRQGP GKKRDLVASISSTYSTNYADSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTIDARRGW NTAYWGQGTPTVTVSS	SEQ ID NO.	11 6
CX3CR1B IIPMP48B 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSKTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYTDSVKGRFTVS RDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRGW NTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 7
CX3CR1B IIPMP48D 11	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 8
CX3CR1B IIPMP48G 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSRTIFRSNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFAV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTGYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	11 9
CX3CR1B IIPMP48H 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMG WYRQAPGKKRDLVASISNSGSTNYADSVKGRFTV SRDNDKNTGYLQMNSLKPEDTGVYYCTVDARRG WNTAYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	12 0

Bảng 6. Các vùng VHH được tối ưu hóa

CX3CR1B II043	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 1
CX3CR1B II045	DVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 2
CX3CR1B II047	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 3
CX3CR1B II048	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 4
CX3CR1B II049	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQKRDVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 5
CX3CR1B II050	EVQLVESGGGSVQPGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRELVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 6
CX3CR1B II061	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 7
CX3CR1B II056	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQKRDVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 8
CX3CR1B II057	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRELVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	12 9
CX3CR1B II060	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKQRELVAAINSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 0
CX3CR1B II065	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 1
CX3CR1B II067	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAIQSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 2

CX3CR1B II068	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAIGSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 3
CX3CR1B II074	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAITSVGVTKYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 4
CX3CR1B II118	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINTVGVTYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 5
CX3CR1B II129	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINGVGVTYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 6
CX3CR1B II158	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINPVGVTYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLMQNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 7
CX3CR1B II306	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMA WYRQAPGKRRDLVAAISSVGVTYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWD TRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 8
CX3CR1B II307	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMA WYRQAPGKRRDLVAAISTVGVTYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	13 9
CX3CR1B II308	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	14 0
CX3CR1B II00306 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMA WYRQAPGKRRDLVAAISSVGVTYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWD TRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	22 2
CX3CR1B II00307 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMA WYRQAPGKRRDLVAAISTVGVTYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	22 3
CX3CR1B II00308 (D1E)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMA WYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	22 4

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, được làm tương thích với người và/hoặc được

tối ưu hóa về độ ổn định, hiệu lực, khả năng sản xuất và/hoặc độ tương đồng với các vùng khung của người. Ví dụ, polypeptit được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự ở một hoặc nhiều vị trí sau (theo cách đánh số Kabat): 1, 11, 14, 16, 74, 83, 108. Theo một khía cạnh, polypeptit này bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau: E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K83R, Q108L.

Theo một khía cạnh, một hoặc nhiều vùng khung của polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, bao gồm các vùng khung (FR) ví dụ, như được thể hiện dưới đây:

- i) FR1 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 198-204;
- ii) FR2 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 205-208;
- iii) FR3 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 209-210; và/hoặc
- iv) FR4 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 211-212.

Các trình tự vùng khung (FR) globulin miễn dịch người mà cũng có thể được sử dụng làm trình tự vùng khung trong các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch như được mô tả trên đây đã biết trong lĩnh vực này. Trong lĩnh vực này cũng đã biết đến các phương pháp làm cho các vùng khung của vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có nguồn gốc từ các loài không phải người có đặc tính giống của người.

Theo một phương án khác, một hoặc nhiều vùng CDR của polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa trình tự ở một hoặc nhiều vị trí sau (theo cách đánh số Kabat): 52, 53.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, bao gồm một hoặc nhiều đột biến sau: N52S, S53T.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế, bao gồm CDR2 được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 214-221.

Các trình tự được làm tương thích với người và/hoặc được tối ưu hóa đại diện theo sáng chế được nêu trong Bảng 4 và Bảng 6 trên đây và trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Các biến thể được tối ưu hóa trình tự

Bảng 7a thể hiện FR1-CDR1-FR2-CDR2 của các biến thể được tối ưu hóa trình tự, Bảng 7b thể hiện FR3-CDR3-FR4-CDR4 của các biến thể này. Số của các trình tự trong bảng (SEQ) chỉ trình tự trong danh mục trình tự kèm theo đơn.

Bảng 7a. Các biến thể được tối ưu hóa trình tự (FR1-CDR1-FR2-CDR2)

Nano body	SEQ	FR1	SEQ FR1	CDR1	SEQ CDR1	FR2	SEQ FR2	CDR2	SEQ CDR2
CX3CR1BII002	1	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII043	121	EVQLVESG GGSVQPG SLRLSCAA S	199	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII045	122	DVQLVESG GGSVQPG SLRLSCAA S	200	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII047	123	EVQLVESG GGLVQPG SLRLSCAA S	201	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII048	124	EVQLVESG GGSVQPG SLRLSCAA S	202	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII049	125	EVQLVESG GGSVQPG SLRLSCAA S	199	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KQDLVA	206	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII050	126	EVQLVESG GGSVQPG SLRLSCAA S	199	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRELVA	207	AINSV GVTK	162
CX3CR1BII061	127	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA	203	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162

		AS							
CX3CR 1BII056	128	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS	203	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KQRDLVA	206	AINSV GVTK	162
CX3CR 1BII057	129	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS	203	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRELVA	207	AINSV GVTK	162
CX3CR 1BII060	130	EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS	203	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KQRELVA	208	AINSV GVTK	162
CX3CR 1BII065	131	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AISSV GVTK	214
CX3CR 1BII067	132	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AIQSV GVTK	215
CX3CR 1BII068	133	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AIGSV GVTK	216
CX3CR 1BII074	134	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AITSV GVTK	217
CX3CR 1BII118	135	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINTV GVTK	218
CX3CR 1BII129	136	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINGV GVTK	219
CX3CR 1BII158	137	EVQLVESG GGSVQAG ESLRLSCA AS	198	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINPV GVTK	220
CX3CR 1BII306	138	DVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS	204	GSIFSST AMA	213	WYRQAPG KRRDLVA	205	AISSV GVTK	214
CX3CR 1BII307	139	DVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA	204	GSIFSST AMA	213	WYRQAPG KRRDLVA	205	AISTV GVTK	221

		AS							
CX3CR 1BII308	140	DVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCA AS	204	GSIFSSN AMA	141	WYRQAPG KRRDLVA	205	AINSV GVTK	162

Bảng 7b. Các biến thể được tối ưu hóa trình tự (FR3-CDR3-FR4)

Nano body	SEQ	FR3	SEQ FR3	CDR3	SEQ CDR3	FR4	SEQ FR4
CX3CR 1BIIPM P66B02	1	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT QVTVSS	211
CX3CR 1BII043	121	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII045	122	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII047	123	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII048	124	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII049	125	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII050	126	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII061	127	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212
CX3CR 1BII056	128	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVVSS	212

		S					
CX3CR 1BII057	129	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII060	130	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII065	131	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII067	132	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII068	133	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII074	134	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII118	135	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII129	136	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII158	137	YADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCT S	209	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII306	138	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212
CX3CR 1BII307	139	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LTVSS	212

CX3CR1BII308	140	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCT S	210	DPRRGW DTRY	186	WGQGT LVTVSS	212
--------------	-----	---	-----	----------------	-----	-----------------	-----

Theo một khía cạnh của sáng chế, polypeptit theo sáng chế có thể chứa thêm các cải biến như các gốc glycosyl, các chuỗi bên axit amin được cải biến, và các cải biến tương tự.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng để sử dụng làm dược phẩm cho người, tốt hơn là các polypeptit theo sáng chế được định hướng kháng CX3CR1 người, trong khi đi để dùng cho các mục đích thú y, tốt hơn là các polypeptit theo sáng chế được định hướng kháng CX3CR1 từ các loài cần được điều trị.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng đã biết rõ rằng khi được dùng làm dược phẩm để điều trị cho người, tốt hơn là các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch trong polypeptit theo sáng chế là các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch được làm tương thích với người.

Theo sáng chế, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có thể là kháng thể vùng, tức là kháng thể VL hoặc VH, và/hoặc các vùng VHH như được mô tả trên đây, và/hoặc loại vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch bất kỳ khác, ví dụ VH được làm tương thích với lạc đà, miễn là các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch này đều là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1.

Theo một khía cạnh của sáng chế, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch về cơ bản bao gồm trình tự kháng thể vùng hoặc trình tự vùng VHH như được mô tả trên đây. Cụ thể, vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch về cơ bản bao gồm các trình tự vùng VHH.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1, ví dụ các VHH kháng CX3CR1. Theo một khía cạnh, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có cùng trình tự axit amin. Theo khía cạnh khác, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 trong polypeptit theo sáng chế có các trình tự axit amin khác nhau.

Theo một phương án khác của sáng chế, ít nhất hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có trong polypeptit theo sáng chế có thể được liên kết với nhau trực tiếp (tức là không có cầu liên kết) hoặc qua cầu liên kết. Tốt hơn nếu cầu liên kết là peptit liên kết và, theo sáng chế, sẽ được chọn để cho phép liên kết ít nhất hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch với CX3CR1, trong một và vùng một phân tử CX3CR1, hoặc trong hai phân tử khác nhau.

Các cầu liên kết thích hợp sẽ tùy thuộc vào các epitop và, đặc biệt, khoảng cách giữa các epitop trên CX3CR1 mà vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch liên kết, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ dựa trên bản mô tả, tùy ý sau một số thử nghiệm thông thường ở mức độ hạn chế.

Ngoài ra, khi hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 là các kháng thể vùng hoặc các vùng VHH, chúng cũng có thể được liên kết với nhau qua kháng thể vùng thứ ba hoặc vùng VHH (trong đó hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có thể được liên kết trực tiếp với kháng thể vùng thứ ba hoặc vùng VHH hoặc thông qua cầu liên kết). Kháng thể vùng thứ ba hoặc vùng VHH có thể ví dụ, là kháng thể vùng hoặc vùng VHH mà được tạo ra để tăng thời gian bán thải, như được mô tả tiếp trong bản mô tả. Ví dụ, kháng thể vùng hoặc vùng VHH sau có thể là kháng thể vùng hoặc vùng VHH có khả năng liên kết với protein huyết thanh (người) như albumin huyết thanh (người) hoặc transferrin (người), như được mô tả tiếp trong bản mô tả.

Theo cách khác, hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 có thể được liên kết thành dây (trực tiếp hoặc qua liên kết thích hợp) và kháng thể vùng (đơn) thứ ba hoặc vùng VHH (mà có thể được tạo ra để làm tăng thời gian bán thải, như được mô tả trên đây) có thể được nối trực tiếp hoặc qua cầu liên kết với một trong số hai hoặc nhiều trình tự globulin miễn dịch đã nêu.

Các cầu liên kết thích hợp được mô tả trong bản mô tả liên quan đến các polypeptit cụ thể theo sáng chế và có thể ví dụ và không chỉ giới hạn ở - bao gồm trình tự axit amin, tốt hơn nếu trình tự axit amin có độ dài 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 7 axit amin hoặc nhiều hơn, 9 axit amin hoặc nhiều hơn, 11 axit amin hoặc nhiều hơn, 15 axit amin hoặc nhiều hơn hoặc ít nhất 17 axit amin, như khoảng 20 đến 40 axit amin. Tuy nhiên, giới hạn trên không phải là tối hạn mà được chọn vì các lý do thuận tiện về ví dụ, sản xuất được sinh học các polypeptit này.

Trình tự cầu liên kết có thể là trình tự có trong tự nhiên hoặc trình tự không có trong tự nhiên. Nếu được sử dụng để điều trị, tốt hơn là cầu nối không sinh miễn dịch ở đối tượng sử dụng polypeptit theo sáng chế.

Nhóm các trình tự liên kết hữu dụng là các cầu liên kết có nguồn gốc từ vùng bản lề của các kháng thể chuỗi nặng như được mô tả trong WO 96/34103 và WO 94/04678.

Các ví dụ khác là các trình tự liên kết poly-alanin như Ala-Ala-Ala.

Các ví dụ được ưu tiên khác về trình tự liên kết là các cầu liên kết Gly/Ser có độ dài khác nhau như cầu liên kết $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$, bao gồm $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_4$, (gly_4ser) , (gly_3ser) , gly_3 , và $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$.

Nếu polypeptit theo sáng chế được cải biến bằng cách gắn polyme, ví dụ gốc polyetylen glycol (PEG), tốt hơn nếu trình tự liên kết bao gồm gốc axit amin, như cystein hoặc lysin, để cho phép cải biến, ví dụ, PEG hóa, ở vùng liên kết.

Ví dụ về các cầu liên kết là:

GGGGS (cầu liên kết 5 GS, SEQ ID NO. 233)

SGGSGGS (cầu liên kết 7GS, SEQ ID NO. 234)

GGGGCGGGS (cầu liên kết 8GS, SEQ ID NO. 235)

GGGGSGGGS (cầu liên kết 9GS, SEQ ID NO. 236)

GGGGSGGGGS (cầu liên kết 10GS, SEQ ID NO. 237)

GGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 15GS, SEQ ID NO. 238)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 18GS, SEQ ID NO. 239)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 20GS, SEQ ID NO. 240)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 25GS, SEQ ID NO. 241)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 30GS, SEQ ID NO. 242)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (cầu liên kết 35GS, SEQ ID NO. 243)

EPKSCDKTHTCPPCP (cầu liên kết bản lề G1, SEQ ID NO. 244)

GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP (cầu liên kết bản lề 9GS-G1, SEQ ID NO. 245)

EPKTPKPQAAAA (vùng bản lề dài phía trên của lạc đà không bướu, SEQ ID NO. 246)

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP (vùng bản lề G3, SEQ ID NO. 247)

AAA (cầu liên kết Ala, SEQ ID NO. 248)

Hơn nữa, cầu liên kết cũng có thể là gốc poly(etylen glycol), như được nêu trong ví dụ, WO04/081026.

Các ví dụ không hạn chế về các polypeptit bao gồm hoặc gồm hai hoặc nhiều vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-CX3CR1 được đưa ra trong bảng 8a.

Bảng 8a. Các polypeptit hóa trị hai kháng-CX3CR1

CX3CR 1BII007	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGW FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRFTVSRD NARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDY YGGGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GGGGSGGGGSKVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGT IFSNNAMGWYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVK GRFTVSRDNDKNTGYLMNSLKPEDTGVYYCTLDAR RGWNTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO.	26 7
CX3CR 1BII009	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFSNNAMGWY RQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGRFTVSRDND KNTGYLMNSLKPEDTGVYYCTLDARRGWNTAYWG QGAQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTF SSYAMGWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVK GRFTVSRDNARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNS YPKVQFDYYGGGTQVTVSS	SEQ ID NO.	26 8
CX3CR 1BII012	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGGSKVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGTIFS NNAMGWYRQAPGKKRDLVASISSSGSTNYADSVKGR FTVSRDNDKNTGYLMNSLKPEDTGVYYCTLDARRG WNTAYWGQGAQVTVSS	SEQ ID NO.	26 9
CX3CR 1BII016	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGRFTISGDNA KNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRGWWDTRYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFS SNAMAWYRQAPGKQRDLVAVINSVGITKYADSVKGR FTISGDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDARRG WDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	27 0
CX3CR 1BII017	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTISSDNA KNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGWWDTRYWG	SEQ ID NO.	27 1

	QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFS SNAMAWYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKG RFTISSDNAKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRG WDTRYWGQGTQVTVSS		
CX3CR 1BII018	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFS SNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKG RFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRG WDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	27 2
CX3CR 1BII019	EMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGWDTRYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEMQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSS NAMAWYRQAPGKQRDLVALINSVGITKYADSVKGRF TISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDGRRGW DTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	27 3
CX3CR 1BII020	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGRFTISRDN AKNTAYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFS SNAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVKGR FTISRDNKNTAYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGW DTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	27 4
CX3CR 1BII026	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRFTSSYAMGW FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRFTVSRD NARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDY YGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGS IFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSV KGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPR RGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	27 5
CX3CR 1BII027	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRFTSSYAMGW FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRFTVSRD NARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDY YGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGS IFSSNAMAWYRQAPGKQRDLVAGINSVGITKYADSVK GRFTISRDNKNTAYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRR GWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	27 6
CX3CR	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRFTSSYAMGW	SEQ	28

1BII006	FRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADSVKGRFTVSRD NARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASNSYPKVQFDY YGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASG RTFSSYAMGWFRQAPGKERAFVAGISGSASRKYYADS VKGRFTVSRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAS NSYPKVQFDYYGQGTLLTVSS	ID NO.	2
---------	--	-----------	---

Theo một phương án khác, ít nhất hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch của polypeptit theo sáng chế được liên kết với nhau qua gốc khác (tùy ý qua một hoặc hai cầu liên kết), như polypeptit khác mà, theo phương án được qu tiên nhưng không giới hạn, có thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch khác như đã mô tả trên đây. Gốc này có thể hầu như không hoạt động hoặc có thể có tác dụng sinh học như cải thiện các đặc tính mong muốn của polypeptit hoặc có thể tạo ra một hoặc nhiều đặc tính mong muốn khác cho polypeptit. Ví dụ, và không chỉ giới hạn ở, gốc mà có thể cải thiện thời gian bán thải của protein hoặc polypeptit, và/hoặc có thể làm giảm tính sinh miễn dịch hoặc cải thiện đặc tính mong muốn bất kỳ khác.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm, chủ yếu khi được dùng làm dược phẩm để điều trị, gốc mà kéo dài thời gian bán thải của polypeptit theo sáng chế trong huyết thanh hoặc dịch thể khác ở bệnh nhân. Thuật ngữ "thời gian bán thải" chỉ thời gian cần thiết để nồng độ trong huyết thanh của polypeptit (cải biến) giảm 50%, *in vivo*, ví dụ do sự phân hủy polypeptit và/hoặc thanh thải và/hoặc sự khu trú theo cách cơ chế tự nhiên.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, hai vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có thể dung hợp vào phân tử albumin huyết thanh, như được mô tả trong, ví dụ, WO01/79271 và WO03/59934.

Theo cách khác, gốc kéo dài thời gian bán thải này có được thể liên kết cộng hóa trị hoặc dung hợp với polypeptit và có thể, không giới hạn, là phần Fc, gốc albumin, đoạn của gốc albumin, gốc liên kết albumin, như vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-albumin, gốc liên kết transferin, như vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng-transferin, phân tử polyoxyalkylen, như phân tử polyetylen glycol, peptit liên kết albumin, hoặc các dẫn xuất tinh bột hydroxyetyl (HES).

Theo khía cạnh khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm gốc mà liên kết với kháng nguyên trong máu, như albumin huyết thanh, globulin miễn dịch huyết thanh,

protein liên kết thyroxin, fibrinogen hoặc transferin, nhờ đó làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của polypeptit thu được theo sáng chế. Theo một phương án, gốc này là globulin miễn dịch liên kết albumin và, cụ thể là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch liên kết albumin vùng VHH liên kết albumin.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm gốc liên kết với albumin huyết thanh, trong đó gốc này là peptit liên kết albumin, như được mô tả, ví dụ, trong WO2008/068280 và WO2009/127691.

Nếu đề dùng cho người, sẽ tốt hơn nếu vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch liên kết albumin (còn gọi là vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng albumin) liên kết với albumin huyết thanh người và sẽ tốt hơn nếu là vùng VHH liên kết albumin được làm cho có đặc tính giống của người.

Các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch liên kết với albumin huyết thanh người đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả chi tiết hơn ví dụ, trong WO2006/122786. Vùng VHH liên kết albumin đặc biệt hữu dụng bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 230-232:

Bảng 8b

ALB-1	AVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	230
ALB-11 (ALB-1 được làm tương thích với người)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	231
ALB-2	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLN LMGWYRQGPGENERELVATCITVGDSTNYADS VKGRFTISM DYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLYY CKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	232

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế có thể được liên kết với một hoặc nhiều phân, đoạn hoặc vùng của kháng thể mà tạo ra một hoặc nhiều chức năng đáp ứng cho polypeptit theo sáng chế và/hoặc có thể tạo ra khả năng liên kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc. Để thực hiện mục đích này, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, các phần của kháng thể có thể là hoặc có thể bao gồm các vùng CH2 và/hoặc CH3 của kháng thể, như từ kháng thể chuỗi nặng (như được mô tả trên đây) và tốt hơn là từ kháng thể

4 chuỗi thông thường của người; đặc biệt, polypeptit theo sáng chế có thể được liên kết với vùng Fc, ví dụ từ IgG người, từ IgE người hoặc từ Ig khác của người. Ví dụ, WO 94/04678 mô tả các kháng thể chuỗi nặng chứa vùng VHH lạc đà hoặc dẫn xuất được làm tương thích với người của nó, trong đó vùng CH2 và/hoặc CH3 của lạc đà được thay thế bằng vùng CH2 và/hoặc CH3 của người, để tạo ra globulin miễn dịch bao gồm 2 chuỗi nặng mỗi chuỗi chứa vùng VHH và các vùng CH2 và CH3 (nhưng không chứa vùng CH1) tùy ý được làm cho có đặc tính giống của người, globulin miễn dịch này có chức năng đáp ứng do các vùng CH2 và CH3 tạo ra, có thể hoạt động chức năng mà không cần sự có mặt của chuỗi nhẹ bất kỳ, và tăng thời gian bán thải so với các vùng VHH tương ứng không có cải biến này.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm hai VHH kháng-CX3CR1 và một VHH có khả năng liên kết với albumin huyết thanh. Theo một khía cạnh, các VHH được dung hợp bằng cách sử dụng peptit liên kết. Các ví dụ đại diện về các polypeptit theo sáng chế được đưa ra dưới đây.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế chứa VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất được dung hợp với peptit liên kết thứ nhất, peptit này được dung hợp với VHH có khả năng liên kết albumin huyết thanh, VHH có khả năng liên kết albumin huyết thanh được dung hợp với peptit liên kết thứ hai, peptit liên kết thứ hai được dung hợp với VHH kháng-CX3CR1 thứ hai. Theo một khía cạnh, peptit liên kết thứ nhất hoặc thứ hai cầu liên kết 9GS, theo một khía cạnh, peptit liên kết thứ nhất và thứ hai là cầu liên kết 9GS. Theo một khía cạnh, VHH có khả năng liên kết albumin huyết thanh có khả năng liên kết với albumin huyết thanh người. Theo một khía cạnh, VHH có khả năng liên kết albumin huyết thanh có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO. 231. Theo một khía cạnh, VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất và thứ hai có cùng trình tự axit amin. Theo một khía cạnh, VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất và thứ hai có CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong:

- SEQ ID NO. 213, 214 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Theo một khía cạnh, VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất và thứ hai có CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong:

- SEQ ID NO. 213, 214 và 186; hoặc

-SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc

-SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Theo một khía cạnh, VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất và thứ hai có trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 138 đến 140 hoặc SEQ ID NO. 222 đến 224. Theo một khía cạnh, VHH kháng-CX3CR1 thứ nhất và thứ hai có cùng trình tự axit amin, trong đó trình tự axit amin này là trình tự được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 138 đến 140 hoặc SEQ ID NO. 222 đến 224.

Các ví dụ không hạn chế về các polypeptit theo sáng chế là các polypeptit có trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 225 đến 227, 249 hoặc 277 đến 281.

Bảng 9

CX3CR 1BII003 12	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTISR NSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAAKTLLYLMQNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR QAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQ GTLTVSS	SEQ ID NO.	225
CX3CR 1BII003 13	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTISR NSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAAKTLLYLMQNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR QAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLTVSS	SEQ ID NO.	226
CX3CR 1BII003 14	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISR NSKNTVYLMQNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAAKTLLYLMQNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGSEV	SEQ ID NO.	227

	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR QAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSS		
CX3CR 1BII032	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAG ESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAI NSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKP EDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKTTLYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRS SQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	277
CX3CR 1BII034	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAA SGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCT SDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNK TTLVYLMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTLVTVS S	SEQ ID NO.	278
CX3CR 1BII036	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR QAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSS	SEQ ID NO.	249
CX3CR 1BII040	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAG ESLRLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAI NSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKP EDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQA	SEQ ID NO.	279

	PGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVS S		
CX3CR 1BII041	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISRDN NAKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQAGESLRLSCAA SGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCT SDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	280
CX3CR 1BII042	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISRDN NAKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSGVQAGESLRL SCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRRDLVAAINSVGV TKYADSVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLKPEDTAV YYCTSDPRRGWDTRYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO.	281

Theo khía cạnh khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm VHH kháng-CX3CR1 và vùng Fc. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế bao gồm VHH kháng-CX3CR1 được dung hợp với peptit liên kết, peptit này được dung hợp với vùng Fc. Theo một khía cạnh, peptit liên kết là cầu liên kết 15GS. Theo một khía cạnh, vùng Fc domain có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO. 250 hoặc 252. Theo một khía cạnh, VHH có CDR1, CDR2 và CDR3 được nêu trong:

- SEQ ID NO. 213, 214 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 213, 221 và 186; hoặc
- SEQ ID NO. 141, 162 và 186.

Theo một khía cạnh, VHH có trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 138 đến 140 hoặc SEQ ID NO. 222 đến 224. Theo một khía cạnh polypeptit ở dạng dime, ví dụ trong đó dime được tạo ra nhờ một hoặc nhiều cầu nối disulfua.

Các ví dụ không hạn chế về các polypeptit theo sáng chế là các polypeptit có SEQ ID NO. 251, 253 hoặc 254.

Bảng 10

Vùng Fc chuột	PPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVV VAVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNS TLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGK	SEQ ID NO.	25 0
66B02- mFc	EVQLVESGGGSVQAGESLRLSCAASGSIFSSNAMAW YRQAPGKRRDLVAAINSVGVTKYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSPCKCPAPN LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVAVSEDDP DVQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSLTLRVVSALP IQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	SEQ ID NO.	25 1
Vùng Fc người	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	SEQ ID NO.	25 2
306D-hFc	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO.	25 3
307D-hFc	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAISTVGVTKYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	SEQ ID NO.	25 4

	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		
--	--	--	--

Polypeptit theo sáng chế có thể được cải biến để cải thiện các đặc tính của nó. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế có thể được cải biến để làm tăng độ ổn định khi bảo quản. Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế có thể được cải biến để tạo thuận lợi cho việc biểu hiện ở một số hệ thống chủ đặc biệt. Ví dụ, codon thứ nhất của polypeptit theo sáng chế có thể được cải biến. Theo một khía cạnh, axit amin đầu tiên của polypeptit theo sáng chế là axit glutamic (glu). Theo khía cạnh khác, axit amin đầu tiên của polypeptit theo sáng chế là axit aspartic (asp), ví dụ để giảm tạo thành pyroglutamat ở đầu tận cùng N khi bảo quản và do đó tăng độ ổn định cho sản phẩm. Theo khía cạnh khác, axit amin đầu tiên của polypeptit theo sáng chế là alanin (ala) hoặc valin (val), ví dụ để tạo thuận lợi cho việc biểu hiện polypeptit trong hệ biểu hiện tế bào nhân sơ, như *Escherichia coli*. Các cải biến này của polypeptit theo sáng chế tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

Các ví dụ đại diện về các polypeptit theo sáng chế với cải biến ở codon thứ nhất được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 257-262 và 263-266 và được nêu trong các Bảng 11 và 12 dưới đây:

Bảng 11

CX3CR1 BII00312 (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWY RQAPGKRRDLVAAISSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQAPGKRR DLVAAISSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO.	25 7
CX3CR1 BII00313 (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWY RQAPGKRRDLVAAISTVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQAPGKRR DLVAAISTVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQM	SEQ ID NO.	25 8

	NSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLLTVVSS		
CX3CR1 BII00314 (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWY RQAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLLYLMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRR DLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMN NSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLLTVVSS	SEQ ID NO.	25 9
CX3CR1 BII00312 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR QAPGKRRDLVAAISSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQ GTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLLYLMNSLRPEDTAVY CTIGGSLSRSSQGTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQAPGKRR DLVAAISSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMN SLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLLTVVSS	SEQ ID NO.	26 0
CX3CR1 BII00313 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYR QAPGKRRDLVAAISTVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQ GTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLLYLMNSLRPEDTAVY CTIGGSLSRSSQGTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWYRQAPGKRR DLVAAISTVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMN SLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLLTVVSS	SEQ ID NO.	26 1
CX3CR1 BII00314 (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWYR QAPGKRRDLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDN KNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQ GTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLLYLMNSLRPEDTAVY CTIGGSLSRSSQGTLLTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMAWYRQAPGKRR DLVAAINSVGVTKEYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMN SLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWGQGTLLTVVSS	SEQ ID NO.	26 2

Bảng 12

306D-hFc (D1A)	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAW YRQAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTISR NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRY WGQGTLVTVSSggggsgggsgggsgggscppcpapeaaggpsvflfppk pkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynst yrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakgqprepvytlpp sreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflys kltdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgk	SEQ ID NO.	26 3
307D-hFc (D1A)	Avqlvesggglvqpggslrlscaasgsifsstamawyrqapgkrrdlvaaistvg vtkyadsvkgrftisrdnsntvylqmnslrpedtavyyctsdprrgwdtrywg qgtlvtvssggggsgggsgggsgggscppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisr tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltv lhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakgqprepvytlppsreemtkn qvsltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltdksr wqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgk	SEQ ID NO.	26 4
306D-hFc (D1V)	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSTAMAWY RQAPGKRRDLVAAISSVGVTKYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTSDPRRGWDTRYWG QGTLVTVSSggggsgggsgggsgggscppcpapeaaggpsvflfppkpkd tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr vvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakgqprepvytlppsree mtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltd ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgk	SEQ ID NO.	26 5
307D-hFc (D1V)	vqlvesggglvqpggslrlscaasgsifsstamawyrqapgkrrdlvaaistvg kyadsvkgrftisrdnsntvylqmnslrpedtavyyctsdprrgwdtrywgqg tlvtvssggggsgggsgggsgggscppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisr tpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltv lhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakgqprepvytlppsreemtknqv sltlvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflyskltdksrwq qgnvfscsvmhealhnhytqkslspsgk	SEQ ID NO.	26 6

Theo một phương án khác nữa, polypeptit theo sáng chế đặc trưng bởi một hoặc nhiều đặc tính sau:

- Liên kết với CX3CR1 người với hoạt tính cao;
- Ức chế liên kết của fractalkin hòa tan với CX3CR1 người;
- Ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra;
- Ức chế sự nhập nội của thụ thể CX3CR1 người do fractalkin cảm ứng;
- Phản ứng chéo với CX3CR1 khỉ cynomolgus gấp 10 lần E/IC50 của CX3CR1 người về liên kết và ức chế chức năng.

Theo đó, theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế có ái lực với CX3CR1 người với IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, như được xác định bằng FACS cạnh tranh.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế có ái lực với CX3CR1 người với EC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, như được xác định bằng FACS liên kết tế bào.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế chặn liên kết của CX3CR1 người với fractalkin người ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 50%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 60%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 70%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 80%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 90%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 95% như được xác định bằng FACS cạnh tranh với fractalkin người.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người với IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 300nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 20nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM như được xác định bằng FACS cạnh tranh với fractalkin người.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra qua trung gian CX3CR1 người ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 10%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 30%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 40%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 50%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 60%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 70%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 80%, hoặc ở mức độ lớn hơn hoặc bằng 90%.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra qua trung gian CX3CR1 người với IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 500nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 75nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 50nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM.

Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế ức chế sự nhập nội của thụ thể CX3CR1 người do fractalkine gây ra với IC₅₀ nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5nM hoặc hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM.

Theo một phương án khác, sự cải biến kéo dài thời gian bán thải của polypeptit theo sáng chế (cải biến này cũng làm giảm tính sinh miễn dịch của polypeptit) bao gồm gắn thêm polymer được dung thích hợp, như poly(etylen glycol) (PEG) mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc các dẫn xuất của nó (như metoxypoly(etylen glycol) hoặc mPEG). Nói chung, dạng PEG hóa thích hợp bất kỳ của có thể được sử dụng, như PEG hóa được dùng trong lĩnh vực này với các kháng thể và đoạn kháng thể (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể vùng và scFv); tham khảo, ví dụ: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003); WO 04/060965; và US6,875,841.

Các chất phản ứng khác nhau để PEG hóa các polypeptit cũng sẵn có trên thị trường, ví dụ từ Nektar Therapeutics, USA, hoặc NOF Corporation, Japan, như Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series, và ME Series, như Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA, và Sunbright® ME-400MA.

Tốt hơn nếu PEG hóa có định hướng vị trí, cụ thể là thông qua gốc xystein (xem ví dụ, Yang et al., Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). Ví dụ, để thực hiện mục đích này, PEG có thể được gắn với gốc xystein có trong tự nhiên trong polypeptit theo sáng chế, polypeptit theo sáng chế may có thể được cải biến để đưa vào một hoặc nhiều gốc xystein thích hợp để gắn PEG, hoặc trình tự axit amin bao gồm một hoặc nhiều gốc xystein để gắn PEG có thể được dung hợp với đầu tận cùng N- và/hoặc C- và/hoặc PEG có thể được gắn vào vùng liên kết mà nối hai hoặc nhiều vùng chức năng của polypeptit theo sáng chế, tất cả đều sử dụng các kỹ thuật thao tác di truyền protein đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

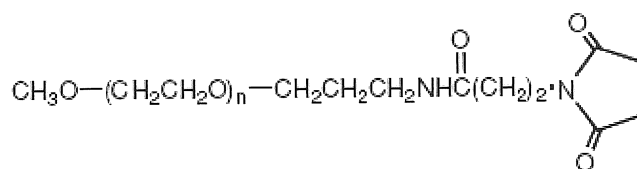
Đối với các polypeptit theo sáng chế, tốt hơn nếu sử dụng PEG với phân tử lượng trên 5 kDa, như trên 10 kDa và nhỏ hơn 200 kDa, như nhỏ hơn 100 kDa; ví dụ nằm trong khoảng từ 20 kDa đến 80 kDa.

Đối với PEG hóa, cần lưu ý rằng nói chung, sáng chế cũng bao gồm polypeptit bất kỳ theo sáng chế được PEG hóa ở một hoặc nhiều vị trí axit amin, tốt hơn là theo cách mà việc PEG hóa (1) làm tăng thời gian bán thải *in vivo*; (2) làm giảm tính sinh miễn dịch; (3) tạo ra một hoặc nhiều đặc tính có lợi đã biết đối với PEG hóa; (4) hầu như không ảnh hưởng đến ái lực của polypeptit với CX3CR1 (ví dụ, không làm giảm ái lực quá 50%, và tốt hơn là không quá 10%, như được xác định bằng các thử nghiệm

thích hợp, như các thử nghiệm được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây); và/hoặc (4) không ảnh hưởng đến các đặc tính mong muốn khác bất kỳ của các polypeptit theo sáng chế. Các nhóm PEG thích hợp và phương pháp để gắn chúng đặc hiệu hoặc không đặc hiệu đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, polypeptit PEG hóa theo sáng chế bao gồm một gốc PEG dạng PEG thẳng có phân tử lượng 40 kDa hoặc 60 kDa, trong đó gốc PEG được gắn vào polypeptit ở vùng cầu liên kết, cụ thể, ở gốc Cys, ví dụ tại vị trí số 5 của peptit liên kết GS8 như được nêu trong SEQ ID NO.235.

Các ví dụ được ưu tiên về các polypeptit PEG hóa theo sáng chế là các polypeptit PEG hóa tốt hơn là bằng một trong số các chất phản ứng PEG như nêu trên, như "Sunbright® ME-400MA" có công thức hóa học sau:



có phân tử lượng trung bình 40 kDa.

Sử dụng trong trị liệu

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit theo sáng chế hoặc được phẩm chứa polypeptit này để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc được phẩm chứa polypeptit này để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn xơ vữa động mạch ở tim và mạch não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh tái phát hẹp, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm thận tiểu cầu hình liềm ở người, bệnh thận IgA, bệnh màng thận, bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch bao gồm ban xuất huyết Henoch-Schonlein và bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, thái loại đoạn ghép, bệnh xơ cứng toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh và bệnh hủy myelin, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh Alzheimer, bệnh phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh hen, đau do căn nguyên thần kinh, đau do viêm, hoặc bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc được phẩm chứa polypeptit này để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh xơ vữa động mạch.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa polypeptit này để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh xơ vữa động mạch bằng cách ngăn ngừa và/hoặc giảm tạo thương tổn xơ vữa động mạch mới hoặc mảng bám và/hoặc bằng cách ngăn ngừa hoặc làm chậm tiến triển của thương tổn và mảng bám đã có.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng polypeptit theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa polypeptit này để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh xơ vữa động mạch bằng cách thay đổi thành phần mảng bám để làm giảm nguy cơ thoát vị mảng bám và biến cố huyết khối động mạch.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, hoặc giảm nguy cơ rối loạn xơ vữa động mạch ở tim và mạch não, bệnh động mạch ngoại biên, bệnh tái phát hẹp, bệnh thận do đái tháo đường, bệnh viêm thận tiểu cầu, bệnh viêm thận tiểu cầu hình liềm ở người, bệnh thận IgA, bệnh màng thận, bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch bao gồm ban xuất huyết Henoch-Schonlein và bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, thải loại đoạn ghép, bệnh xơ cứng toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh và bệnh hủy myelin, bệnh xơ cứng rải rác (MS), Bệnh Alzheimer, bệnh phổi như bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh hen, đau do căn nguyên thần kinh, đau do viêm, hoặc bệnh ung thư, ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, trong đó phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu điều trị polypeptit theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa polypeptit này.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh xơ vữa động mạch ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu điều trị polypeptit theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa polypeptit này.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh xơ vữa động mạch bằng cách ngăn ngừa và/hoặc giảm tạo thành thương tổn xơ vữa động mạch hoặc mảng bám và/hoặc bằng cách ngăn ngừa hoặc làm chậm tiến triển của thương tổn và mảng bám đã có ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu điều trị polypeptit theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa polypeptit này.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh xơ vữa động mạch bằng cách thay đổi thành phần mảng để giảm nguy cơ thoát vị mảng và các biến cố huyết khối động mạch ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu điều trị polypeptit theo sáng chế hoặc được phẩm chứa polypeptit này.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế được chỉ định để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến CX3CR1.

Theo một khía cạnh, polypeptit theo sáng chế được chỉ định để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý trong đó cần có sự cải biến hoạt tính của thụ thể CX3CR1. Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc giảm nguy cơ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý trong đó sự đối kháng thụ thể CX3CR1 là có lợi, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này sử dụng polypeptit theo sáng chế.

Dự phòng được cho là đặc biệt thích hợp để điều trị đối tượng đã trải qua cơn bệnh trước đó, hoặc được xem là có nguy cơ tăng cao đối với bệnh hoặc tình trạng bệnh lý nghi ngờ. Đối tượng có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể nói chung bao gồm các đối tượng có tiền sử gia đình đối với bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này, hoặc đối tượng đã được xác định bằng xét nghiệm di truyền hoặc sàng lọc là đặc biệt dễ cảm với sự phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh lý.

Theo sáng chế, thuật ngữ "ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm" không chỉ bao gồm việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, mà nói chung cũng bao gồm cả việc ngăn ngừa bệnh khởi phát, làm chậm hoặc hồi biến sự tiến triển bệnh, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh, làm giảm và/hoặc thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh, giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc khoảng thời gian bị bệnh và/hoặc triệu chứng bất kỳ có liên quan đến bệnh và/hoặc ngăn ngừa bệnh bệnh và/hoặc triệu chứng bất kỳ có liên quan đến bệnh trầm trọng hơn, ngăn ngừa, làm giảm hoặc hồi biến các thương tổn sinh lý do bệnh gây ra, và nói chung hoạt động được lý bất kỳ có lợi cho bệnh nhân được điều trị.

Đối tượng được điều trị là động vật có vú, và cụ thể hơn là người. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ, đối tượng cụ thể là người mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý nêu trên.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng biết rõ rằng các phương pháp điều trị bệnh nêu trên bao gồm việc bào chế thuốc để điều trị bệnh này. Hơn nữa, rõ ràng là các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính trong thuốc hoặc được phẩm dự định để điều trị các bệnh nêu trên. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng polypeptit theo sáng chế để bào chế được phẩm để ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ nêu trên. Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit theo sáng chế để dùng trong điều trị hoặc dự phòng và, đặc biệt là để phòng ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ nêu trên. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm để ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý nêu trên, trong đó được phẩm này chứa ít nhất một polypeptit theo sáng chế.

Các polypeptit theo sáng chế và/hoặc chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng trên bệnh nhân theo nhu cầu theo cách thích hợp bất kỳ, tùy thuộc vào dạng bào chế hoặc được phẩm cần sử dụng. Do đó, các polypeptit theo sáng chế và/hoặc chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế có thể ví dụ được dùng đường tĩnh mạch, dưới da, trong bắp, trong màng bụng, qua da, đường uống, dưới lưỡi (ví dụ, ở dạng viên nén đặt dưới lưỡi, dạng phun hoặc nhỏ giọt dưới lưỡi và được hấp phụ qua niêm mạc vào hệ mao quản dưới lưỡi), đường (trong) mũi (ví dụ, ở dạng phun mũi và/hoặc sol khí), dùng cục bộ, bằng thuốc đạn, bằng cách xông, trong nhãn cầu (đặc biệt để điều trị AMD khô hoặc bệnh tăng nhãn áp), hoặc theo đường thích hợp bất kỳ với lượng hoặc liều hữu hiệu.

Các polypeptit theo sáng chế và/hoặc chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng theo chế độ trị liệu thích hợp để ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cần ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm. Nói chung, bác sĩ điều trị có thể xác định chế độ trị liệu thích hợp, tùy thuộc vào các yếu tố bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cần ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm, mức độ nghiêm trọng của bệnh, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng của bệnh, polypeptit cụ thể theo sáng chế cần sử dụng, đường dùng cụ thể và dạng bào chế hoặc được phẩm cần sử dụng, độ tuổi, giới tính, thể trọng, chế độ ăn,

tình trạng chung của bệnh nhân, và các yếu tố tương tự mà bác sĩ đã biết rõ. Nói chung, chế độ trị liệu bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế, hoặc một hoặc nhiều chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế, với lượng hoặc liều hữu hiệu điều trị và/hoặc dự phòng.

Nói chung, để ngăn ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý đã nêu và tùy thuộc vào bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể cần điều trị, hiệu lực của polypeptit cụ thể theo sáng chế cần sử dụng, đường dùng cụ thể và dạng bào chế hoặc dược phẩm cụ thể cần sử dụng, các polypeptit theo sáng chế nói chung sẽ được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 0,005 đến 20,0mg trên một kilogram thể trọng và liều tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10,0 mg/kg/liều, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 10 mg/kg/liều, liên tục (ví dụ, bằng cách truyền) hoặc liều đơn (như ví dụ, liều hằng ngày, hằng tuần, hoặc hằng tháng; xem dưới đây), những có thể thay đổi đáng kể, đặc biệt, tùy thuộc vào các thông số nêu trên.

Đối với các ứng dụng dự phòng, chế phẩm chứa các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được dùng theo liều tương tự hoặc hơi thấp hơn. Liều lượng cũng có thể được điều chỉnh bởi bác sĩ riêng trong trường hợp có biến chứng.

Tùy thuộc vào polypeptit cụ thể theo sáng chế và các đặc tính dược động học và các đặc tính khác của nó, có thể sử dụng polypeptit hằng ngày, mỗi ngày thứ hai, thứ ba, thứ 4, thứ 5 hoặc thứ sáu, hằng tuần, hằng tháng, và tương tự. Chế độ dùng thuốc có thể bao gồm điều trị dài hạn, hằng tuần. Thuật ngữ "dài hạn" có nghĩa là khoảng thời gian điều trị ít nhất hai tuần và tốt hơn là hàng tháng, hoặc hàng năm.

Hiệu quả của các polypeptit theo sáng chế, và của chế phẩm chứa polypeptit theo sáng chế, có thể được kiểm tra bằng các thử nghiệm *in vitro*, thử nghiệm dựa trên tế bào, thử nghiệm *in vivo* và/hoặc thử nghiệm trên động vật thí nghiệm bất kỳ thích hợp đã biết, hoặc các kết hợp bất kỳ của chúng, tùy thuộc vào bệnh cụ thể có liên quan. Các thử nghiệm và động vật thí nghiệm thích hợp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, và ví dụ bao gồm các thử nghiệm và động vật thí nghiệm được sử dụng trong các ví dụ dưới đây.

Để dùng trong lĩnh vực dược, các polypeptit theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm chứa (i) ít nhất một polypeptit theo sáng chế và (ii) ít nhất một chất mang dược dụng, chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ, và/hoặc chất ổn định, và

(iii) tùy ý một hoặc nhiều polypeptit và/hoặc hợp chất có hoạt tính dược lý khác. Thuật ngữ "dược dụng" chỉ nguyên liệu không thể hiện tác dụng sinh học hoặc tác dụng không mong muốn khác bất kỳ khi sử dụng trên cá thể và không tương tác theo cách có hại với thành phần bất kỳ khác của dược phẩm (như ví dụ, thành phẩm hoạt tính của dược phẩm) chứa nó. Các ví dụ cụ thể có thể có trong các sổ tay tiêu chuẩn, như ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990). Ví dụ, các polypeptit theo sáng chế có thể được bào chế và sử dụng theo cách bất kỳ đã biết đối với các kháng thể và đoạn kháng thể thông thường và các protein có hoạt tính dược lý khác. Do đó, theo phương án tiếp theo, sáng chế đề cập đến dược phẩm hoặc chế phẩm 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 ổn định dược dụng, và tùy ý một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính dược lý khác.

Theo các ví dụ không hạn chế, dạng bào chế có thể ở dạng thích hợp để dùng theo đường uống, dùng ngoài đường tiêu hóa (như tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, trong nội tủy mạc, trong khoang dương vật hoặc tiêm màng bụng hoặc truyền tĩnh mạch), để sử dụng khu trú, để dùng dưới lưỡi, để dùng bằng cách xông, bằng miếng dán ngoài da, bằng cách cấy ghép, bằng thuốc đạn, để dùng qua da, đường mũi, trong nhãn cầu, đường trực tràng hoặc đường âm đạo, và các đường dùng tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ các dạng sử dụng thích hợp – có thể là rắn, bán rắn hoặc lỏng, tùy thuộc vào cách sử dụng - cũng như phương pháp và chất mang để bào chế các dạng này.

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

Các dung dịch chứa hoạt chất hoặc muối của nó cũng có thể chứa chất bảo quản để ngăn ngừa sự phát triển của vi sinh vật, như các tác nhân chống khuẩn và chống nấm, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal (thiomersal), và các chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm các tác nhân đẳng trương, ví dụ, đường, chất đệm hoặc natri clorua. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách tạo ra các liposom, bằng cách duy trì cỡ hạt theo yêu cầu trong trường hợp thể phân tán hoặc bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Các tác nhân khác làm chậm sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin, cũng có thể được bổ sung.

Trong mọi trường hợp, dạng liều cơ bản phải vô trùng, ở thể lỏng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Các dung dịch tiêm vô trùng được bào chế bằng cách kết hợp lượng cần thiết hoạt chất trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nêu trên, nếu cần, tiếp theo lọc vô trùng. Trong trường hợp bộ vô trùng để pha dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp được ưu tiên để bào chế là các kỹ thuật làm khô trong chân không và đông khô, các phương pháp này tạo ra bột thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ có trong dung dịch đã lọc vô trùng trước đó.

Thông thường, các dung dịch muối hoặc hỗn dịch được ưu tiên. Nói chung, các dạng bào chế thích hợp của các protein dùng trong điều trị như các polypeptit theo sáng chế là các dung dịch protein được đệm, như dung dịch bao gồm protein ở nồng độ thích hợp (như từ 0,001 đến 400mg/ml, tốt hơn là từ 0,005 đến 200mg/ml, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 200mg/ml, tốt hơn nữa là từ 1,0 đến 100mg/ml, như 1,0mg/ml (dùng đường tĩnh mạch) hoặc 100mg/ml (dùng dưới da) và dung dịch đệm trong nước như:

- nước muối đệm bằng phosphat, độ pH = 7,4,
- các dung dịch đệm phosphat khác, độ pH = 6,2 đến 8,2,
- dung dịch đệm histidin, độ pH = 5,5 đến 7,0,
- dung dịch đệm succinat, độ pH = 3,2 đến 6,6, và
- dung dịch đệm xitrat, độ pH = 2,1 đến 6,2,

và, tùy ý, muối (ví dụ, NaCl) và/hoặc đường hoặc rượu đa chức (như trehaloza, manitol, hoặc glycerol) để tạo ra tính đẳng trương cho dung dịch.

Các dung dịch protein được đệm được ưu tiên là các dung dịch chứa khoảng 0,05mg/ml polypeptit theo sáng chế hòa tan trong dung dịch đệm phosphat 25mM, độ

pH = 6,5, được điều chỉnh đến đẳng trương bằng cách bổ sung trehaloza 220mM. Ngoài ra, các tác nhân khác như chất tẩy rửa, ví dụ, Tween-20 hoặc Tween-80 0,02%, có thể được đưa vào các dung dịch này. Các dạng bào chế để dùng dưới da có thể chứa nồng độ polypeptit theo sáng chế cao hơn đáng kể, như lên tới 100mg/ml hoặc thậm chí trên 100mg/ml. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng các thành phần và lượng của chúng được đưa ra trên đây chỉ đại diện cho một lựa chọn được ưu tiên. Các lựa chọn và biến thể khác của nó sẽ rõ ràng ngay đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc có thể dễ dàng thu được từ phần mô tả trên.

Các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được dùng qua dạng chứa (depot) thích hợp, như các dạng bào chế giải phóng chậm hoặc giải phóng kéo dài, ví dụ, thích hợp để tiêm, bằng cách sử dụng các dụng cụ giải phóng có kiểm soát để ghép dưới da, và/hoặc bằng cách sử dụng bơm định liều hoặc các dụng cụ khác đã biết để sử dụng các hoạt chất được lý hoặc thành phần chính. Ngoài ra, các polypeptit theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng gel, kem, phun, nhỏ giọt, miếng dán hoặc màng mà nếu được dùng trên da, sẽ thấm qua da.

Tương tự, so với các kháng thể hoặc đoạn kháng thể thông thường, một ưu điểm chính của việc sử dụng các polypeptit theo sáng chế là ở chỗ chúng cũng có thể dễ dàng được dùng qua các đường không phải ngoài đường tiêu hóa và có thể dễ dàng được bào chế cho việc sử dụng đó. Ví dụ, như được mô tả trong WO2004/041867, các polypeptit như vậy có thể được bào chế để sử dụng qua đường uống, trong mũi, trong phổi và qua da.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm phối hợp chứa ít nhất một polypeptit theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả và ít nhất một thành phần hoạt tính khác được chọn từ nhóm gồm statin, chất chống tiểu cầu, chất chống đông, thuốc chống tiểu đường và thuốc chống cao huyết áp.

Các dược phẩm phối hợp có thể tùy ý chứa thêm chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất ổn định.

Khi hai hoặc nhiều chất hoặc thành phần chính được sử dụng trong chế độ điều trị phối hợp, chúng có thể được sử dụng qua cùng đường dùng hoặc qua các đường dùng khác nhau, gần như cùng lúc hoặc tại các thời điểm khác nhau (ví dụ, gần như đồng thời, liên tiếp, hoặc theo chế độ khác). Khi các hợp chất hoặc thành phần chính

cần sử dụng đồng thời theo cùng một đường sử dụng, chúng có thể được dùng dưới dạng các dạng bào chế hoặc được phẩm khác nhau hoặc dưới dạng một phần của dạng bào chế hoặc được phẩm phối hợp. Tương tự, khi hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc thành phần chính cần sử dụng dưới dạng một phần của chế độ trị liệu phối hợp, mỗi chất hoặc thành phần chính này có thể được sử dụng với cùng lượng và theo cùng chế độ như khi hợp chất hoặc thành phần chính được dùng một mình, và việc sử dụng phối hợp này có thể tạo ra tác dụng hiệp đồng hoặc không. Tuy nhiên, khi việc sử dụng phối hợp hai hoặc nhiều hoạt chất hoặc thành phần chính tạo ra tác dụng hiệp đồng, cũng có thể giảm lượng một, một số hoặc tất cả các hợp chất hoặc thành phần chính cần dùng, mà vẫn đạt được tác dụng trị liệu mong muốn. Điều này có thể, ví dụ hữu dụng để tránh, hạn chế hoặc giảm tác dụng phụ không mong muốn bất kỳ có liên quan đến việc sử dụng một hoặc nhiều chất hoặc thành phần chính khi dùng chúng với lượng thường dùng, trong khi đó vẫn có được tác dụng dược lý hoặc trị liệu mong muốn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh và rối loạn nêu trên, bao gồm việc cho đối tượng sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt, lượng hữu hiệu của ít nhất một polypeptit theo sáng chế và ít nhất một tác nhân được chọn từ nhóm gồm statin, chất chống tiểu cầu, chất chống đông, thuốc chống tiểu đường và thuốc chống cao huyết áp.

Theo một phương án khác của sáng chế, polypeptit theo sáng chế được bào chế để sử dụng phối hợp với các thuốc khác được dùng trong điều trị các bệnh và rối loạn nêu trên, các thuốc khác này được chọn từ nhóm gồm statin, chất chống tiểu cầu, chất chống đông, thuốc chống tiểu đường và thuốc chống cao huyết áp.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, các thuốc dùng để điều trị bệnh và rối loạn nêu trên, các thuốc được chọn từ nhóm gồm statin, chất chống tiểu cầu, chất chống đông, thuốc chống tiểu đường và thuốc chống cao huyết áp được bào chế để sử dụng phối hợp với polypeptit theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, polypeptit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với dụng cụ hữu dụng để dùng polypeptit, như xi lanh, bút tiêm, hoặc dụng cụ khác.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý do CX3CR1 hoạt động bất thường gây ra bao gồm các bước:

- a) thu mẫu từ đối tượng, và
- b) cho mẫu tiếp xúc *in vitro* với polypeptit theo sáng chế như xác định trên đây, và
- c) phát hiện liên kết của polypeptit với mẫu, và
- d) so sánh liên kết đã phát hiện ở bước (c) với chuẩn, trong đó độ khác biệt về liên kết tương ứng với mẫu là chẩn đoán bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý đặc trưng bởi sự hoạt động bất thường của CX3CR1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý do CX3CR1 hoạt động bất thường gây ra bao gồm các bước:

- a) thu mẫu từ đối tượng, và
- b) cho mẫu tiếp xúc với polypeptit theo sáng chế như xác định trên đây;
- c) xác định lượng CX3CR1 có trong mẫu; và
- d) so sánh lượng đã xác định ở bước (c) với chuẩn, trong đó độ khác biệt về lượng tương ứng với mẫu là chẩn đoán bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý đặc trưng bởi sự hoạt động bất thường của CX3CR1.

Các phương pháp chẩn đoán trên đây cũng có thể được sử dụng để theo dõi độ hữu hiệu của phương pháp điều trị ở đối tượng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kit chẩn đoán bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý do CX3CR1 hoạt động bất thường gây ra, để sử dụng trong phương pháp xác định trên đây, kit này bao gồm ít nhất một polypeptit theo sáng chế và, tùy ý, một hoặc nhiều phương tiện phát hiện trung gian và/hoặc tác nhân tạo hình ảnh *in vitro* hoặc *in vivo*, và tùy ý, hướng dẫn sử dụng. Các tác nhân tạo hình ảnh *in vivo* thích hợp bao gồm ^{99m}Tc, ¹¹¹Indi, ¹²³Iot, và các hợp chất thuận từ để tạo hình ảnh cộng hưởng từ.

Sáng chế cũng đề xuất kit chứa ít nhất một polypeptit theo sáng chế và, một hoặc nhiều thành phần khác được chọn từ nhóm gồm các thuốc khác được dùng để điều trị bệnh và rối loạn như được mô tả trên đây, và dụng cụ như được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, phương pháp này nói chung bao gồm các bước:

- nuôi cấy tế bào chủ mang axit nucleic có khả năng mã hóa polypeptit theo sáng chế (sau đây gọi là: "axit nucleic theo sáng chế") trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit theo sáng chế; và,
- thu hồi hoặc phân lập polypeptit được biểu hiện bởi tế bào chủ từ môi trường nuôi cấy; và
- tùy ý tinh chế và/hoặc cải biến tiếp và/hoặc bào chế polypeptit theo sáng chế.

Axit nucleic theo sáng chế có thể là ADN hệ gen, ADN bổ trợ hoặc ADN tổng hợp (như ADN với cách dùng mã bộ ba đặc biệt thích hợp để biểu hiện trong tế bào chủ hoặc sinh vật chủ dự định). Theo một phương án của sáng chế, axit nucleic theo sáng chế chủ yếu ở dạng phân lập, như mô tả trên đây.

Axit nucleic theo sáng chế cũng có thể ở dạng, có trong và/hoặc là một phần của vector, như ví dụ plasmid, cosmid hoặc YAC mà đều có thể chủ yếu ở dạng được phân lập. Vector có thể đặc biệt là vector biểu hiện, tức là vector mà có thể tạo ra để biểu hiện polypeptit *in vitro* và/hoặc *in vivo* (ví dụ, trong tế bào chủ, sinh vật chủ và/hoặc hệ thống biểu hiện thích hợp). Vector biểu hiện thường bao gồm ít nhất một axit nucleic theo sáng chế được liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố điều khiển thích hợp, như đoạn khởi đầu, đoạn tăng cường, đoạn kết thúc, và các yếu tố tương tự. Các ví dụ cụ thể về yếu tố điều khiển và các yếu tố khác, như (các) yếu tố kết hợp, dấu chuẩn chọn lọc, trình tự tín hiệu hoặc trình tự dẫn, gen báo cáo, và các yếu tố tương tự, hữu dụng hoặc cần thiết để biểu hiện các polypeptit theo sáng chế, được bộc lộ ví dụ, từ trang 131 đến 133 trong WO2006/040153.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra hoặc thu được theo cách đã biết (ví dụ, bằng cách tổng hợp ADN tự động và/hoặc công nghệ ADN tái tổ hợp), dựa trên thông tin về trình tự axit amin của các polypeptit theo sáng chế được nêu trong bản mô tả, và/hoặc có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên thích hợp.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến vật chủ hoặc tế bào chủ biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện polypeptit theo sáng chế; và/hoặc chứa a axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế. Theo phương án đặc biệt được ưu tiên, tế bào chủ này là tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào nấm mốc hoặc tế bào động vật có vú.

Các tế bào chủ vi khuẩn thích hợp bao gồm các tế bào từ các chủng vi khuẩn gram âm như các chủng *Escherichia coli*, *Proteus*, và *Pseudomonas*, và các chủng vi khuẩn gram dương như các chủng *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, và *Lactococcus*. Tế bào nấm mốc thích hợp bao gồm tế bào từ các loài *Trichoderma*, *Neurospora*, và *Aspergillus*. Các tế bào nấm men thích hợp bao gồm tế bào từ các loài *Saccharomyces* (ví dụ *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (ví dụ, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (ví dụ *Pichia pastoris* và *Pichia methanolica*), và *Hansenula*.

Các tế bào động vật có vú thích hợp bao gồm ví dụ tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào HeLa, tế bào COS, tế bào NS0, tế bào HEK, và các tế bào tương tự. Tuy nhiên, cũng có thể sử dụng các tế bào động vật lưỡng cư, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, và các tế bào bất kỳ khác được dùng trong lĩnh vực này để biểu hiện các protein khác loại.

Để sản xuất trên quy mô công nghiệp, các vật chủ khác loại được ưu tiên để sản xuất (công nghiệp) vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch trong polypeptit và protein dùng trong trị liệu bao gồm các chủng *E. coli*, *Pichia pastoris*, và *S. cerevisiae* thích hợp để biểu hiện, sản xuất và lên men trên quy mô lớn, và đặc biệt để biểu hiện, sản xuất và lên men (sinh) được lý trên quy mô lớn.

Việc lựa chọn hệ biểu hiện cụ thể sẽ tùy thuộc một phần vào yêu cầu về các cải biến sau dịch mã nhất định, cụ thể hơn là glycosyl hóa. Để sản xuất polypeptit theo sáng chế mà mong muốn hoặc cần phải glycosyl hóa sẽ cần phải sử dụng vật chủ biểu hiện động vật có vú có khả năng glycosyl hóa protein được biểu hiện. Theo khía cạnh này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng phổ glycosyl hóa thu được (tức là loại, số lượng và vị trí các gốc gắn thêm) sẽ tùy thuộc vào tế bào hoặc dòng tế bào được dùng để biểu hiện.

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

Các phương pháp và thành phần phản ứng khác để sản xuất theo cách tái tổ hợp polypeptit, như vectơ biểu hiện thích hợp, phương pháp biến nạp hoặc chuyển nhiễm,

các dấu chuẩn chọn lọc, phương pháp cảm ứng sự biểu hiện protein, các điều kiện nuôi cấy, và tương tự, là đã biết trong lĩnh vực này. Tương tự, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết rõ các kỹ thuật phân lập protein và tinh chế hữu dụng trong phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế.

Việc sản xuất các polypeptit theo sáng chế qua lên men trong 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 cũng đòi hỏi những điều kiện nuôi cấy tế bào động vật có vú đắt tiền. Hơn nữa, các mức biểu hiện và năng suất cao có thể đạt được của các polypeptit theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 10g/l (*E. coli*) và lên tới 10g/l (nấm men) và cao hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tạo các dòng tế bào CHO, Baf/3, Caki và HEK293 biểu hiện quá mức CX3CR1 người hoặc CX3CR1 khỉ cynomolgus

Các tế bào CHO và Baf/biểu hiện quá mức CX3CR1 người hoặc khỉ cynomolgus được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào biểu hiện CCR2 hoặc CCR5 người cũng có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

ADN bổ trợ được tách dòng vào pCDNA3.1(+)-neo để tạo ra CX3CR1 người trong khi pcDNA-DEST40-neo được dùng cho CX3CR1 chuột.

Các trình tự axit amin CX3CR1 người và CX3CR1 khỉ cynomolgus lần lượt được mô tả trong SEQ ID NO. 255 và 256.

Để tạo ra các tế bào thận lạc đà (Camel Kidney - Caki) biểu hiện quá mức CX3CR1 người hoặc CX3CR1 chuột, các tế bào Caki gốc lần lượt được điện chuyển pCDNA3.1(+)-neo-hCX3CR1 hoặc pcDNA-DEST40-neo-mCX3CR1. Trong mọi điều kiện, thể chuyển nhiễm được chọn lọc bằng cách bổ sung 1mg/mL Geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Tế bào thận phôi thai người (HEK293) biểu hiện quá mức CX3CR1 người hoặc CX3CR1 khỉ cynomolgus được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm lần lượt plasmit pCDNA3.1(+)-neo-hCX3CR1 hoặc cyCX3CR1 qua trung gian lipit với Eugene (Roche), trong dòng tế bào gốc HEK293. Các tế bào này được dùng làm thể chuyển

nhễm tạm thời và do đó không được chọn lọc. Tóm lại, các tế bào 2×10^6 được cấy vào bình nuôi cấy T75 và ủ qua đêm để chuyển nhiễm. Sau khi loại bỏ môi trường nuôi cấy, các tế bào được chuyển nhiễm plasmit tương ứng ($9 \mu\text{g}$) và Eugene ($27 \mu\text{l}$) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được thu hoạch và làm lạnh đông để sử dụng tiếp.

Ví dụ 1: Gây miễn dịch bằng CX3CR1 gây ra đáp ứng miễn dịch người ở lạc đà không bướu

1.1. Gây miễn dịch

Sau khi được sự chấp thuận của Ủy ban Đạo đức (Ethical Committee, University Antwerp, Belgium, UA2008A1, 2008/096, 2007/068), 9 con lạc đà không bướu (số 368, 369, 370, 381, 382, 384, 312, 313 và 314) được gây miễn dịch.

Sáu con lạc đà không bướu (312, 313, 314, 381, 382 và 384) được gây miễn dịch bằng cách tiêm trong bắp 4 mũi (2mg /liều hằng tuần hoặc mỗi hai tuần) vectơ plasmit pVAX1-huCX3CR1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ba con lạc đà không bướu (381, 382 và 384) sau đó được tiêm dưới da 4 mũi tế bào Caki biểu hiện quá mức CX3CR1 người được tạo ra như được mô tả trên đây. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch D-PBS và giữ trên đá trước khi tiêm.

Ba con lạc đà không bướu khác (số 368, 369 và 370) được gây miễn dịch theo quy trình chuẩn bằng cách tiêm dưới da 4 mũi tế bào Caki biểu hiện quá mức CX3CR1 người được tạo ra như được mô tả trên đây. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch D-PBS và giữ trên đá trước khi tiêm. Sau đó, các con lạc đà không bướu được tiêm 2 mũi CX3CR1 NT tái tổ hợp/đoạn EC3 kết hợp với BSA (Bảng 13). Các peptit được mua từ NeoMPS (Polypeptitgroup, Strasbourg, France) và kết hợp với BSA theo quy trình chuẩn.

Bảng 13. Trình tự các đoạn peptit dùng để gây miễn dịch

Đoạn	Trình tự	SEQ ID NO.
CX3CR1-NT	Ac-Met-Asp-Gln-Phe-Pro-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Asn-Phe-Glu-Tyr-Asp-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Cys-NH ₂	228
CX3CR1-EC3	Ac-Lys-Leu-Tyr-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Cys-Asp-Met-Arg-Lys-Asp-Leu-Arg-Leu-NH ₂	229

Mũi tiêm đầu tiên được pha trong chất phụ trợ Freund đầy đủ (Difco, Detroit, MI, USA), trong khi đó mũi tiêm tiếp theo được pha trong chất phụ trợ Freund không đầy đủ (Difco, Detroit, MI, USA).

1.2. Đánh giá đáp ứng miễn dịch được cảm ứng ở lạc đà không bướu

Để đánh giá sự cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở động vật chống lại CX3CR1 người bằng thử nghiệm ELISA hoặc FACS, thu huyết thanh từ lạc đà không bướu 312, 313 và 314 ở ngày 0 (tiền miễn dịch), và tại các thời điểm khác nhau trong lịch tiêm chủng (thời điểm thu lympho bào máu ngoại vi (peripheral blood lymphocyte - PBL)).

Tóm lại, Neutravidin (2µg/ml) được ủ qua đêm ở 4°C trong đĩa 96 giếng Maxisorb (Nunc, Wiesbaden, Germany). Các giếng được phong bế bằng dung dịch casein (1%) trong PBS. Tiếp đó, đoạn NT tái tổ hợp biotinyl hóa (Polypeptit, Strasbourg, France) hoặc các đoạn EC3 biotinyl hóa của CX3CR1 (Polypeptit, Strasbourg, France) được thu ở 2 µg/ml. Sau khi bổ sung dịch pha loãng huyết thanh, các globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng peroxidaza cây cải ngựa (horseradish peroxidase - HRP) tiếp hợp globulin miễn dịch của dê kháng lạc đà không bướu (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) và sau đó là phản ứng enzym với sự có mặt của cơ chất TMB One (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) (Promega, Mannheim, Germany), cho thấy rằng đáp ứng miễn dịch phụ thuộc kháng thể đáng kể chống lại CX3CR1 đã được cảm ứng sau khi gây miễn dịch bằng peptit.

Ngoài ra, hiệu giá huyết thanh của các động vật được gây miễn dịch tế bào được xác nhận bằng phép phân tích FACS trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức CX3CR1 người đang phát triển mạnh. Đáp ứng hiệu giá huyết thanh CX3CR1 đối với lạc đà không bướu 368, 369 và 370 được xác định bằng huyết thanh được thu mẫu sau 4 lần gây miễn dịch tế bào (ngày 49), 4 lần gây miễn dịch tế bào và lần tiêm 1 peptit (ngày 77) và 4 lần gây miễn dịch tế bào và 2 lần tiêm peptit (ngày 81). Các tế bào được thu hoạch và rửa trước khi ủ với các dịch pha loãng huyết thanh. Tiến hành phát hiện bằng IgG dê kháng lạc đà không bướu (Bethyl, Montgomery, TX, USA) tiếp theo là lừa kháng dê kết hợp với PE (Jackson Laboratories, Suffolk, UK) và đọc bằng cách phân tích trên thiết bị FACSArray (BD Biosciences). Tóm tắt về các đáp ứng huyết thanh thu được như xác định bằng ELISA hoặc FACS được thể hiện trên Bảng 14 và Bảng 15.

Bảng 14. Phân tích chuẩn độ huyết thanh của động vật được gây miễn dịch bằng tế bào/peptit

Lạc đà không bướu	Immunogen	ELISA		FACS	
		NT tái tổ hợp	EC3 tái tổ hợp	Sau khi gây miễn dịch tế bào	Sau khi tiêm peptit
368	Caki-huCX3CR1 + peptit NT/EC3	+	+/-	-	-
369	Caki-huCX3CR1 + peptit NT/EC3	+	+/-	+	+
370	Caki-huCX3CR1 + peptit NT/EC3	++	++	-	+

Bảng 15. Phân tích hiệu giá huyết thanh của động vật được gây miễn dịch bằng ADN/tế bào

Lạc đà không bướu	Immunogen	ELISA		FACS	
		NT tái tổ hợp	EC3 tái tổ hợp	Sau khi gây miễn dịch bằng ADN	Sau khi tiêm tế bào
381	DNA + Caki-huCX3CR1	++	+	++	++
382	DNA + Caki-huCX3CR1	+	-	-	-
384	DNA + Caki-huCX3CR1	++	-	-	-

Đối với các lạc đà không bướu chỉ gây miễn dịch bằng ADN (312, 313 và 314) không xác định được hiệu giá huyết thanh.

Ví dụ 2: Tách dòng nguồn đoạn kháng thể chỉ chứa chuỗi nặng và tạo thể thực khuẩn

Sau khi tiêm chủng lần cuối ở mỗi nhóm, thu mô miễn dịch làm nguồn tế bào B tạo ra kháng thể chuỗi nặng từ các lạc đà không bướu được gây miễn dịch. Đối với lạc đà không bướu 312, 313 và 314, hai mẫu máu 150ml, sau khi tiêm mũi kháng nguyên cuối cùng 4 ngày và 8 ngày được thu ở từng động vật. Đối với lạc đà không bướu 368, 369 và 370 thu bốn mẫu máu 150ml, sau khi gây miễn dịch tế bào lần cuối 5 ngày và 7 ngày và sau khi gây miễn dịch bằng peptit lần cuối 4 ngày và 8 ngày. Sau khi thu mẫu như trên, thu hai mẫu sinh thiết hạch lympho, sau khi gây miễn dịch tế bào lần cuối 12 ngày và sau khi gây miễn dịch bằng peptit lần cuối 12 ngày. Đối với các con lạc đà không bướu 381, 382 và 384 thu 5 mẫu máu 150ml, sau khi gây miễn dịch bằng ADN

lần cuối 8 ngày và sau khi tiêm tế bào lần đầu 4 ngày, sau khi tiêm tế bào lần hai 8 ngày và 11 ngày và sau khi gây miễn dịch tế bào lần cuối 8 ngày. Tiếp theo việc thu mẫu này, thu một mẫu sinh thiết hạch lympho sau khi gây miễn dịch tế bào lần hai 8 ngày.

Từ các mẫu máu, lympho bào máu ngoại vi (PBL) được chuẩn bị bằng Ficoll-Hypaque theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Từ PBL và mẫu sinh thiết hạch lympho (LN), chiết ARN tổng số để dùng làm nguyên liệu ban đầu trong RT-PCR để khuếch đại các đoạn ADN mã hóa VHH.

Đối với mỗi con lạc đà không bướu được gây miễn dịch, xây dựng thư viện bằng gom ARN tổng số được phân lập từ các mẫu có nguồn gốc từ các nhóm nhất định theo lịch chủng ngừa tức là sau khi mỗi loại kháng nguyên gây miễn dịch, và đối với một số lạc đà không bướu, mẫu từ các động vật khác nhau được gom vào một thư viện (Bảng 16).

Bảng 16. Gom mẫu khác nhau để tạo thư viện

Tên thư viện	Lạc đà không bướu	Mẫu
368-PBL1+2+LN-V-100209	368	PBL 1 và 2, LN
369+370-PBL1+2+LN-V-100209	369, 370	PBL 1 và 2, LN
368-PBL3+4-V-280909	368	PBL 3 và 4
369-PBL3+4-V-070409	369	PBL 3 và 4
370-PBL3+4-V-070409	370	PBL 3 và 4
381-PBL1-V-180310	381	PBL 1
382-PBL1-V-180310	382	PBL1
384-PBL1-V-180310	384	PBL1
381-PBL1+2+3+4+5+LN-V-280909	381	PBL 1, 2, 3, 4, 5 và LN
382-PBL1+2+3+4+5+LN-V-280909	382	PBL 1, 2, 3, 4, 5 và LN
384-PBL1+2+3+4+5+Ln-V-280909	384	PBL 1, 2, 3, 4, 5 và LN
312+313+314-PBL1+2-V-220210	312, 313 và 314	PBL 1 và 2
312-PBL1+2-V-180310	312	PBL 1 và 2
313-PBL1+2-V-180310	313	PBL 1 và 2
314-PBL1+2-V-180310	314	PBL 1 và 2

Tóm lại, nguồn VHH được khuếch đại bằng PCR được tách dòng qua các vị trí giới hạn cụ thể vào vector được thiết kế để tạo thuận lợi cho việc bộc lộ trên thể thực khuẩn thư viện VHH. Vector thu được từ pUC119 và chứa đoạn khởi đầu LacZ, trình tự mã hóa protein gIII của thể thực khuẩn M13, gen kháng ampicilin hoặc carbenixilin, các vị trí tác động và trình tự dẫn gIII-pelB lai (pAX050). Trong cùng khung với trình tự mã hóa VHH, vector mã hóa đuôi c-myc ở đầu tận cùng C và đuôi His6. Thể thực khuẩn được chuẩn bị theo quy trình chuẩn và bảo quản sau khi lọc vô trùng ở 4°C hoặc ở -80°C trong glycerol 20% để sử dụng tiếp.

Ví dụ 3: Chọn lọc VHH đặc hiệu CX3CR1 bằng kỹ thuật bộc lộ trên thể thực khuẩn

Nguồn VHH thu được từ tất cả các lạc đà không bướu và tách dòng dưới dạng thư viện thể thực khuẩn được dùng trong các cách chọn lọc khác nhau, sử dụng nhiều điều kiện chọn lọc. Các biến bao gồm i) dạng trình diện của protein CX3CR1 (trên các nền tế bào khác nhau hoặc trên liposom/VLP), ii) phương pháp trình diện kháng nguyên (trong dung dịch khi sử dụng các tế bào hoặc phủ trên đĩa khi sử dụng VLP), iii) nồng độ kháng nguyên iv) nguồn được sử dụng (người hoặc khỉ cynomolgus) v) số vòng chọn lọc và vi) các phương pháp giải hấp khác nhau (không đặc hiệu bằng trypsin hoặc đặc hiệu bằng phối tử Fractalkin). Tất cả các bước chọn lọc thể thực khuẩn kiểu phủ pha rắn được thực hiện trong đĩa Maxisorp 96 giếng (Nunc, Wiesbaden, Germany).

Việc chọn lọc được tiến hành như sau: các chế phẩm CX3CR1 kháng nguyên để chọn lọc thể thực khuẩn pha rắn và dung dịch được trình diện như được mô tả trên đây ở nhiều nồng độ. Sau khi ủ 2 giờ với thư viện thể thực khuẩn tiếp theo rửa kỹ, các thể thực khuẩn liên kết được giải hấp bằng trypsin (1mg/mL) trong 15 phút. Sau khi dùng trypsin để giải hấp thể thực khuẩn, hoạt tính proteaza ngay lập tức được trung hòa bằng cách dùng chất ức chế proteaza ABSF 0,8mM. Các bước chọn lọc không có kháng nguyên được tiến hành song song để đối chứng.

Thể thực khuẩn thu được được sử dụng để nhiễm vào *E. coli* mà sau đó lại được dùng để tạo ra thể thực khuẩn cho vòng chọn lọc tiếp theo (chọn lọc thể thực khuẩn) sau khi chọn lọc vòng thứ hai, thể thực khuẩn thu được được dùng để nhiễm vào *E. coli* mà sau đó được trải trên đĩa aga (LB+carbamat+glucoza^{2%}) để phân tích các dòng VHH riêng rẽ. Để sàng lọc sản phẩm chọn lọc về liên kết đặc hiệu, các dòng đơn được

nhặt từ đĩa aga và nuôi trong các đĩa 96 giếng sâu 1mL. Cảm ứng sự biểu hiện VHH kiểm soát bằng LacZ bằng cách bổ sung IPTG (nồng độ cuối 1mM) khi không có mặt glucoza. Các phần chiết chu chất (thể tích ~ 80uL) được chuẩn bị theo quy trình chuẩn.

Ví dụ 4: Sàng lọc các phần chiết chu chất trong thử nghiệm FACS cạnh tranh CX3CR1-Fraktalkin

Các phần chiết chu chất được sàng lọc trong thử nghiệm FACS cạnh tranh CX3CR1 người/fractalkin người để đánh giá khả năng ngăn chặn của các VHH được biểu hiện. CX3CR1 người được trình diện trên các tế bào CHO biểu hiện quá mức CX3CR1. Cả nhóm dùng tế bào thu được từ môi trường nuôi cấy đang phát triển mạnh và nhóm dùng tế bào đông lạnh đều được sử dụng. Fractalkin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) được đánh dấu bằng alexa647 (A647-Fractalkin) ở độ đánh dấu 1 được sử dụng làm chất chỉ thị. Để thiết kế thử nghiệm, loạt chuẩn độ đầu tiên của fractalkin được đánh dấu được tiến hành trên các tế bào CHO-huCX3CR1 để xác định giá trị EC50 về liên kết. Tiến hành sàng lọc ban đầu với nồng độ fractalkin cao hơn (3nM) để tăng độ mạnh của thử nghiệm. Để tăng độ nhạy của bước sàng lọc đến tối đa, nồng độ EC30 (1nM) được chọn để sàng lọc tiếp. Tóm lại, 50µl phần chiết chu chất được bổ sung vào 6nM fractalkin được đánh dấu (50µl) và 200000 tế bào CHO-huCX3CR1. Sau khi ủ 1 giờ ở nhiệt độ 4°C, các tế bào được rửa 3 lần trước khi đọc trên thiết bị FACS Array (Becton Dickinson). Đầu tiên, cổng được thiết lập trên các tế bào nguyên vẹn như được xác định từ profin phân tán. Tiếp theo, các tế bào chết được tạo cổng bằng profin huỳnh quang từ chúng PI (Sigma, St Louis, US) của chúng. Profin huỳnh quang từ nhãn đánh dấu alexa647 được xác định cho mỗi mẫu và sử dụng để tính khả năng chặn. Các điều kiện được thực hiện khi không có VHH trong phần chiết chu chất hoặc VHH đã biết là không liên quan để đối chứng và mẫu được đưa vào khi fractalkin lạnh dư được đưa vào. Đối với mỗi mẫu, tỷ lệ phần trăm chặn được xác định bằng cách sử dụng mẫu đối chứng để xác định cửa sổ thử nghiệm.

Từ bước sàng lọc này, chọn được các VHH và việc phân tích trình tự cho thấy 120 VHH đặc biệt thuộc về 3 dòng tế bào B khác nhau. Tổng số biến thể phát hiện được đối với mỗi dòng tế bào B được minh họa trong Bảng 17.

Bảng 17. Các thông số chọn lọc dùng để nhận dạng các dòng tế bào B VHH đặc hiệu CX3CR1 người

Dòng tế bào B	Mã nhận dạng VHH đại diện	Số biến thể	Thư viện
9	CX3CR1BII11H11	4	368-PBL1+2+LN-V-100209
13	CX3CR1BII18E06	68	368-PBL1+2+LN-V-100209 368-PBL3+4-V-280909
101	CX3CR1BII66B02	48	312+313+314-PBL1+2-V-220210 314-PBL1+2-V-180310

Tổng quan về quy trình chọn lọc và việc tiến hành trong bước sàng lọc ban đầu được đưa ra cho tất cả các VHH trong Bảng 18.

Bảng 18. Điều kiện chọn lọc và kết quả sàng lọc sơ bộ VHH đặc hiệu CX3CR1 người

Mã nhận dạng VHH	Họ	Thư viện	Chọn lọc				% ngăn chặn
			vòng thứ nhất		vòng thứ hai		
CX3CR1BII PMP11H11	9	368- PBL1+2+L N-V- 100209	BA/F3_hC X3CR1	tổng (trypsin)	CHO- K1_hCX3C R1	tổng (trypsin)	99,0
CX3CR1BII PMP18E6	13	368- PBL3+4-V- 280909	BA/F3_hC X3CR1	tổng (trypsin)	CHO- K1_hCX3C R1	tổng (trypsin)	53,1
CX3CR1BII PMP54A12	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	93,8
CX3CR1BII PMP54A3	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	90,8
CX3CR1BII PMP54A4	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	86,6
CX3CR1BII PMP54A5	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	92,5
CX3CR1BII	101	312+313+3	VLPs-	tổng	VLPs-	tổng	68,9

PMP54A7		14- PBL1+2-V- 220210	hCX3CR1 (10U)	(trypsin)	hCX3CR1 (10U)	(trypsin)	
CX3CR1BII PMP54B1	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	92,1
CX3CR1BII PMP54B2	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	65,3
CX3CR1BII PMP54B3	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	90,1
CX3CR1BII PMP54B5	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	92,6
CX3CR1BII PMP54D5	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	87,8
CX3CR1BII PMP54D8	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	tổng (trypsin)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	tổng (trypsin)	64,1
CX3CR1BII PMP54F6	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	96,6
CX3CR1BII PMP54G3	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	74,7
CX3CR1BII PMP54H1	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	74,6
CX3CR1BII PMP54H4	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	96,0

CX3CR1BII PMP61F10	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	73,5
CX3CR1BII PMP61D1	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	68,4
CX3CR1BII PMP61D5	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	94,9
CX3CR1BII PMP61E2	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	70,3
CX3CR1BII PMP61F11	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	96,5
CX3CR1BII PMP61G2	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	82,0
CX3CR1BII PMP61G3	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	92,1
CX3CR1BII PMP61G4	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	94,5
CX3CR1BII PMP61F4	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	94,4
CX3CR1BII PMP61A11	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	78,0
CX3CR1BII PMP61B2	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	94,5
CX3CR1BII PMP61C9	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	tổng (trypsin)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	tổng (trypsin)	69,4
CX3CR1BII PMP65H02	101	312+313+3 14- PBL1+2-V- 220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65E11	101	312+313+3 14-	VLPs- hCX3CR1	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1	hFrac (2 μM)	#N/A

		PBL1+2-V-220210	(10U)		(10U)		
CX3CR1BII PMP65E10	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65E05	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65B11	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65B07	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65B09	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65H01	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP65G07	101	312+313+3 14- PBL1+2-V-220210	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP66H08	101	314- PBL1+2-V-180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP66H04	101	314- PBL1+2-V-180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP66F02	101	314- PBL1+2-V-180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A
CX3CR1BII PMP66E11	101	314- PBL1+2-V-180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μM)	#N/A

CX3CR1BII PMP66D10	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66D08	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66B02	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66A04	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66D04	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66D02	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66D06	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A
CX3CR1BII PMP66G01	101	314- PBL1+2-V- 180310	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	VLPs- hCX3CR1 (10U)	hFrac (2 μ M)	#N/A

Trình tự axit amin của tất cả các VHH đặc biệt thu được được thể hiện trên đây và trong danh mục trình tự (các CDR và vùng khung được chỉ rõ).

Ví dụ 5: Xác định đặc tính của VHH được tinh chế

Các VHH kháng CX3CR1 theo cách ức chế được chọn từ bước sàng lọc được mô tả trong Ví dụ 4 được tinh chế tiếp và xác định đặc tính. Các VHH chọn được được biểu hiện trong *E. coli* TG1 dưới dạng protein c-myc, đuôi His6. Việc biểu hiện được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG 1mM và để tiếp tục trong 4 giờ ở 37°C. Sau khi ly tâm nhẹ dung dịch nuôi cấy tế bào, các phần chiết chu chất được chuẩn bị bằng cách đông lạnh-làm tan phần cặn tế bào. Các phần chiết này được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu và VHH được tinh chế qua IMAC và kỹ thuật sắc ký phân cỡ (size exclusion chromatography - SEC) tạo ra độ tinh khiết 95% theo đánh giá bằng SDS-PAGE.

Ức chế liên kết fractalkin người với CX3CR1 người được biểu hiện trên các tế bào BA/F3 bởi VHH kháng-CX3CR1

Khả năng ngăn chặn phối tử fractalkin của các VHH được đánh giá trong thử nghiệm FACS cạnh tranh CX3CR1 người như thể hiện trên Bảng 4. Sử dụng các tế bào CHO-CX3CR1 người, BA/F3-CX3CR1 người hoặc các tế bào HEK293T được chuyển nhiễm tạm thời. Lượng phối tử đánh dấu được dùng trong các thử nghiệm cạnh tranh khác nhau cũng thay đổi. Các giá trị IC_{50} đối với VHH ngăn chặn tương tác của fractalkin người với CX3CR1 người được minh họa trong Bảng 19.

Bảng 19. Hiệu lực và hiệu quả của VHH trong FACS cạnh tranh phối tử

Mã nhận dạng VHH	Họ	Dòng tế bào	IC_{50}	% ngăn chặn	Số lần lặp
11H11	9	CHO-huCX3CR1	1,7 E-8	100	4
18E06	13	CHO-huCX3CR1	1,8 E-9	33	4
54A12	101	CHO-huCX3CR1	2,1 E-9	104	2
54D08	101	CHO-huCX3CR1	1,5 E-8	101	2
54A07	101	CHO-huCX3CR1	1,1 E-8	78	2
54D05	101	CHO-huCX3CR1	2,7 E-9	102	2
54B03	101	CHO-huCX3CR1	2,5 E-8	108	1
54G03	101	CHO-huCX3CR1	5,6 E-8	107	1
11H11	9	BA/F3-huCX3CR1	8,1 E-9	100	3
18E06	13	BA/F3-huCX3CR1	2,8 E-9	71	3
54A12	101	BA/F3-huCX3CR1	4,0 E-9	100	4
54D08	101	BA/F3-huCX3CR1	3,8 E-8	99	1
54A07	101	BA/F3-huCX3CR1	1,5 E-8	81	4
54D05	101	BA/F3-huCX3CR1	5,5 E-9	99	1
54B03	101	BA/F3-huCX3CR1	3,3 E-8	99	1
54G03	101	BA/F3-huCX3CR1	9,8 E-8	98	1
54A12	101	HEK293-huCX3CR1	6,8 E-9	96	5
54D08	101	HEK293-huCX3CR1	8,4 E-8	95	2
54A07	101	HEK293-huCX3CR1	2,3 E-8	52	2
54D05	101	HEK293-huCX3CR1	5,3 E-9	94	5
54B03	101	HEK293-	6,7 E-8	92	2

		huCX3CR1			
54G03	101	HEK293- huCX3CR1	2,7E-7	89	2
61E02	101	HEK293- huCX3CR1	8,2 E-8	98	2
61B04	101	HEK293- huCX3CR1	5,7 E-8	97	2
61B02	101	HEK293- huCX3CR1	1,0 E-8	94	2
54H01	101	HEK293- huCX3CR1	1,0 E-8	64	2
54A04	101	HEK293- huCX3CR1	4,9 E-8	100	2
61F11	101	HEK293- huCX3CR1	4,6 E-8	96	2
61G03	101	HEK293- huCX3CR1	6,0 E-8	96	2
61G04	101	HEK293- huCX3CR1	4,2 E-8	96	2
66B02	101	HEK293- huCX3CR1	2,5 E-9	102	2
66G01	101	HEK293- huCX3CR1	1,4 E-8	99	2

Sự ức chế fractalkin người bởi VHH kháng-CX3CR1 do sự hóa hướng động tế bào BA/F3 biểu hiện quá mức CX3CR1 người gây ra

Để đánh giá mức độ ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra, thử nghiệm hóa hướng động được thiết lập bằng cách sử dụng khoang ChemoTx dùng một lần với cỡ giếng 5µm (Neuroprobe, Gaithersburg, US). Các tế bào được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy đang phát triển mạnh và rửa trước khi dùng trong môi trường thử nghiệm, RPMI (Gibco, Carlsbad, US) có bổ sung 0,1% BSA. Khoang dưới được đổ 320pM fractalkin người với tổng thể tích 300µl. Khi lắp màng, 0,13E6 tế bào được đưa lên trên màng với tổng thể tích 70µl. Sự hóa hướng động được để cho diễn ra trong 3 giờ ở 37°C trong khoảng làm ẩm bằng CO₂. Sau quá trình ủ, màng được tháo ra và các tế bào ở khoang dưới được tạo huyền phù lại. Lượng ATP có trong các giếng được xác định bằng cách sử dụng kit CellTiter-Glo (Promega, Madison WI, US). Tiến hành đọc trên thiết bị Envision (Perkin Elmer, Massachusetts, US) với thiết lập chuẩn để đọc độ phát quang. Tiến hành loạt chuẩn độ lặp lại ba lần và mỗi đĩa cũng chứa các

mẫu đối chứng lặp lại 3 lần. Mẫu không chứa VHH được đưa vào cũng như mẫu không có fractalkin người được bổ sung vào khoang dưới để làm đối chứng. Tóm tắt kết quả được thể hiện trên Bảng 20.

Bảng 20. Khả năng và hiệu quả của VHH trong ngăn chặn sự hóa hướng động do fractalkin gây ra

Mã nhận dạng VHH	Họ	IC50	% ngăn chặn	Số lần lặp
11H11	9	2 E-7	89	5
18E06	13	NA	17	4
54A12	101	8 E-8	84	6
54D08	101	NA	33	2
54A07	101	5 E-8	45	4
54D05	101	7 E-8	81	4
54B03	101	1 E-7	73	1
54G03	101	NA	40	1
66B02	101	2 E-8	87	2
66G01	101	4 E-7	54	2

Đánh giá khả năng phản ứng chéo của VHH kháng-CX3CR1 chống lại CX3CR1 khi cynomolgus

Ban đầu, thử nghiệm liên kết dựa trên FACS được dùng để đánh giá khả năng phản ứng chéo với khi cynomolgus. Trong thử nghiệm này, các VHH được ủ với tế bào tương ứng trong 30 phút ở 4°C tiếp theo rửa ba lần và sau đó ủ với chất chỉ thị. Kháng thể chuột kháng cmcy (Serotec, MCA2200) tiếp theo là kháng thể dê kháng chuột kết hợp với PE (Jackson 115-116-071) được dùng làm chỉ thị, mỗi lần ủ trong 30 phút ở 4°C, tiếp theo rửa ba lần. Kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên Bảng 21.

Bảng 21. Giá trị EC50 của liên kết của VHH tương ứng trên CX3CR1 người hoặc trên CX3CR1 khi cynomolgus

Mã nhận dạng VHH	Họ	EC50 (M) Người	EC50 (M) khi cynomolgus	tỷ lệ	Số lần lặp
11H11	9	8,0 E-10	NA	NA	2
18E06	13	1,5 E-9	1,4 E-8	9	2
54A12	101	3,5 E-8	1,1 E-7	3,3	1

54A07	101	5,4 E-7	3,0 E-8	0,1	1
54D05	101	8,4 E-10	5,0 E-8	59,6	1

Để nhận dạng VHH ở bước tiếp theo, FACS cạnh tranh fractalkin người được thiết lập bằng cách sử dụng CX3CR1 người hoặc CX3CR1 khỉ cynomolgus được biểu hiện trong các tế bào HEK293T. Cả thụ thể người và khỉ được chuyển nhiễm tạm thời trong các tế bào HEK293T và các lần chuyển nhiễm được ghép bằng liên kết của phối tử đánh dấu, fractalkin người. Mức độ cạnh tranh được đánh giá bằng nồng độ EC30 của fractalkin và nhờ đó các giá trị IC50 thu được là ước lượng tốt của giá trị Ki, đại lượng đo ái lực (Bảng 22). Thử nghiệm được tiến hành như mô tả trong Ví dụ 4. Tỷ lệ giá trị IC50 trên CX3CR1 khỉ cynomolgus và CX3CR1 người được dùng để đánh giá sự chênh lệch hiệu lực về ái lực đối với CX3CR1 ở cả hai loài.

Bảng 22. Hiệu quả và hiệu lực của VHH trong FACS cạnh tranh phối tử đối với CX3CR1 người và CX3CR1 khỉ cynomolgus

Mã nhận dạng VHH	Họ	Người		Khỉ cynomolgus		Tỷ lệ	Số lần lặp
		IC50 (M)	% ngăn chặn	IC50 (M)	% ngăn chặn		
54A12	101	6,8 E-9	96	6,7 E-8	94	9,85	5
54D08	101	8,4 E-8	95	7,2 E-8	91	0,85	2
54A07	101	2,3 E-8	52	2,8 E-7	69	12,3	2
54D05	101	5,3 E-9	94	6,4 E-8	91	12,25	5
54B03	101	6,7 E-8	92	4,7 E-7	95	7,05	2
54G03	101	2,7E-7	89	4,7 E-7	89	1,74	2
61E02	101	8,2 E-8	98	4,6 E-8	96	0,55	2
61B04	101	5,7 E-8	97	8,7 E-8	93	1,53	2
61B02	101	1,0 E-8	94	4,5 E-8	92	4,37	2
54H01	101	1,0 E-8	64	6,8 E-8	92	6,48	2
54A04	101	4,9 E-8	100	3,1 E-8	91	0,64	2
61F11	101	4,6 E-8	96	1,6 E-7	95	3,58	2
61G03	101	6,0 E-8	96	3,0 E-7	89	5,02	2
61G04	101	4,2 E-8	96	2,0 E-7	100	4,8	2
66B02	101	2,5 E-9	102	1,9 E-8	97	7,5	2
66G01	101	1,4 E-8	99	1,2 E-7	100	8,29	2

Liên kết của VHH kháng-CX3CR1 người với CCR2 người, CCR5 người hoặc CX3CR1 chuột

Độ đặc hiệu đối với thụ thể huCX3CR1 được đánh giá bằng cách thực hiện thử nghiệm liên kết FACS trên các tế bào gốc CHO-K1 hoặc CHO biểu hiện CCR2 người, CCR5 người hoặc CX3CR1 chuột. Các VHH được ủ với dòng tế bào tương ứng trong 30 phút ở 4°C tiếp theo là ba bước rửa và sau đó ủ với chất chỉ thị. Kháng thể chuột kháng cmyc (Serotec, MCA2200) tiếp theo là kháng thể dê kháng chuột kết hợp với PE (Jackson 115-116-071) được dùng làm chỉ thị, mỗi lần ủ 30 phút ở 4°C, tiếp theo là ba bước rửa. Đối với mỗi dòng tế bào kháng thể đặc hiệu thụ thể được đưa vào làm đối chứng chất lượng. Ngoài ra, từng VHH với nồng độ cao nhất cũng được ủ với các tế bào CHO biểu hiện huCX3CR1 làm đối chứng dương. Không quan sát thấy liên kết với CX3CR1 chuột, CCR2 người hoặc CCR5.

Xác định nhóm theo epitop

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh được thiết lập để xác định xem các VHH có liên kết với các epitop gối nhau trên CX3CR1 hay không. Trong thử nghiệm này, VHH 66B02 đánh dấu bằng alexa647 được dùng trong FACS cạnh tranh trên các tế bào BA/F3 biểu hiện CX3CR1 người. Các VHH đại diện từ các họ chức năng được sử dụng làm mẫu cạnh tranh với liên kết của 66B02 đánh dấu. Các giá trị IC50 thu được được thể hiện trên Bảng 23.

Bảng 23. Phân nhóm theo epitop dựa trên FACS

Mã nhận dạng VHH	Họ	IC50 (M)	% ngăn chặn
11H11	9	4,9E-09	100
18E06	13	2,3E-09	100
66B02	101	1,5E-09	100

Do thu được kết quả ức chế hoàn toàn liên kết 66B02 từ tất cả các VHH đại diện thuộc các họ ngăn chặn phối tử khác nhau, có thể kết luận rằng tất cả các họ chức năng liên kết ở khoảng lân cận đủ gần với nhau nên chúng cạnh tranh với liên kết của 66B02.

Ví dụ 6: Định dạng VHH thành hóa trị hai

Tạo kết cấu hóa trị hai

Để tăng hiệu lực và/hoặc hiệu quả từ việc chọn lọc các VHH thu được, các phân tử hóa trị hai được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Hai VHH được liên kết gen với nhau qua cầu liên kết 35GS nằm giữa hai đơn vị kết cấu này và tiếp đó biểu hiện trong *E.coli* như được mô tả trên đây đối với VHH. Nhiều kết cấu hóa trị hai khác nhau được tạo ra như liệt kê trong Bảng 24.

Bảng 24. Các dạng hóa trị hai đại diện

Mã nhận dạng kết cấu	Mã nhận dạng VHH	Họ	Cầu liên kết	Mã nhận dạng VHH	Họ
CX3CR1BII007	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII18E6	13
CX3CR1BII009	CX3CR1BII18E6	13	35GS	CX3CR1BII11H11	9
CX3CR1BII012	CX3CR1BII54D08	101	35GS	CX3CR1BII18E06	101
CX3CR1BII016	CX3CR1BII54A12	101	35GS	CX3CR1BII54A12	101
CX3CR1BII017	CX3CR1BII54D5	101	35GS	CX3CR1BII54D5	101
CX3CR1BII018	CX3CR1BII66B02	101	35GS	CX3CR1BII66B02	101
CX3CR1BII019	CX3CR1BII66G01	101	35GS	CX3CR1BII66G01	101
CX3CR1BII020	CX3CR1BII54B5	101	35GS	CX3CR1BII54B5	101
CX3CR1BII026	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII66B02	101
CX3CR1BII027	CX3CR1BII11H11	9	35GS	CX3CR1BII54B5	101

Ức chế liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người được biểu hiện trên các tế bào BA/F3 bởi VHH kháng-CX3CR1

Khả năng ức chế phối tử liên kết với CX3CR1 người được nghiên cứu đối với các dạng khác nhau như mô tả trong Ví dụ 4. Trong việc xác định đặc tính này, sử dụng dòng tế bào BA/F3-CX3CR1 người thể hiện khả năng biểu hiện thụ thể CX3CR1 người ổn định. Phối tử fractalkin được đánh dấu alexa647 được sử dụng ở nồng độ EC30 của nó và nhờ đó các giá trị IC50 thu được phản ánh các giá trị Ki. Tóm lược về các dữ liệu thu được được thể hiện trên Bảng 25.

Bảng 25. Khả năng của các dạng hóa trị hai trong cạnh tranh phối tử

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	IC50 (M)	% ngăn chặn	Số lần lặp
CX3CR1BII007	CHO-huCX3CR1	3,8 E-10	100	2
CX3CR1BII009	CHO-huCX3CR1	7,0 E-10	91	2
CX3CR1BII012	CHO-huCX3CR1	8,0 E-10	93	1
CX3CR1BII016	HEK293-huCX3CR1	1,9 E-10	102	2
CX3CR1BII017	HEK293-huCX3CR1	3,1 E-10	99	2
CX3CR1BII018	HEK293-huCX3CR1	3,0 E-10	102	2
CX3CR1BII019	HEK293-huCX3CR1	2,9 E-10	100	2
CX3CR1BII020	HEK293-huCX3CR1	2,2 E-10	102	2
CX3CR1BII026	BA/F3-huCX3CR1	7,0 E-10	100	3
CX3CR1BII027	BA/F3-huCX3CR1	6,7 E-10	100	3

Ức chế sự hóa hướng động do fractalkin người gây ra của các tế bào BA/F3 biểu hiện quá mức CX3CR1 người bởi VHH kháng-CX3CR1

Tương tự mô tả cho các VHH kháng-CX3CR1 hóa trị một, khả năng ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra trên các tế bào BA/F3-huCX3CR1 được đánh giá đối với các kết cấu hóa trị hai. Một thử nghiệm độc lập được thiết lập và sử dụng như mô tả trên đây và kết quả thu được được tóm tắt trong Bảng 26.

Bảng 26. Ức chế sự hóa hướng động do fractalkin gây ra bởi các kết cấu VHH hóa trị hai

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	IC50 (M)	% ngăn chặn	Số lần lặp
CX3CR1BII007	BA/F3-huCX3CR1	4 E-9	101	5
CX3CR1BII009	BA/F3-huCX3CR1	2 E-8	79	5
CX3CR1BII012	BA/F3-huCX3CR1	4 E-9	78	1
CX3CR1BII016	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	88	3
CX3CR1BII017	BA/F3-huCX3CR1	3 E-9	89	3
CX3CR1BII018	BA/F3-huCX3CR1	6 E-10	98	6
CX3CR1BII019	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	85	3
CX3CR1BII020	BA/F3-huCX3CR1	2 E-9	85	3
CX3CR1BII026	BA/F3-huCX3CR1	3 E-10	98	1
CX3CR1BII027	BA/F3-huCX3CR1	9 E-10	98	1

Đánh giá khả năng phản ứng chéo của VHH kháng-CX3CR1 với CX3CR1 khi cynomolgus

Các kết cấu hóa trị hai cũng được đánh giá về khả năng liên kết chéo với CX3CR1 khi cynomolgus và so sánh với khả năng phản ứng với CX3CR1 người. Như đã mô tả trên đây, thử nghiệm liên kết (Bảng 27) hoặc thử nghiệm cạnh tranh phối tử (Bảng 28) được áp dụng bằng cách sử dụng các tế bào HEK293T được chuyển nhiễm tạm thời. Các mẽ tế bào được chuyển nhiễm tạm thời được ghép bởi mức biểu hiện thụ thể của chúng.

Bảng 27. Liên kết của các kết cấu hóa trị hai với CX3CR1 người hoặc CX3CR1 khi cynomolgus

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	EC50 (M) người	EC50 (M) khi cynomolgus	Tỷ lệ	Số lần lặp
CX3CR1BII007	HEK293T	3,1 E-10	4,8 E-8	154	2
CX3CR1BII009	HEK293T	2,0 E-9	6,8 E-9	3,3	2
CX3CR1BII012	HEK293T	5,6 E-11	6,3 E-11	1,1	1

Bảng 28. Cạnh tranh phối tử của kết cấu hóa trị hai trên CX3CR1 người hoặc khi cynomolgus

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	Người		Khi cynomolgus		Tỷ lệ	Số lần lặp
		IC50 (M)	% ngăn chặn	IC50 (M)	% ngăn chặn		
CX3CR1BII016	HEK293T	1,9 E-10	102	6,9 E-10	98	3,67	2
CX3CR1BII017	HEK293T	3,1 E-10	99	1,6 E-9	95	5,34	2
CX3CR1BII018	HEK293T	3,0 E-11	102	1,0 E-10	97	3,33	2
CX3CR1BII019	HEK293T	2,9 E-10	100	8,2 E-10	96	2,86	2
CX3CR1BII020	HEK293T	2,2 E-10	102	3,2 E-10	97	1,47	2

Ví dụ 7: Nghiên cứu về độ dài cầu liên kết và khả năng kéo dài thời gian bán thải

Đánh giá về độ dài cầu liên kết và bố trí alb11 VHH

Do độ dài cầu liên kết sử dụng trong dạng hóa trị hai có thể ảnh hưởng đáng kể đến khả năng có được, các độ dài cầu liên kết khác nhau được đánh giá.

Ngoài ra, Alb11, nanobody liên kết với albumin huyết thanh người được đưa vào để tăng thời gian bán thải *in vivo* của các phân tử được định dạng (WO 06/122787). Các dạng khác nhau được tạo ra bao gồm các biến thể về độ dài cầu liên kết được sử dụng, và cả về cách bố trí các VHH thành phần khác nhau. Tóm tắt về các dạng được nghiên cứu được nêu trong Bảng 29.

Bảng 29. Nghiên cứu về khả năng kéo dài thời gian bán thải và độ dài cầu liên kết

Mã nhận dạng kết cấu	Mã nhận dạng VHH	Cầu liên kết	Mã nhận dạng VHH	Cầu liên kết	Mã nhận dạng VHH
CX3CR1BII03 2	CX3CR1BII66B0 2	9GS	CX3CR1BII66B02	9GS	Alb11
CX3CR1BII03 4	CX3CR1BII66B0 2	35GS	CX3CR1BII66B02	9GS	Alb11
CX3CR1BII03 6	CX3CR1BII66B0 2	9GS	Alb11	9GS	CX3CR1 BII66B02
CX3CR1BII04 0	CX3CR1BII66B0 2	9GS	CX3CR1BII66B02	35GS	Alb11
CX3CR1BII04 1	CX3CR1BII66B0 2	35GS	CX3CR1BII66B02	35GS	Alb11
CX3CR1BII04 2	CX3CR1BII66B0 2	35GS	Alb11	35GS	CX3CR1 BII66B02

Các trình tự mã hóa VHH được định dạng được tách dòng vào plasmit được tạo kết cấu nội bộ cho phép biểu hiện trong *Pichia pastoris* và tiết vào môi trường nuôi cấy. Vector biểu hiện có được từ pPICZa (Invitrogen) và chứa đoạn khởi đầu AOX1 để điều chỉnh chặt chẽ sự biểu hiện cảm ứng bằng metanol, gen kháng Zeocin™, vị trí đã tách dòng và tín hiệu tiết yếu tố α . Khi biến nạp, các giống nuôi cấy biểu hiện được nuôi và sự biểu hiện VHH được cảm ứng bằng cách bổ sung metanol và để cho tiếp tục trong 48 giờ ở 30°C.

Hiệu lực của các dạng kết cấu khác nhau này được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm cạnh tranh phối tử như được mô tả trên đây. Khi nồng độ phối tử được sử dụng nhỏ hơn giá trị EC50, giá trị IC50 thu được tương đương với giá trị Ki. Ki thu được đối với mỗi dạng kết cấu được tóm lược trong Bảng 30.

Bảng 30. Hiệu lực của các dạng kéo dài thời gian bán thải trong cạnh tranh phối tử

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	IC50 (M)	% ngăn chặn	Số lần lặp
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	5,8 E-10	99	2
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	5,2 E-10	99	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	5,6 E-10	99	2
CX3CR1BII040	BA/F3-huCX3CR1	5,9 E-10	104	1
CX3CR1BII041	BA/F3-huCX3CR1	6,4 E-10	102	1
CX3CR1BII042	BA/F3-huCX3CR1	8,9 E-10	100	1

Ảnh hưởng của albumin huyết thanh người đến hiệu lực

Liên kết của albumin huyết thanh người (HSA) với alb11 VHH có thể ảnh hưởng đến hiệu lực của dạng kết cấu và do đó thử nghiệm cạnh tranh phổ tử được lặp lại với sự có mặt của HSA. Tóm lại, để HSA liên kết với alb11 VHH, các kết cấu cần đánh giá và fractalkin được ủ trước với HSA trong 30 phút trước khi bổ sung vào tế bào. Các tế bào cũng được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS có bổ sung HSA. Nồng độ cuối của HSA được sử dụng gấp 50 lần nồng độ VHH cao nhất được sử dụng. Tiếp đó, để cho cạnh tranh trong 2 giờ và xử lý tiếp như được mô tả trong Ví dụ 4.

Mã nhận dạng trình tự	Dòng tế bào	IC50 (M)	% ngăn chặn	Số lần lặp
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	1,4 E-9	100	2
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	1,3 E-9	100	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	1,4 E-9	100	2

Tương tác tiềm tàng của HSA cũng được đánh giá trong thử nghiệm hóa hướng động thích ứng, bao gồm HSA trong các khoang khác nhau của thử nghiệm. Nồng độ HSA được sử dụng lại là 50 lần nồng độ cao nhất của kết cấu được sử dụng và các kết cấu được tải HSA trong 30 phút trước khi bắt đầu thử nghiệm. Dung dịch đệm thử nghiệm cũng được bổ sung HSA sao cho HSA có trong tất cả các khâu của thử nghiệm. Như được mô tả trên đây, các khoang ChemoTx dùng một lần với cỡ giếng 5µm (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA) được sử dụng. Các tế bào được thu hoạch từ giống nuôi cấy đang phát triển mạnh và rửa trước khi dùng trong môi trường thử

nghiệm, RPMI (Gibco, Carlsbad, US) có bổ sung 0,1% BSA và 62,5 μ M HSA (Sigma, A8763). Khoang dưới được nạp 320pM fractalkin người với tổng thể tích 300 μ l. Khi lắp màng, 0,13E6 tế bào được đưa lên trên màng với tổng thể tích 70 μ l. Sự hóa hướng động được để diễn ra trong 3 giờ ở 37°C trong khoang được làm ẩm bằng CO₂. Sau quá trình ủ, màng được tháo ra và các tế bào ở khoang dưới được tạo huyền phù lại. Lượng ATP có trong giếng được xác định bằng cách sử dụng kit CellTiter-Glo (Promega, Madison WI, USA). Tiến hành đọc trên thiết bị Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) với thiết lập chuẩn của nhà sản xuất để đọc bằng phát quang. Loạt chuẩn độ được thực hiện ba lần và mỗi đĩa cũng bao gồm các mẫu đối chứng lặp lại ba lần. Mẫu không chứa VHH được đưa vào cũng như mẫu không chứa fractalkin người được bổ sung vào khoang dưới làm đối chứng. Các giá trị IC₅₀ thu được được liệt kê trong bảng 31.

Bảng 31. Sự hóa hướng động do fractalkin gây ra với sự có mặt của HSA

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	IC ₅₀ (M)	% ngăn chặn	Số lần lặp
CX3CR1BII032	BA/F3-huCX3CR1	6E-10	98	2
CX3CR1BII034	BA/F3-huCX3CR1	9E-10	100	2
CX3CR1BII036	BA/F3-huCX3CR1	6E-10	102	2

Ức chế sự nhập nội của fractalkin bởi các polypeptit hóa trị hai được định dạng kéo dài thời gian bán thải

Các thử nghiệm chức năng bổ sung được tiến hành để chứng tỏ hoạt tính đối kháng của các polypeptit hóa trị hai được kéo dài thời gian bán thải. Các polypeptit này được đánh giá về khả năng ức chế sự nhập nội của fractalkin A647 trong các tế bào CHO CX3CR1 người. Tóm lại, 1E4/giếng tế bào được đưa vào các đĩa 96 giếng màu đen, đáy trong (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) và nuôi qua đêm. Các tế bào được rửa một lần và sau đó cân bằng trong dung dịch đệm thử nghiệm (HBSS với canxi và magie (Gibco) có bổ sung 10mM HEPES và 0,1% BSA). Các kết cấu polypeptit được định dạng được bổ sung vào và các đĩa được ủ trong 15 phút ở 37°C. Sau đó, fractalkin A647 được bổ sung vào ở nồng độ cuối 8nM và các tế bào được ủ trong 60 phút ở 37°C. Loại bỏ môi trường và cố định các tế bào trong 10 phút bằng dung dịch formaldehyt 3,7% (Polysciences, Warrington, PA, USA). Các tế bào được rửa một lần

bằng PBS và nhân được đánh dấu bằng thuốc nhuộm Hoechst (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Để định lượng fractalkin nhập nội đã đánh dấu, các tế bào được tạo hình ảnh bằng cách sử dụng hệ thống tạo hình ảnh sinh học BD Pathway. Tiến hành phân đoạn hình ảnh bằng cách nhận dạng nhân tế bào được đánh dấu và vẽ một vòng tròn 3 điểm ảnh quanh dấu này. Đo cường độ A647 trung bình trong vòng bào chất. Các polypeptit được định dạng ức chế sự nhập nội fractalkin một cách có hiệu lực như được tóm tắt trong Bảng 32:

Bảng 32. Ức chế sự nhập nội fractalkin A647

Mã nhận dạng kết cấu	Dòng tế bào	IC50 (M)	Số lần lặp
CX3CR1BII032	CHO-huCX3CR1	4,0 E-10	5
CX3CR1BII034	CHO-huCX3CR1	7,4 E-10	3
CX3CR1BII036	CHO-huCX3CR1	4,9 E-10	8
CX3CR1BII040	CHO-huCX3CR1	1,0 E-9	3
CX3CR1BII041	CHO-huCX3CR1	1,1 E-9	2
CX3CR1BII042	CHO-huCX3CR1	8,5 E-10	2

Polypeptit kháng-CX3CR1 hóa trị hai được định dạng kéo dài thời gian bán thải không có hoạt tính chủ vận

Để khẳng định rằng polypeptit kháng-CX3CR1 hóa trị hai được kéo dài thời gian bán thải không có hoạt tính chủ vận, CX3CR1BII036 được đánh giá về khả năng cảm ứng dòng canxi vào trong các tế bào CHO CX3CR1 người. Sự gia tăng mức canxi phân bào tan do fractalkin ở các tế bào này theo cách phụ thuộc CX3CR1 và CX3CR1BII036 ức chế đáp ứng này.

Các tế bào CHO CX3CR1 người được đưa vào đĩa với lượng 5E4 tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng màu đen, đáy trong (BD) và nuôi qua đêm. Các tế bào được ủ với thuốc nhuộm Calcium-4/2mM probenidicid (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) trong HBSS có bổ sung 20mM HEPES trong 60 phút ở 37°C. Để chứng tỏ khả năng đối kháng của polypeptit, CX3CR1BII036 được ủ với các tế bào trong 15 phút trước khi bổ sung fractalkin ở giá trị EC80 của nó. Sự di chuyển của canxi được theo dõi trên hệ thống FLIPR Tetra (Molecular Devices) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để xác định sự đối kháng, không ủ trước với polypeptit và thay vào đó, CX3CR1BII036 được sử dụng thay cho fractalkin kích thích. Trong khi đó

CX3CR1BII036 ức chế dòng canxi vào qua trung gian fractalkin với IC₅₀ là 1,3nM, không quan sát thấy sự gia tăng mức canxi phần bào tan khi chỉ bổ sung polypeptit ở các nồng độ không quá 1 μ M.

Ví dụ 8: Nghiên cứu các dạng kéo dài thời gian bán thải bằng Fc chuột

Để nghiên cứu các phương thức kéo dài thời gian bán thải khác nhau, vùng VHH 66B02 được tạo ra dưới dạng protein dung hợp với vùng Fc của IgG2 chuột (66B02-mFc). Đột biến axit aspartic thành alanin (D265A) được kết hợp trong vùng CH2 để loại bỏ chức năng tác động hiệu lực qua trung gian Fc ở kết cấu này (Baudino, J. Immunol., 181, 6664-6669 (2008)). 66B02-Fc chuột được biểu hiện trong các tế bào HEK293T hoặc tế bào NS0 và tinh chế bằng sắc ký ái lực Protein A tiếp theo bằng sắc ký trao đổi ion. Phân tử này được kiểm tra hoạt tính bằng cách sử dụng các dạng thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 7. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 33:

Bảng 33. Hoạt tính của 66B02-Fc chuột

Thử nghiệm	Dòng tế bào	IC ₅₀ (M)	Số lần lặp
Cạnh tranh phối tử	BA/F3-huCX3CR1	5,7 E-10	2
Hóa hướng động	BA/F3-huCX3CR1	8,9 E-10	3
Nhập nội phối tử	CHO-huCX3CR1	5,2 E-10	5
Dòng canxi vào	CHO-huCX3CR1	9,8 E-10	5

Trong khi 66B02-Fc chuột ức chế một cách hiệu lực sự hoạt hóa CX3CR1 qua trung gian fractalkin, nó không thể hiện hoạt tính chủ vận. Không quan sát thấy sự gia tăng mức canxi phần bào tan khi xử lý bằng không quá 1 μ M phân tử này.

Ví dụ 9: Ức chế sự tiến triển mảng bám trong mô hình bệnh xơ vữa động mạch ở chuột bởi polypeptit hóa trị hai kéo dài thời gian bán thải

Tạo chuột Apo E^{-/-} mang CX3CR1 người

Do sự thiếu hụt khả năng phản ứng chéo của các VHH đã nhận dạng đối với CX3CR1 chuột (Ví dụ 5), dòng chuột mang CX3CR1 người (hu CX3CR1 KI) được tạo ra tại TaconicArtemis (Koeln, Germany) để cho phép thử nghiệm các phân tử này trên mô hình bệnh ở chuột. Chiến lược nghiên cứu là biểu hiện thụ thể chemokin

người trong điều kiện có kiểm soát của đoạn khởi đầu tương ứng của chuột trong khi đó không cho phép biểu hiện protein chuột nội sinh. Tóm lại, tạo ra vector hướng đích được trong đó vùng mã hóa CX3CR1 chuột tại exon 2 được thay bằng khung đọc mở của CX3CR1 người đầy đủ và củng cố bằng các dấu chuẩn chọn lọc và các vị trí loxP. Vector hướng đích được đưa vào các tế bào chuột ES và các dòng tái tổ hợp tương đồng thành công được dùng để tạo ra chuột thể ghép. Chuột này được gây giống với chuột Flp-deleter hiệu quả cao để loại bỏ dấu chuẩn chọn lọc và chuyển nhiễm qua đường di truyền. Sau đó, chuột hu CX3CR1 KI thu được trên nền C57BL/6 được lai với chuột Apo E^{-/-} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) để tạo ra chuột hu CX3CR1 KI Apo E^{-/-}. Mô hình chuột Apo E^{-/-} cung cấp phương pháp mạnh để thúc đẩy sự tạo thành mảng xơ vữa động mạch rộng rất giống với bệnh ở người về sự khu trú đặc hiệu vị trí của sự hình thành mảng bám, thành phần mô, và các yếu tố nguy cơ đã biết (cholesterol, viêm, tăng huyết áp, v.v.).

Đánh giá các polypeptit kháng-CX3CR1 hóa trị hai kéo dài thời gian bán thải ở mô hình bệnh xơ vữa động mạch trên chuột Apo E^{-/-}

Chuột hu CX3CR1KI ApoE^{-/-} được cho ăn chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao/cholesterol cao chứa 1,5% cholesterol trong 16 tuần bắt đầu ở tuần tuổi thứ 4. Sau 10 tuần, các động vật này được cho sử dụng trong màng bụng chất dẫn tiêu (Naxitrat 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 115mM), 10mg/kg 66B02-mFc một hoặc hai lần một tuần hoặc 30mg/kg CX3CR1BII036 hai lần một tuần trong 6 tuần. Các động vật được gây mê bằng chất gây mê dạng khí và tưới nước muối 0,9%. Động mạch chủ hướng xuống hồi tràng rẽ nhánh được cẩn thận lấy ra và cố định trong formalin. Sau đó, mở động mạch theo chiều dọc, và nhuộm bằng Sudan IV trong 15 phút, tiếp theo là 70% metanol trong 2 phút. Các mạch máu được rửa bằng nước chảy và bao trong PBS. Các mô được chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số dùng phần mềm SPOT Advanced (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA). Tỷ lệ phần trăm lipit bắt màu được xác định bằng phần mềm phân tích hình ảnh (Image-Pro Plus, MediaCybernetics, Rockville, MD, USA) và biểu thị dưới dạng tỷ lệ phần trăm bắt màu dương tính của mạch. Kết quả từ thử nghiệm này được tóm tắt trong Bảng 34:

Bảng 34. Định lượng cỡ mảng bám trong động mạch chủ hướng xuống ở chuột hu
CX3CR1 KI Apo E^{-/-} cái

Nhóm	Liều dùng	# động vật	% vùng mảng bám	% giảm diện tích vùng mảng bám
Đối chứng (10 tuần)	N/A	6	3,4	N/A
Đối chứng (16 tuần)	Chất dẫn	17	14,8	N/A
66B02-mFc	10 mg/kg (1 lần/tuần)	17	13,0	16
66B02-mFc	10 mg/kg (2 lần/tuần)	17	10,3	39 (p<0,05)
CX3CR1BII036	30 mg/kg (2 lần/tuần)	17	10,1	41 (p<0,05)

Cả 66B02-mFc và CX3CR1BII036 ức chế đáng kể sự tiến triển mảng bám khi dùng với liều hai lần một tuần. Điều này có liên quan đến độ bao phủ vì mức huyết tương của các phân tử này có thể được khẳng định là được duy trì trong suốt thử nghiệm. Đối với liều 66B02-mFc một lần một tuần, các mức huyết tương phát hiện được không được duy trì và điều này có liên quan đến sự thiếu hiệu quả đáng kể quan sát được sau 6 tuần điều trị. Không phân tử nào ảnh hưởng đáng kể đến mức huyết tương hoặc triglycerit.

Ví dụ 10: Tối ưu hóa trình tự VHH gốc

Nói chung, trong quá trình tối ưu hóa trình tự VHH, các trình tự VHH gốc kiểu đại được gây đột biến để tạo ra các trình tự VHH giống với các trình tự VH3-JH người liên ứng di truyền. Các axit amin cụ thể trong vùng khung khác nhau giữa VHH và trình tự liên ứng di truyền VH3-JH người được thay đổi thành axit amin tương ứng của người theo cách mà cấu trúc protein, hoạt tính và độ ổn định được giữ nguyên. Để nghiên cứu vấn đề này, tất cả các biến thể tối ưu hóa trình tự được so sánh với VHH gốc trong ba thử nghiệm khác nhau: (i) xác định nhiệt độ nóng chảy (Melting Temperature - T_m) trong thử nghiệm nâng nhiệt độ (Thermal Shift Assay - TSA), (ii) phân tích hiệu lực in vitro trong thử nghiệm FACS cạnh tranh fractalkin, và đối với một số kết cấu (iii) phân tích hiệu lực in vitro trong thử nghiệm hóa hướng động do fractalkin gây ra.

Đột biến các gốc vùng khung

Để tối ưu hóa trình tự, các đột biến sau được nghiên cứu: E1D, S11L, A14P, E16G, R44Q, D46E, A74S, K83R và Q108L. Các đột biến riêng rẽ được tạo ra trong trình tự gốc CX3CR1BII66B02 được minh họa trong Bảng 35:

Bảng 35. Các đột biến được nghiên cứu khi tối ưu hóa trình tự 66B02

Dòng số	Đột biến được đưa vào
C100CX3CR1BII043	A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII045	E1D,A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII047	S11L,A14P,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII048	A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII049	A14P,R44Q,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII050	A14P,D46E,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII061	S11L,A14P,E16G,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII056	S11L,A14P,E16G,R44Q,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII057	S11L,A14P,E16G,D46E,A74S,K83R,Q108L
C100CX3CR1BII060	S11L,A14P,E16G,R44Q,D46E,A74S,K83R,Q108L

Tất cả các kết cấu được tách dòng trong vector biểu hiện *E. coli*, và biểu hiện trong *E. coli* dưới dạng protein myc/đuôi His trong thể tích giống nuôi cấy 0,25L đến 0,5L môi trường TB. Việc biểu hiện được cảm ứng bởi 1mM IPTG và để tiếp tục trong 4 giờ ở 37°C và lắc 250 vòng/phút. Các tế bào được kết lắng, và các phần chiết chu chất được chuẩn bị bằng cách đông lạnh-làm tan và tạo huyền phù lại trong dPBS. Các phần chiết được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sắc ký ái lực cố định kim loại (immobilized metal affinity chromatography - IMAC) bằng cột thô Histrap FF (GE healthcare). Các nanobody được giải hấp từ cột bằng 250mM imidazol và tiếp đó loại muối bằng dPBS. Độ tinh khiết và độ nguyên vẹn của nanobody được kiểm tra bằng SDS-PAGE khử.

Như tóm tắt trong Bảng 36, các đột biến A14P, A74S, K83R và Q108L không có ảnh hưởng rõ ràng đến hiệu lực xác định bằng thử nghiệm FACS cạnh tranh. Tương tự, các đột biến khác E1D, S11L và E16G không ảnh hưởng đến hiệu lực. Mặt khác,

việc đưa đột biến R44Q hoặc D46E vào gây ra sự sụt giảm đáng kể hiệu lực, nếu đưa cả hai đột biến thì sự sụt giảm này còn rõ rệt hơn.

Bảng 36. Hiệu lực các kết cấu tối ưu hóa trình tự theo thử nghiệm FACS cạnh tranh phối tử

Dòng số	IC50	% ngăn chặn	Tm ở độ pH=7
CX3CR1BII66B02	2,6E-09	101,0	65,66
C100CX3CR1BII043	2,2E-09	101	66,49
C100CX3CR1BII045	2,2E-09	101,2	66,07
C100CX3CR1BII047	2,3E-09	101,2	66,49
C100CX3CR1BII048	1,9E-09	101,2	67,74
C100CX3CR1BII049	1,8E-08	101,2	66,07
C100CX3CR1BII050	1,7E-08	101,1	71,90
C100CX3CR1BII061	1,4E-09	98,9	68,57
C100CX3CR1BII056	1,6E-08	101,1	68,57
C100CX3CR1BII057	1,4E-08	99,4	74,39
C100CX3CR1BII060	1,9E-07	98,4	74,81

Nhiệt độ nóng chảy, dự báo độ ổn định của VHH, cũng được đánh giá. Hầu hết các đột biến riêng rẽ có ảnh hưởng hạn chế hoặc không ảnh hưởng trừ đột biến D46E làm tăng nhiệt độ nóng chảy khoảng 6°C. Việc đưa các đột biến kết hợp vào cũng tăng độ ổn định nhiệt, cfr 057 và 060.

Do các tác dụng chính lên hiệu lực trong thử nghiệm FACS cạnh tranh phối tử, các đột biến R44Q và D46E không được đưa vào trình tự cuối.

Đột biến các gốc CDR

Dựa trên phân tích trên máy tính về trình tự gốc, vị trí glycosyl hóa dự kiến tại vị trí số 52. Do đó hai thư viện được xây dựng; một dùng cho vị trí số 52 và một dùng cho vị trí số 53, các thư viện này được thiết kế để bao gồm tất cả các axit amin có thể có ở vị trí tương ứng. Các thư viện được sàng lọc về phân chiết chu chất trong thử nghiệm FACS cạnh tranh phối tử. Đầu tiên, loạt pha loãng được tạo ra bằng nguyên liệu chu chất từ trình tự gốc và ba thể pha loãng được chọn để sàng lọc tiếp. Điểm pha loãng thứ nhất (hai lần) được chọn để ngăn chặn hoàn toàn sự tương tác phối tử trong khi đó hai điểm pha loãng khác (128 lần và 512 lần) lần lượt ngăn chặn 70% và 40%.

Khi sản xuất các phần chiết chu chất từ thư viện, tất cả các mẫu được tách thành hai và một trong số chúng được xử lý nhiệt. Sau đó, cả mẫu xử lý nhiệt và không xử lý nhiệt được phân tích trong thử nghiệm FACS cạnh tranh phối tử ở ba điểm pha loãng. Ảnh hưởng của đột biến có thể đánh giá được bằng cách so sánh mức độ ngăn chặn thu được với đột biến này và với trình tự gốc. Việc phân tích các mẫu được xử lý nhiệt đưa ra các số đo về ảnh hưởng tiềm tàng của đột biến đến độ ổn định.

Dựa trên các kết quả sàng lọc ban đầu, bảy đột biến được chọn để tiếp tục xác định đặc tính. Hiệu lực thu được trong thử nghiệm FACS cạnh tranh phối tử được thể hiện trên Bảng 37.

Bảng 37. Loại bỏ vị trí glycosyl hóa tại vị trí số 52

Kết cấu	IC ₅₀ (M)	% ngăn chặn	Tm ở độ pH=7
C100CX3CR1BII66B02	2,5E-09	98,0	65,66
CX3CR1BII66B02 (N52S, Q108L)	1,7E-09	98,0	66,07
CX3CR1BII66B02 (N52Q, Q108L)	2,1E-09	97,9	59,83
CX3CR1BII66B02 (N52G, Q108L)	1,1E-09	98,0	59,83
CX3CR1BII66B02 (N52T, Q108L)	2,8E-09	98,0	66,07
CX3CR1BII66B02 (S53T, Q108L)	1,3E-09	98,1	66,07
CX3CR1BII66B02 (S53G, Q108L)	1,2E-09	98,3	64,83
CX3CR1BII66B02 (S53P, Q108L)	8,0E-10	98,2	66,91

Từ phép phân tích này, từ việc sắp thẳng hàng trình tự với trình tự đối chứng của người và dựa trên chương trình dự đoán việc nhận biết epitop tế bào T trên máy tính, đã quyết định đưa các đột biến N52S và S53T vào trình tự.

Do các nguyên nhân về độ ổn định, một thư viện khác được xây dựng cho vị trí 32. Thử nghiệm sàng lọc cạnh tranh phối tử được thiết lập theo cách tương tự như mô tả trên đây. Tương tự, ba dịch pha loãng các phần chiết chu chất được sàng lọc và % ngăn chặn thu được được so sánh với % ngăn chặn thu được từ trình tự gốc. Khi phân tích các thể đột biến khác nhau, phép thể N32T được chọn và đưa vào biến thể được tối ưu hóa trình tự cuối.

Ví dụ 11: Phân tích các biến thể được tối ưu hóa

Trong vòng xác định đặc tính cuối các kết cấu được liệt kê trong Bảng 38 được xác định đặc tính.

Bảng 38. Các biến thể được tối ưu hóa trình tự của VHH 66B02 dẫn

Dòng số	Đột biến được đưa vào	SEQ ID NO.
CX3CR1BII00306	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, A74S, K86R, Q113L)	138
CX3CR1BII00307	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, S53T, A74S, K86R, Q113L)	139
CX3CR1BII00308	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K86R, Q113L)	140
CX3CR1BII00312	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, A74S, K86R, Q113L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, A74S, K86R, Q113L)	225
CX3CR1BII00313	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, S53T, A74S, K86R, Q113L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L, A14P, E16G, N32T, N52S, S53T, A74S, K86R, Q113L)	226
CX3CR1BII00314	CX3CR1BII66B02(E1D, S11L, A14P, E16G, A74S, K86R, Q113L)-9GS-Alb11-9GS-CX3CR1BII66B02(S11L, A14P, E16G, A74S, K86R, Q113L)	227

Thử nghiệm FACS cạnh tranh cũng như việc xác định nhiệt độ nóng chảy được tiến hành như mô tả trên đây. Các giá trị thu được được nêu trong Bảng 39.

Bảng 39. Thử nghiệm FACS cạnh tranh và T_m của các biến thể được tối ưu hóa trình tự

Kết cấu	IC50 (M)	% ngăn chặn	T _m ở độ pH=7
C100CX3CR1BII66B02	2,5E-09	98,0	65,05
CX3CR1BII00306	1,7E-09	97,0	68,54
CX3CR1BII00307	1,9E-09	97,0	68,13
CX3CR1BII00308	1,6E-09	97,0	68,13
CX3CR1BII00312	4,6E-10	100,0	59,37
CX3CR1BII00313	4,0E-10	100,0	58,88
CX3CR1BII00314	6,5E-10	100,0	58,40

Các kết cấu này cũng được xác định đặc tính hóa hướng động do fractalkin gây ra như được mô tả trên đây (Bảng 40).

Bảng 40. Hóa hướng động do phối tử gây ra với các biến thể được tối ưu hóa trình tự

Kết cấu	IC50 (M)	% ngăn chặn	n
C100CX3CR1BII66B02	3,6E-08	91	3
CX3CR1BII00306	6,3E-08	95	2
CX3CR1BII00307	6,3E-08	100	2
CX3CR1BII00308	4,4E-08	89	2
CX3CR1BII00312	2,7E-09	99	3
CX3CR1BII00313	2,7E-09	99	3
CX3CR1BII00314	3,6E-09	100	3

Các kết cấu chọn được được đánh giá về khả năng ức chế sự nhập nội do fractalkin A647 gây ra trong các tế bào CHO huCX3CR1. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 41:

Bảng 41. Sự nhập nội do phối tử gây ra với các biến thể được tối ưu hóa trình tự

Kết cấu	IC50 (M)	n
CX3CR1BII00312	5,5 E-10	1
CX3CR1BII00313	3,3E-10	6

Polypeptit kháng-CX3CR1 được tối ưu hóa trình tự kéo dài thời gian bán thải không có hoạt tính chủ vận

Để khẳng định rằng polypeptit kháng-CX3CR1 được tối ưu hóa trình tự kéo dài thời gian bán thải không có hoạt tính chủ vận, CX3CR1BII00313 được đánh giá về khả năng cảm ứng dòng canxi vào trong các tế bào CHO huCX3CR1. Trong khi polypeptit ủ trước với CX3CR1BII00313 ức chế dòng canxi vào qua trung gian fractalkin với IC50 là 1,3nM, không quan sát thấy mức canxi phân bào tan tăng khi chỉ bổ sung polypeptit ở nồng độ không quá 1μM.

Ví dụ 12: Nghiên cứu các dạng kéo dài thời gian bán thải bằng Fc người

Để nghiên cứu các phương pháp kéo dài thời gian bán thải khác, các vùng VHH được tối ưu hóa trình tự CX3CR1BII00306 và CX3CR1BII00307 được tạo ra dưới dạng protein dung hợp với vùng Fc của IgG1 người (306D-hFc và 307D-hFc). Hai đột biến được kết hợp trong vùng CH2 để hạn chế chức năng đáp ứng tiềm tàng qua trung

gian Fc của kết cấu này. 306D-hFc và 307D-hFc được biểu hiện trong các tế bào HEK293T hoặc tế bào NS0 và tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực Protein A tiếp theo là sắc ký trao đổi ion. Các phân tử này được kiểm tra về hoạt tính chức năng bằng cách sử dụng các dạng thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 7. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 42:

Bảng 42. Hoạt tính của các protein dung hợp hFc

Thử nghiệm	Dòng tế bào	IC50 306D-hFc	Số lần lặp 306D-hFc	IC50 307D-hFc	Số lần lặp 307D- hFc
Cạnh tranh phối tử	BA/F3-huCX3CR1	6,9 E-10	2	7,0 E-10	2
Hóa hướng động	BA/F3-huCX3CR1	2,9 E-9	2	3,0 E-9	3
Nhập nội phối tử	CHO-huCX3CR1	4,8 E-10	3	3,7 E-10	3
Dòng canxi vào	CHO-huCX3CR1	1,3 E-9	3	3,2 E-9	3

Các phân tử này ức chế mạnh sự hoạt hóa CX3CR1 qua trung gian fractalkin, nhưng chúng không thể hiện hoạt tính chủ vận. Không quan sát thấy mức canxi phản bào tan tăng khi điều trị bằng không quá 1 μ M các nanobody này một mình.

Ví dụ 13: Ức chế sự tiến triển mảng bám ở mô hình bệnh xơ vữa động mạch trên chuột bởi nanobody kháng-CX3CR1 được tối ưu hóa trình tự

Chuột cái hu CX3CR1KI ApoE^{-/-} được cho ăn bằng chế độ ăn giàu béo/giàu cholesterol chứa 1,5% cholesterol trong 16 tuần bắt đầu từ tuần tuổi thứ 4. Sau 10 tuần, các động vật này được cho sử dụng chất dẫn tiêm trong màng bụng (20mM Naxitrat độ pH = 6,0, 115mM NaCl), 30mg/kg CX3CR1BII00313 một lần hoặc hai lần mỗi tuần hoặc 30mg/kg CX3CR1BII036 hai lần một tuần trong 6 tuần. Các động vật bị giết và tỷ lệ phần trăm diện tích mảng bám trong động mạch chủ hướng xuống được định lượng như mô tả trên đây. Kết quả từ nghiên cứu này được tóm tắt trong Bảng 43:

Bảng 43. Định lượng kích cỡ mảng bám trong động mạch chủ hướng xuống ở chuột cái hu CX3CR1 KI Apo E ^{-/-}

Nhóm	Liều	Số động vật	% diện tích mảng bám	% giảm diện tích mảng bám
Đối chứng (10 tuần)	không áp dụng	6	2,1	N/A
Đối chứng (16 tuần)	Chất dẫn	18	12,0	N/A
CX3CR1BII00313	30 mg/kg (1 lần/tuần)	17	10,7	13
CX3CR1BII00313	30 mg/kg (2 lần/tuần)	18	5,9	62 (p<0,01)
CX3CR1BII036	30 mg/kg (2 lần/tuần)	17	6,8	52 (p<0,01)

Cả CX3CR1BII00313 và CX3CR1BII036 ức chế đáng kể sự tiến triển của mảng bám khi được dùng với liều hai lần một tuần. Điều này tương ứng với độ bao phủ vì mức huyết tương của các phân tử này có thể được xác nhận là duy trì trong suốt thử nghiệm. Đối với chế độ liều CX3CR1BII00313 mỗi tuần một lần, mức huyết tương phát hiện được không được duy trì và điều này tương ứng với sự thiếu ảnh hưởng đáng kể sau 6 tuần điều trị. Không có phân tử nào ảnh hưởng đáng kể đến cholesterol huyết tương hoặc mức triglycerit.

Ví dụ 14: Nanobody liên kết với tế bào CD14⁺ sơ cấp của người và khi cynomolgus trong máu toàn phần

FACS cạnh tranh với nanobody kháng-CX3CR1 được định dạng tối ưu hóa trình tự

Để xác nhận liên kết của nanobody kháng-CX3CR1 được định dạng tối ưu hóa trình tự với tế bào sơ cấp của người, CX3CR1BII00313 đã được chứng tỏ là cạnh tranh với CX3CR1BII018 được đánh dấu A647 (A647-018) trong liên kết với tế bào CD14⁺ trong thử nghiệm FACS cạnh tranh trong máu toàn phần. Tóm lại, kháng thể CD14 chuột kháng người liên hợp với eFluor 450 (eBioscience, San Diego, CA, USA) được pha loãng 1:10 trong máu toàn phần từ người cho khỏe mạnh được xử lý EDTA. 40µl/giếng được bổ sung vào đĩa polystyren đáy tròn 96 giếng tiếp theo là 10µl/giếng CX3CR1BII00313 được pha loãng trong dung dịch đệm nhuộm với BSA (BD Pharmingen) với nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 100nM đến 0,002pM và các mẫu

được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó 10 μ l/giếng A647-018 trong dung dịch đệm nhuộm được bổ sung vào để tạo ra nồng độ cuối 1nM (EC80 của liên kết A647-018) và các mẫu được ủ trong thêm 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó bổ sung 220 μ l/giếng dung dịch cố định/ly giải một bước (eBioscience). Sau 10 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng các tế bào được kết lắng, rửa hai lần trong dung dịch đệm nhuộm và tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm này. Các mẫu được phân tích trên máy đếm tế bào kiểu dòng BD LSR II. Cường độ huỳnh quang trung bình của AlexaFluor 647 được định lượng về quần thể tế bào dương tính CD14 cổng. CX3CR1BII00313 ức chế mạnh liên kết của A647-018 với tế bào dương tính CD14 trong máu người với IC50 0,35nM (n=8).

Để xác nhận liên kết của nanobody kháng-CX3CR1 được định dạng tối ưu hóa tính tự với tế bào sơ cấp của khỉ cynomolgus, CX3CR1BII00313 đã được chứng tỏ là cạnh tranh với CX3CR1BII018 được đánh dấu (A647-018) trong liên kết với tế bào CD14+ trong thử nghiệm FACS cạnh tranh ở máu toàn phần của khỉ cynomolgus. Phương pháp được sử dụng là tương tự với phương pháp trình bày trên đây trừ nồng độ cuối của A647-018 là 3nM (EC80 của liên kết A647-018) và dung dịch ly giải ACK (Life Technologies) được dùng thay cho dung dịch cố định/ly giải một bước. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm nhuộm có bổ sung 1% formaldehyt trước khi phân tích. CX3CR1BII00313 potently ức chế mạnh liên kết của A647-018 với tế bào dương tính CD14 trong máu khỉ cynomolgus với IC50 là 0,43nM (n=4).

Ví dụ 15: Dược động học (Pharmacokinetics - PK) ở khỉ cynomolgus

Nghiên cứu dược động học được tiến hành trên các khỉ cynomolgus đực (*Macaca fascicularis*) 2 -5 tuổi với thể trọng trung bình nằm trong khoảng từ 2,4 đến 3,5kg chưa trải qua thử nghiệm nào. Các khỉ này được chia thành bốn nhóm điều trị. Nhóm 1 (n=3) được cho dùng 0,2mg/kg CX3CR1BII00313 đường tĩnh mạch; Nhóm 2 (n=3) được cho dùng 2mg/kg CX3CR1BII00313 đường tĩnh mạch; Nhóm 3 (n=3) được cho dùng 2mg/kg CX3CR1BII00313 dưới da và Nhóm 4 (n=3) được cho dùng 5mg/kg CX3CR1BII00313 đường tĩnh mạch. CX3CR1BII00313 được dùng dưới dạng dung dịch 2mg/ml trong đệm xitrat (20mM natri xitrat/115mM natri clorua, độ pH = 6,0). Mẫu máu được thu thập trong 6 tuần từ tĩnh mạch ngoại biên vào ống tách huyết thanh để phân tích PK.

Các mẫu huyết thanh được phân tích bằng cách sử dụng định dạng MSD (Meso Scale Discovery). Tóm lại, kháng thể kháng nanobody được biotin hóa được liên kết vào đĩa streptavidin chuẩn MSD (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA). Các đĩa được rửa bằng 0,05% Tween 20 trong nước muối được đệm phosphat và phong bế bằng 5% trọng lượng/thể tích SeraCare BSA (SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA) trước khi ủ với các mẫu huyết thanh. CX3CR1BII00313 được phát hiện bằng nanobody kháng nanobody được đánh dấu bằng sulfo và các đĩa được phân tích trên thiết bị Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Nồng độ CX3CR1BII00313 thay đổi từ 5000 đến 0,5ng/ml trong 5% huyết thanh khi được dùng làm chuẩn. Mức độ gắn kết với đích được đánh giá bằng cách kiểm tra mức CX3CR1 từ do trên bạch cầu đơn nhân được tạo công CD14+. Thử nghiệm này tương tự với thử nghiệm FACS cạnh tranh được tóm tắt trong Ví dụ 14 trừ việc không bổ sung thêm CX3CR1BII00313. Các mẫu huyết thanh cũng được kiểm tra về sự có mặt của kháng thể động vật linh trưởng kháng người (PAHA) vì chúng có thể ảnh hưởng đến PK và CX3CR1 tự do.

ForteBio RED96 được sử dụng để phát hiện PAHA. Tóm lại, CX3CR1BII00313 biotin hóa được giữ lại qua cảm biến streptavidin. Sau đó, phần huyết thanh của khi chưa trải qua thử nghiệm nào được gom lại được dùng làm đối chứng âm để tính giá trị ngưỡng (được định nghĩa bằng hai lần giá trị tín hiệu liên kết trung bình của huyết thanh gốc). Tất cả các mẫu huyết thanh được pha loãng 20 lần trong dung dịch đệm và đáp ứng PAHA được xác định là dương tính nếu tín hiệu liên kết lớn hơn giá trị ngưỡng.

Dữ liệu về thời điểm sau khi phát hiện PAHA được loại khỏi phân tích PK/PD. Dữ liệu PK được tóm tắt trong Bảng 44 dưới đây.

Bảng 44. Thông số dược động học của CX3CR1BII00313

Liều (mg/kg)	CL (mL/ngày/kg)	T _{1/2} (ngày)	MRT (ngày)	LiềuAUC(0-14 ngày)(nM·ngày)	F%
0,2 đường tĩnh mạch	113	1	1	**	
2,0 đường tĩnh mạch	9 ± 1	9 ± 2	8 ± 2	56530	
5,0 đường tĩnh mạch	**	**	**	58604	
2,0 dưới da					54

**không có đủ dữ liệu để xác định đặc tính pha kết thúc

Độ thanh thải và thời gian bán thải ở liều 2,0mg/kg đường tĩnh mạch lần lượt là 9,4 mL/ngày/kg và 9,6 ngày. Ở liều 0,2mg/kg đường tĩnh mạch, độ thanh thải về cơ bản là cao hơn (113mL/ngày/kg) phù hợp với dược động học phân bố thông qua đích (target-mediated disposition - TMD) bão hòa được. AUC(ngày 0-14) của liều được điều chỉnh là tương đương giữa liều 2 và 5mg/kg đường tĩnh mạch, điều này cho thấy sự bão hòa của TMD ở liều 2mg/kg. Phơi nhiễm ở tuần thứ 2 sau khi dùng đường tĩnh mạch hoặc dưới da. Nanobody được dùng với nồng độ > 70nM và độ sinh khả dụng sau khi dùng dưới da là 54%. Thụ thể tự do được theo dõi khi phơi nhiễm với độ bao phủ đích lớn hơn 90% được duy trì ở những lần phơi nhiễm với nồng độ > 10nM.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 (thụ thể chemokin 1 kháng CX3), trong đó polypeptit này chứa CDR1, CDR2 và CDR3 có các trình tự axit amin nêu trong:

SEQ ID No: 141, 162 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 163 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 164 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 166 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 167 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 168 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 169 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 170 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 171 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 174 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 175 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 214 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 215 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 216 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 217 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 218 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 219 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 141, 220 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 142, 165 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 142, 173 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 143, 164 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 144, 172 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 145, 172 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 213, 221 và 197, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 213, 214 và 197, tương ứng;

trong đó polypeptit này có khả năng ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người.

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu về cơ bản bao gồm bốn vùng khung (FR1, FR2, FR3 và FR4) và ba vùng quyết định bổ trợ (CDR1, CDR2 và CDR3).
3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu là VH, VL, VHH, VH được làm tương thích với lạc đà, hoặc VHH mà được tối ưu hóa về độ ổn định, hiệu lực, khả năng sản xuất và/hoặc độ tương tự với các vùng khung của người.
4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này có ái lực với CX3CR1 người ở mức:
 - a) EC50 nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, như được xác định bằng phương pháp FACS (phương pháp phân loại tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang) liên kết tế bào; hoặc
 - b) IC50 nhỏ hơn hoặc bằng 10nM như được xác định bằng phương pháp FACS cạnh tranh.
5. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này ngăn chặn liên kết của fractalkin người với CX3CR1 người ở IC50 nhỏ hơn hoặc bằng 300nM.
6. Polypeptit theo điểm 1, trong đó CDR3 đã nêu có trình tự axit amin Asp-Pro-Arg-Arg-Gly-Trp-Asp-Thr-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 186).
7. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa CDR1, CDR2 và CDR3 có các trình tự axit amin nêu trong:
 - SEQ ID No: 147, 178 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 147, 179 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 147, 179 và 194, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 148, 179 và 193, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 149, 179 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 149, 180 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 149, 181 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 149, 183 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 149, 185 và 192, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 150, 179 và 194, tương ứng; hoặc
 - SEQ ID No: 150, 182 và 194, tương ứng; hoặc

SEQ ID No: 151, 179 và 193, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 151, 182 và 194, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 151, 184 và 196, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 152, 179 và 195, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 153, 179 và 194, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 154, 182 và 194, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 155, 179 và 195, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 156, 181 và 192, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 157, 179 và 194, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 158, 179 và 192, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 159, 178 và 192, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 160, 179 và 194, tương ứng; hoặc
SEQ ID No: 161, 179 và 194, tương ứng.

8. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này chứa CDR1, CDR2 và CDR3 có các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 141, 164 và 186, SEQ ID NO: 141, 162 và 186, SEQ ID NO: 213, 214 và 186, hoặc SEQ ID NO: 213, 221 và 186.

9. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu là vùng VHH chứa trình tự nêu trong:

- a) trình tự axit amin SEQ ID NO: 3;
- b) trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% axit amin với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3; hoặc
- c) trình tự axit amin có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-48, 121-140 hoặc 222-224.

10. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu là vùng VHH chứa trình tự nêu trong:

- a) trình tự axit amin SEQ ID NO: 67;
- b) trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 90% axit amin với trình tự axit amin SEQ ID NO: 67; hoặc
- c) trình tự axit amin có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 53-120.

11. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 121-140 hoặc SEQ ID NO: 222-224.

12. Polypeptit theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch đã nêu:

a) ngăn chặn chéo liên kết của, hoặc

b) bị ngăn chặn chéo khỏi liên kết bởi

ít nhất một trong số các vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có SEQ ID NO: 1-120, 121-140 và 222-224 với CX3CR1.

13. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này còn chứa gốc kéo dài thời gian bán thải.

14. Polypeptit theo điểm 13, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải đã nêu được liên kết cộng hóa trị với polypeptit này và được chọn từ nhóm gồm gốc liên kết albumin, như vùng globulin miễn dịch kháng albumin, gốc liên kết transferrin, như vùng globulin miễn dịch kháng transferrin, phân tử polyetylen glycol, phân tử polyetylen glycol tái tổ hợp, albumin huyết thanh người, đoạn albumin huyết thanh người, peptit liên kết albumin hoặc vùng Fc.

15. Polypeptit theo điểm 13, trong đó gốc kéo dài thời gian bán thải đã nêu bao gồm vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng albumin.

16. Polypeptit theo điểm 15, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch được chọn từ vùng VHH, VHH được làm tương thích với người, vùng VH được làm tương thích với lạc đà, kháng thể vùng, kháng thể vùng đơn và/hoặc "dAb".

17. Polypeptit chứa vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 (thụ thể chemokin 1 kháng CX3) trong đó polypeptit này chứa CDR1, CDR2 và CDR3 có các trình tự axit amin nêu trong:

SEQ ID No: 146, 176 và 191, tương ứng; hoặc

SEQ ID No: 146, 177 và 191, tương ứng.

18. Polypeptit theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch kháng CX3CR1 đã nêu là vùng VHH chứa trình tự nêu trong:

- a) trình tự axit amin SEQ ID NO: 49;
- b) trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất 95% axit amin với trình tự axit amin SEQ ID NO: 49; hoặc
- c) trình tự axit amin có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 49-52.

19. Phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18.

20. Vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 19.

21. Tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó tế bào chủ này có khả năng biểu hiện polypeptit này.

22. Dược phẩm chứa (i) polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, và (ii) chất mang dược dụng, và tùy ý (iii) chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ và/hoặc chất làm ổn định.

23. Phương pháp sản xuất polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, bao gồm các bước:

- nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện cho phép biểu hiện polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18,
- trong đó tế bào chủ này mang vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic, phân tử axit nucleic này chứa vùng mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, và trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân điển hình.

24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:

- thu hồi polypeptit; và
- tinh chế polypeptit này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Singh, Sanjaya
 Waterman, Alisa
 Depla, Erik
 Laeremans, Toon
 Van Hoorick, Diane
 Ververken, Cedric J

<120> POLYPEPTIT LIÊN KẾT CX3CR1, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC MÃ HÓA
 POLYPEPTIT NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA POLYPEPTIT NÀY

<130> 09-0569

<150> 61/603,622

<151> 2012-02-27

<160> 282

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 1

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 2

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 3

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 4

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 5

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 6

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asn Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 118

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 9

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 10

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 11

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu
 35 40 45

Val Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Ser Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 12

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

[illegible]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu

```

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

```

```

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự nanobody

```

```

<400> 15

```

```

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

```

```

<210> 16
<211> 118

```

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 16

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 17

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asn Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 18

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Phe Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 19

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Phe Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 20

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 22

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

<210> 23

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

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 23

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
              35              40              45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
              100              105              110

Gln Val Thr Val Ser Ser
              115
```

<210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 24

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
              35              40              45

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

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

Gln Met Met Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
              85              90              95
```

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 25

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 26

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 27

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 30

```

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
              35              40              45

Ala Gly Ile Asn Ser Val Gly Ile Ala Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
              50              55              60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
              100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser
              115

```

<210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 31

```

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

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

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

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr

```

85 90 95
 Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 32

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 33

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val

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

<210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 35

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 36

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 37

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asn Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 38

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 39

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 40

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Gly Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 41

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 42

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 43

Glu Val Gln Leu Met Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 44

```

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
              35              40              45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
              50              55              60

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
              100              105              110

Leu Val Thr Val Ser Ser
              115

```

<210> 45
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 45

```

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
              35              40              45

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

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

```

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asn Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 46

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 47

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 48

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ser Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 49

```

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

```

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 50

```

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

```

120

<400> 51

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

<400> 52

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

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

[illegible]

<400> 54

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Thr

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

<210> 55
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 55

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

<210> 56
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 56

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 57

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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 58

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

<210> 59
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 59

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 60

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 61

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 62

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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 63

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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 64

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 65

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 Thr Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 66

Lys 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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 67

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 68

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 69

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Arg Thr Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 70

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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 71

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 72
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự nanobody

 <400> 72

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

<210> 73
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 73

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

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

<210> 74
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 74

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

<210> 75
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

[illegible]

44

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 77

```

Lys 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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
          20           25           30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
          35           40           45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
          85           90           95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Gln Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 78
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 78

```

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
          35           40           45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
          85           90           95

```

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 79

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 80

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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Asp Arg Asn Thr Gly Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 81

Lys 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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 82

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 83

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 Thr Ser Ala Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

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

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 84

```

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 Thr Ser Ala Thr Ile Phe Arg Ser Asn
                20              25              30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
                35              40              45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
                85              90              95

Ile Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100             105             110

Gln Val Thr Val Ser Ser
                115

```

<210> 85
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 85

```

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
                20              25              30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
                35              40              45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Met Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
                85              90              95

```

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 86
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 86

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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 87
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 87

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 Thr Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 88

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 89

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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 90

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 91

```

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 Ile Ser Ala Thr Ile Phe Arg Ser Asn
              20              25              30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
              35              40              45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
              85              90              95

Ile Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
              100              105              110

Gln Val Thr Val Ser Ser
              115
  
```

<210> 92
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 92

```

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
              35              40              45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
  
```

85 90 95
 Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 93
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 93

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 Thr Ser Gly Ile Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Asn His Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 94
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 94

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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val

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

<210> 95
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 95

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

<210> 96
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 96

Lys 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 Thr Ser Gly Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 97

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

Ser Leu Arg Leu Pro Cys Ala Thr Ser Lys Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 98

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 Thr Ser Lys Thr Ile Phe Arg Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 99
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 99

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 100

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 100

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Asp Arg Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 101

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 102

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 102

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 103

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 103

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

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 104

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

<210> 105
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 105

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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 106
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 106

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 Thr Ser Gly Thr Val Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 107

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 107

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 Thr Ser Lys Pro Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 108

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 109

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Pro Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 110

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 111

Glu Met 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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 112
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 112

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Ile Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Pro Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 113
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 113

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

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

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Gly Tyr Leu

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

<210> 116
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 116

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

<210> 117
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 117

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 Thr Ser Lys Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 118

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 118

Lys 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 Thr Ser Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 119
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 119

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

<210> 120
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 120

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Val Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 121

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 121

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 122

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 122

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

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

<210> 123
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 123

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

<210> 124
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 124

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 125

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 126
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 126

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 127

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 128

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 129

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 130

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 131

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 132

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 132

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 133
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự nanobody

 <400> 133

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

 <210> 134
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự nanobody

 <400> 134

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu

[illegible]

79

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 138

```

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

```

<210> 139
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 139

```

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

```

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 140
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 140

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự CDR

<400> 141

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

<210> 142
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 142

Gly	Thr	Ile	Phe	Ser	Ser	Asn	Ala	Met	Ala
1				5				10	

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 143

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

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 144

Gly	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	Asn	Ala	Met	Ala
1				5				10	

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 145

Gly	Gly	Ile	Phe	Ser	Arg	Asn	Ala	Met	Ala
1				5				10	

<210> 146

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 146

Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly

1 5 10

<210> 147
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 147

Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 148

Gly Thr Ile Phe Ser Asn Thr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 149
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 149

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

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 150

Arg Thr Ile Phe Arg Ser Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 151
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 151

Gly	Thr	Ile	Phe	Arg	Ser	Asn	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 152

Gly	Thr	Ile	Phe	Arg	Thr	Asn	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 153

Lys	Thr	Ile	Phe	Arg	Ser	Asn	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 154
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 154

Gly	Thr	Thr	Phe	Arg	Ser	Asn	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 155

Ala Thr Ile Phe Arg Ser Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 156

Gly Leu Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 157

Gly Ser Ile Phe Arg Ser Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 158

Arg Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 159

Gly Thr Val Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 160
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 160

Lys Pro Ile Phe Arg Ser Asn Ala Met Gly
1 5 10

<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 161

Gly Leu Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 162

Ala Ile Asn Ser Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 163

Val Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 164

Gly Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 165

Gly Ile Asn Ser Val Asp Ile Thr Lys
1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 166

Ala Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 167

Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 168

Val Ile Asn Thr Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 169

Leu Ile Asp Ser Ala Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 170

Gly Ile Asn Ser Val Gly Ile Ala Lys
1 5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 171

Val Ile Asn Lys Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 172

Ser Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 173

Gly Ile Asn Ser Val Asp Ile Thr Arg
1 5

<210> 174
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 174

Ala Ile Asn Ser Val Gly Thr Thr Lys
1 5

<210> 175
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 175

Ser Ile Asp Ser Val Gly Ile Thr Lys
1 5

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 176

Gly Ile Ser Gly Ser Ala Ser Arg Lys Tyr
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 177

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Arg Lys Tyr
1 5 10

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 178

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 179

Ser Ile Ser Asn Ser Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 180

Ser Ile Gly Ser Thr Tyr Ser Thr Asn
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 181

Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Asn
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 182

Ser Ile Thr Asn Ser Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 183

Ser Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Asn
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 184

Ser Ile Ser Ile Ser Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 185
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 185

Ser Ile Thr Asn Thr Gly Ser Thr Asn
1 5

<210> 186
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 186

Asp	Pro	Arg	Arg	Gly	Trp	Asp	Thr	Arg	Tyr
1				5					10

<210> 187
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 187

Asp	Ala	Arg	Arg	Gly	Trp	Asp	Thr	Arg	Tyr
1				5					10

<210> 188
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 188

Asp	Pro	Arg	Arg	Gly	Trp	Asn	Thr	Arg	Tyr
1				5					10

<210> 189
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 189

Asp	Gly	Arg	Arg	Gly	Trp	Asp	Thr	Arg	Tyr
1				5					10

<210> 190
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 190

Asp	Ala	Arg	Arg	Gly	Trp	Asn	Thr	Lys	Tyr
1				5					10

<210> 191

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 191

Ser	Asn	Ser	Tyr	Pro	Lys	Val	Gln	Phe	Asp	Tyr
1				5						10

<210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 192

Asp	Ala	Arg	Arg	Gly	Trp	Asn	Thr	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 193

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 193

Asp	Ala	Arg	Arg	Gly	Trp	Asn	Ser	Gly	Tyr
1				5					10

<210> 194

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 194

Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr
1 5 10

<210> 195
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 195

Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Tyr
1 5 10

<210> 196
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 196

Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asn Thr Gly Phe
1 5 10

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X = Pro, Ala or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X = Asp or Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X = Thr or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X = Arg, Lys, Ala or Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X = Tyr or Phe

<400> 197

Asp Xaa Arg Arg Gly Trp Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 198
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 198

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 199
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 199

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 200
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 200

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 201
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 201

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 202
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 202

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 203
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 203

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
 20 25

<210> 204
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 204

Asp 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
 20 25

<210> 205
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 205

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 206
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 206

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 207
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 207

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 208
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 208

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 209
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 209

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

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser
 35

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

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 210

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

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser
 35

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

<220>
 <223> Trình tự khung

<400> 211

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

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

<220>
<223> Trình tự khung

<400> 212

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

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

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 213

Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala
1 5 10

<210> 214
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 214

Ala Ile Ser Ser Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 215

Ala Ile Gln Ser Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 216

Ala Ile Gly Ser Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 217

Ala Ile Thr Ser Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 218

Ala Ile Asn Thr Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 219

Ala Ile Asn Gly Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự CDR

<400> 220

Ala Ile Asn Pro Val Gly Val Thr Lys
1 5

<210> 221

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

<220>
 <223> Trình tự CDR

<400> 221

Ala Ile Ser Thr Val Gly Val Thr Lys
 1 5

<210> 222
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 222

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 223
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 223

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 224

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 224

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 225

<211> 369

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 225

```

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
          35          40          45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
          115          120          125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
          130          135          140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
145          150          155          160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
          165          170          175

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
          180          185          190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
          195          200          205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
          210          215          220

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225          230          235          240

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
          245          250          255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
          260          265          270

Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr
          275          280          285

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Ser

```

Ser

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 226

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

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 210 215 220
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr
 275 280 285
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Thr
 290 295 300
 Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 305 310 315 320
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 325 330 335
 Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

Ser

<210> 227
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 227

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

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

<210> 228
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự CX3CR1 đầu N

<400> 228

Met Asp Gln Phe Pro Glu Ser Val Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Cys
 20

<210> 229
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CX3CR1-EC3

<400> 229

Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Pro Ser Cys Asp Met Arg Lys Asp Leu Arg
 1 5 10 15

Leu

<210> 230
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 230

Ala 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 Arg Ser Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro 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 Lys 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 Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 231
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 231

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> 232
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 232

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Glu Arg Ile Phe Asp Leu Asn
20 25 30

Leu Met Gly Trp Tyr Arg Gln Gly Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val

<210> 236

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

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 236

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 237
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 237

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

<210> 238
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 238

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

<210> 239
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 239

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

Gly Ser

<210> 240
 <211> 20
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự cầu nối

<400> 240

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 241

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự cầu nối

<400> 241

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 242

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự cầu nối

<400> 242

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 243

<211> 35

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự cầu nối

<400> 243

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser
 35

<210> 244
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 244

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 245
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 245

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20

<210> 246
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 246

Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 247
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cầu nối

<400> 247

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

<210> 248

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự cầu nối

<400> 248

Ala Ala Ala

1

<210> 249

<211> 369

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 249

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 145 150 155 160
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 210 215 220
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 245 250 255
 Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser
 260 265 270
 Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr
 275 280 285
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Ser
 290 295 300
 Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 305 310 315 320
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 325 330 335
 Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 355 360 365

Ser

<210> 250
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng Fc của chuột

<400> 250

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

```

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

```

<210> 251

<211> 356

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nanobody với vùng Fc

<400> 251

```

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

```

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

<210> 252
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng Fc của người

<400> 252

```

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
1          5          10          15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
          20          25          30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
          35          40          45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          50          55          60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65          70          75          80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
          85          90          95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
          100          105          110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
          115          120          125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          130          135          140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145          150          155          160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
          165          170          175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          180          185          190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
          195          200          205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          210          215          220

```

<210> 253
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nanobody với vùng Fc

<400> 253

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 340 345 350

Pro Gly Lys
 355

<210> 254

<211> 355

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nanobody với vùng Fc

<400> 254

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 145 150 155 160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 165 170 175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

210 215 220
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 225 230 235 240
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 245 250 255
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 260 265 270
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 275 280 285
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 290 295 300
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 325 330 335
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 340 345 350
 Pro Gly Lys
 355
 <210> 255
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 255
 Met Asp Gln Phe Pro Glu Ser Val Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Asp Ile Val Val Phe Gly Thr Val
 20 25 30
 Phe Leu Ser Ile Phe Tyr Ser Val Ile Phe Ala Ile Gly Leu Val Gly
 35 40 45
 Asn Leu Leu Val Val Phe Ala Leu Thr Asn Ser Lys Lys Pro Lys Ser
 50 55 60
 Val Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Phe
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Leu Pro Phe Trp Thr His Tyr Leu Ile Asn Glu Lys Gly
 85 90 95
 Leu His Asn Ala Met Cys Lys Phe Thr Thr Ala Phe Phe Phe Ile Gly
 100 105 110
 Phe Phe Gly Ser Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Tyr
 115 120 125

Leu Ala Ile Val Leu Ala Ala Asn Ser Met Asn Asn Arg Thr Val Gln
 130 135 140
 His Gly Val Thr Ile Ser Leu Gly Val Trp Ala Ala Ala Ile Leu Val
 145 150 155 160
 Ala Ala Pro Gln Phe Met Phe Thr Lys Gln Lys Glu Asn Glu Cys Leu
 165 170 175
 Gly Asp Tyr Pro Glu Val Leu Gln Glu Ile Trp Pro Val Leu Arg Asn
 180 185 190
 Val Glu Thr Asn Phe Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile Met Ser
 195 200 205
 Tyr Cys Tyr Phe Arg Ile Ile Gln Thr Leu Phe Ser Cys Lys Asn His
 210 215 220
 Lys Lys Ala Lys Ala Ile Lys Leu Ile Leu Leu Val Val Ile Val Phe
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr Asn Val Met Ile Phe Leu Glu Thr Leu
 245 250 255
 Lys Leu Tyr Asp Phe Phe Pro Ser Cys Asp Met Arg Lys Asp Leu Arg
 260 265 270
 Leu Ala Leu Ser Val Thr Glu Thr Val Ala Phe Ser His Cys Cys Leu
 275 280 285
 Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Glu Lys Phe Arg Arg Tyr Leu
 290 295 300
 Tyr His Leu Tyr Gly Lys Cys Leu Ala Val Leu Cys Gly Arg Ser Val
 305 310 315 320
 His Val Asp Phe Ser Ser Ser Glu Ser Gln Arg Ser Arg His Gly Ser
 325 330 335
 Val Leu Ser Ser Asn Phe Thr Tyr His Thr Ser Asp Gly Asp Ala Leu
 340 345 350
 Leu Leu Leu
 355
 <210> 256
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 256
 Met Asp Pro Phe Pro Glu Ser Val Thr Glu Asn Phe Glu Tyr Asp Asp
 1 5 10 15
 Ser Ala Glu Ala Cys Tyr Ile Gly Asp Ile Val Ala Phe Gly Thr Val
 20 25 30
 Phe Leu Ser Ile Phe Tyr Ser Val Val Phe Ala Ile Gly Leu Val Gly
 35 40 45

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

<210> 257
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 257

```

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 Ser Ile Phe Ser Ser Thr
20          25          30

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35          40          45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115         120         125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
130         135         140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
145         150         155         160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
165         170         175

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
180         185         190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
195         200         205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
210         215         220

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225         230         235         240

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
245         250         255

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
260         265         270

```

Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr
275 280 285

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Ser
290 295 300

Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
305 310 315 320

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
325 330 335

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg
340 345 350

Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
355 360 365

Ser

<210> 258

<211> 369

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 258

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 Ser Ile Phe Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
130 135 140

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

```

145                      150                      155                      160
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
                      165                      170                      175
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
                      180                      185                      190
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
                      195                      200                      205
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
                      210                      215                      220
Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225                      230                      235                      240
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
                      245                      250                      255
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
                      260                      265                      270
Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr
                      275                      280                      285
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Thr
                      290                      295                      300
Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
305                      310                      315                      320
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
                      325                      330                      335
Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg
                      340                      345                      350
Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                      355                      360                      365

```

Ser

<210> 259
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 259

```

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 Ser Ile Phe Ser Ser Asn
                      20                      25                      30

```

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

355

360

365

Ser

<210> 260
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 260

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
260 265 270

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr Arg
275 280 285

Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Ser Val
290 295 300

Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
305 310 315 320

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
325 330 335

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg Gly
340 345 350

Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
355 360 365

<210> 261

<211> 368

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 261

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

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

Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala
35 40 45

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

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

Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
115 120 125

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
130 135 140

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 145 150 155 160
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 165 170 175
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 180 185 190
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 195 200 205
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 210 215 220
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 245 250 255
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 260 265 270
 Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Thr Ala Met Ala Trp Tyr Arg
 275 280 285
 Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Thr Val
 290 295 300
 Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 305 310 315 320
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
 325 330 335
 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg Gly
 340 345 350
 Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 355 360 365

<210> 262
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 262

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

35	40	45
Ala Ile Asn Ser Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly		
50	55	60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln		
65	70	75
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser		
	85	90
Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
	100	105
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val		
	115	120
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu		
	130	135
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met		
145	150	155
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser		
	165	170
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly		
	180	185
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln		
	195	200
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile		
	210	215
Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
225	230	235
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu		
	245	250
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys		
	260	265
Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg		
	275	280
Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Ser Val		
	290	295
Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser		
305	310	315
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg		
	325	330
Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg Gly		
	340	345
Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	355	360
		365

<210> 263
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 263

```

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 Ser Ile Phe Ser Ser Thr
          20          25          30

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
          35          40          45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
          115          120          125

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
130          135          140

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
145          150          155          160

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          165          170          175

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
          180          185          190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
          195          200          205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
210          215          220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
225          230          235          240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          245          250          255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

```

260 265 270
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 275 280 285
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 290 295 300
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 325 330 335
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 340 345 350
 Pro Gly Lys
 355
 <210> 264
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nanobody
 <400> 264
 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 Ser Ile Phe Ser Ser Thr
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Thr Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95
 Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 145 150 155 160

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

<210> 265
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 265

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

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

<210> 266

<211> 354

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 266

```

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

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

Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala
          35          40          45

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65          70          75          80

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

Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          115          120          125

Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
          130          135          140

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
145          150          155          160

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
          165          170          175

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
          180          185          190

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
          195          200          205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
          210          215          220

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
225          230          235          240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
          245          250          255

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
          260          265          270

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
          275          280          285

```

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
290 295 300

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
305 310 315 320

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
325 330 335

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
340 345 350

Gly Lys

<210> 267

<211> 273

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 267

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala 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 Ala Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Ser Asn Ser Tyr Pro Lys Val Gln Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Lys Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly Trp Tyr

180 185 190
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val Ala Ser Ile Ser Ser
 195 200 205
 Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val
 210 215 220
 Ser Arg Asp Asn Asp Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 225 230 235 240
 Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Leu Asp Ala Arg Arg
 245 250 255
 Gly Trp Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser

<210> 268
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 268

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

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val
 165 170 175

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln
 180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Ala Phe Val Ala Gly Ile Ser Gly Ser Ala
 195 200 205

Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser
 210 215 220

Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Asn Ser Tyr Pro
 245 250 255

Lys Val Gln Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 260 265 270

Ser

<210> 269

<211> 271

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 269

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Lys Val Gln Leu Val Glu Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
165 170 175

Thr Ser Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Lys Arg Asp Leu Val Ala Ser Ile Ser Ser Ser Gly
195 200 205

Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg
210 215 220

Asp Asn Asp Lys Asn Thr Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225 230 235 240

Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Leu Asp Ala Arg Arg Gly Trp
245 250 255

Asn Thr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 270

<211> 271

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 270

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 165 170 175
 Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln
 180 185 190
 Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Val Ile Asn Ser Val Gly
 195 200 205
 Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly
 210 215 220
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Ala Arg Arg Gly Trp
 245 250 255
 Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

 <210> 271
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự nanobody

 <400> 271

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

Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys
165 170 175

Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg
180 185 190

Gln Ala Pro Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Leu Ile Asn Ser
195 200 205

Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
210 215 220

Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu
225 230 235 240

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Gly Arg Arg
245 250 255

Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
260 265 270

Ser

<210> 272

<211> 271

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 272

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
165 170 175

Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln
180 185 190

Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Ser Val Gly
195 200 205

Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp
245 250 255

Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 273

<211> 271

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 273

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Ser Asp Gly Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

```

          100              105              110
Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Met Gln Leu Val Glu Ser
145              150              155              160
Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
      165              170              175
Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln
      180              185              190
Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Leu Ile Asn Ser Val Gly
      195              200              205
Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
      210              215              220
Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225              230              235              240
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Gly Arg Arg Gly Trp
      245              250              255
Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      260              265              270

```

<210> 274
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 274

```

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

```

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

<210> 275
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 275

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

Ala Ala Ser Asn Ser Tyr Pro Lys Val Gln Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175
 Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr
 180 185 190
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Ser
 195 200 205
 Val Gly Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 210 215 220
 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 225 230 235 240
 Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg
 245 250 255
 Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 260 265 270
 Ser

<210> 276
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 276

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala 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 Ala Phe Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Gly Ser Ala Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr

```
<210> 277
<211> 369
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự nanobody

<400> 277

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

<210> 278
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 278

```

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35              40              45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100             105             110

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
145             150             155             160

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
165             170             175

Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln
180             185             190

Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Asn Ser Val Gly
195             200             205

Val Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
210             215             220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225             230             235             240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp
245             250             255

```

Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
275 280 285

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
290 295 300

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
305 310 315 320

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser
325 330 335

Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
340 345 350

Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
355 360 365

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg
370 375 380

Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
385 390 395

<210> 279

<211> 395

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 279

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

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

<210> 280
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nanobody

<400> 280

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

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
325 330 335

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
340 345 350

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
355 360 365

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
370 375 380

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
385 390 395 400

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
405 410 415

Val Thr Val Ser Ser
420

<210> 281

<211> 421

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nanobody

<400> 281

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

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

Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Asp Leu Val
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Pro Arg Arg Gly Trp Asp Thr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

```
<210> 282
<211> 275
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự nanobody
```

<400> 282

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala 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 Ala Phe Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Gly Ser Ala Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Asn Ser Tyr Pro Lys Val Gln Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 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 Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175
 Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Ala Phe Val Ala Gly Ile Ser Gly
 195 200 205
 Ser Ala Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220
 Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240
 Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Asn Ser
 245 250 255
 Tyr Pro Lys Val Gln Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270
 Val Ser Ser
 275