



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0053688

(51)^{2021.01} **A61K 47/68**; C07K 16/40; C07K 16/28; (13) **B**
A61P 1/00; A61P 29/00

(21) 1-2022-03964

(22) 15/01/2021

(86) PCT/EP2021/050798 15/01/2021

(87) WO 2021/144415 22/07/2021

(30) 20152428.7 17/01/2020 EP

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/11/2022 416A

(73) 1. UNIVERSITEIT GENT (BE)

Sint-Pietersnieuwstraat 25, 9000 Gent, Belgium

2. VIB VZW (BE)

Rijvisschestraat 120, 9052 Zwijnaarde, Belgium

(72) COX, Eric (BE); DEVRIENDT, Bert (BE); DEPICKER, Anna (BE).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) POLYPEPTIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ MIỄN ĐƠN CỦA
GLOBULIN MIỄN DỊCH

(21) 1-2022-03964

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể miễn đơn liên kết đặc hiệu với aminopeptidaza N (APN), và cụ thể hơn đến các polypeptit và các axit nucleic mã hóa các polypeptit này; đến các phương pháp điều chế các polypeptit này; đến các chế phẩm và cụ thể là đến các dược phẩm chứa các polypeptit này, nhằm các mục đích phòng ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán. Cụ thể, các kháng thể miễn đơn theo sáng chế có khả năng gắn đích một gốc đến bề mặt niêm mạc.

Fig. 6

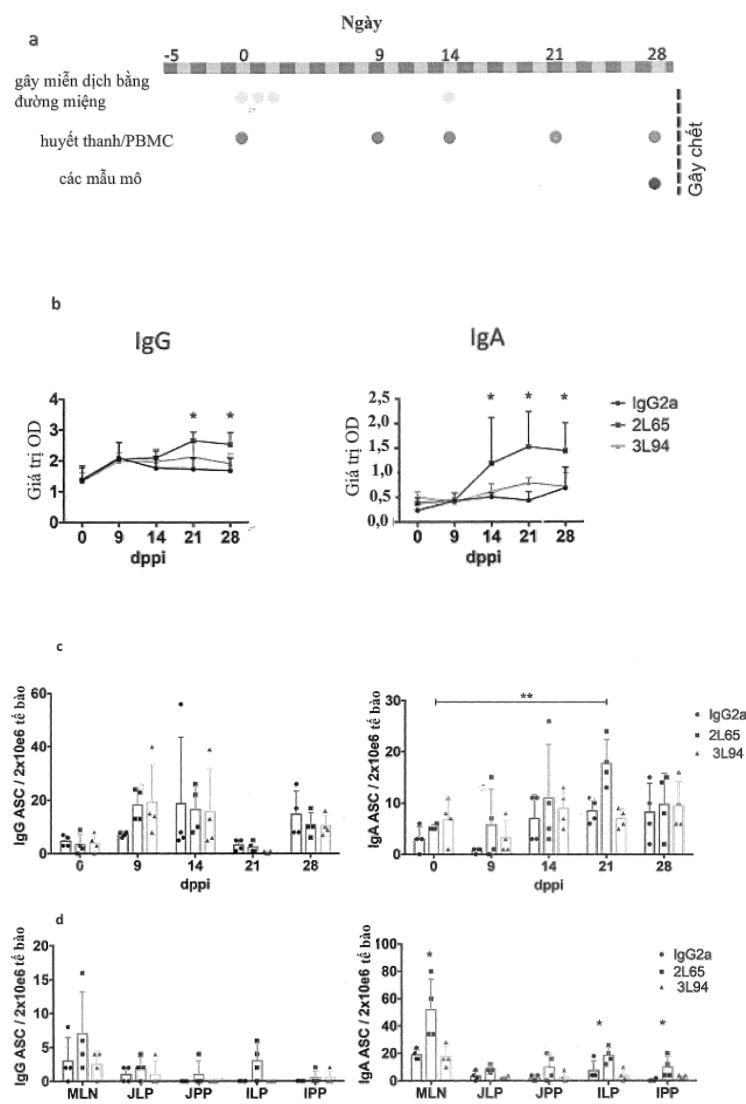


Fig. 6 tiếp

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể miễn đơn liên kết đặc hiệu với aminopeptidaza N (APN), và cụ thể hơn đến các polypeptit và các axit nucleic mã hóa các polypeptit này; đến các phương pháp điều chế các polypeptit này; đến các chế phẩm và cụ thể là đến các dược phẩm chứa các polypeptit này, nhằm các mục đích phòng ngừa, điều trị hoặc chẩn đoán. Cụ thể, các kháng thể miễn đơn theo sáng chế có khả năng gắn đích một gốc đến bề mặt niêm mạc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phần lớn các mầm bệnh và các chất độc ngoại sinh đi vào cơ thể qua các bề mặt niêm mạc của đường hô hấp, tiêu hóa (GI) và niệu sinh dục, và do đó tính miễn dịch của niêm mạc là đặc biệt quan trọng để chống lại bệnh nhiễm trùng. Hiện nay, việc phân phối vaccin qua đường miệng không dùng kim tiêm là đường sử dụng hấp dẫn nhất để bảo vệ chống lại các mầm bệnh ở ruột, vì nó có nhiều ưu điểm, như dễ sử dụng, không có nguy cơ nhiễm bệnh lây truyền qua đường máu và khả năng áp dụng để chủng ngừa quy mô lớn. Ngược lại với vaccin tiểu đơn vị, chỉ các vaccin sống nhược độc hoặc các hạt mầm bệnh đã bị bất hoạt đã được phát hiện ra là hữu hiệu trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch hiệu quả. Tuy nhiên, vì các vấn đề an toàn liên quan đến các mầm bệnh bất hoạt hoặc nhược độc sống được phân phối qua đường miệng, chỉ một số lượng nhỏ các vaccin này được chấp thuận. Trái lại, các vaccin tiểu đơn vị được xem là an toàn vì chúng không chứa thành phần sống của mầm bệnh, nhưng lại kém trong việc vận chuyển kháng nguyên vaccin qua biểu mô đường ruột để đạt đến vị trí cảm ứng miễn dịch bên dưới dẫn đến đáp ứng miễn dịch kém tạo ra rào cản đối với sự phát triển của các vaccin đường miệng. Tế bào ruột hoặc tế bào biểu mô nhung mao hấp thu tạo thành 90% toàn bộ biểu mô đường ruột và chúng có các khả năng thực bào và vận chuyển xuyên tế bào để vận chuyển các mầm bệnh đường ruột hoặc các đại phân tử qua hàng rào biểu mô [1]. Do đó, kháng nguyên gắn đích vào các thụ thể xuyên tế bào trên các tế bào ruột là phương pháp được quan tâm để phân phối vaccin và gây ra đáp ứng miễn dịch niêm mạc cũng như toàn thân mạnh kháng lại các mầm bệnh đường ruột [2].

Trước đây, aminopeptidaza N (APN) đã được xác định là thụ thể cho F4 fimbriae (tua) mà được biểu hiện trên nhiều loại tế bào bao gồm tế bào ruột của ruột non và các tế bào trình diện kháng nguyên (APC), nhưng không có trên các tế bào biểu mô của các phần khác của đường GI [3]. Việc gây miễn dịch đường miệng bằng các kháng thể đa dòng đặc hiệu APN gây ra tính miễn dịch niêm mạc [3, WO09/103555]. Ngoài ra, việc chức năng hóa các vi hạt với các kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu APN cũng làm tăng sự hấp thu các hạt này bởi biểu mô đường ruột và gây ra các đáp ứng miễn dịch toàn thân [4]. Các phát hiện này gợi ý rằng chất phân phối đặc hiệu APN được liên hợp với kháng nguyên vacxin có thể là chiến lược đáng quan tâm để gây ra đáp ứng miễn dịch ở ruột mạnh hơn. Đến nay, một số cơ chế gắn đích đã được phát hiện ra, như các kháng thể, gắn đích qua trung gian tế bào (liệu pháp miễn dịch DC, chuyển tế bào T nuôi), và liên hợp hóa học của kháng nguyên với các phân tử nhỏ như các glycan và các axit amin [5]. Nhờ tính đặc hiệu và ái lực mạnh của chúng, các kháng thể là các protein lý tưởng mà kháng nguyên cần quan tâm có thể được dung hợp di truyền với chúng để gắn đích các tế bào ruột biểu hiện APN. Các dạng kháng thể khác nhau có thể được sử dụng, như kháng thể đơn dòng (mAb), các đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv), hoặc miền biến đổi của các kháng thể chỉ có chuỗi nặng (VHH, còn được biết là Nanobody®). Mặc dù các mAb thông thường trước đây được ưu tiên hơn để làm phương tiện gắn đích, việc sản xuất chúng được dung hợp với các kháng nguyên là rất cồng kềnh và tốn thời gian. Ngoài ra, sự phức tạp trong cấu trúc của chúng cản trở việc sử dụng chúng làm các phối tử tiềm năng. Do đó, các dạng đơn giản hơn khác như scFv và VHH được xem là các phương pháp tiếp cận thay thế cho các kháng thể có kích thước đầy đủ. Mặc dù các tiến bộ trong việc thiết kế di truyền kháng thể giúp dễ dàng thiết kế và tách dòng các gen scFv dựa trên hoạt động gắn đích của các mAb, độ ổn định và sự tích lũy của các protein scFv tổng hợp thay đổi nhiều, phụ thuộc vào một số yếu tố, bao gồm độ dài không thể dự đoán được của cầu nối cần thiết để đạt được sự gấp đúng và sự lắp ráp của hai miền biến đổi, và điều này thường giới hạn các ứng dụng gắn đích scFv [6, 7]. Ngược lại, miền globulin miễn dịch VHH chỉ là đoạn biến đổi 15 kDa thu được từ kháng thể chỉ có chuỗi nặng của camelid [8]. Khác với scFv, VHH chứa các đặc điểm liên kết kháng nguyên của nó trong miền đơn mà không phải là trong hai miền biến đổi trong các kháng thể thông thường và các scFv được tạo dẫn xuất, trong khi vẫn giữ được ái lực tương tự. Nhờ các đặc điểm riêng của nó như kích thước nhỏ, dễ sản xuất, độ bền nhiệt tốt và tính

thâm vào mô hiệu quả, VHH đã nhận được sự quan tâm lớn đối với nhiều ứng dụng khác nhau so với các kháng thể cổ điển [9-11].

Sáng chế đề xuất các VHH và ứng dụng của chúng làm chất mang để phân phối hướng đích vào biểu mô ruột, ví dụ, để gây ra đáp ứng miễn dịch niêm mạc mạnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đã nhận diện được họ các VHH, có thể được sản xuất ở quy mô lớn và là ổn định. Họ các VHH này không chỉ liên kết với APN, mà còn được nhập bào hiệu quả bởi các dòng tế bào và nằm trong các vòng của ruột lợn trong các điều kiện sinh lý, và đáng chú ý là, có khả năng gây ra các đáp ứng IgA ở ruột và toàn thân, cụ thể là sau khi sử dụng bằng đường miệng. Các polypeptit theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương tiện phân phối gắn đích thụ thể APN và để phân phối hiệu quả các phân tử đặc hiệu đến niêm mạc biểu hiện APN, cụ thể hơn là đến ruột (non). Ngoài ra, các polypeptit theo sáng chế đi qua hàng rào biểu mô sau khi sử dụng bằng đường miệng cho lợn, thể hiện sự hữu ích của nó để làm chất mang để gắn đích các hợp chất/kháng nguyên khác loại đến hệ miễn dịch niêm mạc ruột.

Trong một phương án, polypeptit theo sáng chế chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), trong đó ISVD này chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt từ CDR1 đến CDR3), trong đó

(i) CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, và

các trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 1, cụ thể là 2 khác biệt axit amin, cụ thể hơn là 1 khác biệt axit amin;

(ii) CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, và

các trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 3, cụ thể là 2 khác biệt axit amin, cụ thể hơn là 1 khác biệt axit amin;

và

(iii) CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, và

các trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 4, cụ thể là 2 khác biệt axit amin, cụ thể hơn là 1 khác biệt axit amin.

Cụ thể hơn, (i) CDR1 được chọn từ SEQ ID NO: 1 hoặc 2; (ii) CDR2 là SEQ ID NO: 3; và (iii) CDR3 được chọn từ SEQ ID NO: 4 hoặc 5. Polypeptit cụ thể theo sáng chế chứa kết hợp CDR1, CDR2 và CDR3 được chọn từ:

- CDR1 là SEQ ID NO: 1, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 4; hoặc

- CDR1 là SEQ ID NO: 2, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 5.

Cụ thể hơn, ISVD theo sáng chế chứa hoặc chủ yếu chứa 4 vùng khung (lần lượt từ FR1 đến FR4) và các vùng quyết định bổ sung CDR1, CDR2 và CDR3 được đề xuất ở đây.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm hoặc chứa SEQ ID NO: 6, hoặc polypeptit có tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO: 6, như ví dụ, SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8.

Trong một phương án khác, cấu trúc liên kết APN bao gồm ít nhất một polypeptit theo sáng chế được đề xuất. Cấu trúc này có thể chứa các gốc khác được liên kết với miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch. Các gốc khác này có thể liên kết với APN hoặc không. Trong một phương án cụ thể, cấu trúc này còn chứa miền Fc và/hoặc gốc chẩn đoán hoặc điều trị khác, ví dụ, hợp chất hoạt động sinh học.

Trong một phương án khác, các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch không được tạo ra như vậy, mà được tạo ra dưới dạng các axit nucleic, nghĩa là các phân tử axit nucleic được phân lập hoặc tái tổ hợp mã hóa các polypeptit như được mô tả ở đây. Ngoài ra, các vectơ hoặc tế bào chủ được tạo ra chứa các axit nucleic này. Thông thường, các tế bào chủ này sẽ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với các axit nucleic này. Ứng dụng cụ thể được đề xuất cho các tế bào chủ này là sản xuất miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch hoặc polypeptit theo sáng chế. Do đó, các tế bào chủ đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với các phân tử axit nucleic mã hóa các polypeptit được đề xuất ở đây có thể được sử dụng để sản xuất miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch.

Theo một khía cạnh khác, các polypeptit, các axit nucleic hoặc các cấu trúc được đề xuất ở đây là để sử dụng làm thuốc, cụ thể là để sử dụng làm thuốc điều trị, cho người hoặc động vật. Theo một phương án khác, các polypeptit (hoặc các axit nucleic mã hóa chúng) được đề xuất để sử dụng trong các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh (dạ dày) ruột.

Polypeptit theo sáng chế có thể được đề xuất dưới dạng protein (dưới dạng miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, như là một phần của cấu trúc liên kết APN, phân tử khảm hoặc dược phẩm) hoặc có thể được sử dụng làm phân tử axit nucleic mã hóa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch này, hoặc dưới dạng vectơ chứa phân tử axit nucleic này. Các đường sử dụng khác nhau có thể được đề xuất. Các ví dụ không giới hạn là polypeptit có thể được sử dụng toàn thân, qua đường miệng hoặc trong mũi, mà

cụ thể là bằng đường miệng. Trong trường hợp miễn biến đổi đơn của globulin miễn dịch được đề xuất dưới dạng axit nucleic hoặc vectơ, được đề xuất cụ thể là miễn biến đổi đơn của globulin miễn dịch này được sử dụng bằng liệu pháp gen. Phương án cụ thể đề xuất polypeptit, cấu trúc, phân tử khảm, hoặc được phẩm để sử dụng trong việc chủng ngừa, cụ thể là chủng ngừa qua niêm mạc.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa polypeptit, cấu trúc hoặc phân tử khảm, axit nucleic hoặc tế bào chủ như được mô tả ở đây, và chất mang, tá được và/hoặc chất pha loãng được dụng. Cụ thể là, được phẩm này là vaccin, cụ thể hơn là vaccin sử dụng bằng đường miệng, nghĩa là vaccin được bào chế thích hợp để phân phối bằng đường miệng.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn hoặc bệnh đường ruột ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng polypeptit, cấu trúc, phân tử khảm hoặc được phẩm, cho đối tượng này với lượng hữu hiệu để điều trị, làm giảm hoặc phòng ngừa ít nhất một triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn này.

Trong một phương án khác, sáng chế bao gồm polypeptit, cấu trúc hoặc phân tử khảm, axit nucleic hoặc tế bào chủ như được mô tả ở đây để sử dụng trong việc chẩn đoán, ví dụ, để sử dụng trong việc chụp ảnh sinh học hoặc để sử dụng trong thử nghiệm cạnh tranh. Ngoài ra, polypeptit, cấu trúc hoặc phân tử khảm có thể được sử dụng trong phương pháp in vitro để phát hiện và thu được hợp chất hoặc sinh vật (ví dụ, virus) có khả năng đi qua hàng rào niêm mạc ở đối tượng, phương pháp này bao gồm: a) ủ nguồn, tế bào hoặc dòng tế bào chứa APN hoặc đoạn chức năng của nó với hợp chất hoặc sinh vật cần được thử nghiệm; và b) xác định khả năng của phân tử này trong việc cạnh tranh với polypeptit hoặc phân tử khảm như được đề xuất ở đây.

Cũng được đề xuất là phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước:

- đưa axit nucleic mã hóa polypeptit vào hệ biểu hiện, cụ thể là *Pichia pastoris*, và
- tinh chế polypeptit đã biểu hiện.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Thể hiện bằng sơ đồ chiến lược tách dòng Gibson dựa vào Hệ thống BioXp™ 3200 để thu được một cách hữu hiệu thể dung hợp VHH-MG (miễn biến đổi của kháng thể chỉ có chuỗi nặng được dung hợp với miền Fc của IgG murine) (a). 40 bp

ở các đầu của các đoạn dung hợp VHH-MG là tương đồng với các đầu của vector pKaiGG được tạo mạch thẳng bởi SapI. MG thể hiện miền Fc của IgG chuột nhắt. Các đoạn VHH-MG được tổng hợp và được nối vào pKaiGG đã cắt bằng SapI trong quá trình chạy qua đêm trên hệ thống BioXP. Các tế bào DH5 α được biến nạp với các mẫu ghép nối và các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường được bổ sung Zeocin (Zeo). Tiếp theo, ADN được phân lập từ bốn dòng được chọn ngẫu nhiên và được phân tích bằng cách tiêu hóa giới hạn hoặc PCR khuôn lác và giải trình tự để sàng lọc các dòng dương tính. (b) Hiệu quả của việc thu được các dòng không có lỗi nhờ hệ thống tách dòng BioXP. Xác suất thu được các dòng không có lỗi là 77% khi một dòng được sàng lọc và 97% khi hai dòng được sàng lọc cho mỗi cấu trúc bằng cách giải trình tự.

Fig. 2: Chọn VHH-MG đặc hiệu APN bằng ELISA và phương pháp đo tế bào theo dòng. Các dòng được sắp xếp theo họ của chúng và được tách riêng bằng đường chấm chấm. (a) Các đĩa ELISA được phủ bằng APN và được ủ với môi trường nuôi cấy. Sự liên kết APN của VHH-MG được mô tả bằng các giá trị O.D. của phản ứng đo màu. (b) Sàng lọc bằng phương pháp đo tế bào theo dòng các VHH-MG mà liên kết với APN có độ dài đầy đủ được biểu hiện trên màng của BHK21 đã được chuyển nhiễm APN (BHK21-APN, ô màu xám) và IPEC-J2 đã được chuyển nhiễm APN (IPEC-J2-APN, ô màu đen). IMM013 (IgG1 của murine) là đối chứng dương. V2-MG và D3-MG isotyp IgG1 là các đối chứng âm. Các thể dung hợp V2-MG và D3-MG chứa VHH (lần lượt là V2 và D3) liên kết với đích không thích hợp. Đồ thị thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình (MFI).

Fig. 3: Tinh chế các thể dung hợp VHH-MG khác nhau. (a) Hồ sơ sắc ký loại cỡ (SEC) của sáu thể dung hợp VHH-MG khác nhau sau khi tinh chế protein A, được đánh dấu bằng tên tương ứng của nó ở góc trên bên phải. Các mũi tên thể hiện vị trí và khối lượng phân tử là ~80 kDa, tương ứng với các thể dung hợp VHH-MG monome được lắp ráp bằng các cầu nối disulfua giữa hai polypeptit VHH-MG (mỗi phân tử ~40 kDa). (b) Phân tích SDS-PAGE các phân đoạn đã gộp của đỉnh 80-kDa sau khi SEC trên gel 4-20% polyacrylamit trong cả điều kiện khử (trái) và không khử (phải). Vị trí được dự đoán của polypeptit có chiều dài đầy đủ nguyên vẹn được chỉ ra bằng đầu mũi tên đối với VHH-MG đơn giá (~40 kDa) trong các điều kiện khử và bằng mũi tên đối với VHH-MG hai giá (~80 kDa) trong các điều kiện không khử. M, chất đánh dấu khối lượng phân

tử (kDa). (Sản lượng- 3L94-MG: 2,7 mg/L; 2L48-MG: 2,3 mg/L; 2L69-MG: 1,9 mg/L; 2L65-MG: 5,9 mg/L; 2L22-MG: 8 mg/L; 2L46-MG: 1,4 mg/L).

Fig. 4: Sàng lọc các VHH liên kết với các dòng tế bào biểu hiện APN. Dịch chiết chu chất thô được tạo ra từ các tế bào TGI mang các phagemit tái tổ hợp từ thư viện.

28 ứng viên VHH liên kết APN được sàng lọc trên các dòng tế bào biểu hiện APN bằng phương pháp đo tế bào theo dòng. Các dòng được nhóm lại theo mức độ tương tự của chúng trong trình tự CDR3; số nằm trên cùng giữa các đường chấm chấm chỉ ra họ của các dòng khác nhau. Trục Y thể hiện tỷ lệ của cường độ huỳnh quang trung vị (MFI) của các tế bào BHK21 được chuyển nhiễm APN (APN) và các tế bào BHK21 mẹ không chuyển nhiễm (mẹ).

Fig. 5: Phân tích sự liên kết và khả năng nhập bào qua trung gian APN của các thể dung hợp VHH-MG đã tinh chế. (a) ELISA liên kết APN với các thể dung hợp VHH-MG đã tinh chế. Dây pha loăng ba lần của các VHH-MG đã tinh chế được ủ trên đĩa vi phiếm được phủ APN và được dò bằng kháng thể kháng IgG chuột được liên hợp với peroxidaza cải ngựa. Sự liên kết của VHH-MG với kháng nguyên đã bất động được mô tả bằng các giá trị OD (492 nm). IMM013 là đối chứng dương và GBP-MG là đối chứng âm. Ngưỡng nền được xác định là hai lần giá trị OD (492 nm) của đối chứng âm. (b) Sự liên kết của các thể dung hợp VHH-MG với các tế bào biểu hiện APN được xác định bằng phương pháp đo tế bào theo dòng. Đồ thị thể hiện số lượng tế bào dương tính APN mà liên kết với VHH-MG ở nồng độ đã chỉ ra ($\mu\text{g/ml}$).

Fig. 6: Việc gây miễn dịch bằng đường miệng cho lợn con bằng VHH-MG gây ra các đáp ứng kháng thể ở ruột non và hệ tuần hoàn. (a) thiết kế thử nghiệm gây miễn dịch bằng đường miệng. (b) các đáp ứng IgA và IgG huyết thanh đặc hiệu IgG2a chuột nhất khi gây miễn dịch bằng đường miệng cho lợn con ($n=4/\text{nhóm}$) bằng 1 mg VHH-MG 2L65 và 3L94 và lượng đẳng mol IgG2a chuột nhất không liên quan. dpri: số ngày sau khi gây miễn dịch lần đầu; OD: mật độ quang. Số liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình + sd. *, $p<0,05$ đối với IgG2a (Friedman). (c) lượng tế bào tiết IgG và IgA đặc hiệu IgG2a chuột nhất tuần hoàn ở các thời điểm chỉ định. ASC: tế bào tiết kháng thể. **, $p<0,01$ đến ngày 0; Δ , $p<0,05$ đối với IgG2a (Friedman). (d) lượng tế bào tiết IgG và IgA đặc hiệu IgG2a chuột nhất trong ruột non ở d28 sau khi gây miễn dịch lần đầu. MLN: hạch bạch huyết mạc treo ruột; JLP: lớp đệm hồng tràng; JPP: mảng Peyer hồng tràng; ILP: lớp đệm hồi tràng; IPP: mảng Peyer hồi tràng. *, $p<0,05$ (Holm-Sidak).

Fig. 7: Sự biểu hiện của các biến thể khác nhau của các thể dung hợp VHH-MG đặc hiệu APN ở *Pichia pastoris*. Môi trường nuôi cấy các thể biến nạp nấm men (4 khuẩn lạc cho mỗi cấu trúc) được sàng lọc bằng cách nhuộm Coomassie và phân tích thẩm tách western để phát hiện dòng biểu hiện cao nhất. Ở đây, chỉ một dòng biểu hiện cao cho mỗi cấu trúc được thể hiện và chúng được nhóm lại theo mức độ tương tự của CDR3 của chúng; các số nằm giữa các đường chấm chấm thể hiện họ của chúng. Sự biểu hiện protein được cảm ứng trong 48 h với 1% metanol. Các môi trường nuôi cấy được thu hoạch và dịch nổi được phân tích bằng SDS-PAGE (Top) và thẩm tách western (Bottom). 'Độ tinh khiết V2-MG' được sử dụng làm đối chứng nạp và 500 ng các mẫu được nạp để nhuộm Coomassie và 200 ng để thẩm tách western.

Fig. 8: Các trình tự axit amin và axit nucleic điển hình của các polypeptit theo sáng chế. CDR được gạch chân.

Fig. 9: Trình tự axit amin và axit nucleic của cấu trúc dung hợp IgG2a chuột nhất VHH-Fc (thể dung hợp 2L65-MG). Trình tự của 2L65 VHH được in đậm. Trình tự bản lề được gạch chân.

Fig. 10: (a) Trình tự axit amin của một phần của IgA lợn (AAA65943.1; U12594.1); (b) đoạn bản lề-CH2-CH3 của IgA lợn; (c) Trình tự axit amin của một phần của IgG3 lợn (EU372658.1); (d) đoạn CH1-bản lề-CH2-CH3 của IgG3 lợn (miền CH1 bắt đầu ở vị trí 5).

Fig. 11: VHH đặc hiệu APN được nội bào hóa bởi các tế bào BHK-APN.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ được sử dụng đều có nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực, mà sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình.

Như được sử dụng ở đây, các danh từ dạng số ít "một" bao gồm cả nghĩa số nhiều, trừ khi ngữ cảnh có quy định khác một cách rõ ràng. Do đó, ví dụ, việc đề cập đến "một chất phản ứng" bao gồm một hoặc nhiều chất phản ứng khác nhau này và việc đề cập đến "phương pháp" bao gồm việc đề cập đến các bước và các phương pháp tương đương đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này mà có thể được cải biến hoặc thay thế cho các phương pháp được mô tả ở đây.

Trừ khi được chỉ ra khác đi, thuật ngữ "ít nhất" đứng trước một dãy yếu tố được hiểu là đề cập tới yếu tố bất kỳ trong dãy này. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra hoặc có thể xác định được, bằng cách chỉ sử dụng thử nghiệm thông

thường, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể theo sáng chế đã mô tả ở đây. Các phương án tương đương này đều dự định được bao gồm bởi sáng chế.

Thuật ngữ "và/hoặc" được sử dụng ở đây bao gồm nghĩa "và", "hoặc" và "toàn bộ hoặc sự kết hợp khác bất kỳ của các yếu tố được liên kết bởi thuật ngữ này". Thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" như được sử dụng ở đây có nghĩa là nằm trong khoảng 20%, tốt hơn là nằm trong khoảng 15%, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng 10% và tốt nhất nếu nằm trong khoảng 5% giá trị hoặc khoảng đã cho.

Trong toàn bộ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ sau đây, trừ khi ngữ cảnh quy định theo cách khác, thuật ngữ "gồm" và các thuật ngữ biến thể của nó, như "gồm" và "việc gồm", sẽ được hiểu là bao gồm số nguyên hoặc bước hoặc nhóm số nguyên hoặc bước được nêu, nhưng không loại trừ số nguyên hoặc bước hoặc nhóm số nguyên hoặc bước khác bất kỳ. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gồm" có thể được thay bằng thuật ngữ "chứa" hoặc "bao gồm" hoặc đôi khi khi được sử dụng ở đây với thuật ngữ "có".

Thuật ngữ "trình tự" như được sử dụng ở đây (ví dụ trong các thuật ngữ như "trình tự globulin miễn dịch", "trình tự kháng thể", "trình tự miền biến đổi", "trình tự VHH" hoặc "trình tự protein"), nói chung nên được hiểu là bao gồm cả trình tự axit amin liên quan cũng như các axit nucleic hoặc các trình tự nucleotit mã hóa chúng, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi cách hiểu hạn chế hơn. Trình tự axit nucleic hoặc axit amin được xem là "(ở) (dạng) (gần như) được phân lập" - ví dụ, so với môi trường phản ứng hoặc môi trường nuôi cấy mà nó thu được từ đó - khi nó được tách ra khỏi ít nhất một thành phần khác mà thường kết hợp với nó trong nguồn hoặc môi trường này, như axit nucleic hoặc axit amin khác, protein/polypeptit khác, thành phần sinh học hoặc đại phân tử khác hoặc ít nhất một chất gây nhiễm; tạp chất hoặc các thành phần có lượng nhỏ.

Với mục đích so sánh hai hoặc nhiều trình tự nucleotit, tỷ lệ phần trăm "đồng nhất trình tự" giữa trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai có thể được tính bằng cách chia [số nucleotit trong trình tự nucleotit thứ nhất mà đồng nhất với các nucleotit ở các vị trí tương ứng trong trình tự nucleotit thứ hai] cho [tổng số nucleotit trong trình tự nucleotit thứ nhất] và nhân với [100%], trong đó mỗi đột biến mất đoạn, gán xen, thế hoặc bổ sung của nucleotit trong trình tự nucleotit thứ hai - so với trình tự nucleotit thứ nhất - được xem là khác biệt ở một (vị trí) nucleotit. Theo cách khác, mức độ đồng nhất trình tự giữa lại hoặc nhiều trình tự nucleotit có thể được tính bằng cách

sử dụng thuật toán máy tính đã biết để sắp xếp thẳng hàng trình tự như NCBI Blast v2.0, sử dụng các thiết lập chuẩn.

Với mục đích so sánh hai hoặc nhiều trình tự axit amin, tỷ lệ phần trăm "đồng nhất trình tự" giữa trình tự axit amin thứ nhất và trình tự axit amin thứ hai (còn được gọi ở đây là "tỷ lệ đồng nhất axit amin") có thể được tính bằng cách chia [số lượng gốc axit amin trong trình tự axit amin thứ nhất mà đồng nhất với các gốc axit amin ở các vị trí tương ứng trong trình tự axit amin thứ hai] cho [tổng số gốc axit amin trong trình tự axit amin thứ nhất] và nhân với [100%], trong đó mỗi đột biến mất đoạn, gán xen, thế hoặc bổ sung của gốc axit amin trong trình tự axit amin thứ hai - so với trình tự axit amin thứ nhất - được xem là khác biệt ở một (vị trí) gốc axit amin, nghĩa là, là "khác biệt axit amin" như được xác định ở đây. Theo cách khác, mức độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự axit amin có thể được tính bằng cách sử dụng thuật toán máy tính đã biết, như các thuật toán được đề cập trên đây để xác định mức độ đồng nhất trình tự cho trình tự nucleotit, lại sử dụng các thiết lập chuẩn.

Ngoài ra, để xác định mức độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự axit amin, người có hiểu biết trung bình có thể xem xét cái gọi là các đột biến thế axit amin "bảo tồn", mà thường có thể được mô tả là các đột biến thế axit amin trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có cấu trúc hóa học tương tự và có rất ít hoặc gần như không có ảnh hưởng đến chức năng, hoạt động hoặc các đặc điểm sinh học khác của polypeptit này. Các đột biến thế bảo tồn này tốt hơn là các đột biến thế mà trong đó một axit amin trong các nhóm (a) - (e) sau đây được thế bằng gốc axit amin khác nằm trong cùng nhóm: (a) gốc nhỏ béo, không phân cực hoặc phân cực nhẹ: Ala, Ser, Thr, Pro và Gly; (b) gốc phân cực, tích điện âm và các amit (không tích điện) của chúng: Asp, Asn, Glu và Gln; (c) gốc phân cực, tích điện dương: His, Arg và Lys; (d) gốc lớn béo, không phân cực: Met, Leu, Ile, Val và Cys; và (e) các gốc thơm: Phe, Tyr và Trp. Các đột biến thế bảo tồn được đặc biệt ưu tiên là như sau: Ala thành Gly hoặc thành Ser; Arg thành Lys; Asn thành Gln hoặc thành His; Asp thành Glu; Cys thành Ser; Gln thành Asn; Glu thành Asp; Gly thành Ala hoặc thành Pro; His thành Asn hoặc thành Gln; Ile thành Leu hoặc thành Val; Leu thành Ile hoặc thành Val; Lys thành Arg, thành Gln hoặc thành Glu; Met thành Leu, thành Tyr hoặc thành Ile; Phe thành Met, thành Leu hoặc thành Tyr; Ser thành Thr; Thr thành Ser; Trp thành Tyr; Tyr thành Trp; và/hoặc Phe thành Val, thành Ile hoặc thành Leu.

Các đột biến thể axit amin bất kỳ được áp dụng cho các polypeptit được mô tả ở đây cũng có thể dựa trên phân tích về tần số của các biến thể axit amin giữa các protein tương đồng của các loài khác nhau.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "globulin miễn dịch" và "trình tự globulin miễn dịch" được sử dụng như thuật ngữ chung để bao gồm cả kháng thể có kích thước đầy đủ. "Miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch" hoặc "ISVD" là đoạn kháng thể chứa miền kháng thể biến đổi đơn. Tương tự kháng thể nguyên vẹn, nó có thể liên kết chọn lọc với kháng nguyên đặc hiệu. Với khối lượng phân tử chỉ 12-18 kDa, ISVD nhỏ hơn nhiều so với các kháng thể thông thường (150-160 kDa) mà bao gồm hai chuỗi protein nặng và hai chuỗi protein nhẹ, và thậm chí nhẹ hơn các đoạn Fab (~50 kDa, một chuỗi nhẹ và nửa chuỗi nặng) và các đoạn biến đổi chuỗi đơn (~25 kDa, hai miền biến đổi, một từ chuỗi nặng và một từ chuỗi nhẹ). Nói chung, ISVD sẽ có trình tự axit amin chứa 4 vùng khung (FR1 đến FR4) và 3 vùng quyết định bổ sung (CDR1 đến CDR3), tốt hơn là theo công thức sau đây: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3- FR4. Vị trí liên kết kháng nguyên của ISVD được tạo bởi không nhiều hơn ba CDR. Thuật ngữ "ISVD", như được sử dụng ở đây, bao gồm các miền biến đổi của kháng thể chuỗi nặng camelid (VHH), còn được gọi là Nanobodies®, các kháng thể miền (dAb), và ISVD thu được từ cá mập (các miền IgNAR).

Các trình tự khung được ưu tiên hơn được tóm tắt, ví dụ, trong Fig. 8 và có thể được sử dụng trong ISVD theo sáng chế. Tốt hơn là, các CDR được mô tả trong Bảng 2 được bắt cặp với các vùng khung tương ứng của cùng cấu trúc ISVD.

Thuật ngữ "miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch" được sử dụng thay thế với "miền biến đổi đơn". Như vậy, miền biến đổi đơn có thể là trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (ví dụ, trình tự VL) hoặc đoạn thích hợp của nó; hoặc trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (ví dụ, trình tự VH hoặc trình tự VHH) hoặc đoạn thích hợp của nó; với điều kiện là nó có khả năng tạo ra đơn vị liên kết kháng nguyên đơn (nghĩa là, đơn vị liên kết kháng nguyên chức năng mà chủ yếu chứa miền biến đổi đơn, sao cho miền liên kết kháng nguyên đơn này không cần tương tác với miền biến đổi khác để tạo ra đơn vị liên kết kháng nguyên chức năng). Trong một phương án, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch là trình tự VHH.

Phân tử liên kết APN theo sáng chế có thể là globulin miễn dịch, như miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, thu được theo cách thích hợp bất kỳ và từ nguồn thích

hợp bất kỳ, và có thể, ví dụ, là các trình tự VHH xuất hiện tự nhiên (nghĩa là, từ loài thích hợp của Camelid) hoặc các trình tự axit amin tổng hợp hoặc bán tổng hợp, bao gồm nhưng không giới hạn ở các trình tự VHH “được làm tương thích với người”, các trình tự globulin miễn dịch “được làm tương thích với camelid” (và cụ thể là trình tự miễn biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với camelid), cũng như Nanobodies® đã thu được bằng các kỹ thuật như thành thực ái lực (ví dụ, bắt đầu từ các trình tự globulin miễn dịch tổng hợp, ngẫu nhiên hoặc xuất hiện tự nhiên), ghép CD, các đoạn nguy trang, kết hợp thu được từ các trình tự globulin miễn dịch khác nhau, lắp ráp PCR sử dụng các đoạn nối chồng lên nhau, và các kỹ thuật tương tự để thao tác di truyền các trình tự globulin miễn dịch đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình; hoặc sự kết hợp thích hợp bất kỳ của bất kỳ trong các kỹ thuật trên đây.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất các polypeptit, cụ thể là liên kết đặc hiệu với APN, chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch mà là trình tự axit amin có cấu trúc (chung) FR1 – CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 trong đó FR1 đến FR4 lần lượt đề cập đến vùng khung 1 đến 4, và trong đó CDR1 đến CDR3 lần lượt đề cập đến vùng quyết định bổ sung 1 đến 3. Trong một phương án theo sáng chế, ISVD này có tỷ lệ đồng nhất axit amin ít nhất là 80%, tốt hơn nếu ít nhất là 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 90%, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 92% với ít nhất một trong số các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6-8 (xem Fig. 8 – CDR được gạch chân), cụ thể là với SEQ ID NO: 6.

Như được sử dụng ở đây "được thể hiện bằng" trong ngữ cảnh của SEQ ID NO bất kỳ là tương đương với "chứa hoặc bao gồm" SEQ ID NO này và tốt hơn nếu tương đương với "bao gồm" SEQ ID NO này. "Họ VHH" hoặc "họ" như được sử dụng trong phần mô tả này đề cập đến nhóm các trình tự VHH mà có độ dài giống nhau (nghĩa là, chúng có cùng số lượng axit amin trong trình tự của chúng) và trình tự axit amin của nhóm này có tỷ lệ đồng nhất trình tự là 80% hoặc cao hơn (ví dụ, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% hoặc cao hơn).

Trong một phương án, trình tự tương đương đề cập đến đột biến thể axit amin mà tốt hơn nếu là đột biến thể axit amin bảo tồn (như được xác định ở đây); và/hoặc trình tự axit amin này tốt hơn nếu chỉ chứa các đột biến thể axit amin, và không có đột biến mất đoạn hoặc gắn xen axit amin, so với (các) trình tự axit amin được xác định ở đây; và/hoặc trình tự axit amin mà có 3, 2 hoặc chỉ 1 "khác biệt axit amin" (như được xác

định ở đây) với một trong (các) trình tự axit amin được xác định ở đây. Cụ thể hơn là, trình tự tương đương có đột biến thể axit amin tốt hơn nếu là đột biến thể axit amin bảo tồn (như được xác định ở đây); và/hoặc trình tự axit amin này tốt hơn nếu chỉ chứa đột biến thể axit amin, và không có đột biến mất đoạn hoặc gắn xen axit amin, so với (các) trình tự axit amin được xác định ở đây.

Thuật ngữ "epitop" và "quyết định kháng nguyên", mà có thể được sử dụng thay thế nhau, đề cập đến một phần của đại phân tử, như polypeptit hoặc protein mà được nhận biết bởi phân tử liên kết kháng nguyên, như các globulin miễn dịch, các kháng thể thông thường, miễn biến đổi đơn của globulin miễn dịch và/hoặc các polypeptit theo sáng chế, và cụ thể hơn là bởi vị trí liên kết kháng nguyên của các phân tử này. Epitop xác định vị trí liên kết tối thiểu cho globulin miễn dịch, và do đó thể hiện đích của tính đặc hiệu của globulin miễn dịch. Trình tự axit amin (như miễn biến đổi đơn của globulin miễn dịch, kháng thể, polypeptit theo sáng chế, hoặc nói chung là polypeptit hoặc protein liên kết kháng nguyên hoặc một đoạn của chúng) 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 đối với ít nhất một phần, đoạn hoặc epitop của nó) được cho là "kháng" hoặc "được định hướng kháng" epitop, kháng nguyên hoặc protein này hoặc là phân tử "liên kết" đối với epitop, kháng nguyên hoặc protein này, hoặc được cho là "kháng"-epitop, "kháng"-kháng nguyên hoặc "kháng"-protein (ví dụ, "kháng"-APN).

Ái lực là cường độ hoặc độ ổn định của tương tác phân tử. Ái lực thường được đưa ra dưới dạng K_D , hoặc hằng số phân ly, mà có đơn vị là mol/lit (hoặc M). Ái lực này cũng có thể được thể hiện bằng hằng số liên kết, K_A , bằng $1/K_D$ và có đơn vị là (mol/lit)⁻¹ (hoặc M⁻¹). K_D đối với các tương tác sinh học mà được xem là có ý nghĩa (ví dụ, đặc hiệu) thường nằm trong khoảng 10⁻¹²M (0,001 nM) đến 10⁻⁵M (10000 nM). Tương tác càng mạnh, K_D càng thấp.

Ái lực của tương tác phân tử giữa hai phân tử có thể được đo bằng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, như kỹ thuật cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) đã được biết rõ (xem, ví dụ Ober et al.[12]) trong đó một phân tử được bất động trên chip cảm biến sinh học và phân tử còn lại được cho qua phân tử đã bất động trong các điều kiện chảy tạo ra các giá trị đo kon, koff và nhờ đó, các giá trị K_D (hoặc K_A). Quy trình này có thể, ví dụ, được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị BIACORE® đã được biết rõ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). Thử nghiệm

loại trừ động học (KINEXA®) [13] đo các sự kiện liên kết trong dung dịch mà không đánh dấu các đối tác liên kết và dựa vào việc loại trừ động học sự phân ly của phức hợp. Phân tích ái lực trong dung dịch cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống thử nghiệm miễn dịch GYROLAB®, cung cấp nền tảng cho phân tích sinh học tự động và quay vòng mẫu nhanh [14].

Thuật ngữ “tính đặc hiệu” đề cập đến số lượng các loại kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên khác nhau mà phân tử liên kết kháng nguyên hoặc phân tử protein liên kết kháng nguyên cụ thể (như ISVD hoặc polypeptit theo sáng chế) có thể liên kết vào. Tính đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên có thể được xác định dựa vào ái lực và/hoặc ái tính. Thông thường, các protein liên kết kháng nguyên (như ISVD và/hoặc các polypeptit theo sáng chế) sẽ liên kết với kháng nguyên của chúng với hằng số phân ly (K_D) từ 10^{-5} đến 10^{-12} mol/lit hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nếu từ 10^{-7} đến 10^{-12} mol/lit hoặc nhỏ hơn. Giá trị K_D bất kỳ lớn hơn 10^{-4} mol/lit (hoặc giá trị K_A bất kỳ thấp hơn 10^4 lit/mol) thường được xem là chỉ ra sự liên kết không đặc hiệu. Tốt hơn nếu, ISVD đơn giá một theo sáng chế sẽ liên kết với kháng nguyên mong muốn với ái lực khoảng hoặc nhỏ hơn $10\mu\text{M}$, cụ thể là khoảng hoặc nhỏ hơn $5\mu\text{M}$, cụ thể hơn là nhỏ hơn $1\mu\text{M}$, như ví dụ, nhỏ hơn 500 nM , cụ thể hơn là nhỏ hơn 200 nM , cụ thể hơn là nhỏ hơn 10 nM , như nhỏ hơn 500 pM , như ví dụ, từ 10 đến 5 pM hoặc nhỏ hơn.

Sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên, như ISVD, với kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên có thể được xác định theo cách thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình, bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm liên kết bão hòa và/hoặc các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) và thử nghiệm cạnh tranh kiểu bánh kẹp, và các biến thể khác nhau của chúng đã được biết trong lĩnh vực; cũng như các kỹ thuật khác được đề cập ở đây và tốt hơn nếu bằng kỹ thuật đo tế bào theo dòng hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt.

Trong một phương án, sự liên kết của các polypeptit với APN lợn (pAPN) được xác định bằng ELISA và với các tế bào biểu hiện pAPN bằng phương pháp đo tế bào theo dòng. Tuy nhiên, vì khả năng liên kết với kháng nguyên bất động có thể không tương đương với khả năng liên kết với màng tế bào, dữ liệu của phương pháp đo tế bào theo dòng là đáng tin cậy nhất. Nó thể hiện khả năng liên kết với protein có độ dài đầy đủ ở dạng tự nhiên của nó được biểu hiện trên màng sinh học. Ngoài ra, tác giả sáng chế

đã quan sát thấy mối tương quan rõ ràng với khả năng liên kết trên mô ruột mà xác nhận thêm dữ liệu của phương pháp đo tế bào theo dòng.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit liên kết đặc hiệu với APN và ngoài ra thể hiện sự hấp thu đặc hiệu bởi các tế bào qua thụ thể APN, cụ thể là bởi các tế bào biểu hiện APN, cụ thể hơn là bởi các tế bào ruột. Như được sử dụng ở đây, “các tế bào ruột”, hoặc tế bào hấp thu ở ruột (còn được gọi là tế bào biểu mô nhung mao hấp thu), là các tế bào biểu mô mà lót bề mặt bên trong của ruột non và ruột già và có khả năng thực bào và vận chuyển xuyên tế bào để vận chuyển các mầm bệnh ở ruột hoặc các đại phân tử qua hàng rào biểu mô.

“Aminopeptidaza N (APN)” (còn được biết là CD13, ANPEP, PEPN, alanyl aminopeptidaza) là glycoprotein màng typ II, thuộc họ của các metalloprotease liên kết màng và được biểu hiện trong nhiều loại mô, mà trong đó có các màng rìa bàn chải của ruột.

Thông tin cấu trúc thích hợp cho APN có thể được tìm thấy, ví dụ, ở số truy cập UniProt hoặc GenBank như được mô tả trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Số truy cập protein	Số truy cập cADN	Sinh vật
P15145.4	NM_214277 (phiên bản: NM_214277.1)	Sus scrofa
P15144.4	NM_001150 (phiên bản: NM_001150.3)	Homo sapiens
P79143.2	NM_001146034 (phiên bản: NM_001146034.1)	Canis lupus familiaris
P79171.3	NM_001009252 (phiên bản: NM_001009252.2)	Felis catus
	GDHK01043038.1	Equus caballus
P79098.4	NM_001075144 (phiên bản: NM_001075144.1)	Bos Taurus

Như được sử dụng ở đây polypeptit “APN” hoặc “CD13” có nghĩa là protein được mã hóa bởi gen APN động vật có vú, bao gồm các biến thể alen cũng như các đoạn hoạt động sinh học của chúng chứa các thay đổi bảo tồn hoặc không bảo tồn cũng như các protein nhân tạo mà gần như đồng nhất, nghĩa là, đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các polypeptit APN đã đề cập trên đây. Trong một phương án cụ thể polypeptit APN đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với APN lợn và lợn con (Sus scrofa; số truy cập

ADX53333.1). Trong một phương án khác, các polypeptit APN như được xác định ở đây, khác biệt thêm ở chỗ chúng được glycosyl hóa.

Tương tự, polynucleotit “APN” hoặc “CD13” có nghĩa là bao gồm các biến thể alen cũng như các đoạn hoạt động sinh học của chúng chứa các thay đổi bảo tồn hoặc không bảo tồn cũng như phân tử axit nucleic bất kỳ mà gần như đồng nhất, nghĩa là đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các polynucleotit mã hóa APN đã đề cập trên đây.

Trong một phương án cụ thể, polynucleotit APN đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với phân tử axit nucleic mã hóa APN lợn con (Số truy cập Genbank HQ824547.1).

Trong một phương án, polypeptit theo sáng chế liên kết đặc hiệu với và được nội bào hóa bởi APN ruột của động vật có vú, cụ thể là APN lợn con, cụ thể hơn là APN ruột lợn con, cụ thể hơn là được biểu hiện trên các tế bào biểu mô hoặc các tế bào ruột có mặt trong ruột non, APN này chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng số truy cập protein ADX53333.1. Dữ liệu duy nhất trong sáng chế chứng minh là sau khi phân phối qua miệng, polypeptit này không chỉ liên kết với APN, mà còn dẫn đến sự nhập bào (vận chuyển vào trong tế bào) bởi các tế bào ruột và vận chuyển tiếp qua tế bào (vận chuyển xuyên qua phần bên trong tế bào) qua hàng rào biểu mô với sự trình diện thích hợp cho hệ miễn dịch niêm mạc.

Các tế bào biểu hiện APN có thể được sử dụng để xác định sự hấp thu hoặc nội bào hóa polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ “biểu hiện” thường đề cập đến quá trình mà nhờ đó các polynucleotit được phiên mã thành mARN và/hoặc quá trình mà nhờ đó mARN được dịch mã tiếp thành các peptit, các polypeptit hoặc protein. Sự biểu hiện APN có thể được tạo thuận lợi hoặc tăng cường bằng các phương pháp bao gồm bước đưa axit nucleic ngoại sinh vào trong tế bào. Tế bào này có thể chứa polynucleotit hoặc vectơ theo cách mà cho phép sự biểu hiện của polypeptit APN đã được mã hóa. Các polynucleotit mã hóa APN như được đề xuất ở đây có thể được đưa vào tế bào chủ như một phần của plasmid vòng, hoặc dưới dạng ADN mạch thẳng chứa vùng mã hóa protein đã phân lập, hoặc trong vectơ virus. Các phương pháp để đưa axit nucleic ngoại sinh vào tế bào chủ đã được biết rõ và được thực hành thông thường trong lĩnh vực bao gồm biến nạp, chuyển nhiễm, xung điện, tiêm vào nhân, hoặc dung hợp với chất mang như

liposom, mixen, tế bào ma, và thể nguyên sinh. Các hệ tế bào chủ theo sáng chế bao gồm hệ tế bào thực vật, tế bào động vật không có xương sống và tế bào động vật có xương sống.

Các tế bào được sử dụng để nghiên cứu sự nội bào hóa là các tế bào sơ cấp được phân lập từ mô biểu mô ruột non, như ví dụ các chế phẩm tế bào ruột; hoặc các tế bào liên tục bao gồm các dòng tế bào tái tổ hợp biểu hiện APN, cụ thể thể là tế bào biểu mô ruột lợn (IPEC-J2, IPEC-I, IPI-2i), tế bào thận chuột hàng con (BHK) (ví dụ, các tế bào BHK21), hoặc “ruột nhỏ” thu được từ ISC trưởng thành (mô hình ruột (enteroid)/mô hình tế bào (organoid)) hoặc từ các tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC)(mô hình tế bào). Các tế bào khác nữa có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào sau đây: tế bào côn trùng, tế bào thận lợn (PK), tế bào vỏ thận lợn (SK-RST), tế bào thận mèo (FK), tế bào bào thai nguyên vẹn của *felis catus* (Fcwf-4), tế bào tinh hoàn lợn (ST), tế bào thận khỉ xanh châu Phi (các tế bào MA-104, MARC-145, VERO, và COS), tế bào buồng trứng chuột hàng Trung Quốc (CHO), tế bào 293 người, và nguyên bào sợi 3T3 murine, tế bào biểu mô caxinom đại tràng người (CaCo2), nguyên bào lympho người (Kasumi-3), nguyên bào tủy người (Kasumi-4), nguyên bào tủy người (Kasumi-6), dòng tế bào bạch cầu ái kiềm người (KU812), nguyên bào lympho B người (SUP-B15), tế bào vỏ thận biểu mô người (WT 9-7, WT 9-12). Các hệ nuôi cấy tế bào chủ côn trùng cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các polypeptit theo sáng chế.

Trong ngữ cảnh này, việc lựa chọn vector biểu hiện thích hợp để biểu hiện các polypeptit theo sáng chế tất nhiên sẽ phụ thuộc vào tế bào chủ cụ thể sẽ được sử dụng, và nằm trong kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ về các vector biểu hiện thích hợp bao gồm pSport và pcDNA3 (Invitrogen), pCMV-Script (Stratagene), và pSVL (Pharmacia Biotech). Các vector biểu hiện để sử dụng trong tế bào chủ động vật có vú có thể bao gồm các trình tự đối chứng phiên mã và dịch mã thu được từ các bộ gen virus. Các trình tự khởi động được sử dụng phổ biến và các trình tự biến đổi mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các trình tự thu được từ cytomegalovirus người (CMV), virus Rous sarcoma (RSV), Adenovirus 2, virus Polyoma, và virus Simian 40 (SV40).

Phương án thay thế là, sự hấp thu hoặc nội bào hóa các polypeptit có thể được xác định bằng cách sử dụng mô ruột lợn trong thử nghiệm vòng nối ruột, như được mô

tả trong các ví dụ này. Dữ liệu này chứng minh sự vận chuyển hữu hiệu của VHH gắn đích APN qua biểu mô ruột non.

Vì các trình tự APN đã được biết là tồn tại trong các tế bào từ nhiều loài khác nhau, gen nội sinh có thể được biến đổi để cho phép, hoặc tăng cường, sự biểu hiện của polypeptit APN. Các tế bào có thể được biến đổi (ví dụ, bằng cách tái tổ hợp tương đồng) để cung cấp sự biểu hiện được tăng cường bằng cách thay thế, toàn bộ hoặc một phần, trình tự khởi động APN xuất hiện tự nhiên bằng tất cả hoặc một phần của trình tự khởi động khác loài, nhờ đó các tế bào này biểu hiện polypeptit APN ở các mức cao hơn. Trình tự khởi động khác loài được gắn xen theo cách sao cho nó được liên kết điều khiển được với các trình tự mã hóa APN nội sinh. Cũng được đề xuất là, ngoài ADN trình tự khởi động khác loài, ADN đánh dấu có thể khuếch đại được (ví dụ, ada, dhfr, và gen cad đa chức năng, mà mã hóa carbamyl phosphat synthaza, aspartat transcarbamylaza, và dihydroorotaza) và/hoặc ADN intron có thể được gắn xen cùng với ADN trình tự khởi động khác loài. Nếu được liên kết với trình tự mã hóa APN, sự khuếch đại của ADN đánh dấu bằng các phương pháp chọn lọc chuẩn dẫn đến sự khuếch đại đồng thời các trình tự mã hóa APN trong các tế bào này.

Theo cách khác, sự biểu hiện APN cũng có thể được cảm ứng bằng cách xử lý với các hợp chất đã biết là gây ra sự biểu hiện của APN trong tế bào, như ví dụ xử lý với yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản (bFGF) [15], hoặc với bestatin [16].

Trong một phương án, ISVD hoặc polypeptit theo sáng chế, được cho là "phản ứng chéo" với hai kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên khác nhau (như ví dụ, APN từ các loài động vật có vú khác nhau, như ví dụ, APN người, APN lợn con, APN chó, APN mèo, APN ngựa, APN bò, APN chuột cống, APN chuột nhắt, và/hoặc APN khỉ rhesus) nếu nó đặc hiệu với (như được xác định ở đây) các kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên khác nhau này. Sẽ biết rõ là ISVD hoặc polypeptit có thể được xem là phản ứng chéo mặc dù ái lực liên kết đối với hai kháng nguyên khác nhau này có thể khác nhau, như theo hệ số, 2, 5, 10, 50, 100 hoặc thậm chí cao hơn, miễn là nó đặc hiệu với (như được xác định ở đây) các kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên khác nhau này.

Trong một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit trong đó polypeptit này cạnh tranh với polypeptit như được mô tả ở đây, như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6, 7 hoặc 8, ví dụ như được xác định bởi thử nghiệm liên kết cạnh tranh như phương

pháp đo tế bào theo dòng, cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc ELISA cạnh tranh, cụ thể là bởi ELISA cạnh tranh.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp xác định các chất cạnh tranh, như, ví dụ, các polypeptit hoặc các phân tử nhỏ, cạnh tranh với polypeptit như được mô tả ở đây, như được thể hiện bởi bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 6, 7 hoặc 8, trong đó polypeptit như được mô tả ở đây cạnh tranh với hoặc phong bế chéo chất cạnh tranh này, như polypeptit, để liên kết với APN, như, ví dụ APN lợn, trong đó khả năng liên kết với APN của chất cạnh tranh bị giảm ít nhất là 5%, như 10%, 20%, 30%, 40%, 50% hoặc thậm chí nhiều hơn, như 80%, 90% hoặc thậm chí 100% (nghĩa là, gần như không thể phát hiện được trong thử nghiệm được đưa ra) khi có mặt polypeptit theo sáng chế, so với khả năng liên kết với APN của chất cạnh tranh này khi không có mặt polypeptit theo sáng chế. Cụ thể là, sự giảm ít nhất là 80%, và tốt hơn nếu ít nhất là 90%, như được đo bằng bất kỳ một trong số các thử nghiệm được đề xuất ở đây, chỉ ra sự liên kết cạnh tranh. Sự cạnh tranh và phong bế chéo có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, như, ví dụ, thử nghiệm liên kết cạnh tranh như phương pháp đo tế bào theo dòng, cộng hưởng plasmon bề mặt, phép đo giao thoa lớp sinh học hoặc ELISA cạnh tranh. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit theo sáng chế, trong đó polypeptit này phong bế chéo sự liên kết với APN của ít nhất một trong các polypeptit được thể hiện bởi SEQ ID No: 6, 7 hoặc 8.

Các điều kiện thử nghiệm được áp dụng như thường được biết bởi người có hiểu biết trung bình và/hoặc như được cung cấp ở đây.

Thuật ngữ “phong bế (chéo)”, “liên kết cạnh tranh” và “cạnh tranh” được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây để chỉ khả năng của globulin miễn dịch, kháng thể, ISVD, polypeptit hoặc chất liên kết khác trong việc cản trở sự liên kết của các globulin miễn dịch, kháng thể, ISVD, các polypeptit hoặc chất liên kết khác với đích đã cho. Phương pháp xác định globulin miễn dịch, kháng thể, miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch, polypeptit hoặc chất liên kết khác mà được định hướng kháng đích có phong bế (chéo), liên kết cạnh tranh hoặc là cạnh tranh như được xác định ở đây hay không được mô tả ví dụ, trong Xiao-Chi Jia et al. [17] hoặc Miller et al. [18] (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Sáng chế đã xác định được họ các VHH có khả năng liên kết với APN, gây ra sự vận chuyển qua biểu mô ruột và gây ra đáp ứng miễn dịch. Họ của các kháng thể miền

đơn này được đặc trưng bởi các vùng quyết định bổ sung sau đây (lần lượt là CDR1 đến CDR3), được đưa ra trong Bảng 2.

Các VHH có tỷ lệ đồng nhất trình tự cao như vậy, đặc biệt là trong CDR3 (tỷ lệ đồng nhất 80% hoặc cao hơn), nhận biết cùng một epitop và được mong đợi là có cùng các đặc điểm chức năng.

Bảng 2.

Dòng	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
AA						
2L65	GRTISNHAMG	1	AISWTGLTTN	3	RQSGYVSKFVDDYGY	4
3L2	GRTISNHAMG	1	AISWTGLTTN	3	RQSGYVSKFVDDYGY	4
3L73	GRTFSSNAMG	2	AISWTGLTTN	3	RQSGYASKFLDEYGY	5

Trong một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) liên kết với aminopeptidaza N của ruột, trong đó ISVD này chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

- (i) CDR1 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 70% với nó;
- (ii) CDR2 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3, hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80% với nó;
- (iii) CDR3 bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80% với nó.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD) liên kết với aminopeptidaza N của ruột, trong đó ISVD này chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

- (i) CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, và các trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 1;
- (ii) CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, và các trình tự axit amin có 1, 2, hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 3; và
- (iii) CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, và các trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 4.

Trong một phương án, các axit amin biến đổi nằm ở (các) vị trí 4, 6 và/hoặc 7 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1; và/hoặc ở (các) vị trí 6, 10 và/hoặc 12 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến ISVD như được mô tả ở đây, trong đó ISVD này liên kết đặc hiệu với APN và chủ yếu chứa 4 vùng khung (lần lượt từ FR1 đến FR4) và 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

(i) CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm:

- SEQ ID NO: 1; và

- trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 1, trong đó ở vị trí 4 I được thay thế bằng F, và/hoặc trong đó ở vị trí 6 N được thay thế bằng S, và/hoặc trong đó ở vị trí 7 H được thay thế bằng N;

(ii) CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 3; và

(iii) CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm:

- SEQ ID NO: 4; và

- trình tự axit amin có 1, 2 hoặc 3 khác biệt axit amin với SEQ ID NO: 4, trong đó ở vị trí 6 V được thay thế bằng A, và/hoặc trong đó ở vị trí 10 V được thay thế bằng L, và/hoặc trong đó ở vị trí 12 D được thay thế bằng E.

Cụ thể, sáng chế đề xuất polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), trong đó ISVD này chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

(i) CDR1 bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(ii) CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 3; và

(iii) CDR3 bao gồm SEQ ID NO: 4 hoặc 5.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất polypeptit chứa miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), trong đó ISVD này chứa kết hợp CDR1, CDR2 và CDR3 được chọn từ:

- CDR1 là SEQ ID NO: 1, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 4; hoặc

- CDR1 là SEQ ID NO: 2, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 5.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), polypeptit này bao gồm hoặc chứa trình tự của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80% với chúng, cụ thể là tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 85%, cụ thể hơn là, tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 90%, còn cụ thể hơn là, tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 92%. Trong một phương án cụ thể, sự biến đổi trình tự trong CDR được giới hạn vào (các) vị trí 4, 6 và/hoặc 7 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1; và/hoặc ở (các) vị trí 6, 10

và/hoặc 12 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Trong một phương án khác, không có sự biến đổi trình tự trong CDR như được đặc trưng lần lượt bởi các SEQ ID NO: 1-5, và chỉ trình tự của FR có thể khác. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất polypeptit chứa SEQ ID NO: 6, hoặc polypeptit có tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, cụ thể hơn ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, với SEQ ID NO: 6 và trong đó CDR1 chứa SEQ ID NO: 1 hoặc 2; CDR2 chứa SEQ ID NO: 3; và/hoặc CDR3 chứa SEQ ID NO: 4 hoặc 5.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), polypeptit này được mã hóa bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 70% với chúng, cụ thể là, tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80%, cụ thể hơn là, tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 85%. Trong một phương án cụ thể, biến đổi trình tự trong CDR được giới hạn ở (các) vị trí 4, 6 và/hoặc 7 của trình tự axit amin được mã hóa được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1; và/hoặc ở (các) vị trí 6, 10 và/hoặc 12 của trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Trong một phương án khác, không có sự biến đổi trình tự trong CDR mã hóa các axit amin như được đặc trưng lần lượt bởi các SEQ ID NO: 1-5, và chỉ trình tự axit nucleic của FR có thể khác. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất polypeptit chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), polypeptit này bao gồm hoặc chứa trình tự của SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8.

Sẽ được biết rõ là, không có giới hạn, các miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng làm "khối xây dựng" để tạo ra polypeptit, mà có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch khác nữa mà có thể đóng vai trò là khối xây dựng (nghĩa là, kháng lại cùng một epitop hoặc epitop khác trên APN và/hoặc kháng lại một hoặc nhiều kháng nguyên, protein hoặc đích khác APN). Do đó, polypeptit theo sáng chế chứa ít nhất một ISVD liên kết với APN, cụ thể là liên kết với APN cũng như được nội bào hóa bởi tế bào biểu hiện APN.

Nói chung, các polypeptit hoặc các cấu trúc chứa hoặc chứa chủ yếu một khối xây dựng duy nhất, ví dụ, một ISVD duy nhất, sẽ được gọi ở đây là các polypeptit "đơn giá" và "các cấu trúc đơn giá", tương ứng. Các polypeptit hoặc các cấu trúc mà chứa hai hoặc nhiều khối xây dựng (như, ví dụ, các ISVD) cũng sẽ được gọi ở đây là các polypeptit hoặc các cấu trúc "đa giá", và các khối xây dựng/ISVD có mặt trong các

polypeptit hoặc các cấu trúc này cũng sẽ được gọi ở đây là ở "dạng đa hóa trị". Ví dụ, polypeptit "hai giá" có thể chứa hai ISVD, tùy ý được liên kết qua trình tự cầu nối, trong khi đó polypeptit "ba giá" có thể chứa ba ISVD, tùy ý được liên kết qua hai trình tự cầu nối; v.v..

Theo đó, các ISVD theo sáng chế mà liên kết với APN và được đề xuất ở đây có thể ở dạng gần như là được phân lập, hoặc chúng có thể tạo ra một phần của cấu trúc hoặc polypeptit, mà có thể chứa hoặc chủ yếu chứa một hoặc nhiều hơn một ISVD theo sáng chế và có thể tùy ý chứa thêm một hoặc nhiều trình tự axit amin khác nữa (tất cả đều được liên kết tùy ý qua một hoặc nhiều trình tự cầu nối thích hợp), mã hóa ví dụ, protein hoặc polypeptit, cụ thể là protein hoặc polypeptit kháng nguyên.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất "phân tử khảm" (tùy ý còn được gọi là cấu trúc) chứa ít nhất một polypeptit như được xác định ở đây, cụ thể là ít nhất một ISVD như được đề xuất ở đây, được tạo cặp, liên kết hoặc liên hợp (trực tiếp hoặc gián tiếp) với ít nhất một hợp chất có hoạt tính sinh học hoặc chức năng, như hóa học (ví dụ, các phân tử nhỏ) hoặc sinh học, cụ thể là thuốc/dược chất, hợp chất hoạt động sinh học, kháng nguyên, độc tố, và/hoặc chất chẩn đoán (ví dụ, nhãn, chất đánh dấu hoặc chất chụp ảnh). Trong phương án này, polypeptit hoặc ISVD sẽ có tác dụng làm chất mang để phân phối hợp chất này qua hàng rào ruột. Thuốc hoặc dược chất sẽ hoạt động ở lớp dưới niêm mạc ruột hoặc trong mô bạch huyết liên kết niêm mạc ruột và/hoặc kháng nguyên sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch trong lớp dưới niêm mạc ruột hoặc trong mô bạch huyết liên kết niêm mạc ruột. Dược chất này có thể là chất chống viêm, chất chống ung thư, chất gây độc tế bào, chất chống nhiễm trùng (ví dụ, chống nấm, kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, chống virus, độc tố, thuốc gây độc tế bào, nuclit phóng xạ, v.v.). Các kháng nguyên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các protein, peptit, lipid, các axit nucleic, glycolipit và các glycoprotein, carbohydrat, oligosacarit, và polysacarit. Các hệ phân phối thuốc khác hoặc các chất mang (dược nạp dược chất) khác ví dụ, dựa trên các hạt nano (NP) cũng có thể được liên hợp với polypeptit theo sáng chế, bao gồm các hạt vô cơ, hạt từ và hạt polyme hoặc NP.

Thuật ngữ "được liên hợp với", như được sử dụng ở đây, đề cập đến, cụ thể là, sự liên hợp hóa học và/hoặc enzym gây ra liên kết đồng hóa trị bền vững. Việc tạo cặp để thu được phân tử khảm có thể xảy ra nhờ axit amin đặc hiệu (ví dụ, lysin, xystein) có mặt trong ISVD. Như đã đề cập, gốc bất kỳ có thể được tạo cặp, như các chất (ví dụ,

protein, trình tự nucleotit, lipit, carbohydrat, peptit, các gốc thuốc (ví dụ, thuốc gây độc tế bào, các thể liên hợp thuốc kháng thể hoặc được chất được mang), chất đánh dấu và chất phát hiện) có hoạt tính sinh học cụ thể hoặc hoạt tính chức năng đặc hiệu. Trong một phương án, trong đó gốc tạo cặp là protein điều trị hoặc chẩn đoán được mã hóa di truyền hoặc trình tự nucleotit, gốc tạo cặp này có thể được tổng hợp hoặc được biểu hiện bằng phương pháp tổng hợp peptit hoặc phương pháp ADN tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Theo khía cạnh khác, trong đó gốc liên hợp là peptit không được mã hóa di truyền, ví dụ, gốc thuốc, gốc liên hợp này có thể được tổng hợp nhân tạo hoặc được tinh chế từ nguồn tự nhiên.

Trong một phương án khác, polypeptit hoặc phân tử khả năng như được đề xuất ở đây có thể chứa thêm một hoặc nhiều nhóm, gốc còn lại, gốc, hoặc đơn vị liên kết khác. Một hoặc nhiều nhóm, gốc còn lại (residue), gốc (moiety), hoặc đơn vị liên kết khác, tốt hơn, nếu được chọn từ nhóm bao gồm phân tử polyetylen glycol, protein huyết thanh hoặc các đoạn của chúng, các đơn vị liên kết mà có thể liên kết với các protein huyết thanh, phần Fc hoặc các protein nhỏ hoặc peptit mà có thể liên kết với protein huyết thanh, các gốc axit amin khác, đuôi hoặc các gốc chức năng khác, ví dụ, độc tố, nhãn, chất hóa phóng xạ, v.v.. Các nhóm, gốc còn lại, gốc hoặc các đơn vị liên kết khác có thể, ví dụ, là nhóm, gốc còn lại, gốc hóa học mà chính chúng có thể có hoặc có thể không có tác dụng sinh học và/hoặc dược lý. Ví dụ, và không giới hạn, các nhóm này có thể được liên kết với một hoặc nhiều ISVD hoặc các polypeptit theo sáng chế để tạo ra “dẫn xuất” của polypeptit hoặc cấu trúc theo sáng chế.

Nói chung, nhiều câu nối khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để liên kết ISVD và hợp chất, chất hoặc gốc (hoạt động sinh học) theo sáng chế. Rõ ràng là, các câu nối cắt được và không cắt được có thể được sử dụng để đạt được đặc tính giải phóng mong muốn. Nói chung, sự kết hợp tối ưu của câu nối và hóa học liên hợp phải được điều chỉnh đơn nhất để tương quan với mỗi mặt đơn nhất: ISVD, gốc được liên hợp, và đặc điểm của bệnh cần được điều trị. Các đoạn đệm hoặc câu nối thích hợp khác sẽ là rõ ràng với người có hiểu biết trung bình, và có thể thường là câu nối hoặc đoạn đệm bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này. Theo nhiều khía cạnh cụ thể, các câu nối hoặc đoạn đệm là thích hợp để sử dụng trong các ứng dụng mà được dự định để sử dụng làm dược phẩm. Ví dụ, câu nối giữa lysin và thể liên hợp cũng có thể, trong một số khía cạnh, là trình tự axit amin thích hợp, và cụ thể là, các trình tự axit amin từ

1 đến 50, hoặc cụ thể hơn, từ 1 đến 30 gốc axit amin. Một số ví dụ về các trình tự axit amin này bao gồm các cầu nối Gly-Ser (GS). Các cầu nối thích hợp khác thường bao gồm các hợp chất hoặc polyme hữu cơ, cụ thể là các cầu nối thích hợp để sử dụng trong các polypeptit để sử dụng làm dược phẩm. Ví dụ, các gốc poly(etylenglycol) đã được sử dụng để liên kết các miền kháng thể. Được dự định trong phạm vi sáng chế là độ dài, mức độ linh hoạt và/hoặc các đặc điểm khác của cầu nối này có thể có một số ảnh hưởng đối với các đặc điểm của thể liên hợp ISVD cuối cùng theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở ái lực, tính đặc hiệu hoặc ái tính đối với đích cụ thể. Dựa vào phần mô tả ở đây, người có hiểu biết trung bình sẽ có thể quyết định cầu nối tối ưu sẽ sử dụng trong ISVD cụ thể theo sáng chế, tùy ý sau một số thử nghiệm thông thường giới hạn.

Kích thước nhỏ và sự thải trừ qua thận nhanh của VHH đôi khi là các đặc điểm không mong muốn để tạo ra tác dụng bảo vệ kéo dài ở một số bệnh. Một số phương pháp đảm bảo kéo dài thời gian bán thải và là các phương án được xem xét theo sáng chế. Do đó, hiệu quả của các VHH hiện nay có thể được cải thiện bằng cách tinh chỉnh thời gian lưu. Các VHH được đề xuất ở đây có thể được biến đổi hóa học để làm tăng khối lượng phân tử của chúng. Biến đổi hóa học này, ví dụ với nhóm polyetylen glycol (PEG), cũng có thể bảo vệ VHH kháng lại proteaza. Chiến lược khác để kéo dài thời gian bán thải của VHH là bằng cách tạo cặp các VHH với protein huyết thanh có tuổi thọ dài hoặc với các khối xây dựng mà gắn đích các protein có tuổi thọ dài này. Ngoài ra, đã quan sát thấy là các protein nhỏ tích điện âm duy trì trong hệ tuần hoàn lâu hơn so với các protein trung tính. Có một số cách để bổ sung các điện tích âm vào các protein bao gồm bổ sung các polyme axit sialic (polysial hóa) hoặc tinh bột hydroxyethyl (HESyl hóa) và bằng cách dung hợp với gốc dư axit amin peptit đầu cùng carboxy beta (CTP) được sial hóa cao được tìm thấy trong hormon chorionic gonadotropin người (hCG). Cuối cùng, 'các cấu trúc dung hợp dựa trên miền Fc' cũng được sử dụng rộng rãi để kéo dài thời gian bán thải của các protein điều trị, bao gồm các VHH. Do đó, chiến lược khác là dung hợp VHH theo sáng chế với vùng Fc hoặc các gốc Fc khác của phân tử IgG. Tuy nhiên, các miền Fc khác cũng đủ điều kiện, như miền Fc của IgA mà ổn định hơn trong môi trường ruột non.

Ví dụ, để tăng cường ái lực và ái tính và đồng thời cho phép tinh chế dễ dàng, các miền VHH theo sáng chế được dung hợp với miền Fc của IgG chuột, cụ thể hơn là IgG2a chuột nhất, còn được gọi ở đây là thể dung hợp VHH-MG. Các VHH theo sáng

chế được dung hợp với miền Fc của IgG lợn con hoặc IgA lợn con cũng là một phần của sáng chế và được gọi ở đây lần lượt là thể dung hợp VHH-PG hoặc VHH-PA. Các miền Fc thích hợp hoặc các phần của chúng, ví dụ, được cung cấp trong Fig. 10.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất phân tử khảm chứa ít nhất một polypeptit, cụ thể là ISVD, như được đề xuất ở đây, và vùng Fc hoặc gốc liên kết Fc, cụ thể là miền IgG hoặc IgA Fc, như ví dụ, miền Fc bao gồm hoặc chứa một trong số SEQ ID NO: 18-21. Trong một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất polypeptit chứa ISVD chứa SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8; được dung hợp với miền Fc bao gồm hoặc chứa SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, hoặc SEQ ID NO: 21, hoặc một phần của chúng hoặc trình tự có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 90% với chúng.

Polypeptit theo sáng chế, cụ thể là miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch như được mô tả ở đây, theo nghĩa rộng nhất của chúng không bị giới hạn vào nguồn sinh học cụ thể hoặc vào phương pháp điều chế cụ thể. Chúng thường có thể thu được: (1) bằng cách phân lập miền VHH của kháng thể chuỗi nặng xuất hiện tự nhiên; (2) bằng cách biểu hiện trình tự nucleotit mã hóa miền VHH xuất hiện tự nhiên; (3) bằng cách "làm tương thích với người" miền VHH xuất hiện tự nhiên hoặc bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa miền VHH được làm tương thích với người này; (4) bằng cách "gây đột biến" miền VHH xuất hiện tự nhiên để làm giảm sự liên kết với các kháng thể đã tồn tại trước đó, hoặc bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa miền VHH bị đột biến này; (5) bằng cách "làm tương thích với camelid" miền VH xuất hiện tự nhiên từ loài động vật bất kỳ, và cụ thể là từ loài động vật có vú, như từ loài người, hoặc bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa miền VH được làm tương thích với camelid; (6) bằng cách "làm tương thích với camelid" "kháng thể miền" hoặc "Dab" như được mô tả trong lĩnh vực này, hoặc bằng cách biểu hiện axit nucleic mã hóa miền VH được làm tương thích với camelid này; (7) bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp hoặc bán tổng hợp để tạo ra các protein, các polypeptit hoặc các trình tự axit amin đã biết khác; (8) bằng cách tạo ra axit nucleic mã hóa Nanobody® sử dụng các kỹ thuật để tổng hợp axit nucleic đã biết, sau đó biểu hiện axit nucleic thu được như vậy; và/hoặc (9) bằng cách kết hợp bất kỳ một hoặc nhiều phương pháp trên đây. ISVD "được làm tương thích với camelid" bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự axit amin của miền V xuất hiện tự nhiên từ kháng thể 4 chuỗi thông thường bằng một hoặc nhiều gốc axit amin mà

xuất hiện ở (các) vị trí tương ứng trong miền VHF của kháng thể chuỗi nặng. Quá trình này có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình. Các đột biến thể "làm tương thích với camelid" này tốt hơn nếu được gắn xen vào các vị trí axit amin mà tạo ra và/hoặc có mặt ở mặt phân cách VH-VL, và/hoặc ở các gốc được gọi là các gốc xác nhận của Camelidae, đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và đã được định nghĩa, ví dụ, trong WO 94/04678 và Davies và Riechmann [19].

Ngoài ra và như được biết đối với người có hiểu biết trung bình, các nền tảng sản xuất khác nhau như tế bào động vật có vú, nấm men, thực vật, v.v. có thể được sử dụng để sản xuất các glycoprotein được lắp ráp phức tạp như các kháng thể. Việc sản xuất dựa trên tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột hàng Trung Quốc (CHO) là dễ dàng để sản xuất các kháng thể. Các thực vật chuyển gen và hệ biểu hiện nấm men cũng thể hiện tiềm năng lớn. Nấm men, như *Komagataella phaffii* [20], đã được đặt tên trước đó và được biết đến nhiều hơn với danh pháp cũ là *Pichia pastoris*, có ưu điểm rõ ràng so với các hệ biểu hiện thực vật về thời gian tạo ra ngắn, tiết kiệm chi phí, dễ dàng thao tác di truyền và có khả năng mở rộng quy mô. Ngoài ra, *P. pastoris* tiết ra các lượng protein nội sinh rất thấp, do đó các protein tái tổ hợp được tiết ra được làm giàu cao, tạo thuận lợi cho việc xử lý tiếp theo. Ngược lại, đặc điểm glycosyl hóa của các protein tái tổ hợp trong thực vật là giống với của tế bào động vật hơn so với nền tảng biểu hiện nấm men.

Trong một phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất polypeptit, cụ thể là ISVD, còn cụ thể hơn là phân tử khảm, như được đề xuất ở đây bằng cách sử dụng nấm men, cụ thể là *Pichia pastoris*.

Các polypeptit hoặc phân tử khảm đa hóa trị theo sáng chế thường có thể được tạo ra bằng phương pháp bao gồm ít nhất là bước liên kết thích hợp ISVD và/hoặc polypeptit đơn giá theo sáng chế với một hoặc nhiều ISVD khác, hoặc các hợp chất khác như được mô tả ở đây, tùy ý qua một hoặc nhiều cầu nối thích hợp, để tạo ra polypeptit hoặc phân tử khảm theo sáng chế. Các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp mà thường bao gồm ít nhất là các bước tạo ra axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế, biểu hiện axit nucleic này theo cách thích hợp, và thu hồi polypeptit đã biểu hiện theo sáng chế. Các phương pháp này có thể được thực hiện theo

cách đã biết, mà sẽ là rõ ràng với người có hiểu biết trung bình, ví dụ trên cơ sở các phương pháp và kỹ thuật được mô tả thêm ở đây.

Trong một phương án khác, sáng chế đề cập đến vector chứa trình tự nucleotit như được đề xuất ở đây. Thuật ngữ "vector", như được sử dụng ở đây, bao gồm vector bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình, bao gồm các vector plasmit, các vector cosmit, các vector thể thực khuẩn, như thể thực khuẩn lambda, các vector virus, như các vector adenovirus, AAV hoặc baculovirus, hoặc các vector nhiễm sắc thể nhân tạo như nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo P1 (PAC). Các vector này bao gồm các vector biểu hiện cũng như tách dòng. Các vector biểu hiện bao gồm các plasmit cũng như các vector virus và thường chứa trình tự mã hóa mong muốn và các trình tự ADN thích hợp cần thiết cho sự biểu hiện của trình tự mã hóa được liên kết điều khiển được trong một sinh vật chủ cụ thể (ví dụ, vi khuẩn, nấm men, thực vật, côn trùng, hoặc động vật có vú) hoặc trong hệ biểu hiện in vitro. Thông thường, "vector biểu hiện" chứa trình tự nucleotit trong đó trình tự khởi động có thể biểu hiện hoặc trình tự nucleotit điều hòa được liên kết điều khiển được với hoặc được kết hợp với trình tự nucleotit hoặc vùng ADN mà mã hóa mRNA, sao cho trình tự nucleotit điều hòa có thể điều hòa sự phiên mã hoặc biểu hiện của trình tự nucleotit được kết hợp. Thông thường, trình tự nucleotit điều hòa hoặc trình tự khởi động của vector này không được liên kết điều khiển được với trình tự nucleotit kết hợp như được tìm thấy trong tự nhiên, do đó là khác loại với trình tự mã hóa của vùng ADN được liên kết điều khiển được với nó.

Một phương án khác đề cập đến tế bào chủ hoặc vật chủ biểu hiện chứa polypeptit, hoặc phân tử khảm, hoặc trình tự axit nucleic được đề xuất bởi sáng chế. Thuật ngữ "tế bào chủ", "vật chủ biểu hiện", hoặc "vật chủ" đề cập đến hệ tế bào được sử dụng để biểu hiện protein hoặc axit nucleic cần quan tâm, theo cách tái tổ hợp (được tạo ra bằng cách tái tổ hợp di truyền). Tế bào chủ có thể đề cập đến "tế bào nhân chuẩn cao hơn" (ví dụ, dòng tế bào CHO), thường là một phần của môi trường nuôi cấy tế bào (ví dụ, dòng tế bào, như dòng tế bào HEK hoặc CHO), mặc dù điều này không phải luôn luôn bị bắt buộc (ví dụ, trong trường hợp tế bào thực vật, chính thực vật này có thể được sử dụng để tạo ra protein tái tổ hợp). Tế bào chủ cũng có thể đề cập đến "tế bào nhân chuẩn thấp hơn" như được sử dụng ở đây, trong đó có nghĩa là tế bào nấm sợi hoặc tế bào nấm men. Tế bào nấm men có thể là từ loài *Saccharomyces* (ví dụ, *Saccharomyces*

cerevisiae), *Hansenula* (ví dụ, *Hansenula polymorpha*), *Arxula* (ví dụ, *Arxula adenivorans*), *Yarrowia* (ví dụ, *Yarrowia lipolytica*), *Kluyveromyces* (ví dụ, *Kluyveromyces lactis*), hoặc *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), và cũng có thể được sử dụng thêm ở đây. Theo một phương án cụ thể, các tế bào nhân chuẩn thấp hơn là các tế bào *Pichia*, và trong phương án cụ thể nhất, là các tế bào *Pichia pastoris*. Tế bào chủ liên quan đến "tế bào tiên nhân" thường đề cập đến các sinh vật tiên nhân không phải mầm bệnh như các tế bào vi khuẩn như, ví dụ, loài *E. coli*, *Lactococcus* và *Bacillus*.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất ISVD, polypeptit, phân tử khảm, axit nucleic, vectơ, tế bào chủ hoặc chế phẩm được đề xuất ở đây để sử dụng làm thuốc, cụ thể hơn là để sử dụng trong việc phòng ngừa, điều trị và/hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh đường ruột, còn cụ thể hơn là để sử dụng trong việc chủng ngừa qua đường miệng chống lại các bệnh đường ruột. 'Bệnh đường ruột' như được sử dụng ở đây đề cập đến các nhiễm trùng ở ruột hoặc ruột non và bệnh viêm ruột hoặc ruột non, cụ thể hơn nữa là ruột non (ví dụ, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng). Bệnh viêm này có thể, ví dụ, bị gây ra bởi bệnh tự miễn. Các nhiễm trùng với mầm bệnh đường ruột bao gồm nhiễm trùng với các loài được chọn từ nhóm các chi bao gồm: *Escherichia coli* gây bệnh (ETEC, EHEC, EPEC, STEC,...), *Vibrio*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Lawsonia*, *Rotavirus*, *Shigella*, *PEDV*, *Cryptosporidium*, và *Isospora*. Cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh đường ruột bằng cách sử dụng polypeptit, phân tử khảm hoặc chế phẩm theo sáng chế cho đối tượng. Trong một phương án, việc sử dụng là theo đường miệng. IVSD như được đề xuất ở đây có thể hoạt động như là chất mang, gắn đích hợp chất, cụ thể là hợp chất hoạt động sinh học, cụ thể hơn là kháng nguyên, qua niêm mạc (dạ dày) ruột. Theo một khía cạnh, sáng chế tập trung vào polypeptit hoặc ISVD như là chất mang để phân phối vacxin gắn đích vào biểu mô ruột để gây ra các đáp ứng miễn dịch niêm mạc mạnh, ví dụ, kháng lại các mầm bệnh ở ruột. Như được sử dụng ở đây, "đáp ứng miễn dịch niêm mạc" đề cập đến đáp ứng miễn dịch (đáp ứng dịch thể và đáp ứng tế bào) mà xảy ra ở màng niêm mạc của ruột, đường niệu sinh dục và/hoặc hệ hô hấp, nghĩa là các bề mặt tiếp xúc với môi trường bên ngoài. Trong ngữ cảnh của sáng chế, đáp ứng miễn dịch niêm mạc là đáp ứng miễn dịch niêm mạc ruột xảy ra ở màng niêm mạc của ruột non, cụ thể là sự sản xuất globulin miễn dịch A (IgA). Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh đường ruột và/hoặc để gây ra đáp ứng miễn dịch kháng

lại mầm bệnh ở ruột ở đối tượng bằng cách sử dụng bằng đường miệng ISVD, polypeptit, phân tử khảm hoặc chế phẩm như được đề xuất ở đây cho đối tượng.

Trong một phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng ISVD, polypeptit và/hoặc phân tử khảm theo sáng chế để sản xuất dược phẩm. Do đó còn được đề xuất là dược phẩm và việc sử dụng nó trong một hoặc nhiều phương pháp điều trị được đề cập ở đây. Thông thường, dược phẩm này chứa ISVD, polypeptit và/hoặc cấu trúc như được mô tả ở đây và chất mang và/hoặc tá dược được dụng, tùy ý kết hợp với chất bổ trợ.

"Chất mang", hoặc "chất bổ trợ", cụ thể là "chất mang được dụng" hoặc "chất bổ trợ được dụng" là tá dược, chất pha loãng, chất mang và/hoặc chất bổ trợ thích hợp bất kỳ mà, bản thân chúng, không gây ra sự sản sinh kháng thể gây hại cho đối tượng nhận được chế phẩm cũng như chúng không gây ra tác dụng bảo vệ. Thuật ngữ "được dụng" có nghĩa là nguyên liệu không phải là không mong muốn về mặt sinh học hoặc theo cách khác, nghĩa là, nguyên liệu này có thể được sử dụng cho đối tượng cùng với hợp chất mà không gây ra tác dụng sinh học không mong muốn bất kỳ hoặc không tương tác theo cách gây hại với bất kỳ trong số các thành phần còn lại của các dược phẩm mà nó nằm trong đó. Chất mang được dụng tốt hơn nếu là chất mang tương đối không độc và an toàn với bệnh nhân ở các nồng độ phù hợp với hoạt tính hữu hiệu của thành phần hoạt chất do đó các tác dụng phụ bất kỳ có thể do chất mang không gây ảnh hưởng bất lợi đến tác dụng có lợi của thành phần hoạt chất. Tốt hơn nếu, chất mang hoặc chất bổ trợ được dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi kháng nguyên. Các chất mang hoặc chất bổ trợ thích hợp thường bao gồm một hoặc nhiều hợp chất được bao gồm trong danh sách không giới hạn sau đây: các đại phân tử lớn được chuyển hóa chậm như protein, polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin dạng polyme, copolyme axit amin và các hạt virus không hoạt động. Thuật ngữ "tá dược", như được sử dụng ở đây, được dự định bao gồm tất cả các chất mà có thể có mặt trong dược phẩm và không phải là thành phần hoạt chất, như muối, tá dược dính, (ví dụ, lactoza, dextroza, sucroza, trehaloza, sorbitol, mannitol), tá dược trơn, chất làm đặc, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất nhũ hóa, chất đệm, chất ổn định, chất tạo mùi thơm hoặc chất màu. "Chất pha loãng", cụ thể là "tá dược lỏng được dụng" bao gồm các tá dược lỏng như nước, nước muối, dung dịch nước muối sinh lý, glyxerol, etanol, v.v.. Các chất phụ gia khác như chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH, các chất bảo quản có thể được bao gồm trong các tá dược lỏng này.

Các polypeptit và các phân tử khảm theo sáng chế và tùy ý chất mang và/hoặc tá dược được dụng có thể được sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ như bất kỳ trong số các đường đã biết thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Đối với liệu pháp điều trị, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân bất kỳ theo các kỹ thuật chuẩn. Việc sử dụng có thể là bằng cách thích hợp bất kỳ, bao gồm, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, tại chỗ, trong mũi, trong mắt, nội mạc tử, trong tĩnh mạch, dưới lưỡi, trong trực tràng, trong âm đạo, và tương tự, và tốt hơn nếu qua đường miệng. Các kỹ thuật bào chế khác nữa như công nghệ nano và khí dung và xông hít cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Liều và tần số sử dụng sẽ phụ thuộc vào tuổi, giới tính và tình trạng của bệnh nhân, việc sử dụng đồng thời các thuốc khác, các chống chỉ định và các thông số khác cần được xem xét bởi nhà lâm sàng. Liều và nồng độ của chất mang, tá dược và chất ổn định nên là an toàn cho đối tượng (người, lợn con, chuột nhắt và các động vật có vú khác), bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat, và axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa như vitamin C, polypeptit nhỏ, protein như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như PVP, axit amin như amino axetat, glutamat, asparagin, arginin, lysin; glycoza, disacarit, và carbohydrat khác như glucoza, mannoza hoặc dextrin, chất chelat như EDTA, rượu đường như mannitol, sorbitol; đối ion như Na^+ , và/hoặc chất hoạt động bề mặt như TWEEN®, PLURONICS® hoặc PEG và tương tự.

Khía cạnh khác nữa theo sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit liên kết APN theo sáng chế bao gồm các bước

- biểu hiện polypeptit hoặc phân tử khảm như được đề xuất ở đây, trong hệ biểu hiện hoặc tế bào chủ thích hợp, cụ thể là trong *Pichia pastoris*, và
- tinh chế hoặc phân lập polypeptit liên kết APN này.

Phương pháp tinh chế hoặc phân lập polypeptit đã biểu hiện này có nghĩa là, ví dụ, không giới hạn ở, tinh chế dựa vào ái lực như sắc ký ái lực, tinh chế ái lực, kết tủa miễn dịch, phát hiện protein, hóa học miễn dịch, biểu hiện bề mặt, trong số các kỹ thuật khác, và đều đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến kit chứa polypeptit, phân tử khảm hoặc axit nucleic theo sáng chế. Kit này có thể còn bao gồm sự kết hợp của các chất phản ứng như chất đệm, nhãn phân tử, cấu trúc vectơ, nguyên liệu mẫu tham chiếu, cũng như giá đỡ rắn thích hợp, các tế bào, các axit nucleic, và tương tự. Kit này có thể là hữu

ích cho ứng dụng bất kỳ theo sáng chế như được mô tả ở đây. Cũng được dự định trong phạm vi của sáng chế là giá đỡ rắn hoặc nhựa chứa polypeptit chứa ISVD liên kết APN theo sáng chế. Các ví dụ không giới hạn về các giá đỡ rắn thích hợp bao gồm hạt, cột, phiên kính, chip hoặc đĩa. Cụ thể hơn, các giá đỡ rắn có thể là dạng hạt (ví dụ, hạt tròn hoặc hạt cốm, thường được sử dụng trong các cột tách) hoặc ở dạng tấm (ví dụ, các màng hoặc giấy lọc, phiên kính hoặc nhựa, đĩa thử nghiệm vi phẩm, que thăm, thiết bị nạp mao dẫn hoặc tương tự) mà có thể là ống hoặc sợi phẳng, xếp nếp hoặc rỗng. Việc làm bất động có thể là không đồng hóa trị hoặc đồng hóa trị, sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

Các ví dụ sau đây được đưa ra dưới đây để minh họa cho các phương pháp, các chế phẩm, và các kết quả theo đối tượng đã bộc lộ. Các ví dụ này không được dự định bao gồm tất cả các khía cạnh của đối tượng được bộc lộ ở đây, mà chỉ minh họa cho các phương pháp, các chế phẩm, và các kết quả điển hình. Các ví dụ này không được dự định loại trừ các phương án tương đương và các biến thể của sáng chế, điều này là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

1. Các vector, chủng và dòng tế bào

Để tạo ra thư viện VHH, hệ vector biểu hiện thể thực khuẩn pMECS được sử dụng chứa trình tự tín hiệu pelB để tiết ra VHH đã biểu hiện trong chu chất của vi khuẩn và bổ sung HA và đuôi His6 ở đầu cùng carboxy của VHH, cho phép tinh chế. Vector biểu hiện nấm men pPICZalphaH6E (số truy cập NCBI KM035419.1) được biến đổi để tách dòng GoldenBraid (được gọi là pKaiGG) được sử dụng để tách dòng các thể dung hợp VHH-MG (MG: miền Fc của IgG murine) dưới sự điều khiển của trình tự khởi động AOX1 có thể cảm ứng bởi metanol. Vector này chứa chất đánh dấu kháng Zeocin để lựa chọn trong tế bào vi khuẩn cũng như tế bào nấm men. Chủng E. coli TG1 và DH5 α được sử dụng để xây dựng thư viện VHH và các vector biểu hiện dung hợp, tương ứng. Các thể dung hợp VHH-MG được biểu hiện ở P. pastoris chủng kiểu hoang NRRL Y-11430 (ATCC 76273). Các dòng tế bào biểu hiện APN ổn định (tế bào biểu mô ruột lợn IPEC-J2 và tế bào thận chuột hàng sơ sinh BHK-21) thu được bằng cách chuyển nhiễm và được nuôi cấy như đã mô tả trên đây [3, 4].

2. Tinh chế APN ruột

Các tế bào ruột được phân lập từ ruột non của lợn con 3 tuần tuổi theo phương pháp Lundqvist, Hammarström, Athlin và Hammarström [21]. Sau khi phân tích bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học, độ tinh khiết tế bào ruột hơn 85% được quan sát thấy. Tiếp theo, các túi màng rìa bàn chải (BBMV) được phân lập từ các tế bào ruột như được mô tả bởi Melkebeek, Rasschaert, Bellot, Tilleman, Favoreel, Deforce, De Geest, Goddeeris và Cox [3]. BBMV thu được được dung giải tiếp trong 9 thể tích chất đệm dung giải (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% natri deoxycholate, 0,1% SDS, 2 mM leupeptin, 5 mM DTT, 1 mM AEBSF), được nghiền bằng sóng âm trong 2 phút trên đá, được quay trong 30 phút ở 4°C và được ly tâm ở 17.400 g trong 15 phút ở 4°C. Dịch nổi bề mặt được thu gom và được thẩm tách trong PBS bằng cách sử dụng casset thẩm tách 10 kDa MWCO (Thermo scientific). Nồng độ protein được xác định bằng phản ứng BCA (kit thử nghiệm protein Pierce BCA), theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Dịch dung giải được bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng tiếp.

pAPN ruột được tinh chế bằng phương pháp kết tủa miễn dịch từ các dịch dung giải này. Đầu tiên, IgG kháng APN thô đã tinh chế ái lực (tiêu chuẩn nội bộ) được liên kết chéo với các hạt protein A Sepharose (CL-4B, Sigma). Đối với bước này, 50 mg hạt được rửa ba lần trong 1 ml nước cất để loại bỏ muối bằng cách ly tâm ở 400 g trong 2 phút. IgG kháng APN của thô (4 mg) được bổ sung vào các hạt trong 1 h trong PBS ở nhiệt độ phòng (RT). Tiếp theo, các hạt được rửa hai lần bằng 1 ml 0,2 M chất đệm natri borat (pH 8,0), sau đó 1 ml 0,2 M natri borat (pH 9,0) + 20 mM dimethylpimelimidate (DMP, Sigma) được bổ sung vào trong 30 phút ở RT. Sau khi liên kết chéo, các hạt được rửa hai lần trong 1 h trong 1 ml chất đệm 0,2 M etanolamin + 50 mM amoni bicacbonat (pH 8,0). Tiếp theo, các hạt được rửa ba lần trong PBS trước khi đệm rửa giải (0,2 M Glyxine-HCl, 50 mM L-arginin, 1 M NaCl (pH 2,0)) được bổ sung vào để loại bỏ các IgG chưa liên kết chéo. Các hạt được rửa lại ba lần trong PBS và được bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng tiếp. Cuối cùng, các hạt kháng APN được ủ với 1 ml dịch dung giải BBMV qua đêm ở 4°C trên bánh xe quay. Các hạt được ly tâm (400 g, 2 phút, 4°C) và dịch nổi được thu gom. Các hạt được rửa ba lần với PBS để loại bỏ các protein chưa liên kết. Tiếp theo, APN được rửa giải từ các hạt với đệm rửa giải trong 10 phút ở RT. Sau khi ly tâm, dịch nổi được thu gom và được trung hòa bằng 1 M Tris-HCl (pH 9,0). APN đã rửa giải được thẩm tách ngay lập tức trong PBS và được bảo quản ở -20°C. Nồng độ

được xác định với kit thử nghiệm protein Pierce BCA và độ tinh khiết (>95%) được đánh giá bằng cách thực hiện phương pháp nhuộm bạc (kit nhuộm bạc Pierce®; Thermo Scientific), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3. Tạo ra thư viện VHH đặc hiệu pAPN

VHH đặc hiệu APN của lợn được phát triển bởi nhà máy VIB Nanobody Core, Brussels (Bỉ), như đã mô tả trên đây [22]. Tóm lại, hai con lợn đã không bú sữa được gây miễn dịch dưới da vào các ngày 0, 7, 14, 21 và 28, mỗi lần với 320 µg (mỗi động vật) APN được phân lập từ thận lợn (Sigma, cat. No. L6007-50UN). Vào ngày 35, mỗi con lợn đã không bú sữa nhận được liều tăng cường cuối cùng với 200 µg APN được phân lập từ ruột lợn. APN ruột lợn được tinh chế như được mô tả trên đây. Đối với tất cả các lần gây miễn dịch, Gerbu P (GERBU Biotechnik) được sử dụng làm chất bổ trợ. Vào ngày 40, máu đã chống đông được thu gom để bào chế tế bào lympho. ARN toàn phần từ các tế bào lympho máu ngoại vi (PBL) được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cADN chuỗi thứ nhất với đoạn môi oligo(dT). Bằng cách sử dụng cADN này, các trình tự mã hóa VHH được khuếch đại bằng PCR, được cắt bằng PstI và NotI, và được tách dòng vào các vị trí PstI và NotI của vector phagemit pMECS, và theo cách này được dung hợp với nhân histidin. Các tế bào điện khả nạp E. coli TG1 được biến nạp với vector pMECS tái tổ hợp. Thư viện VHH độc lập thu được từ mỗi con lợn đã không bú sữa, và mỗi thư viện được quét (trong dung dịch), được thực hiện trên các tế bào BHK-21 được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện pAPN. Sau đó đầu ra thể thực khuẩn của vòng quét thứ nhất từ hai thư viện được gộp lại và lượng gộp này được sử dụng cho các vòng quét tiếp theo. 190 khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên từ các vòng quét thứ hai và thứ ba (95 từ mỗi vòng) được giải trình tự và sau đó được phân nhóm dựa vào các trình tự CDR3 của chúng. Bằng cách sử dụng các dịch chiết chu chất thô, 28 trình tự VHH (Nanobody®) đơn nhất được phân tích bằng phương pháp đo tế bào theo dòng về tính đặc hiệu với pAPN sử dụng các tế bào BHK-21 biểu hiện pAPN.

4. Xây dựng các vector biểu hiện dung hợp VHH-MG

Để tách dòng các thể dung hợp VHH-MG đã được thiết kế bằng máy tính trong vector biểu hiện nấm men pKaiGG, các chất phản ứng theo yêu cầu được thiết kế để tách dòng Gibson Assembly® như được từ SGI-DNA (La Jolla, California), là các đoạn ADN được sản xuất bằng cách tổng hợp của các trình tự mã hóa VHH được dung hợp với đuôi Fc của IgG2a chuột nhắt (Hinge-CH2-CH3; số truy cập NCBI KC295246.1) với các

đoạn chồng lấp 40 bazơ giữa đoạn chèn và vector này. Vector biểu hiện pKaiGG đã được làm cho thích hợp để tách dòng Golden Gate được tiêu hóa bằng SapI và được tinh chế cột (kit tinh chế GeneJET PCR, ThermoFisher Cat. No. K0701). Các đoạn VHH luôn được lắp ráp với cùng một đoạn Fc và được tách dòng ở đầu 5' trong khung với trình tự tín hiệu tiết yếu tố alpha (từ vector biểu hiện *P. pastoris* mới được đặt tên là pPICZH6E; số truy cập GenBank KM035419) và ở đầu 3' với trình tự kết thúc phiên mã vào vector pKaiGG được tiêu hóa bằng SapI nội bộ qua hệ thống BioXp™ 3200 trong phản ứng xấp xỉ 18 h và được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Khi tạo ra plasmid và xác nhận trình tự của đoạn chèn, các tế bào nấm men được biến nạp với các vector được làm cho thẳng hàng bởi PmeI và các thể biến nạp dương tính được chọn trên YPD (dịch chiết nấm men 1%, 2% pepton, 2% Dextroza) được bổ sung bằng 50 mg/ml Zeocin (Invitrogen).

5. Sản xuất các thể dung hợp VHH-MG trong *P. pastoris*

Sự biểu hiện và tiết các thể dung hợp VHH-MG trong môi trường được phân tích đầu tiên trong 2 ml các môi trường nuôi cấy. Vào ngày 1, 2 ml môi trường BMGY (dịch chiết 1% nấm men Bacto, 2% pepton, 1,34% YNB, 0,1 M kali phosphat (pH 6), 1% glyxerol) với 25 mg/ml Zeocin được cấy với từng thể biến nạp và được ủ trong khi lắc ở 28°C trong 48 h. Đối với mỗi cấu trúc VHH-MG, bốn thể biến nạp độc lập được nuôi trong các đĩa 24 giếng. Sau đó các tế bào được tạo pelet trong 10 phút ở 1500 g và được tạo huyền phù lại trong 2 ml môi trường BMMY (dịch chiết 1% nấm men Bacto, 2% pepton, 1,34% YNB, 0,1 M kali phosphat (pH 6), 1% metanol) để gây ra sự biểu hiện VHH-MG. Các môi trường nuôi cấy được ủ trong khi lắc ở 28°C trong 48 h và được bổ sung 1% metanol (v/v) mỗi 12 h. Sau 48 h cảm ứng, các tế bào nấm men được tạo pelet, và dịch nổi được phân tích bằng SDS-PAGE, thấm tách western và ELISA để đánh giá các mức tích lũy của các thể dung hợp VHH-MG đã tiết ra trong môi trường này.

6. Tinh chế ái lực các thể dung hợp VHH-MG

Các thể biến nạp nấm men mà đã tạo ra các mức VHH-MG cao được chọn để tăng quy mô trong 1 l các môi trường nuôi cấy, sử dụng các điều kiện sinh trưởng và cảm ứng tương tự như được mô tả trên đây cho 2 ml các môi trường nuôi cấy. Các môi trường nuôi cấy *P. pastoris* đã nuôi trong các bình có màng ngăn được thu hoạch sau khi cảm ứng 48 h. Dịch nổi nuôi cấy được lọc bằng cách sử dụng các máy lọc màng 0,22 μ M PES (Millipore) và được tinh chế ái lực trên cột 1 ml HiTrap MabSelect SuRe protein A (GE healthcare), được cân bằng với 20 mM natri phosphat, 300 mM đệm

NaCl, pH 7,8. Protein đã liên kết được rửa giải với 1 M arginin, pH 2,7 và được trung hòa ngay với 1 M Tris, pH 9. Các phân đoạn thích hợp có nồng độ cao của VHH-MG được gom lại và được đưa vào sắc ký loại cỡ (Superdex 200, GE Healthcare). Các phân đoạn chứa đỉnh kháng thể chính trong sắc ký đồ được gom lại, được cô đặc bằng thẩm tách qua 20% polyetylen glycol trong PBS và được bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng. Nồng độ protein được xác định bằng phép đo OD280.

7. SDS-PAGE và thẩm tách western

Các thể dung hợp VHH-MG (thô/đã tinh chế) được phân tích trên gel gradien 4 đến 20% thương mại (Bio-Rad) trong các điều kiện khử và được nhuộm bằng Coomassie G-250 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với thẩm tách western, các protein được chuyển lên màng polyvinyliden diflorua (PVDF) sử dụng phương pháp chuyển bán khô (Bio-Rad). Màng đã thẩm tách được phong bế qua đêm với 2% sữa tách béo trong PBST (PBS + 0,1% (v/v) Tween-20) ở 4°C. Sau đó, màng này được dò với kháng thể kháng IgG chuột nhắt (GE Healthcare, NXA931) được liên hợp với peroxidaza cải ngựa (HRP), được pha loãng 1:2000 trong dung dịch phong bế và được ủ trong 1h ở RT. Sau đó màng được rửa ba lần bằng PBST, và các dải được hiển thị bằng cách bổ sung cơ chất HRP (WesternBright ECL, Advansta). Màng này được chụp ảnh bằng cách sử dụng hệ thống chụp ảnh ChemiDoc MP (Bio-Rad) và được phân tích bằng phần mềm ImageLab (Bio-Rad).

8. ELISA liên kết kháng nguyên

Các đĩa ELISA 96 giếng (Nunc Polysorp®) được phủ trong hai giờ ở 37°C với 400 ng APN (Sigma) được pha loãng trong PBS. Sau đó các đĩa được rửa ba lần bằng PBST và được phong bế qua đêm ở 4°C với 3% (w/v) gelatin được điều chế trong PBS và 0,05% Tween-80. Sau ba lần rửa với PBST, các thể dung hợp VHH-MG được pha loãng từng bậc trong đệm pha loãng (2% sữa tách béo + PBS + 0,05% Tween-20), được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 1h ở RT. mAb đặc hiệu pAPN được sản xuất nội bộ (IMM013, xem tài liệu tham khảo [4]) được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi VHH đặc hiệu GFP được dung hợp với IgG3 murine (GBP-MG) được sử dụng làm đối chứng âm [23]. Sau khi rửa, các thể dung hợp VHH-MG đã liên kết được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG chuột nhắt (GE Healthcare, NXA931), được pha loãng 1:5000 trong đệm pha loãng. Sau khi ủ trong 1h ở RT, các đĩa được rửa ba lần với PBST và được hiện màu bằng cách bổ sung cơ chất HRP (một viên nén SIGMAFAST™ OPD

được hòa tan trong 20 ml nước khử ion). Cuối cùng, phản ứng được dừng với 1 M axit hydrocloric và mật độ quang của phản ứng đo màu được đo ở 492 nm (VersaMax™).

9. Phương pháp đo tế bào theo dòng

Khả năng liên kết của các thể dung hợp VHH-MG khác nhau với các dòng tế bào biểu hiện APN được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp đo tế bào theo dòng. Các dòng tế bào IPEC-J2 và BHK-21 kiểu hoang và được chuyển nhiễm APN được nuôi đến khi đạt tỷ lệ hợp dòng 90% và được tách ra với StemPro accutase (Gibco). Các tế bào đã tách ($3,0 \times 10^5$) được chuyển vào đĩa vi phiếm 96 giếng đáy hình nón (Gibco) trong 200 μ l môi trường nuôi cấy và được ly tâm trong 3 phút ở 350 g và 4°C. Các tế bào được ủ với 2 μ g/ml thể dung hợp VHH-MG hoặc mAb kháng APN (dòng IMM013) trên đá trong 30 phút. Việc phát hiện các thể dung hợp VHH-MG đã liên kết được thực hiện với kháng thể kháng IgG2a chuột nhất được liên hợp AF647 (4 μ g/ml; Invitrogen, A21241) và với kháng thể kháng IgG1 chuột nhất được liên hợp AF647 (4 μ g/ml; Invitrogen, A-21240) đối với IMM013. Các tế bào được ủ trong 30 phút trên đá. Các tế bào chết được loại ra bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm xanh Sytox (5 nM; các đoạn dò phân tử). Tổng số 10.000 tế bào sống, đơn được đo cho mỗi điều kiện (Cytotflex, Beckman Coulter).

10. Thử nghiệm nội bào hóa VHH-MG

Các tế bào BHK-21 biểu hiện APN được gieo vào các đĩa 24 giếng ($1,0 \times 10^5$ tế bào trong 1 ml) trên mặt trên của tấm kính đáy vô khuẩn và được nuôi cấy đến khi lớp đơn được tạo thành. Các tế bào được rửa hai lần bằng PBS lạnh như băng và được bảo quản trên đá lạnh trước khi các thể dung hợp VHH-MG hoặc IMM013 được bổ sung vào các tế bào này (250 μ l; 100 μ g/ml) trong môi trường nuôi cấy lạnh như băng. Sau khi ủ 30 hoặc 60 phút ở 4°C, các tế bào được rửa ba lần với PBS lạnh như băng và được ủ trong 30 phút ở 37°C, 5% CO₂ trong môi trường nuôi cấy ấm. Sau khi rửa hai lần trong PBS, các tế bào được cố định trong 10 phút ở nhiệt độ phòng (RT) với 500 μ l 4% paraformaldehyt. Tiếp theo, sự có mặt của VHH-MG hoặc IMM013 trên màng tế bào được phát hiện với kháng thể kháng IgG chuột nhất liên hợp AF568 (H+L) (2 μ g/ml; Invitrogen, A-11004) trong 30 phút ở RT và được bảo vệ khỏi ánh sáng. Sau khi rửa ba lần với PBS + 1% FCS, các tế bào được làm cho thấm với 250 μ l 0,2% Triton-X100 trong 2 phút và được rửa lại với PBS + 1% FCS. Sau đó cả VHH-MG và IMM013 đều được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG chuột nhất liên hợp FITC (1/50;

phân tử nguyên vẹn) (Sigma, F2883) trong 30 phút ở RT, được bảo vệ khỏi ánh sáng. Nhân được hiển thị bằng cách nhuộm Hoechst (pha loãng 1/100). Sau khi rửa ba lần, tấm kính dày được lấy ra và được lắp lên lam kính trong dung dịch gắn kết (chất chống mờ 1, 4-Diazobixyclo-2,2,2-octan - DABCO™). Các hình ảnh được chụp với kính hiển vi đồng tiêu (Leica).

11. Hấp thu in vivo VHH-MG kháng APN

Ba lợn cái 5 tuần tuổi được sử dụng để đánh giá sự hấp thu của VHH-MG trong vòng nối ruột như đã mô tả trên đây [24]. Nói ngắn gọn, sau khi gây mê và phẫu thuật mở bụng, hồng tràng được định vị và sáu vòng 3 cm với các khoảng cách 10 cm giữa mỗi vòng được tạo ra tránh mảng Peyer. Việc cung cấp máu được đảm bảo bằng cách đặt các dải buộc giữa các vòng nối mạc treo tràng. mAb đặc hiệu pAPN (IMM013, xem tài liệu tham khảo [4]) được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi GBP-MG được sử dụng làm đối chứng âm [24]. mAb kháng APN IMM013 (1 mg) hoặc lượng đẳng mol của các VHH-MG khác nhau được pha loãng trong 3 ml PBS và được tiêm vào lòng ống của các vòng này. Sau khi tiêm, mỗi vòng được đưa lại vào khoang bụng và bụng được đóng lại. Sau khi ủ 5 h, các động vật bị gây chết bằng cách sử dụng quá liều natri pentobarbital và các mẫu mô từ ruột, vòng và hạch bạch huyết mạc treo ruột được thu gom. Các mẫu mô được gắn vào 2% Methocel® MC (Fluka), được làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng. Tất cả các quy trình trên động vật đều được chấp thuận bởi Ủy ban đạo đức của Khoa thuốc thú y của Đại học Ghent (EC 2018-04).

12. Hóa học mô miễn dịch

Các phần đông lạnh (8 µm) của hồi tràng lợn thu được từ lợn 3 tuần tuổi hoặc từ các vòng ruột được cắt với thiết bị tạo siêu hàn Leica CM3050 S, được lắp lên phiến kính được phủ APES, được làm khô (30 phút, 40°C) và được cố định trong axeton trong 10 phút ở -20°C. Sau đó, các phần đông lạnh được ủ trong 30 phút trong đệm amoni clorua (50 mM, pH 8) và được rửa kỹ. Tất cả các bước rửa được thực hiện ở RT trong PBS. Các thụ thể Fc được phong bế trong 30 phút ở 37°C với PBS chứa 10% huyết thanh cừu hoặc dê. Khả năng liên kết của VHH-MG hoặc IMM013 được phát hiện bằng cách ủ trong 1 h ở 37°C với kháng thể cừu kháng IgG chuột nhất liên hợp FITC (10 µg/ml; Sigma; F2883) hoặc kháng thể dê kháng IgG2a chuột nhất. Nhân được phản nhuộm với Hoechst (10 µg/ml). Để đánh giá khả năng nội bào hóa, các phần được

nhuộm bằng kháng thể thô kháng pan-cytokeratin (Abcam, ab9377) và được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG thô liên hợp TexasRed. Các phần được rửa trong nước siêu tinh khiết và được gắn kết trong dung dịch gắn kết (DABCO). Các mô được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang Leica DC 100 được lắp với camera Scion Corporation hoặc kính hiển vi đồng tiêu Leica. Các ảnh được phân tích và được xử lý bằng cách sử dụng Fiji.

13. Thử nghiệm gây miễn dịch bằng đường miệng

Tất cả các quy trình trên động vật đều được chấp thuận bởi Ủy ban đạo đức của Khoa thuốc thú y (EC 2018-51). Mười hai lợn con được nuôi thông thường (Belgian Landrace x Pietrain) từ trang trại ở Bỉ được cai sữa ở 3 tuần tuổi và được vận chuyển đến cơ sở của tác giả sáng chế. Các động vật được xử lý bằng colistin sulphat (Promycine®, 100,000 U.I./kg khối lượng động vật) trong 5 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm. Thiết kế của thử nghiệm gây miễn dịch bằng đường miệng được mô tả trong Fig. 6. Các động vật được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm: nhóm đối chứng IgG2a chuột nhắt và hai nhóm nhận các VHH-MG đặc hiệu APN 2L65 hoặc 3L94. Các động vật được gây miễn dịch bằng đường miệng vào ba ngày liên tục sau đó gây miễn dịch tăng cường vào ngày 14 sau khi gây miễn dịch lần đầu. Sự sản sinh HCl trong dạ dày được phong bế bằng cách sử dụng Omeprazole (20 mg/động vật) 24 giờ trước mỗi lần gây miễn dịch và các động vật bị bỏ đói 12 giờ trước các lần gây miễn dịch. Các động vật được gây miễn dịch bằng đường miệng với 1 mg 3L94-MG, 2L65-MG hoặc lượng đẳng mol của IgG2a chuột nhắt không liên quan (tế bào Bio X; West Lebanon, USA), có tá được là 50 µg độc tố tả (Merck, ref: C8052). Máu được lấy vào ngày 0, 9, 14, 21 và 28 sau khi gây miễn dịch lần đầu (ppi) để phân tích các đáp ứng miễn dịch đã được gây ra. Vào ngày 28 các động vật ppi bị gây chết bằng cách tiêm tĩnh mạch natri pentobarbital 20% (60 mg/2,5 kg; Kela) và sau khi hút hết máu, các mẫu mô ruột non được thu gom.

14. ELISA IgG2a chuột nhắt

Máu được lấy từ tĩnh mạch cổ vào các ống gel và ống chứa chất kích hoạt cục máu đông (Vacutest, Kima). Sau khi ủ 1 h ở nhiệt độ phòng, các ống được ly tâm, và huyết thanh được thu gom và được bất hoạt ở 56°C trong 30 phút. Các mẫu huyết thanh được bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng.

Kháng thể đơn dòng IgG2a chuột nhắt được sản xuất nội bộ được phủ trong các đĩa vi phẩm 96 giếng (Polysorp; Life Technologies) ở 6 µg/ml trong PBS trong 2h ở

37°C. Sau khi phong bế qua đêm ở 4°C trong PBS được bổ sung 0,2% Tween80 và 3% BSA, các mẫu huyết thanh đã pha loãng (tỷ lệ pha loãng khởi đầu là 1:10 trong đệm pha loãng) được bổ sung vào các giếng. Sau khi ủ trong 1 h ở 37°C, các đĩa được rửa và được ủ trong 1 h ở 37°C với kháng thể chuột nhất kháng IgG lợn liên hợp HRP (MT424, 1/1000; MabTech, Nacka Strand, Sweden) hoặc kháng thể dê kháng IgA lợn liên hợp HRP (1/10.000; Betyl; Montgomery, Texas, U.S). Sau ba bước rửa, cơ chất 2,2'-azino-bis(axit 3-etylbenzothiazolin-6-sulphonic) (ABTS) được bổ sung vào và mật độ quang được đo ở 405 nm sau khi ủ 45 phút ở 37°C sử dụng máy đo quang phổ (Tecan SpectraFluor).

15. ELIsot

Máu được lấy trên heparin từ tĩnh mạch cổ của lợn con và PBMC được phân lập bằng cách ly tâm gradien tỷ trọng sử dụng Lymphoprep® (Alere Technologies, Oslo, Norway). Các tế bào hồng cầu được dung giải trong dung dịch amoni clorua. Phân đoạn PBMC thu được được rửa hai lần trên PBS lạnh như băng + 1 mM EDTA, được tạo huyền phù lại trong CTL-thử nghiệm BTM (Cellular Technology Limited, Cleveland, USA) được bổ sung với 1% penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL) và kanamycin đến 1×10^7 tế bào/ml. Các tế bào đơn nhân (MC) được phân lập từ hạch bạch huyết mạc treo ruột (MLN), mảng Peyer hồng tràng (JPP), lớp đệm hồng tràng (JLP), mảng Peyer hồi tràng (IPP) và lớp đệm hồi tràng (ILP) và được xử lý như đã mô tả trên đây [25]. MC đã phân lập được tạo huyền phù lại trong môi trường tế bào bạch cầu (RPMI-1640 (Gibco) chứa 10% huyết thanh thai bê, 1mM natri pyruvat, 2mM l-glutamin, penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), và các axit amin không thiết yếu (1%) và được đếm.

Các đĩa lọc MultiScreen (dạng 96 giếng, MAIPA4510, Millipore) được hoạt hóa với 70% etanol, được rửa bằng nước siêu tinh khiết (UP) và được phủ bằng 10 µg/ml IgG2a chuột nhất qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa, các đĩa được ủ trong 2h ở 37°C với môi trường CTL-thử nghiệm B. Các tế bào đơn nhân ($2,5 \times 10^5$ /giếng) từ mỗi mô được bổ sung vào các giếng và được ủ trong 18h ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂ đã được làm ẩm. Sau đó các tế bào được lấy ra bằng cách rửa kỹ với PBS chứa 0,1% Tween20. Sau khi rửa, kháng thể kháng IgG lợn được liên hợp HRP (MT424, 1/1000; MabTech) hoặc IgA (1/10,000; Betyl laboratories) được bổ sung vào đệm thử nghiệm (PBS chứa 0,1% Tween20 và 0,1% BSA) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, cơ chất

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) cho các màng (Sigma) được bổ sung vào các giếng sau 3 bước rửa. Phản ứng được dừng bằng cách rửa kỹ bằng nước UP và các đĩa được để khô qua đêm ở 4°C. Các hình ảnh được chụp bằng cách sử dụng máy đọc điểm miễn dịch (Luminoskan). Các điểm được đếm thủ công dựa vào sự phân biệt kích thước.

16. Thử nghiệm cạnh tranh

Phương pháp đo tế bào theo dòng

Thử nghiệm cạnh tranh dựa vào phương pháp đo tế bào theo dòng được sử dụng để xác định các VHH có nhận biết các epitop tương tự trên APN hay không. Dòng tế bào BHK-21 đã chuyển nhiễm APN được nuôi đến khi đạt tỷ lệ hợp dòng 90% và được tách bằng StemPro accutase (Gibco). Các tế bào đã tách ($3,0 \times 10^5$) được chuyển nhiễm vào đĩa vi phôi 96 giếng đáy hình nón (Gibco) trong 200 μ l môi trường nuôi cấy và được ly tâm trong 3 phút ở 350 g và 4°C. Tiếp theo, các tế bào BHK-APN được ủ lần thứ nhất với 2L65, 3L2, 3L73 VHH-MG hoặc đối chứng âm ở 40 μ g/ml trong 30 phút trên băng. Sau khi rửa bằng PBS + 1 mM EDTA, các tế bào được ủ với 2L65, 3L2, 3L73 VHH-MG được gắn nhãn thứ hai (kit gắn nhãn IgG2a Zenon chuột nhắt AlexaFluor405) ở 2 μ g/ml trong 30 phút trên băng. Sau khi rửa với PBS + 1 mM EDTA, các tế bào được phân tích bằng phương pháp đo tế bào theo dòng (Cytotflex, Beckman Coulter). Các tế bào chết được loại trừ bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm propidi iodua. Tổng số 10.000 tế bào đơn, sống được đo cho mỗi điều kiện (Cytotflex, Beckman Coulter).

Phép đo giao thoa lớp sinh học

Các phép đo tạo nhóm epitop (epitope binning) được thực hiện bằng cách sử dụng phép đo giao thoa lớp sinh học ở nhiệt độ xung quanh (BLI; Octet RED96). Ở đây, 10 μ g/ml APN lợn được biotin hóa (Sigma) trong PBS được liên kết trên cảm biến sinh học streptavidin (SAX) độ chính xác cao được ngâm trong PBS, sau đó bổ sung các VHH ở 500 nM trong PBS + 0,2% Tween-20 + 1% BSA (PBST+BSA). Tiếp theo, 2L65 VHH được bổ sung vào ở 250 nM trong PBST+BSA. Số liệu được phân tích với phần mềm tạo nhóm epitop thông lượng cao.

ELISA

Các đĩa ELISA 96 giếng (Nunc Polysorp®) được phủ trong hai giờ ở 37°C với 400 ng APN (Sigma) được pha loãng trong PBS. Sau đó, các đĩa được rửa ba lần bằng PBST và được phong bế qua đêm ở 4°C với 3% (w/v) gelatin được điều chế trong PBS và 0,05% Tween-80. Sau ba lần rửa với PBST, các thể dung hợp VHH-MG được bổ

sung vào mỗi giếng ở nồng độ bão hòa trong đệm pha loãng (2% sữa tách béo + PBS + 0,05% Tween-20) và được ủ trong 1h ở RT. Sau khi rửa, 2L65 VHH đã biotin hóa ở 10 ug/ml trong đệm pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 1h ở RT. 2L65 VHH đã biotin hóa đã liên kết được phát hiện bằng streptavidin-HRP (ThermoFisher scientific), được pha loãng 1:5000 trong đệm pha loãng. Sau khi ủ trong 1h ở RT, các đĩa được rửa ba lần với PBST và được hiện màu bằng cách bổ sung cơ chất HRP (một viên nén SIGMAFAST™ OPD được hòa tan trong 20 ml nước khử ion). Cuối cùng, phản ứng được dừng với 1 M axit hydrocloric và mật độ quang của phản ứng đo màu được đo ở 492 nm (VersaMax™).

17. Phân tích thống kê

Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng GraphPad Prism 6. Các mức kháng thể trong huyết thanh và số lượng tế bào tiết kháng thể đặc hiệu kháng nguyên đang tuân hoàn được phân tích bằng ANOVA hai chiều và kiểm thử Dunnett cho nhiều so sánh. Số lượng các tế bào tiết kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ở ruột được phân tích bằng kiểm thử t và Holm-Sidak cho nhiều so sánh. Mức ý nghĩa được đặt ở 0,05.

Kết quả

1. Xây dựng thư viện VHH đặc hiệu APN

Để tạo ra thư viện VHH kháng APN, hai con lạc đà không bướu được gây miễn dịch năm lần bằng pAPN thận đã có trên thị trường. Liều tăng cường thứ sáu được sử dụng với pAPN ruột được mã hóa bằng cùng một gen và được tạo ra bằng quy trình như đã mô tả trong phần Nguyên liệu và phương pháp. Hai thư viện biểu hiện thể thực khuẩn VHH độc lập được tạo ra, mỗi thư viện bao gồm khoảng 10^8 thể biến nạp. Sau hai vòng quét liên tục, được thực hiện trên các tế bào BHK21 được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện aminopeptidaza N lợn, 190 dòng được chọn ngẫu nhiên và được giải trình tự. Bằng cách sắp xếp thẳng hàng so sánh, các VHH có tỷ lệ tương đồng trình tự lớn hơn 80% trong vùng CDR3 của chúng (dòng tế bào B) được nhóm lại thành một họ vì chúng gắn như chắc chắn nhận biết cùng một epitop (xem tài liệu tham khảo [26]) nhưng các đặc điểm của chúng (ví dụ, ái lực, hiệu suất biểu hiện, độ ổn định, v.v.) có thể là khác nhau. Theo cách này, tác giả sáng chế thu được 28 VHH đơn nhất thuộc 14 họ khác nhau làm chất liên kết ứng viên với APN (Fig. 4). 28 VHH đơn nhất này được sản sinh trong các tế bào E. coli và các dịch chiết chu chất thô được phân tích về tính đặc hiệu liên kết của chúng bằng phương pháp đo tế bào theo dòng trên các tế bào BHK21 biểu hiện pAPN.

Các tế bào BHK-21 mẹ chưa chuyển nhiễm đóng vai trò làm các tế bào đối chứng âm. VHH không liên quan, (BCII10 đặc hiệu với β -lactamaza vi khuẩn, được mô tả bởi Conrath et al.[27]) và mAb IMM013 kháng APN chuột [4] được sử dụng lần lượt làm đối chứng âm và dương. Phân tích FACS vi sai xác nhận 22 trong số 28 VHH khác nhau đã sàng lọc ban đầu thuộc 11 họ khác nhau đặc hiệu với APN lợn, chứng minh là việc quét thư viện trên các tế bào đã chuyển nhiễm pAPN làm giàu cao các dòng VHH liên kết APN (Fig.4).

2. Xây dựng vector biểu hiện VHH-MG bằng máy in BioXP DNA

Vì phân tích FACS để quét trên các tế bào BHK-21 đã được chuyển nhiễm APN được thực hiện với dịch chiết chu chất thô, chất lượng của sự liên kết của các VHH khác nhau cần phải được phân tích thêm với các protein tinh khiết để cho phép so sánh giữa các VHH khác nhau và để loại trừ các biến thử nghiệm bất kỳ như biểu hiện thể nano, hiệu quả chiết chu chất, v.v. trong phân tích FACS (Fig.4). Quan trọng phải nhận ra là một số VHH này có thể chứa codon dừng amber trong trình tự VHH, vì thư viện VHH có nhãn histidin đầu cùng C' được tạo ra trong TG1 chủng E. coli ức chế mã đọc codon dừng amber (TAG) thành glutamin (Q). Do đó, khi codon amber được nhận diện bằng cách giải trình tự, nó cũng được thay thế bằng codon glutamin.

Theo cách cổ điển, các VHH đã chọn được tách dòng phụ trong quá trình dung hợp trực tiếp với nhãn ái lực trong chủng E. coli không ức chế, nhưng ở đây, các tác giả theo chiến lược mới. Tác giả sáng chế tách dòng phụ các VHH trong quá trình dung hợp trực tiếp với đoạn Fc để có các thể dung hợp được tạo ra trong môi trường của *Pichia pastoris*, tạo ra các ưu điểm sau đây: Fc có thể được sử dụng làm nhãn ái lực để tinh chế protein, nó làm cho thể dung hợp VHH-Fc có hai giá tạo ra hiệu quả ái lực, và cho phép so sánh với kháng thể đơn dòng chuột IMM013 về sự liên kết APN như là đối chứng dương. Hai mươi tám VHH đã chọn được dung hợp với miền Fc của IgG2a chuột và được tách dòng vào vector biểu hiện *P. pastoris* nội bộ. Hai VHH không liên quan, V2 [28] và D3 [29], lần lượt đặc hiệu với khuẩn mao (fimbriae) F4 và F18 của E. coli tạo độc tố ruột, được đưa vào làm đối chứng âm.

Các trình tự của VHH và miền Fc được tổng hợp bằng cách sử dụng hệ thống BioXP™ 3200 và được biến nạp vào vector biểu hiện nấm men (Fig. 1a). Toàn bộ 30 cấu trúc (với 28 VHH đã chọn và 2 đối chứng âm) được xây dựng thành công với máy

in BioXP DNA được biến nạp vào *E. coli* và bốn khuẩn lạc cho mỗi cấu trúc được phân tích bằng PCR khuẩn lạc hoặc tiêu hóa giới hạn sau đó là giải trình tự để xác định các dòng có sự gắn xen đúng. Hai mươi ba trong số 30 cấu trúc (77%) tạo ra dòng không có lỗi bằng cách giải trình tự chỉ một khuẩn lạc, trong khi đối với bảy cấu trúc VHH-MG khác, hai khuẩn lạc cần phải được phân tích để thu được dòng đúng; đối với một dòng duy nhất, nghĩa là, 2L58MG (3%) trình tự này vẫn là không đúng trong toàn bộ bốn khuẩn lạc, có một đột biến trong trình tự mã hóa (Fig. 1b). Đồng thời, dòng không đúng từ họ 12 này cũng là âm tính trong quá trình quét trong khi xây dựng thư viện VHH (Fig. 4). Do đó, chúng tôi loại bỏ nó ra khỏi các phân tích tiếp theo.

3. Các thể dung hợp VHH-MG được sản sinh bởi nấm men liên kết hữu hiệu với APN được biểu hiện bề mặt, có độ dài đầy đủ

Sau đó, 29 cấu trúc mã hóa VHH-MG thu được được biến nạp vào *Pichia pastoris*, và đối với mỗi cấu trúc, bốn khuẩn lạc nấm men đơn lẻ được sàng lọc để nhận diện thể biến nạp tạo ra lượng VHH-MG cao nhất tích lũy trong môi trường nuôi cấy. Do đó, các lượng tương đương của dịch nổi được phân tích bằng SDS-PAGE và bằng phương pháp thấm tách western để kiểm tra cường độ của tín hiệu protein tái tổ hợp và tính nguyên vẹn của protein (Fig. 5). Chỉ với các cấu trúc biểu hiện tốt nhất, dải có thể quan sát được sau SDS-PAGE; như với hầu hết các cấu trúc, dải được thể hiện rõ ràng ở khối lượng phân tử dự kiến sau phân tích thấm tách western. Nồng độ của các VHH-MG khác nhau được tạo ra trong *P. pastoris* được xác định bằng cách sử dụng các protein tham chiếu V2-MG và D3-MG đã tinh chế, và nồng độ này nằm trong khoảng từ 4 đến 60 mg/l trong 2 ml môi trường nuôi cấy, dựa trên phân tích bằng phần mềm ImageLab. Chỉ đối với một số dung hợp, như 3L11MG (họ 10), 2L22MG (họ 5) và V2-MG, sản phẩm phân hủy được phát hiện bên cạnh sản phẩm có độ dài đầy đủ, gợi ý là VHH có tác động đến độ ổn định của thể dung hợp VHH-MG như cũng được thấy đối với các thể dung hợp VHH-IgA [30].

Tiếp theo, tác giả sáng chế xác định tính đặc hiệu liên kết của các thể dung hợp VHH-MG trong thử nghiệm ELISA đặc hiệu APN thận (Fig. 2a). Dãy pha loãng ba lần của VHH-MG trong dịch nổi môi trường nuôi cấy được dò với kháng thể kháng IgG chuột. Ba VHH-MG mạnh nhất, nghĩa là 2L48MG, 3L94MG và 2L76MG, thể hiện hoạt động liên kết mạnh với APN đã bất động, mỗi phân tử thuộc nhóm CDR3 khác nhau.

Ba VHH-MG này cũng thể hiện khả năng liên kết tốt trong thử nghiệm FACS được thực hiện sau khi quét để sàng lọc các VHH được biểu hiện bởi thể thực khuẩn (Fig. 4). Tuy nhiên, bất ngờ là, một số họ của các dung hợp VHH-MG là âm tính hoàn toàn trong ELISA, ví dụ, họ 4 (2L63-MG, 2L69-MG), mặc dù chúng là các chất liên kết mạnh trong thử nghiệm FACS (Fig. 4). Do đó, cần lưu ý rằng hoạt động liên kết tương đối trên các giếng phủ APN trong thử nghiệm ELISA không tương quan với ái lực của các thể dung hợp VHH-MG đối với APN được biểu hiện bởi tế bào. Đáng chú ý là, việc sàng lọc VHH được thực hiện bằng FACS sử dụng các tế bào biểu hiện APN trên bề mặt của chúng, do đó khả năng liên kết trên APN đã bất động có thể khác với khả năng liên kết trên tế bào, có lẽ vì các epitop trở nên khó tiếp cận hơn trong quá trình bất động. Ngoài ra, vì các thử nghiệm được thực hiện với các mẫu môi trường thô, trong đó sự tích lũy protein VHH-MG chưa được cân bằng, tín hiệu ELISA có thể liên quan đến nồng độ protein trong môi trường nuôi cấy hơn là ái lực. (Fig. 2a, Fig. 4).

Các thể dung hợp VHH-MG được đánh giá thêm về tính đặc hiệu liên kết và ái lực của chúng trên các dòng tế bào mẹ so với dòng tế bào biểu hiện APN đã chuyển nhiễm thu được (BHK21 và IPEC-J2) bằng phương pháp đo tế bào theo dòng với các lượng tương đương của protein VHH-MG (Fig. 2b). Lưu ý là, IPEC-J2 là dòng tế bào biểu mô ruột non lợn biểu hiện các mức APN thấp trên bề mặt của chúng và do đó, chỉ các tế bào đã chuyển nhiễm ổn định được sử dụng. Dựa trên nồng độ VHH-MG tương đối, như được xác định bằng phương pháp tách chiết western, các lượng đẳng mol của các protein VHH-MG và đối chứng dương (IMM013) được bổ sung vào môi trường đã sử dụng của *P. pastoris*. Một số chất liên kết APN mạnh được nhận diện dựa vào số lượng tế bào có VHH-MG đã liên kết bằng phương pháp đo tế bào theo dòng, trong khi đó không quan sát thấy sự liên kết ở môi trường đã sử dụng có các tế bào BHK21/IPEC-J2 không được chuyển nhiễm. Đáng quan tâm là, họ 4 (2L63 và 2L69), mà là âm tính trong thử nghiệm ELISA đặc hiệu APN, hóa ra là chứa các chất liên kết mạnh trong thử nghiệm liên kết dựa trên tế bào (Fig. 2b, Fig. 7). Các phát hiện này là phù hợp với số liệu FACS thu được từ dịch chiết chu chất thô trong quá trình sàng lọc thư viện VHH (Fig. 4). Tác giả sáng chế đã phát hiện ra là biên độ của hoạt động liên kết trên tế bào IPEC-J2-APN so với BHK21-APN là thấp hơn đáng kể, điều này có thể liên quan đến lượng APN được biểu hiện trên màng tế bào IPEC-J2.

Tác giả sáng chế đã chọn ít nhất một dòng từ các họ thể hiện hoạt động liên kết trong sàng lọc bằng phương pháp đo tế bào theo dòng (ngoại trừ họ 6, 10, 11 và 14: các họ 6, 11 và 14 không chứa VHH liên kết APN bất kỳ; họ 10 (3L11) biểu hiện sự phân hủy và chỉ cường độ liên kết thấp) để đánh giá thêm ái lực của chúng đối với mô ruột non bằng phương pháp hóa mô miễn dịch (IHC). Dựa vào hoạt động liên kết của chúng, một số dòng được chọn và được tinh chế cho phân tích in vivo. Các dòng có sản lượng thấp như 2L76-MG, 2L34-MG và 2L52 được loại bỏ khỏi phân tích tiếp theo. Do đó, chỉ sáu họ chứa các chất liên kết mạnh (1, 4, 8, 9; khoảng 100000 MFI) và trung bình (5, 12; trên 200000 MFI) được chỉ ra là được chọn để tăng quy mô. Mỗi VHH-MG thể hiện khả năng liên kết với hồi tràng ruột, trong khi đó tất cả các đối chứng đều âm tính và không thể hiện nền; ngoài ra, cường độ của tín hiệu tương quan với hoạt động liên kết trong phân tích FACS (Fig. 2b).

4. Các thể dung hợp VHH-MG liên kết APN đã tinh chế được nội bào hóa bởi tế bào biểu mô ruột

Đối với mỗi họ, thể dung hợp VHH-MG đơn thể hiện sự biểu hiện và sự tiết cao trong môi trường Pichia đã sử dụng và thể hiện khả năng liên kết mạnh trong FACS, được chọn để tăng quy mô. Các thể dung hợp VHH-MG đã tiết được tinh chế ái lực trên protein A và được đánh giá thêm bằng sắc ký loại cỡ (SEC) (Fig. 3a). Đối với hầu hết các thể dung hợp, hồ sơ SEC thể hiện hai đỉnh chính, một thể hiện các khối kết tụ và các multime, và một thể hiện monome có khối lượng phân tử tương ứng của hai polypeptit VHH-MG kết hợp. Phần lớn của 2L76 VHH-MG được tìm thấy trong các khối kết tụ; do đó, các tác giả sáng chế đã loại trừ nó ra khỏi phân tích tiếp theo (số liệu không được thể hiện).

Đối với sáu thể dung hợp còn lại, các phân đoạn tương ứng với VHH-MG monome được gom lại và được phân tích thêm bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử và không khử để xác nhận sự dime hóa. Vì các đỉnh cho monome và các khối kết tụ trong hồ sơ SEC hơi chồng lên nhau, các VHH-MG đã tinh chế đã gộp vẫn chứa lượng nhỏ các khối kết tụ. Các mẫu trên gel không khử thể hiện tốt dải 80 kDa (Fig. 3b), tương ứng với VHH-MG monome tạo bởi hai polypeptit VHH-MG 40 kDa, như được thấy trong SDS-PAGE trong các điều kiện khử. Ngoài ra, một số dải có khối lượng phân

tử cao mà gần như chắc chắn thể hiện các khối kết tụ hoặc các biến thể glycan cũng được quan sát thấy.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế kiểm tra các đặc điểm liên kết của các thể dung hợp VHH-MG đã tinh chế khác nhau trong ELISA và FACS (lần lượt là Fig. 5a và 5b). VHH đặc hiệu GFP được dung hợp với IgG3 chuột (GBP-MG) được sử dụng làm đối chứng âm [23]. Mặc dù cả sáu thể dung hợp đã chọn đều thể hiện khả năng liên kết mạnh trên các tế bào biểu hiện APN, hiệu quả liên kết trên kháng nguyên đã bất động trong ELISA thay đổi rất nhiều, như được quan sát thấy với các mẫu thô (Fig. 4).

Vì sự nội bào hóa hiệu quả bởi quần thể tế bào đích của hệ mang vacxin tiềm năng có tầm quan trọng cao để thu được đáp ứng miễn dịch mạnh, các tác giả sáng chế đã kiểm tra thêm việc các thể dung hợp VHH-MG liên kết APN có thể hiện sự hấp thu đặc hiệu bởi các tế bào qua thụ thể APN hay không. Tác giả sáng chế đã sử dụng tế bào BHK21 biểu hiện APN vì khả năng liên kết mạnh của VHH-MG của chúng trong FACS (Fig. 5b). Các protein VHH-MG được nhuộm với phân tử huỳnh quang khác để phân biệt giữa VHH-MG kết hợp màng và VHH-MG được nội bào hóa qua thụ thể APN. Kỹ thuật chụp ảnh đồng tiêu chứng minh rõ ràng sự hấp thu phụ thuộc APN của thể dung hợp VHH-MG, vì sự hấp thu của các thể dung hợp VHH-MG không liên quan không thể quan sát được. Ba thể dung hợp VHH-MG (3L94-MG, 2L65-MG và 2L48-MG) được phát hiện ra là các chất liên kết APN hiệu quả nhất và chúng thể hiện các tín hiệu hấp thu rõ ràng chỉ trong các tế bào biểu hiện APN.

Ngoài ra đã xác nhận được bởi thử nghiệm nội bào hóa là 3L2 và 3L73 VHH gây ra sự nội bào hóa tương tự với 2L65 VHH, như được thể hiện trong Fig. 11.

5. Hoạt động in vivo của các ứng viên VHH-Fc đặc hiệu APN đã chọn trong thử nghiệm vòng nối ruột

Để đánh giá hoạt động in vivo của các cấu trúc VHH-Fc IgG đã chọn, các tác giả sáng chế thực hiện thử nghiệm vòng nối ruột trong ruột non (hỗng tràng) của lợn con. 3L94-MG và 2L65-MG có thể liên kết với toàn bộ biểu mô đỉnh của nhung mao. Ngược lại, 2L48 và 2L22 thể hiện đặc tính liên kết kém đồng đều hơn. Đã thấy là đặc tính liên kết là tương tự ở các động vật khác nhau. Ngoài ra, 3L94-MG và 2L65-MG được nội bào hóa bởi các tế bào ruột theo cách tương tự như IMM013. Dựa trên hoạt động in vivo trong thử nghiệm vòng nối ruột này, các tác giả sáng chế kết luận rằng 3L94-MG và

2L65-MG là các ứng viên thích hợp nhất để gắn đích các kháng nguyên vào biểu mô ruột non. Phân tích các vùng CDR1-3 của các kháng thể miễn dịch đơn này được đưa ra trong bảng 3.

Bảng 3.

Dòng	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
2L65	GRTISNHAMG	1	AISWTGLTTN	3	RQSGYVSKFVDDYGY	4
3L94	GRTFSTYAMG	14	YISQLSLSTK	15	RSQNYVTTYDQSRAYDY	16

6. Việc gây miễn dịch bằng đường miệng bằng VHH-Fc đặc hiệu APN gây ra các đáp ứng miễn dịch ở ruột non và hệ tuần hoàn

Để chứng minh thêm về khả năng của các VHH-MG đã chọn làm hệ phân phối vacxin, thử nghiệm gây miễn dịch bằng đường miệng ở lợn con được thực hiện và các đáp ứng miễn dịch ở ruột non và toàn thân tiếp theo được đánh giá bằng cách phát hiện các đáp ứng kháng thể huyết thanh đặc hiệu Fc IgG2a chuột và các tế bào tiết kháng thể lần lượt bằng ELISA và ELIsot. Fig. 6b thể hiện là khi sử dụng bằng đường miệng 2L65-MG, các mức huyết thanh IgA và IgG đặc hiệu Fc IgG2a chuột được gia tăng đáng kể so với nhóm đối chứng. Bất ngờ là, 3L94 không tăng cường các đáp ứng kháng thể huyết thanh đặc hiệu Fc IgG2a chuột. Ngoài ra, việc gây miễn dịch bằng đường miệng với 2L65-MG làm tăng đáng kể lượng tế bào tiết IgA đặc hiệu Fc IgG2a chuột tuần hoàn ở thời điểm 21 ngày sau khi gây miễn dịch lần đầu so với ngày 0 và nhóm đối chứng (Fig. 6c). Các kết quả này thể hiện là các VHH-MG đặc hiệu APN tăng cường tính miễn dịch toàn thân khi sử dụng bằng đường miệng cho lợn con. Để chứng minh thêm là các đáp ứng miễn dịch ở ruột cũng được tăng cường, các tác giả sáng chế đánh giá sự có mặt của các tế bào tiết kháng thể đặc hiệu Fc IgG2a chuột trong các mô ruột non khác nhau qua ELIsot. Như được thể hiện trong Fig. 6d, chỉ có 2L65-MG làm tăng đáng kể số lượng các tế bào tiết IgA đặc hiệu Fc IgG2a chuột trong hạch bạch huyết mạc treo ruột và lớp đệm hồi tràng và mảng Peyer ở 28 dpi. Các kết quả này cùng chứng minh rằng việc sử dụng bằng đường miệng 2L65-MG gây ra các đáp ứng miễn dịch ở ruột non và toàn thân ở lợn con.

7. Thử nghiệm cạnh tranh

Thử nghiệm cạnh tranh dựa vào phương pháp đo tế bào theo dòng được sử dụng để xác định các VHH có nhận biết các epitop tương tự trên APN hay không. Như được thể hiện trong bảng 4, mỗi VHH phong bế sự liên kết của VHH còn lại với các tế bào BHK-APN, chỉ ra rằng các VHH này là các VHH cạnh tranh liên kết với các epitop rất giống nhau.

Bảng 4: Thử nghiệm cạnh tranh dựa trên phương pháp đo tế bào theo dòng. Số liệu được trình bày dưới dạng cường độ huỳnh quang trung vị sau khi trừ đi các giá trị đối chứng.

		VHH thứ hai (2 ug/ml)		
		2L65	3L73	3L2
VHH thứ nhất (40 ug/ml)	/	2878	4063	2277
	2L65	0	243	0
	3L73	0	0	0
	3L2	191	295	0

Kết luận, sáng chế đề xuất họ các VHH có sự tương đồng trình tự cao (2L65, 3L2, 3L73) và không chỉ liên kết với các tế bào biểu hiện APN mà còn gây ra sự vận chuyển qua biểu mô ruột non. Ngoài ra, họ các VHH này có đặc điểm độc đáo là chúng có thể gây ra các đáp ứng IgA toàn thân và ở ruột sau khi sử dụng bằng đường miệng, và cụ thể là cảm ứng các tế bào IgA+ B đặc hiệu kháng nguyên.

Tài liệu tham khảo

- [1] V. Snoeck, W. Van den Broeck, V. De Colvenaer, F. Verdonck, B. Goddeeris, E. Cox, Transcytosis of F4 fimbriae by villous and dome epithelia in F4-receptor positive pigs supports importance of receptor dependent endocytosis in oral immunization strategies, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 124 (2008) 29-40.
- [2] B. Devriendt, B.G. De Geest, B.M. Goddeeris, E. Cox, Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery, *J. Control. Release*, 160 (2012) 431-439.
- [3] V. Melkebeek, K. Rasschaert, P. Bellot, K. Tilleman, H. Favoreel, D. Deforce, B.G. De Geest, B.M. Goddeeris, E. Cox, Targeting aminopeptidaza N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response, *Mucosal Immunol.*, 5 (2012) 635-645.
- [4] K. Baert, B.G. de Geest, R. de Rycke, A.B. da Fonseca Antunes, H. de Greve, E. Cox, B. Devriendt, β -glucan microparticles targeted to epithelial APN as oral antigen delivery system, *J. Control. Release*, 220 (2015) 149-159.
- [5] B. Narasimhan, J.T. Goodman, J.E. Vela Ramirez, Rational design of targeted next-generation carriers for drug and vaccine delivery, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 18 (2016) 25-49.
- [6] W.W. Cheng, T.M. Allen, The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: an update on immunoliposomal drugs for cancer treatment, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7 (2010) 461-478.
- [7] C.R. Robinson, R.T. Sauer, Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 5929-5934.
- [8] J.N. Duarte, J.J. Cragolini, L.K. Swee, A.M. Bilate, J. Bader, J.R. Ingram, A. Rashidfarrokhi, T. Fang, A. Schiepers, L. Hanke, H.L. Ploegh, Generation of immunity against pathogens via single-domain antibody-antigen constructs, *J. Immunol.*, 197 (2016) 4838-4847.
- [9] T. De Meyer, S. Muyldermans, A. Depicker, Nanobody-based products as research and diagnostic tools, *Trends Biotechnol.*, 32 (2014) 263-270.
- [10] J. Helma, M.C. Cardoso, S. Muyldermans, H. Leonhardt, Nanobodies and recombinant binders in cell biology, *J. Cell Biol.*, 209 (2015) 633-644.

- [11] S. Muyldermans, Nanobodies: natural single-domain antibodies, *Annu. Rev. Biochem.*, 82 (2013) 775-797.
- [12] Ober et al. 2001, *Intern. Immunology* 13: 1551-1559.
- [13] Drake et al. 2004, *Analytical Biochemistry* 328: 35-43.
- [14] Fraley et al. 2013, *Bioanalysis* 5: 1765-74.
- [15] Fontijn D et al., 2006, *BRITISH JOURNAL OF CANCER*, 94, 1627-1636).
- [16] Imamura, Nobutaka, 2000. *Leukemia and lymphoma*, 37, 663-667.
- [17] Xiao-Chi Jia et al. *Journal of Immunological Methods* 288: 91-98, 2004.
- [18] Miller et al. *Journal of Immunological Methods* 365: 118-125, 2011.
- [19] Davies and Riechmann, *Prot. Eng.* 9: 531-537, 1996.
- [20] Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009 Nov;36(11):1435-8.
- [21] C. Lundqvist, M.-L. Hammarström, L. Athlin, S. Hammarström, Isolation of functionally active intraepithelial lymphocytes and enterocytes from human small and large intestine, *J. Immunol. Methods*, 152 (1992) 253-263.
- [22] E. Pardon, T. Laeremans, S. Triest, S.G.F. Rasmussen, A. Wohlkönig, A. Ruf, S. Muyldermans, W.G.J. Hol, B.K. Kobilka, J. Steyaert, A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology, *Nat. Protoc.*, 9 (2014) 674-693.
- [23] T. De Meyer, B. Laukens, J. Nolf, E. Van Lerberge, R. De Rycke, A. De Beuckelaer, S. De Buck, N. Callewaert, A. Depicker, Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*, *Plant Biotechnol. J.*, 13 (2015) 938-947.
- [24] A. Coddens, M. Loos, D. Vanrompay, J.P. Remon, E. Cox, Cranberry extract inhibits in vitro adhesion of F4 and F18+ 748 *Escherichia coli* to pig intestinal epithelium and reduces in vivo excretion of pigs orally challenged with F18+ 749 verotoxigenic *E. coli*, *Vet. Microbiol.*, 202 (2017) 64-71.
- [25] B. Devriendt, M. Gallois, F. Verdonck, Y. Wache, D. Bimeczok, I.P. Oswald, B.M. Goddeeris, E. Cox, The food contaminant fumonisin B(1) reduces the maturation of porcine CD11R1(+) intestinal antigen presenting cells and antigen-specific immune responses, leading to a prolonged intestinal ETEC infection, *Vet Res*, 40 (2009) 40.

[26] E. De Genst, F. Handelberg, A. Van Meirhaeghe, S. Vynck, R. Loris, L. Wyns, S. Muyldermans, Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 53593-53601.

[27] K.E. Conrath, M. Lauwereys, M. Galleni, A. Matagne, J.-M. Frère, J. Kinne, L. Wyns, S. Muyldermans, β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (2001) 2807-2812.

[28] V. Viridi, A. Coddens, S. De Buck, S. Millet, B.M. Goddeeris, E. Cox, H. De Greve, A. Depicker, Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110 (2013) 11809-11814.

[29] K. Moonens, M. De Kerpel, A. Coddens, E. Cox, E. Pardon, H. Remaut, H. De Greve, Nanobody mediated inhibition of attachment of F18 fimbriae expressing *Escherichia coli*, *PLoS ONE*, 9 (2014) e114691.

[30] S. Bakshi, A. Depicker, B. Schepens, X. Saelens, P. Juarez, A two-amino acid mutation in murine IgA enables downstream processing and purification on staphylococcal superantigen- like protein 7, *J.768 Biotechnol.*, 294 (2019) 26-29.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), trong đó ISVD này liên kết đặc hiệu với CD13 và chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

(i) CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, và các trình tự axit amin có khác biệt axit amin ở vị trí 4, 6 và/hoặc 7 của SEQ ID NO: 1;

(ii) CDR2 là SEQ ID NO: 3; và

(iii) CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, và các trình tự axit amin có khác biệt axit amin ở vị trí 6, 10 và/hoặc 12 của SEQ ID NO: 4.

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó

(i) CDR1 được chọn từ SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(ii) CDR2 là SEQ ID NO: 3; và

(iii) CDR3 được chọn từ SEQ ID NO: 4 hoặc 5.

3. Polypeptit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ISVD này chứa kết hợp CDR1, CDR2 và CDR3 được chọn từ:

- CDR1 là SEQ ID NO: 1, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 4; hoặc

- CDR1 là SEQ ID NO: 2, CDR2 là SEQ ID NO: 3, và CDR3 là SEQ ID NO: 5.

4. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong các điểm trên, trong đó polypeptit này chứa SEQ ID NO: 6, hoặc polypeptit có tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO: 6.

5. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong các điểm trên, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, và SEQ ID NO: 8.

6. Polypeptit theo điểm bất kỳ trong các điểm trên, chứa thêm miền Fc.

7. Phân tử khảm chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, và hợp chất, cụ thể là hợp chất có hoạt tính sinh học, cụ thể hơn là kháng nguyên.

8. Axit nucleic phân lập mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

9. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 8.

10. Dược phẩm chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, phân tử khả năng theo điểm 7, axit nucleic theo điểm 8 hoặc tế bào chủ theo điểm 9, và chất mang, tá dược và/hoặc chất pha loãng dược dụng.

11. Polypeptit chứa ít nhất một miền biến đổi đơn của globulin miễn dịch (ISVD), trong đó ISVD này liên kết đặc hiệu với CD13 và chứa 3 vùng quyết định bổ sung (lần lượt là CDR1 đến CDR3), trong đó

(i) CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, và các trình tự axit amin có khác biệt axit amin ở vị trí 4, 6 và/hoặc 7 của SEQ ID NO: 1;

(ii) CDR2 là SEQ ID NO: 3; và

(iii) CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, và các trình tự axit amin có khác biệt axit amin ở vị trí 6, 10 và/hoặc 12 của SEQ ID NO: 4,

để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đường ruột, cụ thể là bệnh viêm hoặc nhiễm trùng ruột hoặc ruột non.

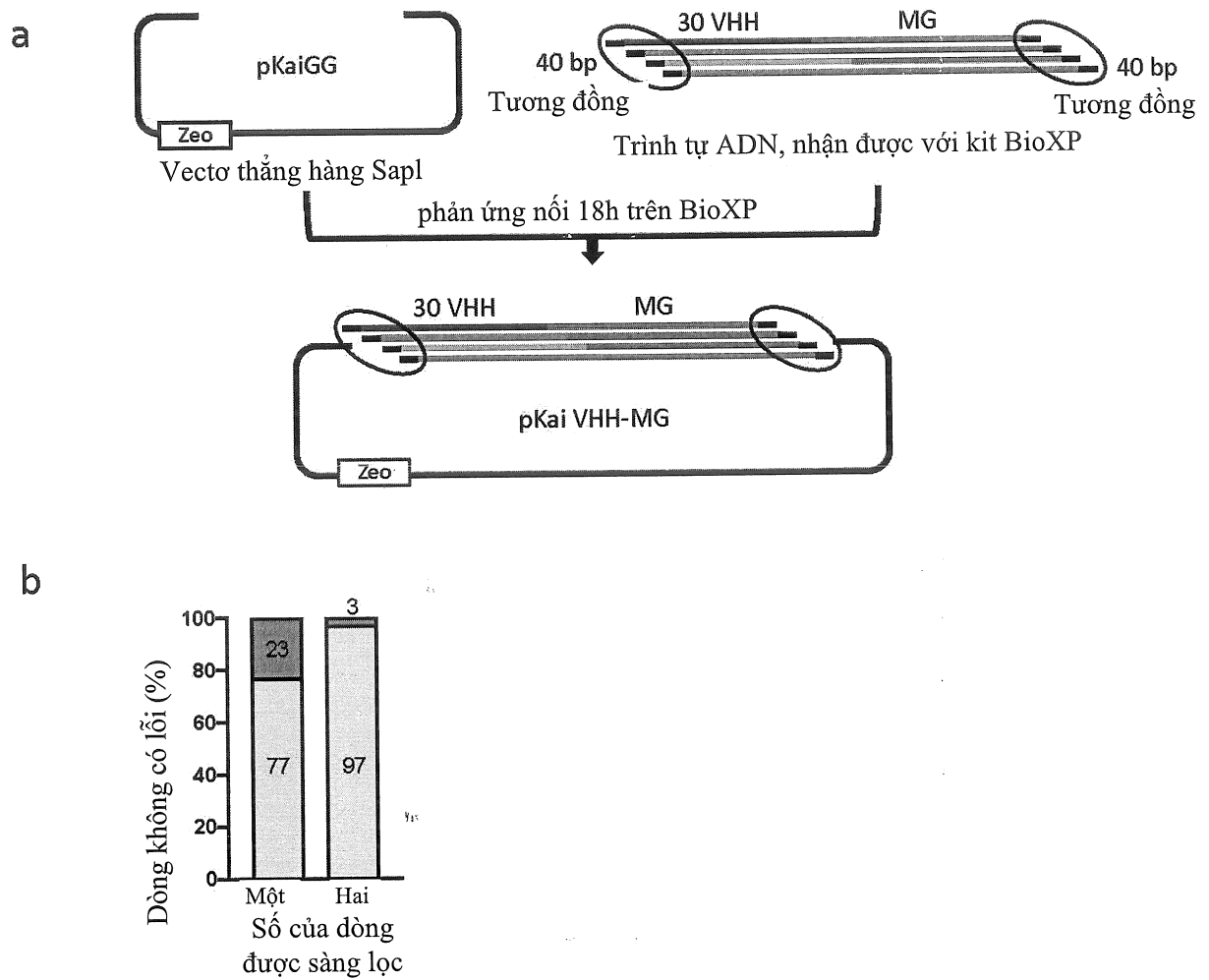
12. Quy trình sản xuất polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- đưa axit nucleic theo điểm 8 vào hệ biểu hiện *Pichia pastoris*, và
- tinh chế polypeptit đã biểu hiện.

13. Phương pháp xác định các chất cạnh tranh của polypeptit theo điểm 1, trong đó sự liên kết của chất cạnh tranh này với CD13 bị giảm ít nhất 50% khi có mặt polypeptit theo điểm 1 so với sự liên kết của chất cạnh tranh này với CD13 khi không có mặt polypeptit theo điểm 1 này.

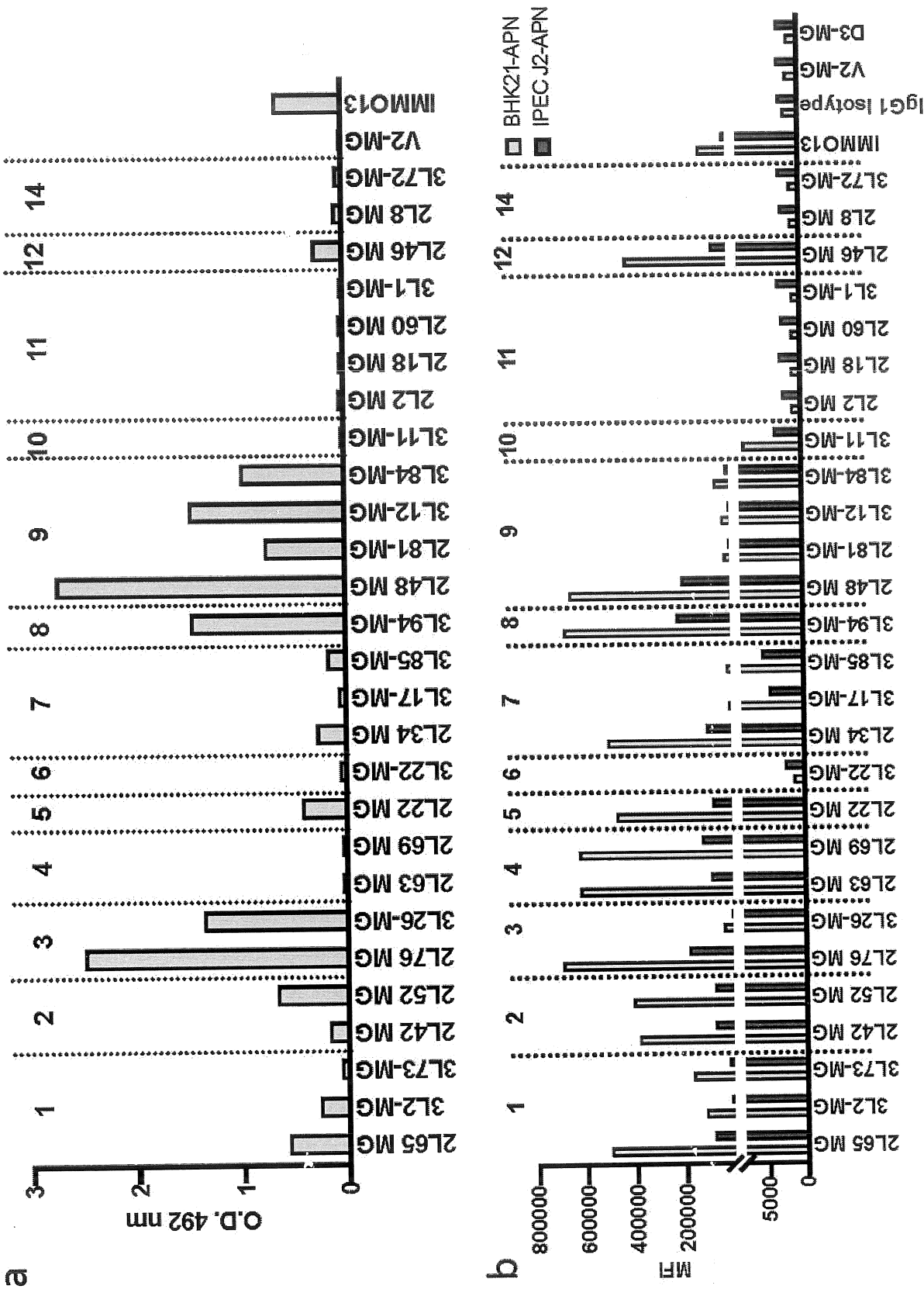
1/12

Fig. 1



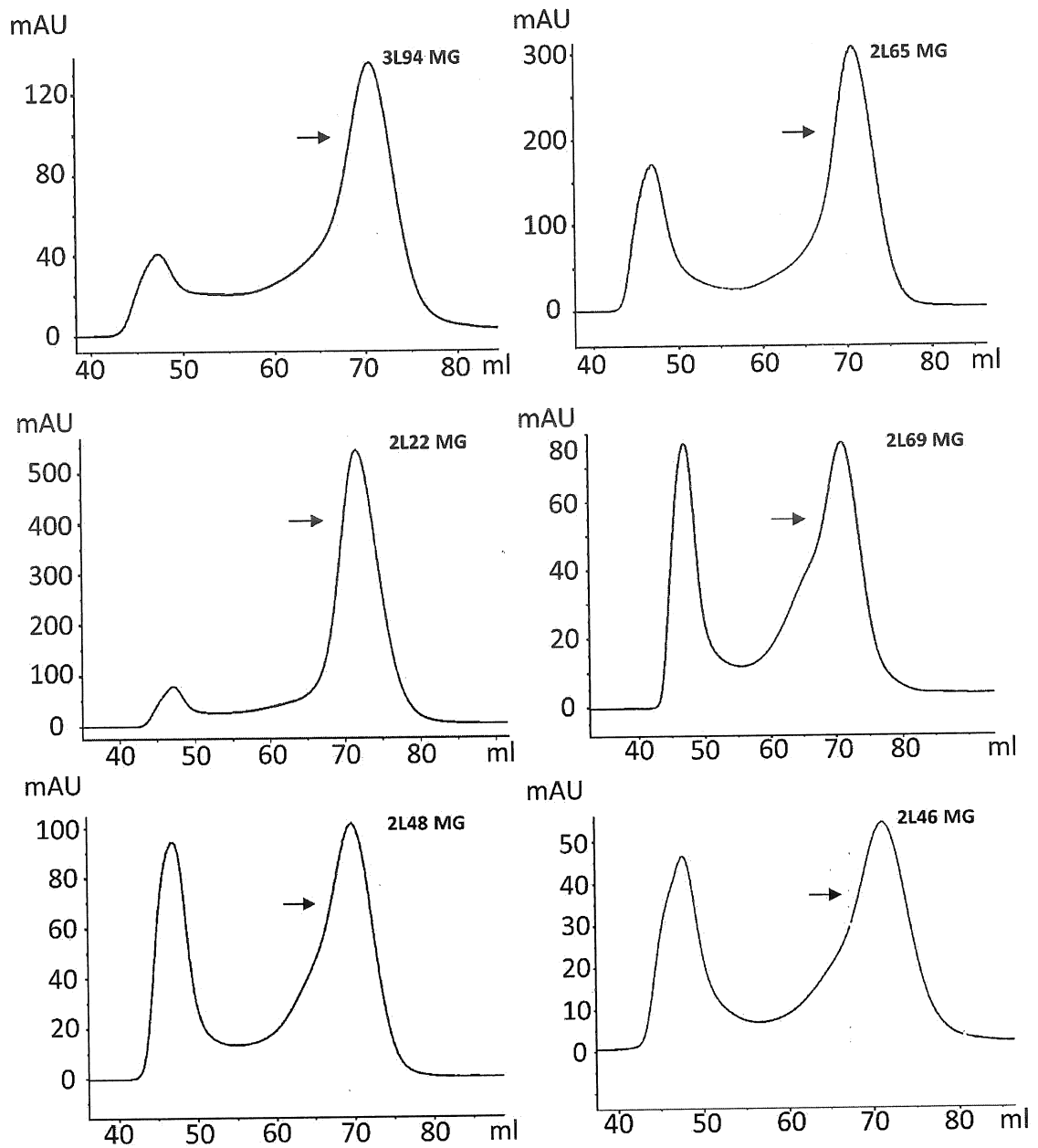
2/12

Fig. 2



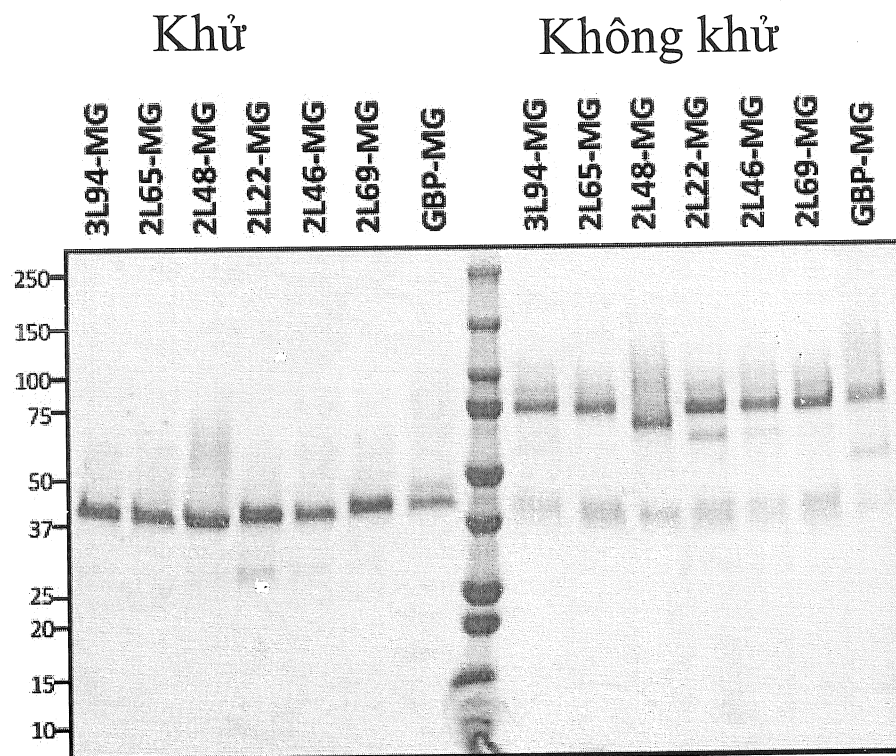
3/12

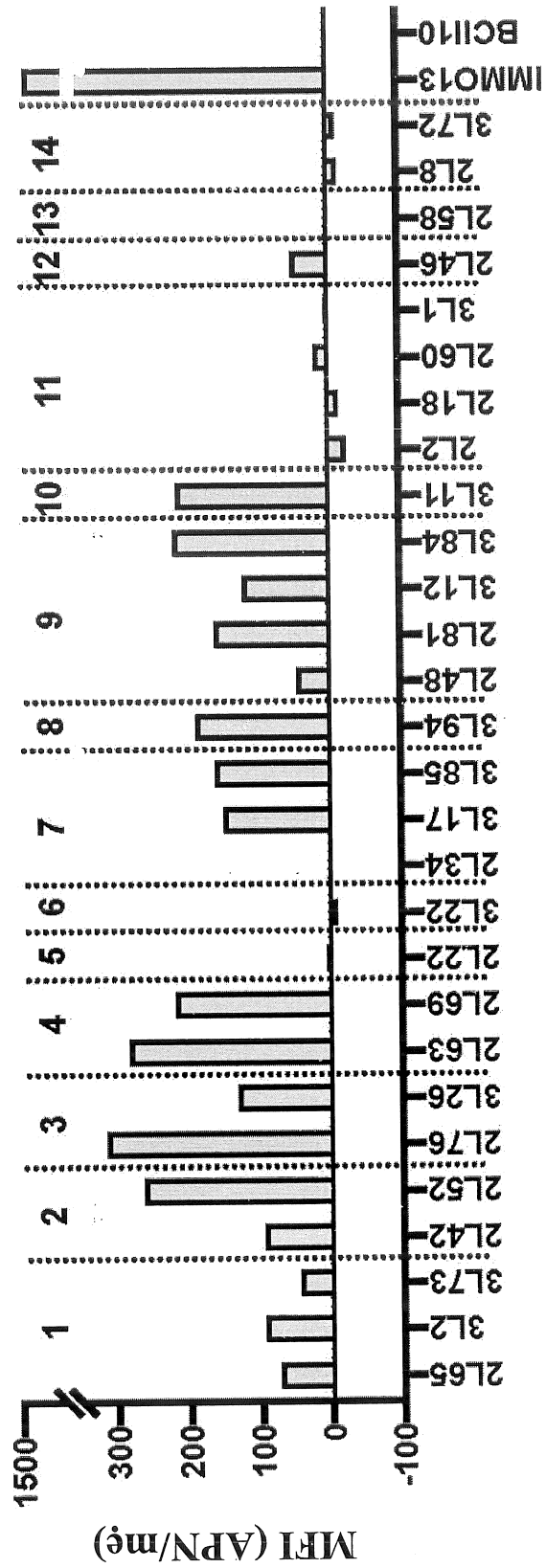
Fig. 3a



4/12

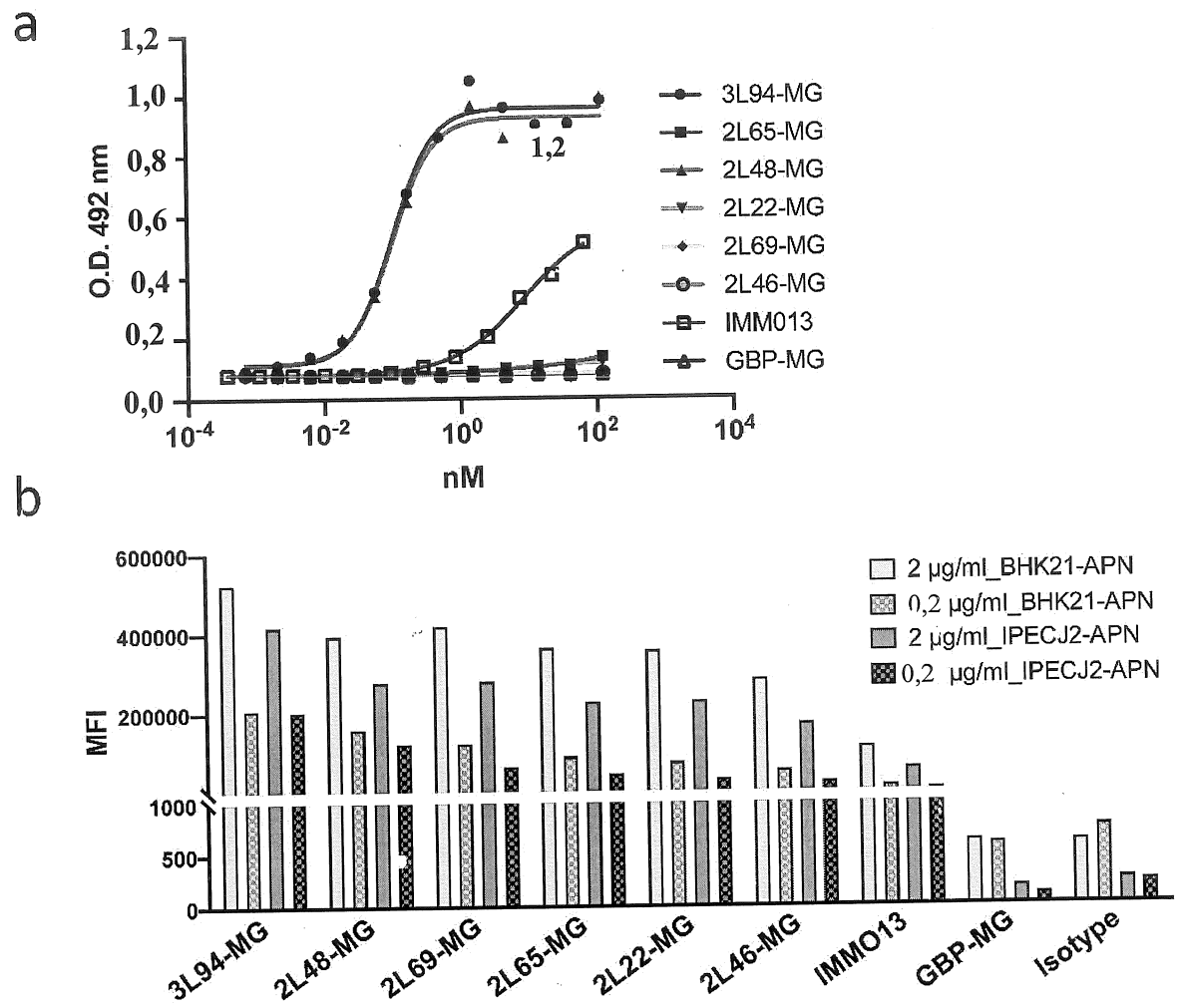
Fig. 3b





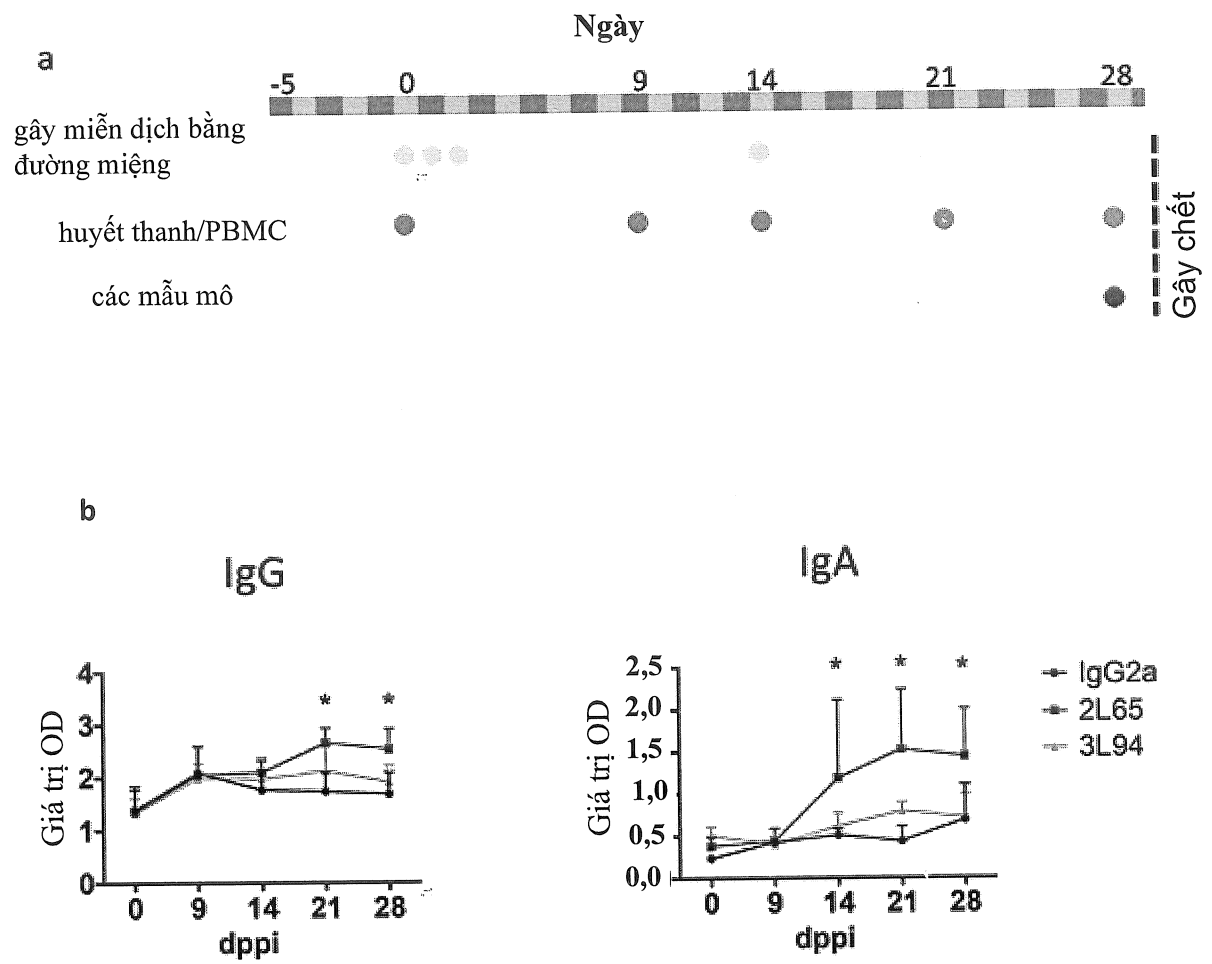
6/12

Fig. 5



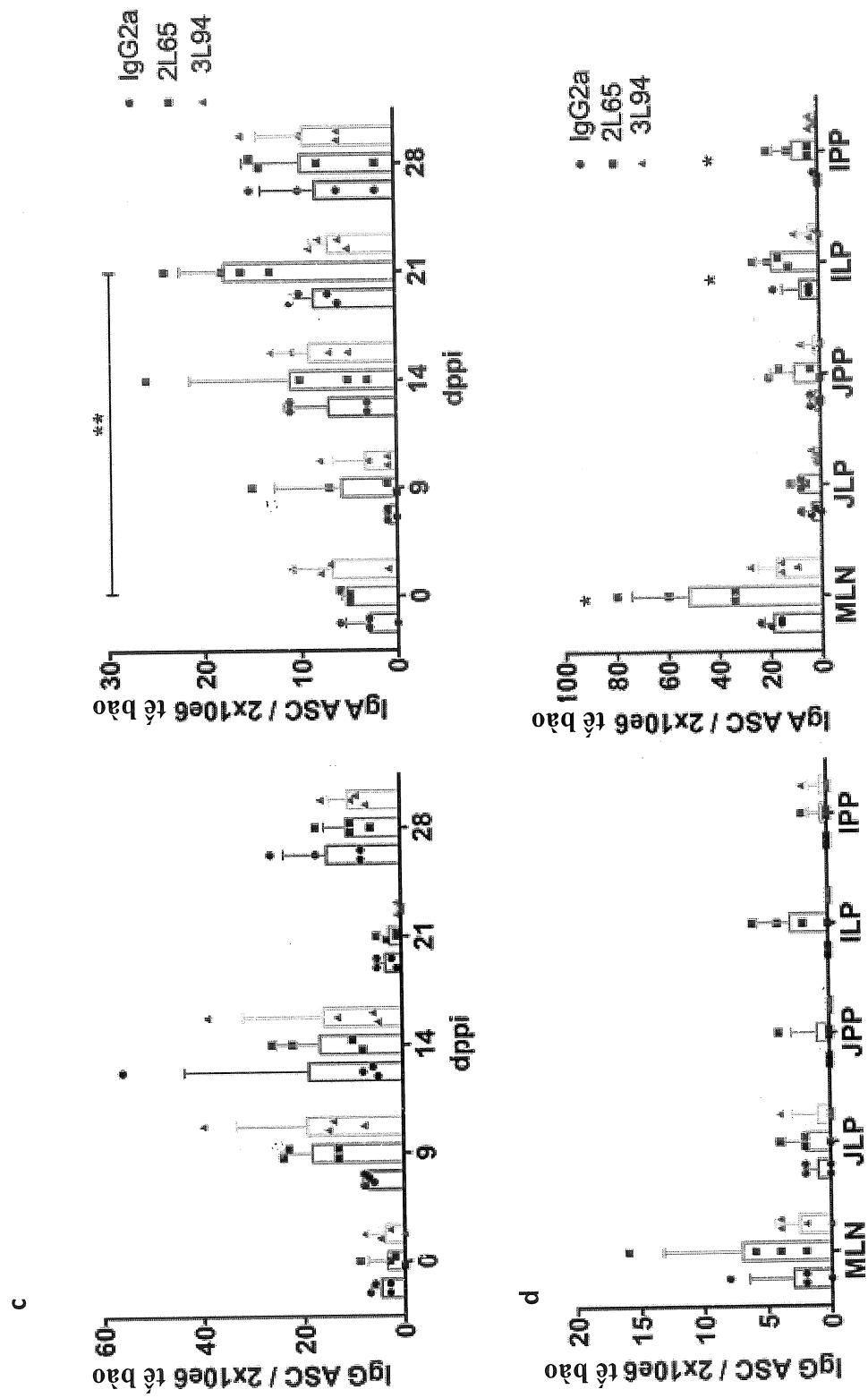
7/12

Fig. 6



8/12

Fig. 6 tiếp



9/12

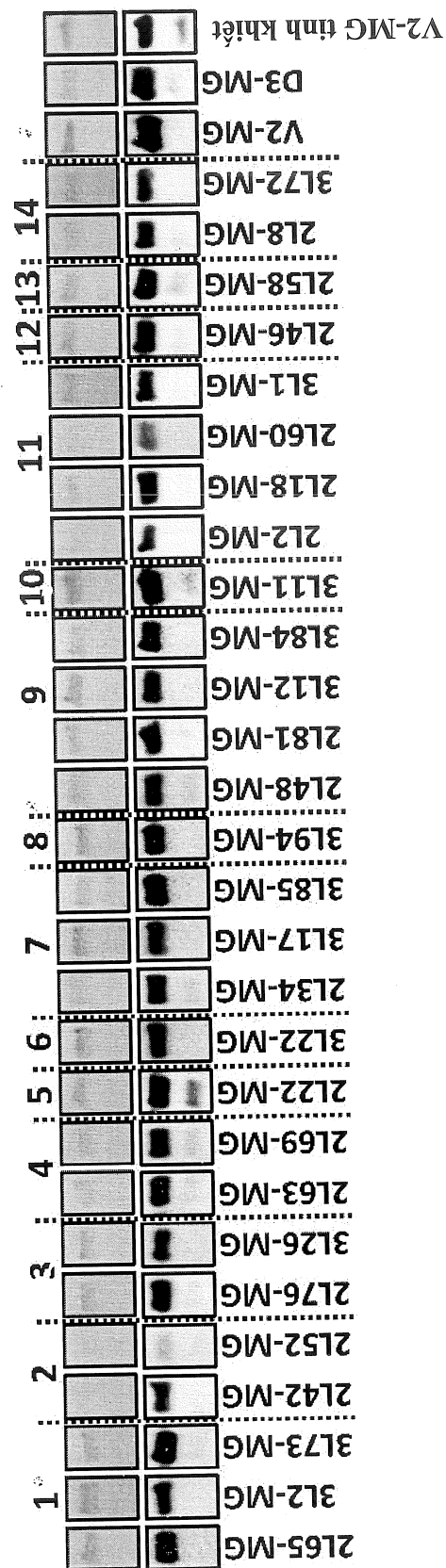


Fig. 7

10/12

Fig. 8

Fam	Dòng	Seq Id No	Trình tự axit amin
1	2L65	6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGRTISNHAMGWFRQAPGKEREF VAAISWTGLTTNYADSVKGRFFISRDDAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AARQSGYVSKFVDDYGYWGQGTQVTVSS
	3L2	7	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAGSGRTISNHAMGWFRQAPGKEREF VAAISWTGLTTNYADSVKGRFFISRDDAENTVYLQMNSLEPEDTAVYYC AARQSGYVSKFVDDYGYWGQGTQVTVSS
	3L73	8	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAISWTGLTTNYADSVKGRFFISRDDAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AARQSGYASKFLDEYGYWGQGTQVTVSS
8	3L94	9	QVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFV AYISQLSLSTKYADSVKGRFTVSRDDAQNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAT RSQNYVTYDQSRAYDYWGQGTQVTVSS
Fam	Dòng	Seq Id No	Trình tự axit nucleic
1	2L65	10	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGA GACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGACGCACTATTAGCAACCATGCCATGGGCTGGTTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCTGGACTGGACTT ACCACGAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTTCATCTCCAGAGACGACGCC GAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACGGCCGTTTAT TACTGTGCAGCCCGCCAGTCCGGTTACGTGTGAAATTCGTGATGACTATGGCTACT GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCCGTACGACGTTCC CGGACTACGGTTCACCAACCATCACCATCACTAG
	3L2	11	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGACTCTCTGA GACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGACGCACTATTAGCAACCATGCCATGGGCTGGTTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCTGGACTGGACTT ACCACGAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTTCATCTCCAGAGACGACGCC GAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACGGCCGTTTAT TACTGTGCAGCCCGCCAGTCCGGTTACGTGTGAAATTCGTGATGACTATGGCTACT GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCCGTACGACGTTCC CGGACTACGGTTCACCAACCATCACCATCACTAG
	3L73	12	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGA GACTCTCCTGCGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTAGTAATGCCATGGGCTGGTTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCTGGACTGGACTT ACCACGAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTTCATCTCCAGAGACGACGCC AAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACGGCCGTTTAT TACTGTGCAGCCCGCCAGTCCGGTTACGTGTGAAATTCCTCGATGAGTATGGCTACT GGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCCGTACGACGTTCC CGGACTACGGTTCACCAACCATCACCATCACTAG
8	3L94	13	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGTAGCCTGGGGACTCTCTGAG ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATGCCATGGGCTGGTTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCCTATATTAGTCAACTTAGTTTGAGC ACAAAGTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACGACGCCAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCGTTTAT TGTGCCACTAGGAGCCAAATTTATGTTACTACTTACGATCAGTCCAGGGCGTATGACT ACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGCGGCCGCATACCCGTACGAC GTTCCGACTACGGTTCACCAACCATCACCATCACTAG

11/12

Fig. 9

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGRTISNHAMGWFRQAPGKEREFVAAISWTGLTTNYADSVKGRFFISRD
DAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARQSGYVSKFVDDYGYWGQGTQVTVSSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG
GPSVFIFPPKIKDVLMSISPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQD
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK
TELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 17)

Fig. 10**a.**

VSETSPKIFPLTLGSSEPAGYVVIACLVRDFFPSEPLTVTWSPSREGVIVRNFPPAQAGGLYTMSSQLTL
PVEQCPADQILKCQVQHLSKSSQSVNPCKVLPSPDPCQCKPSLSLQPPALADLLGASNALSTCTLSGL
KKSEGVSTWQPSGGKDAVQASPTRDSCGCYSVSSILPGCADPWNKGETFSCTAAHSELKSALTATITKP
KVNTFRPQVHLLPPPSEELALNELVTLTCLVRGFSKDVLRWLQGGQELPRDKYLVWESLPEPGQAIPT
YAVTSVLRVDAEDWKQGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEAGICY (SEQ ID NO: 18)

b.

DPCQCKPSLSLQPPALADLLGASNALSTCTLSGLKKSEGVSTWQPSGGKDAVQASPTRDSCGCYSVSSILPGCA
DPWNKGETFSCTAAHSELKSALTATITKPKVNTFRPQVHLLPPPSEELALNELVTLTCLVRGFSKDVLRWLQGGQ
ELPRDKYLVWESLPEPGQAIPTYAVTSVLRVDAEDWKQGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
MAEAGICY (SEQ ID NO: 19)

c.

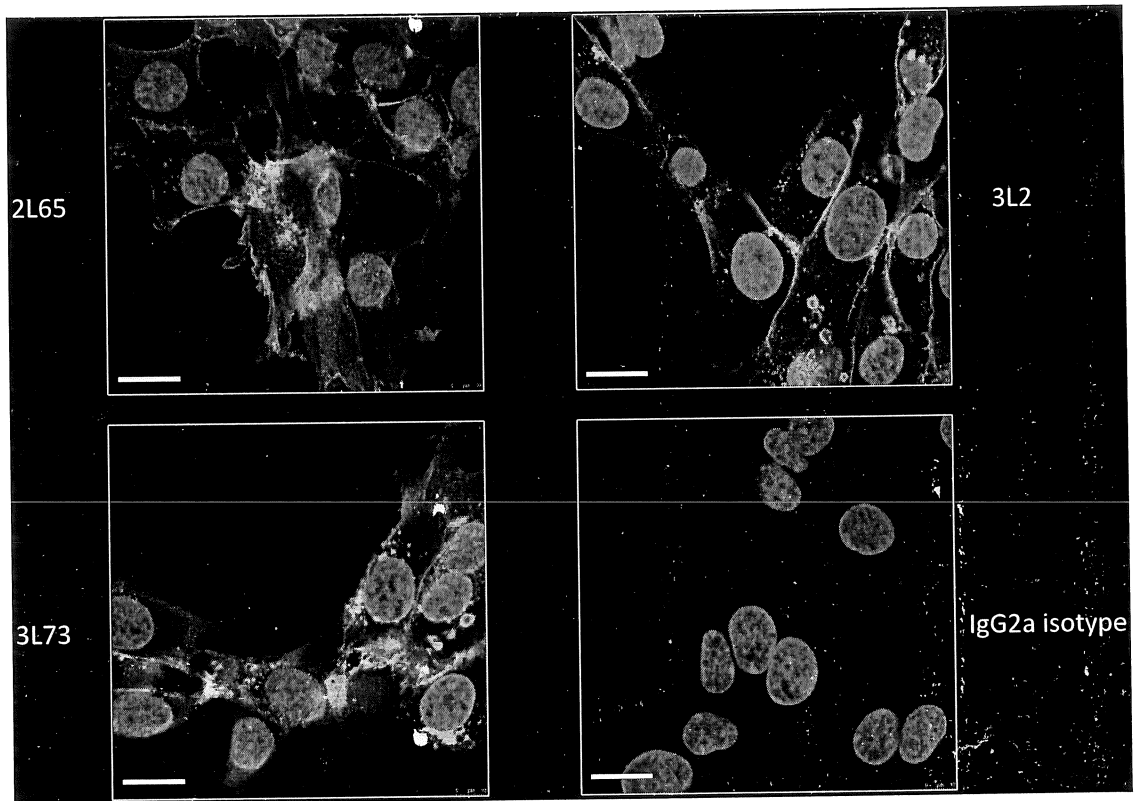
AYNTAPSVYPLAPGRDVS DHNVALGCLVSSYFPEPVTVTWNSGALSRVVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVI
VAASSLSTLSYTCNVYHPATNTKVDKRVDIEPPTPICPEICSPAAEVLGAPSVFLFPPKPKDILMISRT
PKVTCVVVDVSQEEAEVQFSWYVDGVQLYTAQTRPMEEQFNSTYRVVSVLPIQHQQDWLKGKEFKCKVNNK
DLLSPITRTISKATGPSRVPQVYTLPPAWEELSKSVSITCLVTGFYPPDIDVEWQSNGQQEPEGNYRTT
PPQQDVGTYFLYSKLAVDKVRWQRGDLFQCAVMHEALHNHYTQKSISKTQGK (SEQ ID NO: 20)

d.

APSVYPLAPGRDVS DHNVALGCLVSSYFPEPVTVTWNSGALSRVVHTFPSVLQPSGLYSLSSMVI
VAASSLSTLSYTCNVYHPATNTKVDKRVDIEPPTPICPEICSPAAEVLGAPSVFLFPPKPKDILMISRT
PKVTCVVVDVSQEEAEVQFSWYVDGVQLYTAQTRPMEEQFNSTYRVVSVLPIQHQQDWLKGKEFKCKVNNK
DLLSPITRTISKATGPSRVPQVYTLPPAWEELSKSVSITCLVTGFYPPDIDVEWQSNGQQEPEGNYRTT
PPQQDVGTYFLYSKLAVDKVRWQRGDLFQCAVMHEALHNHYTQKSISKTQGK (SEQ ID NO: 21)

12/12

Fig. 11



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Universiteit Gent

<120> Polypeptit và dược phẩm chứa kháng thể miễn đơn của globulin miễn dịch

<130> P2020/004 PCT

<150> EP20152428.7

<151> 2020-01-17

<160> 21

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 1

Gly	Arg	Thr	Ile	Ser	Asn	His	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 2

Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Asn	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 3

Ala Ile Ser Trp Thr Gly Leu Thr Thr Asn
1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 4

Arg Gln Ser Gly Tyr Val Ser Lys Phe Val Asp Asp Tyr Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 5

Arg Gln Ser Gly Tyr Ala Ser Lys Phe Leu Asp Glu Tyr Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 6

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asp Ala Glu 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 Arg Gln Ser Gly Tyr Val Ser Lys Phe Val Asp Asp Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 7

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asp Ala Glu Asn Thr Val Tyr

4

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

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Kháng thể miễn đơn

 <400> 9

Gln Val Gln Leu Gln 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 Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Arg Ser Gln Asn Tyr Val Thr Thr Tyr Asp Gln Ser Arg Ala
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10
 <211> 432
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 10

```

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag gctctggacg cactattagc aaccatgcca tgggctgggtt ccgccaggct      120
ccagggaagg agcgcgagtt tgtagcagct attagctgga ctggacttac cacgaactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcttcac tccagagacg acgccgagaa cacggtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaagac acggccggtt attactgtgc agcccgccag      300
tccggttacg tgtcgaaatt cgtcgatgac tatggctact ggggccaggg gaccagggtc      360
accgtctcct cagcggccgc ataccgtac gacgttccgg actacggttc ccaccacat      420
caccatcact ag      432

```

<210> 11

<211> 432

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 11

```

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggactc tctgagactc      60
tcctgtgcag gctctggacg cactattagc aaccatgcca tgggctgggtt ccgccaggct      120
ccagggaagg agcgcgagtt tgtagcagct attagctgga ctggacttac cacgaactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcttcac tccagagacg acgccgagaa cacggtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgga acctgaagac acggccggtt attactgtgc agcccgccag      300
tccggttacg tgtcgaaatt cgtcgatgac tatggctact ggggccaggg gaccagggtc      360
accgtctcct cagcggccgc ataccgtac gacgttccgg actacggttc ccaccacat      420
caccatcact ag      432

```

<210> 12

<211> 432

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 12

```

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc      60
tcctgcgagc cctctggacg caccttcagt agtaatgcca tgggctgggtt ccgccagggt      120
ccagggaagg agcgcgagtt tgtagcagct attagctgga ctggacttac cacgaactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcttcacg tccagagacg acgccaagaa cacggtgtat      240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaagac acggccgttt attactgtgc agcccggccag      300
tccggttacg cgtcgaaatt cctcgatgag tatggctact ggggccaggg gaccagggtc      360
accgtctcct cagcggccgc ataccgtac gacgttcgag actacgggtc ccaccacat      420
caccatcact ag                                                                432

```

<210> 13

<211> 438

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể miễn đơn

<400> 13

```

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgtagc ctgggggactc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt acctatgcca tgggctgggtt ccgccagggt      120
ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcctat attagtcaac ttagtttgag cacaaagtat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagacg acgcccagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagtctgag acctgaggac acggccgtgt attactgtgc cactaggagc      300
caaaattatg ttactactta cgatcagtcc agggcgatatg actactgggg ccagggggacc      360
caggtcaccg tctcctcagc ggccgcatac ccgtacgacg ttccggacta cggttcccac      420
caccatcacc atcactag                                                                438

```

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 14

Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Gly
1				5					10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 15

Tyr	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Leu	Ser	Thr	Lys
1				5					10

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự CDR

<400> 16

Arg	Ser	Gln	Asn	Tyr	Val	Thr	Thr	Tyr	Asp	Gln	Ser	Arg	Ala	Tyr	Asp
1				5					10					15	

Tyr

<210> 17

<211> 357

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thể dung hợp VHH-MG

<400> 17

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

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

210 215 220
 Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln
 260 265 270
 Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr
 275 280 285
 Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
 290 295 300
 Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
 340 345 350
 Arg Thr Pro Gly Lys
 355
 <210> 18
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> miền Fc của lộn
 <400> 18
 Val Ser Glu Thr Ser Pro Lys Ile Phe Pro Leu Thr Leu Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Gly Tyr Val Val Ile Ala Cys Leu Val Arg Asp Phe Phe
20 25 30

Pro Ser Glu Pro Leu Thr Val Thr Trp Ser Pro Ser Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ile Val Arg Asn Phe Pro Pro Ala Gln Ala Gly Gly Leu Tyr Thr Met
50 55 60

Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Val Glu Gln Cys Pro Ala Asp Gln Ile
65 70 75 80

Leu Lys Cys Gln Val Gln His Leu Ser Lys Ser Ser Gln Ser Val Asn
85 90 95

Val Pro Cys Lys Val Leu Pro Ser Asp Pro Cys Pro Gln Cys Cys Lys
100 105 110

Pro Ser Leu Ser Leu Gln Pro Pro Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Gly
115 120 125

Ser Asn Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Leu Lys Lys Ser Glu
130 135 140

Gly Val Ser Phe Thr Trp Gln Pro Ser Gly Gly Lys Asp Ala Val Gln
145 150 155 160

Ala Ser Pro Thr Arg Asp Ser Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Ile
165 170 175

Leu Pro Gly Cys Ala Asp Pro Trp Asn Lys Gly Glu Thr Phe Ser Cys
180 185 190

Thr Ala Ala His Ser Glu Leu Lys Ser Ala Leu Thr Ala Thr Ile Thr
195 200 205

Lys Pro Lys Val Asn Thr Phe Arg Pro Gln Val His Leu Leu Pro Pro
210 215 220

Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu
225 230 235 240

Val Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly
245 250 255

Gly Gln Glu Leu Pro Arg Asp Lys Tyr Leu Val Trp Glu Ser Leu Pro
260 265 270

Glu Pro Gly Gln Ala Ile Pro Thr Tyr Ala Val Thr Ser Val Leu Arg
275 280 285

Val Asp Ala Glu Asp Trp Lys Gln Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val
290 295 300

Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg
305 310 315 320

Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu
325 330 335

Ala Glu Gly Ile Cys Tyr
340

<210> 19

<211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạc

<220>

<223> miền Fc của lợn

<400> 19

Asp Pro Cys Pro Gln Cys Cys Lys Pro Ser Leu Ser Leu Gln Pro Pro
1 5 10 15

Ala Leu Ala Asp Leu Leu Leu Gly Ser Asn Ala Ser Leu Thr Cys Thr
20 25 30

Leu Ser Gly Leu Lys Lys Ser Glu Gly Val Ser Phe Thr Trp Gln Pro

35	40	45
Ser Gly Gly Lys Asp Ala Val Gln Ala Ser Pro Thr Arg Asp Ser Cys		
50	55	60
Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Ile Leu Pro Gly Cys Ala Asp Pro Trp		
65	70	75
Asn Lys Gly Glu Thr Phe Ser Cys Thr Ala Ala His Ser Glu Leu Lys		
	85	90
Ser Ala Leu Thr Ala Thr Ile Thr Lys Pro Lys Val Asn Thr Phe Arg		
	100	105
Pro Gln Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn		
	115	120
Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp		
130	135	140
Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Gly Gln Glu Leu Pro Arg Asp Lys		
145	150	155
Tyr Leu Val Trp Glu Ser Leu Pro Glu Pro Gly Gln Ala Ile Pro Thr		
	165	170
Tyr Ala Val Thr Ser Val Leu Arg Val Asp Ala Glu Asp Trp Lys Gln		
	180	185
Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala		
195	200	205
Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val		
210	215	220
Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Ala Glu Gly Ile Cys Tyr		
225	230	235

<210> 20

<211> 333

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền Fc của lộn

<400> 20

Ala Tyr Asn Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Cys Gly Arg
 1 5 10 15

Asp Val Ser Asp His Asn Val Ala Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Arg
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Met Val Ile Val Ala Ala Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Tyr His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Asp Ile Glu Pro Pro Thr Pro Ile Cys Pro Glu Ile Cys Ser
 100 105 110

Cys Pro Ala Ala Glu Val Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Lys Val Thr
 130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Glu Ala Glu Val Gln Phe Ser
 145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Leu Tyr Thr Ala Gln Thr Arg Pro Met
 165 170 175

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile
 180 185 190

Gln His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
 195 200 205

Asn Lys Asp Leu Leu Ser Pro Ile Thr Arg Thr Ile Ser Lys Ala Thr
 210 215 220

Gly Pro Ser Arg Val Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ala Trp Glu
 225 230 235 240

Glu Leu Ser Lys Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe
 245 250 255

Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu
 260 265 270

Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly
 275 280 285

Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Val Arg Trp Gln
 290 295 300

Arg Gly Asp Leu Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 305 310 315 320

His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Gln Gly Lys
 325 330

<210> 21

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền Fc của lộn

<400> 21

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Cys Gly Arg Asp Val Ser Asp

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

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