



등록특허 10-2802241



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월07일

(11) 등록번호 10-2802241

(24) 등록일자 2025년04월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7019053
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월02일
심사청구일자 2021년11월30일
- (85) 번역문제출일자 2018년07월03일
- (65) 공개번호 10-2018-0081825
- (43) 공개일자 2018년07월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/079575
- (87) 국제공개번호 WO 2017/093478
국제공개일자 2017년06월08일
- (30) 우선권주장
15197999.4 2015년12월04일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020130066631 A
WO2011119661 A1
KR1020140001216 A
- (73) 특허권자
베링거 인겔하임 인터내셔널 게엠베하
독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
- (72) 발명자
진잘라 비토리아
독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
베링거 인겔하임 게엠베하/ 코포레이트 페이턴츠
쿠엔켈레 클라우스-피터
독일 55216 인겔하임 암 라인 빙거 슈트라쎄 173
베링거 인겔하임 게엠베하/ 코포레이트 페이턴츠
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

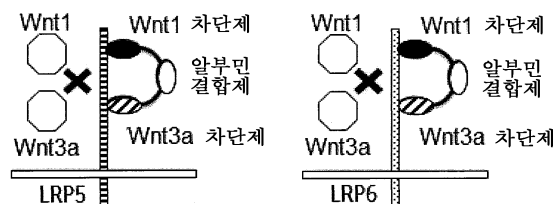
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **중양 세포에서 WNT 신호 전달을 길항하는 바이파라토픽 폴리펩타이드**

(57) 요약

본 발명은 신규한 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 폴리펩타이드, 보다 상세하게는 Wnt 신호 전달 경로를 억제할 수 있는 신규한 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 면역글로불린 단일 가변 도메인 작제물을 제공한다. 본 발명은 또한 암과 같은 질환의 치료 방법을 포함하여 이러한 폴리펩타이드의 특정 서열, 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/62 (2013.01)
C07K 2317/70 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자

뷔즈 마리-앙주

벨기에 9052 즈비나드 테크놀로지바 21 아블링스
엔.브이.

크로미 카렌

벨기에 9052 즈비나드 테크놀로지바 21 아블링스
엔.브이.

스타엘렌스 스테파니

벨기에 9052 즈비나드 테크놀로지바 21 아블링스
엔.브이.

스트루브 비트라이스

벨기에 9052 즈비나드 테크놀로지바 21 아블링스
엔.브이.

명세서

청구범위

청구항 1

저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 5 (LRP5) 및 저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 6 (LRP6)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: TYTVG (= 서열번호 1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= 서열번호 2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= 서열번호 3)

및

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: SYAMG (= 서열번호 10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 11)

CDR3: SPIPYGSLLRRRNNDY (= 서열번호 12)

을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 2

저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 5 (LRP5) 및 저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 6 (LRP6)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: SYAMG (= 서열번호 4)

CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= 서열번호 5)

CDR3: ARVRSSSTRYNTGTWWWEY (= 서열번호 6)

및

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEE (= 서열번호 15)

을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 3

저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 5 (LRP5) 및 저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 6 (LRP6)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드로서, 상기 폴리펩타이드는

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: RYTMG (= 서열번호 7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= 서열번호 9)

및

- 다음 CDR 서열들을 포함함으로써 정의되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:

CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= 서열번호 15)

을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인이 사람화 VHH 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

- 상기 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 19에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖고,
- 상기 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 22에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 6

제2항에 있어서,

- 상기 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 20에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖고,
- 상기 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 7

제3항에 있어서,

- 상기 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 21에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖고,
- 상기 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는, 폴리펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인이 링커 펩타이드에 의해 공유적으로 연결되어 있고, 여기서, 상기 링커 펩타이드는 제3 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 제3 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 이루어지는, 폴리펩타이드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제3 면역글로불린 단일 가변 도메인이 서열번호 24에 의해 정의되는 A1b11 도메인인, 폴리펩타이드.

청구항 10

서열번호 25, 서열번호 26 및 서열번호 27을 포함하거나 이들 서열번호들로 이루어진 폴리펩타이드들의 그룹으로부터 선택되는 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제3항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제11항에 따른 발현 벡터를 운반하는 단리된 숙주 세포.

청구항 13

제1항 내지 제3항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드의 시험관내 제조 방법으로서, 상기 제조 방법은

- 제1항 내지 제3항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건하에서 제1항 내지 제3항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 운반하는 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

- 상기 폴리펩타이드를 회수 및 정제하는 단계

를 포함하는, 폴리펩타이드의 시험관내 제조 방법.

청구항 14

(i) 활성 성분으로서 제1항 내지 제3항 및 제10항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드, (ii) 약제학적으로 허용되는 담체, 및 (iii) 희석제, 부형제, 아쥘반트 및/또는 안정화제를 포함하는, 암, 특발성 폐 질환, 또는 비정상적 Wnt 신호 전달에 의해 초래된 망막병증의 치료, 예방 또는 완화에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 유방암, 폐암, 췌장암, 대장암, 육종, 난소암 또는 간세포 암종의 치료에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-BTLA 항체, 항-LAG3 항체 및 항-TIM3 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 면역 체크포인트 억제제와 조합하거나 암 백신과 조합하여 암 치료에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 5 (LRP5) 및 저밀도 지질단백질 수용체-유사 단백질 6 (LRP6) 결합 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산; 이러한 폴리펩타이드를 제조하는 방법; 이러한 폴리펩타이드를 발현하거나 발현할 수 있는 숙주 세포; 이러한 폴리펩타이드를 포함하는 조성물; 및 이러한 폴리펩타이드 또는 이러한 조성물의 용도, 특히 암 질환 분야에서의 치료 목적을 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Wnt 신호 전달 경로의 활성화는 Frizzled 수용체, 및 공동 수용체 LRP5 (승인 번호: UniProtKB - 075197/LRP5_HUMAN) 또는 이의 밀접하게 관련된 동족체 LRP6 (승인 번호: UniProtKB - 075581/LRP6_HUMAN)에 대한 세포의 Wnt 리간드의 결합을 필요로 한다. 포유동물 세포에는 19개의 Wnt 단백질 및 10개의 Frizzled 수용체가 존재한다. Wnt 리간드의 부재하에서, 세포질 베타-카테닌은 스캐폴딩 단백질 Axin 및 APC 및 키나제 GSK3베타 및 CK1a로 이루어진 단백질 복합체에 의해 인산화된다. 유비퀴틴 리가제 베타-TrcP에 의한 후속적 인식은 베타-카테닌의 유비퀴틴-매개된 분해를 유도한다. Wnt 리간드의 존재하에서, Frizzled 및 LRP5 또는 LRP6에 대한 Wnt의 결합은 세포질 이펙터 단백질 Dvl의 동원 및 Axin에 대한 도킹 부위를 제공하는 LRP5 또는 LRP6 세포질 꼬리의 인산화를 유도한다. LRP5 또는 LRP6에 의한 Axin 격리는 Axin-APC-GSK3베타 복합체의 불활성화를 유도함으로써, 세포내 베타-카테닌 안정화 및 축적을 유도한다. 따라서, 베타-카테닌의 세포질 수준이 증가하고, 베타-카테닌이 핵으로 이동하여 전사 인자들의 T 세포 인자 (TCF)/림프구 인핸서-결합 인자 (LEF) 계열의 구성원과 복합체를 형성한다. 이어서, cAMP 반응 요소-결합 단백질 (CREB)-결합 단백질 (CBP) 또는 이의 동족체 p300을 포함한 기초 전사 기구 및 전사 공동 활성인자가 동원되어, Axin2, 사이클린 D1 및 c-Myc을 포함한 각종 표적 유전자의 발현을 유도한다.

[0003] 리간드-의존성 Wnt 경로 조절의 추가적 수준은 E3 리가제 RNF43 및 이의 밀접하게 관련된 동족체 ZNRF3에 의해 매개되고, 분비된 R-스폰딘 단백질에 의해 매개된다 (문헌 [de Lau *et al.* "The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength". *Genes Dev.* 2014; 28(4): 305-16] 참조). RNF43은 세포 표면에서 Frizzled/LRP5 또는 LRP6 수용체 복합체의 유비퀴틴화를 매개하여 이의 분해를 유도하고, 이로 인해 리간드-의존성 Wnt 경로 활성을 억제한다. RNF43의 활성화는 R 스폰딘 계열 구성원 (R-스폰딘 1 내지 4 리간드)에 의해 제

거된다. R-스폰딘 리간드가 존재할 때, 이것은 세포 표면으로부터 RNF43을 제거하여, Wnt 리간드의 존재하에서 Frizzled/LRP5 또는 LRP6 복합체가 Wnt 신호 전달을 촉진 및 증강하는 것을 가능하게 한다.

[0004]

LRP5 및 LRP6 기능은 리간드 의존성 Wnt 신호 전달 활성화의 게이트키퍼로서 기능함으로써, 19개의 Wnt 리간드와 10개의 Frizzled 수용체 모두에 의해 매개되고 R-스폰딘 리간드에 의해 증강된 경로의 완전한 차단을 달성하기 위한 표적으로서 고려될 수 있다. 특히, Wnt 리간드는 Wnt1 클래스 및 Wnt3a 클래스로 분류될 수 있으며, 각각은 신호 전달을 위한 LRP5 및 LRP6의 상이한 에피토프/영역에 결합한다. LRP5 및 LRP6의 엑토도메인은 EGF-유사 도메인에 연결된 베타-프로펠러의 4개의 반복 단위를 포함하고, 3개의 LDLR-유형 A 반복이 뒤따른다. LRP5와 LRP6의 구조 분석과 기능 분석의 조합은 Wnt1 (Wnt1-클래스 리간드)이 베타-프로펠러 1 및 2를 함유하는 단편에 결합하고, Wnt3a가 LRP6의 베타-프로펠러 3 및 4를 함유하는 단편에 결합한다는 것을 제안한다. 지금까지, 베타-프로펠러의 1 내지 4 영역을 함유하는 LRP6 엑토도메인의 저해상도 사진만이 보고되었다 (문헌 [Ahn *et al.* "Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6". *Dev Cell*. 2011; 21(5):862-73] 참조). 그러나, 이들 저해상도 재구성 (40 Å)의 불확실성 및 Wnt 리간드와의 복합체 중의 LRP6 엑토도메인의 구조 데이터의 부재로 인해, Wnt1 또는 Wnt3a 리간드 결합에 관여된 정확한 에피토프를 정의할 수 없다.

[0005]

Wnt 신호 전달의 과활성화는 각종 유형의 암의 발병 기전에 관여되어 있다. 일부 암 유형에서, 다운스트림 신호 전달 분자의 빈번한 돌연변이는 구성적으로 활성화된 Wnt 경로에 기여한다 (예를 들어, 대장암에서의 APC 돌연변이; 간 세포 암종에서의 베타-카테닌 활성 돌연변이). 대조적으로, 삼중 음성 유방암 (TNBC), 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 췌장 선암종에서의 대장암 (CRC) 및 자궁내막암의 서브셋에서, Wnt 신호 전달 활성화는 베타-카테닌 세포내 축적에 의해 검출되는 바와 같이 리간드 의존성 기작에 의해 (즉, 자가분비/주위분비 Wnt 활성화에 의해) 구동된다. NSCLC, TNBC 및 췌장 선암종에서, 리간드 의존성 Wnt 활성화는 Wnt 리간드 및/또는 LRP5 및 LRP6 수용체의 발현 증가 또는 LRP5 및 LRP6 음성 조절인자 DKK1의 사일런싱을 포함하는 복수의 기작에 의해 매개된다 (TNBC: 문헌 [TNBC: 문헌 [Liu *et al.* "LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (11):5136-41]; [Khramtsov *et al.* "Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome". *Am J Pathol*. 2010; 176(6): 2911-20]; NSCLC: 문헌 [Nakashima *et al.* "Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients". *Oncol Rep*. 2008; 19(1):203-9]; 췌장암: 문헌 [Zhang *et al.* "Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis". *Cancer Res*. 2013; 73(15):4909-22] 참조). 특히, 공개된 데이터는 건강한 조직 (예를 들어, 유방 및 폐 상피)에서는 베타-카테닌이 원형질막에만 국한되어 있다는 것을 나타냈다. 대조적으로, TNBC, NSCLC 및 췌장 선암종의 주요 임상 샘플의 대부분은 비정상적인 Wnt 신호 전달로 인해 베타-카테닌의 세포내 축적 (즉, 세포질/핵에서; Wnt 신호 전달 활성화의 바이오마커)을 나타냈다. 최근 간행물은 리간드 의존성 Wnt 신호 전달 활성화가 CRC 및 자궁내막암의 서브셋에서 돌연변이된/불활성화된 RNF43에 의해 (문헌 [Giannakis *et al.* "RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers". *Nat Genet*. 2014; 46(12):1264-6] 참조) 또는 R-스폰딘 융합 전사물 (구성적으로 활성인 강력한 프로모터에 의해 구동된 R-스폰딘2 또는 R-스폰딘3 단백질을 암호화함; 문헌 [Seshagiri *et al.* "Recurrent R-spondin fusions in colon cancer". *Nature* 2012; 488(7413):660-4] 참조)을 활성화시킴으로써 매개된다. RNF43 돌연변이 및 R-스폰딘 융합 전사물의 불활성화는 둘다 세포 표면에서 Frizzled의 존재비(abundance)를 증가시킴으로써 시험관내에서 리간드 의존성 Wnt 신호 전달을 증가시키는 것으로 나타났다. 종양에서의 리간드 의존성 Wnt 활성화는 화학요법 또는 면역요법에 대한 내성 및 종양 성장을 구동시키는 것으로 나타났으며, 전임상 모델에서의 재발과 관련이 있다.

[0006]

Wnt 신호 전달 경로를 조절할 수 있는 일부 LRP5 또는 LRP6 결합 분자는 당해 분야에 공지되어 있다:

[0007]

Dickkopf-1 (DKK1)은 LRP5 및 LRP6 억제제이다. DKK1은 Wnt 공동 수용체인 LRP5와 LRP6 둘 다와 결합하며, 막 관통 단백질인 Kremen은 Wnt 신호 전달을 억제하고 신속한 LRP5 및 LRP6 내재화를 유도한다. DKK1은 Wnt1과 Wnt3a 매개된 신호 전달 둘 다를 억제하는 것으로 나타났다. 구조 모델링 연구는 단일 DKK1 분자가 (베타-프로펠러 1 내지 3으로부터의) LRP6 엑토도메인의 확장된 영역에 협력하여 결합한다는 것을 나타낸다. 구조 분석은 LRP6 엑토도메인의 형태 변화를 통해 베타-프로펠러 1 및 2 영역에 대한 상호작용/결합을 용이하게 하는 베타-프로펠러 3 영역에 대한 초기 결합으로 LRP6과의 DKK1 협동 결합-상호작용을 제안한다. 그러나, LRP6에 대한 DKK1 결합에 연루된 β-프로펠러 1, 2 및 3 도메인 내의 정의된 에피토프의 해명은 언급된 바와 같이 DKK1에 결합된 완전한 LRP6 엑토도메인의 구조적 재구성의 낮은 해상도로 인해 부족하다.

- [0008] 생체내 DKK1 처리는 위장관에서 심각한 독성을 일으키는 것으로 나타났다. 특히, 성인 마우스에서의 DKK1의 아테노바이러스 매개된 발현은 대장암 및 전신 감염으로 부터 진행성 구조적 변성, 심각한 체중 감소 및 사망을 수반하는 소장 및 결장에서의 증식을 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. 특히, LRP5 및 LRP6은 장내 증식성 상피 세포에서 발현되며 장 상피의 증식에 필요한데, 이는 LRP5 및 LRP6 억제가 이 정상 조직 및 다른 정상 조직에 대해 독성을 가질 수 있다는 것을 제시한다 (문헌 [Zhong *et al.* "Lrp5 and Lrp6 play compensatory roles in mouse intestinal development". *J Cell Biochem.* 2012; 113(1):31-8] 참조). 이것은 LRP5 및 LRP6을 억제하거나 Wnt (Wnt1 및 Wnt3a) 신호 전달 경로를 일반적으로 억제하는 제제가 치료 목적을 위해 사용될 수 있는지 여부, 예를 들어, 항암제로 개발될 수 있는지 여부를 의심스럽게 만든다.
- [0009] 국제공개공보 WO 2009/056634에는 Wnt1 신호 전달 경로 또는 Wnt3/3a 신호 전달 경로와 상호 작용할 수 있는 LRP6 결합 분자가 언급되어 있는데, 이는 길항적 또는 작용적일 수 있으며 진단 목적을 위해 또는 골관절염, 다낭성 신장 질환 또는 암과 같은 "Wnt 신호 전달-관련 장애"를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 아미노산 서열에 의해 정의되는 이러한 결합 분자에 대한 구체적인 예는 본 명세서에서 제공되지 않는다.
- [0010] 국제공개공보 WO 2011/138391 및 WO 2011/138392에는 다가 LRP6 결합 항체가 개시되어 있다. 국제공개공보 WO 2011/138391에는 하나의 Wnt 신호 전달 경로 (Wnt1 또는 Wnt3)를 차단하지만 다른 경로 (각각 Wnt3 또는 Wnt1)를 강화하지 않는 항체가 청구되어 있다. 국제공개공보 WO 2011/138392에는 LRP6 수용체 클러스터링에 의해 Wnt 신호 전달을 강화하는 항체 또는 항체 단편이 제공되어 있지 않다.
- [0011] 국제공개공보 WO 2011/138391에는 LRP6 결합 분자가 원하는 효과를 달성하기 위해 전장 IgG 항체로 포맷팅 (formatted) 필요가 있는 것으로 설명되어 있다. 제2 결합 특이성을 갖는 단일 사슬 Fv 부분에 커플링된, 제1 결합 특이성을 갖는 IgG 분자를 포함하는 LRP6 바이파라토픽 (바이파라토픽) 분자의 예가 제공된다. 일부 형식은 현저하게 감소된 열 안정성 (50 내지 52℃의 T_m)을 갖는 것으로 기재되어 있다. Fc 부분은 보체-의존성 세포독성 (CDC) 또는 항체-의존성 세포독성 (ADCC)과 같은 IgG 분자 상에 이펙터 기능을 부여할 수 있다.
- [0012] 국제공개공보 WO 2013/067355에는 국제공개공보 WO 2011/138391에 개시되어 있는 IgG 분자로부터 유도된 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP6 결합 scFv 면역 글로불린 작제물이 개시되어 있다.
- [0013] 국제공개공보 WO 2011/119661에는 LRP6에 결합하여 제1 Wnt 이소형에 의해, 특히 Wnt3 또는 Wnt3a에 의해 유도된 신호 전달을 억제하지만, Wnt1, 2, 2b, 4, 6, 7a, 7b, 8a, 9a, 9b, 10a 또는 10b 이소형일 수 있는 제2 Wnt 이소형에 의해 유도된 신호 전달을 강화하는 항체가 개시되어 있다. LRP6의 E1-E2 영역 뿐만 아니라 LRP6의 E3-E4 영역에 결합하는 이특이적 분자가 개시되어 있다. 낚-인-홀 (knob-in-hole) 기술이 이특이적 항체를 생성하기 위해 사용된다.
- [0014] LRP6 항체의 결합에 연루된 결합 에피토프 (LRP6 엑토도메인/베타-프로펠러 영역 내의 정의된 아미노산 잔기)의 동정은 국제공개공보 WO 2009/056634, WO 2011/138391 및 WO 2013/067355에 제공되어 있지 않으며, 국제공개공보 WO 2011/119661에 부분적으로만 제공되어 있다. 특히, LRP6 결합 항체는 Wnt와 직접 경쟁하거나 3원 수용체 복합체 (Wnt-LRP6-Frizzled)의 형성을 억제하는 것을 포함하는, LRP6의 상이한 영역에 대한 결합에 따라 대체 기작을 통해 Wnt 신호 전달을 억제할 수 있는 반면, 다른 것들은 아마 수용체 클러스터링에 의해 신호 전달을 강화한다 (문헌 [Ahn *et al.* "Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6". *Dev Cell.* 2011; 21(5):862-73] 참조).
- [0015] 그러나, 당해 분야에 기술된 결합 분자 중 어느 것도 지금까지 질환을 치료하기 위한 약제로서의 용도를 위해 보건 당국에 의해 허가되지 않았다. 구체적으로, 이러한 용도는 매우 특이적인 결합 특성, 올바른 특이성, 이특이적 또는 다특이적 제제의 경우에는 2개 이상의 결합 특이성 사이의 올바른 균형, 적합한 약동학적 및 약력학적 특성, 허용되는 독성학적 프로파일 및 물론 생체내 효능을 필요로 하므로, 이러한 분자는 다른 표적에 결합하거나 결합하지 않거나, 다른 표적을 활성화하거나 활성화하지 않거나, 다른 표적을 억제하거나 억제하지 않는다 (예를 들어, 다른 신호 전달 경로의 원치않은 활성화 또는 억제 또는 표적 이소형에 대한 활성화 또는 억제에의 기여를 초래함).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 상기를 고려하여, 여러 유형의 암 질환 및 종양의 효과적인 치료를 가능하게 하는 신규한 치료제에 대한 필요성이 존재한다. 따라서, 본 발명의 목적은 NSCLC 및 TNBC를 포함하는 여러 암 질환의 치료에 사용될 수 있는 약

리학적 활성제를 제공하는 것이다.

특히, 본 발명의 목적은 당해 분야에서 현재 사용되고/사용되거나 공지되어 있는 약리학적 활성제, 조성물 및/또는 치료 방법과 비교하여 특정 이점을 제공하는 약리학적 활성제, 조성물 및/또는 치료 방법을 제공하는 것이다. 이들 이점은 특히 당해 분야에 이미 공지되어 있는 후보 약물과 비교하여 생체내 효능, 개선된 치료학적 및 약리학적 특성, 부작용 감소, 및 개선된 제조 용이성 또는 제품 비용의 절감과 같은 다른 유리한 특성을 포함한다.

과제의 해결 수단

본 발명의 제1 측면에 따르면, 본 발명은 LRP5 또는 LRP6에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서, 본 발명의 이러한 폴리펩타이드는

(a) 다음 CDR 서열을 가짐으로써 정의되는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (i) 내지 (iii)의 그룹으로부터 선택되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:

(i):

CDR1: TYTVG (= 서열번호 1)

CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= 서열번호 2)

CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= 서열번호 3)

(ii):

CDR1: SYAMG (= 서열번호 4)

CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= 서열번호 5)

CDR3: ARRRSSTRYNTGTWWWEY (= 서열번호 6)

(iii):

CDR1: RYTMG (= 서열번호 7)

CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 8)

CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= 서열번호 9),

(b) 다음 CDR 서열을 가짐으로써 정의되는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (iv) 및 (v)의 그룹으로부터 선택되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:

(iv):

CDR1: SYAMG (= 서열번호 10)

CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 11)

CDR3: SPIPYGSLLRRRNNDY (= 서열번호 12)

(v):

CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)

CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)

CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= 서열번호 15)

을 포함한다.

이러한 면역글로불린 단일 가변 도메인에 대한 용어 "제1" 및 "제2"는 단지 이들 도메인이 2개의 상이한 도메인 (이들은 적어도 상이한 CDR 서열을 포함할 것이므로)인 것을 나타내도록 의도된다. 따라서, 이들 용어는 이러한 폴리펩타이드 사슬 내의 도메인의 정확한 순서 또는 서열을 의미하는 것으로 이해되어서는 안된다.

본 발명의 폴리펩타이드는 다음 CDR을 포함하는 제3 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어, 특히, 알부민

결합 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어, A1b11 도메인을 임의로 포함한다:

- [0044] CDR1(A1b11): SFGMS (= 서열번호 16)
- [0045] CDR2(A1b11): SISGSGSDTLYADSVKG (= 서열번호 17)
- [0046] CDR3(A1b11): GGSLSR (= 서열번호 18).
- [0047] 보다 구체적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 VHH 도메인, 바람직하게는 사람화 VHH 도메인인 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다.
- [0048] 보다 더 구체적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는
- [0049] (a) 다음 서열을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (i) 내지 (iii)의 그룹으로부터 선택되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0050] (i):
- [0051] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREF
- [0052] VAAIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYY
- [0053] CAADTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSS
- [0054] (= 서열번호 19)
- [0055] (ii):
- [0056] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
- [0057] FVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYY
- [0058] CAAARRVRSSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSS
- [0059] (= 서열번호 20)
- [0060] (iii):
- [0061] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREF
- [0062] VAAIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVYY
- [0063] CAADRRGRGENYILLYSSGRYEWGQGLTVTVSS
- [0064] (= 서열번호 21),
- [0065] (b) 다음 서열을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (iv) 및 (v)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0066] (iv):
- [0067] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKERE
- [0068] FVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVY
- [0069] YCAASPIPYGSLRRRNNDYWGQGLTVTVSS
- [0070] (= 서열번호 22), 및
- [0071] (v):
- [0072] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKERE
- [0073] FVAAISWRSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTAVY
- [0074] YCAADPRGYGVAYVSAYYEWGQGLTVTVSS
- [0075] (= 서열번호 23)
- [0076] 을 포함한다.

- [0077] 구체적으로 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 반감기 연장 모이어티 (moiety)를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 반감기 연장 모이어티는 상기 폴리펩타이드에 공유적으로 연결되어 있고, 알부민 결합 모이어티, 예를 들어, 알부민 결합 펩타이드 또는 알부민 결합 면역글로불린 도메인, 바람직하게는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인, 보다 바람직하게는 Alb11 도메인, 트랜스페린 결합 모이어티, 예를 들어, 항-트랜스페린 면역글로불린 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 분자, 사람 혈청 알부민 및 사람 혈청 알부민의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택된다.
- [0078] 구체적으로, 상기한 바와 같은 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인 (a) 및 (b)에 추가하여, 다음 서열을 갖는 Alb11 도메인을 포함하는 폴리펩타이드가 바람직하다:
- [0079] EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEW
- [0080] VSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
- [0081] GGSLRSSQGLTVTVSS
- [0082] (= 서열번호 24)
- [0083] 추가의 실시형태에 따르면, 본 발명은 구체적으로 다음 3개의 폴리펩타이드 사슬 중 어느 하나를 포함하거나 이들로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한다:
- [0084] 서열번호 25를 갖는 F13500575,
- [0085] 서열번호 26을 갖는 F13500571, 및
- [0086] 서열번호 27을 갖는 F13500720.
- [0087] 추가의 측면에 따르면, 본 발명은 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주 세포 및 본 발명의 폴리펩타이드의 생산에 사용되는 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 이후에 본 발명의 폴리펩타이드의 생물학적 생산에 사용되는 숙주 세포로 형질감염될 수 있는 각각의 발현 벡터를 작제하기 위해 단리된 형태로 사용될 수 있다. 이러한 제조 방법은 전형적으로 당해 분야에 공지되어 있는 방법에 따라 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계, 폴리펩타이드를 회수하는 단계, 및 폴리펩타이드를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0088] 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 추가의 측면, 실시형태, 용도 및 방법은 하기의 본 발명의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 명백해질 것이다.
- [0089] 본 발명은 TNBC, CRC 및 NSCLC와 같은 여러 암 유형의 부작용이 덜한 보다 효과적인 치료를 가능하게 하는 신규한 분자를 제공한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 병리학적 완전 반응 (pCR)를 초래하는 종양 퇴행을 유도할 수 있다는 점에서 암 환자의 치료에서 놀라운 치료 효과 (즉, 효능)를 제공한다. 결국, 이것은 특히 높은 미충족 의료 징후, 예를 들어, 유방암에서 무진행 생존율 및 전체 생존율의 현저한 개선을 가져올 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드 여러 암 유형, 특히 탈조절된 Wnt 신호 전달 경로 및 베타-카테닌 축적을 나타내는 것의 치료에서 신규한 치료 옵션을 제공한다.
- [0090] 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 제조하기에 용이하고, 높은 안정성 및 낮은 항원성을 가지며, 주사 및 주입에 추가하여 투여 경로에 대한 다양한 옵션을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0091] **도 1**은 Wnt1 및 Wnt3a 신호 전달을 길항하는 바이파라토픽 폴리펩타이드의 개략도를 도시한다. 이들은 LRP5 및 LRP6의 뚜렷한 에피토프에 결합하는 2개의 도메인 (Wnt1 및 Wnt3a 차단제) 및 반감기 연장을 위한 하나의 도메인 (사람 혈청 알부민 결합제)을 갖는 3개의 도메인으로 이루어진다.
- 도 2**는 라마 면역화로부터 유도된 대표 번호의 LRP6 결합 VHH에 대한 결합 FACS와 ELISA 검정 사이의 상관 관계의 결여를 도시한다. VHH의 "1"번 패널은 FACS 결합 검정 (y 축 상에서, MCF 값이 보고됨)에 의해 검출되는 바와 같이 혈장 막 상에서 LRP6 발현 세포에 대한 높은 친화성을 특징으로 한다. VHH의 "2"번 패널은 ELISA 결합 검정 (x 축 상에서, OD405 값이 보고됨)에 의해 검출되는 바와 같이 재조합 사람 LRP6 엑토도메인 (rhLRP6-Fc)에 대한 높은 친화성을 특징으로 한다.
- 도 3**은 비표적화 결합제로 이루어진 음성 대조군 (HEK293 세포에서 발현되지 않는 박테리아 단백질에 결합하는

VHH 작제물)과 비교하여 HEK293 세포주를 과발현하는 사람 LRP5 (도 3a) 및 사람 LRP6 (도 3b)에 대한 3개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 결합을 도시한다.

도 4는 FACS-기반 DKK1 경쟁 검정에 의해 검출되는 바와 같이 HEK293 세포주를 과발현하는 사람 LRP5 (도 4a)와 사람 LRP6 (도 4b) 둘 다에 결합하기 위한 3개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 완전한 DKK1 경쟁을 도시한다.

도 5는 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서 3개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 완전한 억제 (도 5a) 및 다른 LRP6 결합 분자와의 비교 (도 5b: Knob HC YW210.09 및 MOR08168IgG1LALA 6475 scfv; 도 5c: 802T)를 도시한다.

도 6은 상대적인 Axin2 mRNA 발현의 억제에 의해 검출되는 바와 같은 암 세포에서의 Wnt 신호 전달의 억제 (도 6a), 및 F013500571 및 미처리된 (대조군) 세포 (도 6b의 좌측/우측 다이어그램)와 비교하여 3개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물 (1mM의 최종 농도)로 처리된 후 802T에 의한 처리에 의한 생존 세포의 감소된 백분율 (%)에 의해 검출되는 바와 같은 세포 증식 (도 6b)을 도시하고; 용량(dose)-반응 곡선은 1개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 작제물 (도 6c) 및 802T (도 6d)에 의한 처리에 대해 도시한다.

도 7은 Wnt 구동된 종양 모델 (MMTV-Wnt1 이종이식 모델)에서 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물 (도 7a에서는 F013500571이고 도 7b에서는 F013500720임) 및 Knob HC YW210.09 (도 7c)의 생체 내 효능을 도시한다.

도 8은 대조군에 대한 Axin2 mRNA 발현의 감소에 의해 검출되는 바와 같이 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물 F013500571 및 F013500720으로 처리된 종양에서의 Wnt 경로 억제를 도시한다.

도 9는 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물로 처리시에 수지상 세포에 의한 염증 촉진성 사이토카인 TNF 알파 방출에 대한 Wnt3a 구동된 신호 전달 억제 효과 (도 9a) 및 인터페론-감마 방출에 의해 검출되는 바와 같은 T 세포 활성화에 대한 효과 (도 9b)를 도시한다. 각 기호는 고유한 수지상 세포 (DC) 기증자를 나타낸다. 표시된 데이터는 미처리된 대조군의 TNF 알파 수준으로 정규화되었으며 (도 9a), 각 기호는 DC 및 T 세포 (패널 b)에 대한 고유한 기증자 쌍을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 발명의 상기 및 다른 측면 및 실시형태는 본 명세서의 추가의 기재로부터 명백해질 것이며, 여기서,

a) 달리 명시되거나 정의되지 않는다면, 사용되는 모든 용어는 통상의 기술자에게 명백한 당해 분야의 일반적인 의미를 갖는다. 예를 들어, 표준 핸드북, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990)] 및 [Roitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)] 뿐만 아니라, 본 명세서에 인용된 일반적인 배경기술을 참조할 수 있다. 또한, 달리 명시되지 않는다면, 상세하게 구체적으로 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기술 및 조작은 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이 그 자체로 공지된 방식으로 수행될 수 있으며 수행되었다. 또한, 예를 들어, 표준 핸드북, 상기에서 언급된 일반적인 배경기술 및 본 명세서에 인용된 추가의 참조 문헌이 다시 참조로 인용된다.

b) 달리 명시되지 않는다면, 용어 "면역글로불린" 및 "면역글로불린 서열"이란 - 본 명세서에서 중쇄 항체 또는 통상적인 4개 쇠 항체를 언급하기 위해 사용되든지 간에 - 완전한 크기의 항체, 이의 개별 쇠 및 이의 모든 부분, 도메인 또는 단편 (각각 VHH 도메인 또는 VH/VL 도메인과 같은 항원-결합 도메인 또는 단편을 포함하지만 이들에 한정되지 않음)을 모두 포함하는 일반적인 용어로서 사용된다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열" (예를 들어, "면역글로불린 서열", "항체 서열", "(단일) 가변 도메인 서열", "VHH 서열" 또는 "단백질 서열"과 같은 용어에서)이란, 일반적으로 문맥이 보다 한정된 해석을 요구하지 않는다면 관련 아미노산 서열, 및 이를 암호화하는 핵산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 모두 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

c) 본 명세서에서 사용되는 용어 "도메인" (폴리펩타이드 또는 단백질의 도메인에서)이란, 단백질의 나머지 부

분과 독립적으로 3차원 구조를 보유하는 능력을 갖는 폴딩된 단백질 구조를 나타낸다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 별개의 기능적 특성을 담당하며, 다수의 경우에 단백질 및/또는 도메인의 나머지 부분의 기능의 손실 없이 다른 단백질에 부가되거나 제거되거나 전달될 수 있다.

[0097] d) 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 도메인"이란, 항체 쇄 (예를 들어, 통상적인 4개 쇄 항체 또는 중쇄 항체의 쇄 등)의 구형 영역을 나타내거나, 이러한 구형 영역으로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드를 나타낸다. 면역글로불린 도메인은, 보존된 디설파이드 결합에 의해 임의로 안정화된, 2개의 베타-시트 내에 정렬된 약 7개의 역평행 베타-가닥의 2층 샌드위치로 이루어진 항체 분자의 면역글로불린 폴딩 특징을 보유하는 것을 특징으로 한다.

[0098] e) 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 가변 도메인"이란, 당해 분야 및 이하에서 "골격 영역 1" 또는 "FR1"로서, "골격 영역 2" 또는 "FR2"로서, "골격 영역 3" 또는 "FR3"으로서, 및 "골격 영역 4" 또는 "FR4"로서 각각 언급되는 4개의 "골격 영역"으로 본질적으로 이루어지는 면역글로불린을 의미하고; 상기 골격 영역은 당해 분야 및 이하에서 "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1"로서, "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2"로서 및 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로서 각각 언급되는 3개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"에 의해 차단되어 있다. 따라서, 면역글로불린 가변 도메인의 일반 구조 또는 서열은 다음과 같이 나타낼 수 있다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 이것은 항원-결합 부위를 가짐으로써 항원에 대한 특이성을 항체에 부여하는 면역글로불린 가변 도메인(들)이다.

[0099] f) 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인"이란, 추가의 가변 면역글로불린 도메인과 쌍을 이루지 않으면서 항원의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 가변 도메인을 의미한다. 본 발명의 의미에서 면역글로불린 단일 가변 도메인의 한 예는 면역글로불린 단일 가변 도메인 VH 및 VL (VH 도메인 및 VL 도메인)과 같은 "도메인 항체"이다. 면역글로불린 단일 가변 도메인의 또다른 예는 이하에 정의된 바와 같이 카멜리드(camelid) 유래의 "VHH 도메인" (또는 단순히 "VHH")이다.

[0100] 상기 정의를 고려하여, 통상적인 4개 쇄 항체 (예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 분자; 당해 분야에 공지됨) 또는 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, 예를 들어, 디설파이드 연결된 Fv 또는 scFv 단편, 또는 이러한 통상적인 4개 쇄 항체로부터 유도된 디아바디 (당해 분야에 모두 공지됨)의 항원-결합 도메인은, 통상적으로 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서 간주되지 않는데, 그 이유는 이들 경우에 항원의 각각의 에피토프에 대한 결합이 통상적으로 1개의 (단일) 면역글로불린 도메인에 의해 발생하는 것이 아니라 경쇄 및 중쇄 가변 도메인과 같은 한쌍의 (연합된) 면역글로불린 도메인, 즉 각각의 항원의 에피토프에 함께 결합하는 VH-VL 쌍의 면역글로불린 도메인에 의해 발생하기 때문이다.

[0101] f1) VHH, V_HH 도메인, VHH 항체 단편, 및 VHH 항체로서도 공지된 "VHH 도메인"은 본래에 "중쇄 항체" (즉, "경쇄가 없는 항체"의 항원 결합 면역글로불린 (가변) 도메인으로서 기재되었다 (문헌 [Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)] 참조). 용어 "VHH 도메인"이란, 이들 가변 도메인을, 통상적인 4개 쇄 항체에 존재하는 중쇄 가변 도메인 (본 명세서에서 "V_H 도메인" 또는 "VH 도메인"으로서 언급됨) 및 통상적인 4개 쇄 항체에 존재하는 경쇄 가변 도메인 (본 명세서에서 "V_L 도메인" 또는 "VL 도메인"으로서 언급됨)과 구별하기 위해 선택되었다. VHH 도메인은 추가의 항원 결합 도메인 없이 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다 (통상적인 4개 쇄 항체에서의 VH 또는 VL 도메인과는 대조적인데, 이 경우에는 에피토프는 VH 도메인과 함께 VL 도메인에 의해 인식된다). VHH 도메인은 단일 면역글로불린 도메인에 의해 형성되는 소형이면서 강력하고 효율적인 항원 인식 단위이다.

[0102] 본 발명의 맥락에서, "Nanobody[®]" 및 "Nanobody[®] 도메인" ("Nanobody"는 벨기에 겐트 소재의 Ablynx N.V. 회사의 상표명이다) 뿐만 아니라 용어 VHH 도메인, VHH, V_HH 도메인, VHH 항체 단편, VHH 항체는 상호교환적으로 사용되고, 면역글로불린 단일 가변 도메인 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 구조를 갖고 제2 면역글로불린 가변 도메인의 존재를 필요로 하지 않고 에피토프에 특이적으로 결합함)을 나타내며, 이것은 또한, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2009/109635의 도 1에 정의된 바와 같은 소위 "홀마크 잔기 (hallmark residue)"에 의해 VH 도메인과 구별될 수 있다.

[0103] VHH 도메인의 아미노산 잔기는, 예를 들어, 문헌 [Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999)]의 도 2에 나타낸 카멜리드 유래의 VHH 도메인에 적용되는 바와 같이, 문헌 [Kabat *et al.*,

"Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91]에 의해 주어진 V_H 도메인에 대한 일반적인 넘버링에 따라 번호가 매겨진다. 이러한 넘버링에 따르면,

- [0104] - FR1은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0105] - FR31은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0106] - FR36은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0107] - FR50은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0108] - FR66은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0109] - FR95은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0110] - FR103은 1번 내지 30번 위치의 아미노산 잔기들을 포함하고,
- [0111] 그러나, - V_H 도메인 및 VHH 도메인에 대해서 당해 분야에 널리 공지된 바와 같이 - 각각의 CDR에서 아미노산 잔기의 총수는 다양할 수 있으며, 캐뻛 넘버링에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총수에 상응하지 않을 수도 있다는 것에 특히 주의해야 한다 (즉, 캐뻛 넘버링에 따른 하나 이상의 위치는 실제 서열에서 점유되지 않을 수도 있거나, 실제 서열은 캐뻛 넘버링에 의해 허용되는 수보다 많은 아미노산 잔기를 함유할 수도 있다). 이것은 일반적으로 캐뻛에 따른 넘버링이 실제 서열에서 아미노산 잔기의 실제 넘버링에 상응하거나 상응하지 않을 수도 있다는 것을 의미한다.
- [0112] VHH 도메인과 유사한 방식으로 또한 적용될 수 있는, V_H 도메인의 아미노산 잔기를 넘버링하기 위한 대체 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 그러나, 달리 명시되지 않는다면, 본 명세서, 특허청구범위 및 도면에서는 상기에 기재된 바와 같이 VHH 도메인에 적용된 캐뻛에 따른 넘버링을 따를 것이다.
- [0113] VHH 도메인 중 아미노산 잔기의 총수는 통상적으로 110개 내지 120개, 종종 112개 내지 115개의 범위일 것이다. 그러나, 보다 작고 보다 긴 서열이 본 명세서에 기재된 목적에 적합할 수도 또한 있다는 것을 주지해야 한다.
- [0114] VHH 도메인 및 이를 함유하는 폴리펩타이드의 추가의 구조적 특징 및 기능적 특성은 다음과 같이 요약될 수 있다:
- [0115] VHH 도메인 (이는 경쇄 가변 도메인의 존재 없이 그리고 경쇄 가변 도메인과의 어떠한 상호작용 없이 항원에 기능적으로 결합하도록 본질적으로 "디자인"되었음)은 단일의 비교적 작은 기능성 항원-결합 구조 단위, 도메인 또는 폴리펩타이드로서 기능할 수 있다. 이것은 일반적으로 혼자 단일 항원-결합 단백질 또는 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서 실제 응용에 적합하지 않지만 몇몇 형태 또는 또 다른 형태로 조합되어 기능성 항원-결합 단위 (예를 들어, Fab 단편과 같은 통상적인 항체 단편에서; VL 도메인에 공유적으로 연결된 VH 도메인으로 이루어진 scFv에서)를 제공할 필요가 있는 통상적인 4개 체 항체의 VH 및 VL 도메인과 VHH 도메인을 구별하게 한다.
- [0116] 이들 독특한 성질 때문에, VHH 도메인의 용도는 - 단독으로 또는 거대 폴리펩타이드의 일부로서 - 통상적인 VH 및 VL 도메인, scFv 또는 통상적인 항체 단편 (예를 들어, Fab- 또는 F(ab')₂-단편)의 용도 보다 여러가지 중요한 이점을 제공한다:
- [0117] - 단일 도메인만이 높은 친화성 및 높은 선택성으로 항원에 결합하는데 요구되어, 2개의 개별 도메인이 존재할 필요가 없으며, 이들 2개의 도메인이 올바른 공간 형태 및 배열 (즉, scFv와 함께 특별히 디자인된 링커의 사용을 통한)로 존재하는 것을 보장할 필요가 없고;
- [0118] - VHH 도메인은 단일 유전자로부터 발현될 수 있으며 어떠한 해독 후 폴딩 또는 변형도 필요로 하지 않고;
- [0119] - VHH 도메인은 다가 및 다특이적 형식 (본 명세서에서 추가로 논의되는 바와 같음)으로 용이하게 조작될 수 있고;
- [0120] - VHH 도메인은 고도로 가용성이며 응집하는 경향이 없고 (문헌 [Ward *et al.*, Nature 341: 544-546 (1989)]에 기재된 마우스-유래된 항원-결합 도메인과 같음);

- [0121] - VHH 도메인은 열, pH, 프로테아제 및 다른 변성제 또는 조건에 대해 매우 안정하므로, 냉장 설비의 사용 없이 제조, 저장 또는 수송될 수 있어서 비용, 시간 및 환경비용을 절감할 수 있으며;
- [0122] - VHH 도메인은 심지어 생산에 필요한 규모로도 제조하기가 용이하고 비교적 저렴하다. 예를 들어, VHH 도메인 및 이를 함유하는 폴리펩타이드는 미생물 발효 (예를 들어, 이하에 추가로 기재된 바와 같음)를 사용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어, 통상적인 항체 단편과 같이 포유동물 발현 시스템을 사용할 필요가 없고;
- [0123] - VHH 도메인은 통상적인 4개 쇠 항체 및 이의 항원 결합 단편과 비교하여 비교적 작고(대략적으로 15 kDa이거나, 통상적인 IgG 보다 10배 작음), 따라서, 이러한 통상적인 4개 쇠 항체 및 이의 항원-결합 단편보다
- [0124] -- 조직으로의 (보다) 높은 침투율을 보여주고
- [0125] -- 보다 높은 용량으로 투여될 수 있고;
- [0126] - VHH 도메인은 소위 중공(cavity)-결합 특성 (특히, 통상적인 VH 도메인과 비교하여 이들의 연장된 CDR3 루프를 포함)을 나타낼 수 있고, 따라서, 또한 통상적인 4개 쇠 항체 및 이의 항원-결합 단편에 접근 불가능한 표적 및 에피토프에 접근할 수 있다.
- [0127] 특이적 항원 또는 에피토프에 결합하는 VHH 도메인의 수득 방법은, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2006/040153 및 WO 2006/122786에 먼저 기재되어 있었다. 또한, 본 명세서에 상세히 기재된 바와 같이, 카멜리드로부터 유래된 VHH 도메인은 본래의 VHH 서열의 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 잔기를, 사람 유래의 통상적인 4개 쇠 항체로부터의 VH 도메인에서 상응하는 위치(들)에 발생하는 하나 이상의 아미노산 잔기로 대체함으로써 "사람화"될 수 있다. 사람화된 VHH 도메인은 하나 이상의 완전한 사람 골격 영역 서열을 함유할 수 있고, 보다 더 구체적인 실시형태에서, JH5와 같은 JH 서열과 임의로 조합된, DP-29, DP-47, DP-51 또는 이의 일부로부터 유도된 사람 골격 영역 서열을 함유할 수 있다.
- [0128] f2) "Dab", "도메인 항체", 및 "dAb" (용어 "도메인 항체" 및 "dAb"는 GlaxoSmithKline group of companies에 의해 상표명으로 사용됨)로서도 공지되어 있는 "도메인 항체"는, 예를 들어, 문헌 [Ward, E.S., et al.: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*"; *Nature* 341: 544-546 (1989)], [Holt, L.J. et al.: "Domain antibodies: proteins for therapy"; *TRENDS in Biotechnology* 21(11): 484-490 (2003)] 및 국제공개공보 WO 2003/002609에 기재되어 있다.
- [0129] 도메인 항체는 비-카멜리드 포유동물, 특히 사람 4개 쇠 항체의 VH 또는 VL 도메인에 본질적으로 상응한다. 단일 항원 결합 도메인으로서, 즉 각각 VL 또는 VH 도메인과 쌍을 이루지 않고 에피토프에 결합하기 위해서, 예를 들어, 사람 단일 VH 또는 VL 도메인 서열의 라이브러리를 사용하여 이러한 항원 결합 특성에 대한 구체적인 선택이 요구된다. 도메인 항체는 VHH와 같이 약 13 내지 약 16kDa의 분자량을 가지며, 완전한 사람 서열로부터 유도되는 경우, 예를 들어, 사람에서의 치료 용도를 위해 사람화될 필요가 없다. VHH 도메인의 경우에서와 같이, 이들은 또한 원핵세포 발현 시스템에서도 잘 발현되어 총 제조 비용의 현저한 절감을 제공한다.
- [0130] 도메인 항체 및 VHH 도메인은 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열 중 하나 이상의 변경을 도입시킴으로써 친화성 성숙을 겪을 수 있고, 이러한 변경은 각각의 모 분자와 비교하여 각각의 항원에 대해 생성된 면역글로불린 단일 가변 도메인의 친화성을 개선시킨다. 본 발명의 친화성-성숙된 면역글로불린 단일 가변 도메인 분자는, 예를 들어, 문헌 [Marks *et al.*, 1992, *Biotechnology* 10:779-783], [Barbas, *et al.*, 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813], [Shier *et al.*, 1995, *Gene* 169:147-155], [Yelton *et al.*, 1995, *Immunol.* 155: 1994-2004], [Jackson *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9], [Hawkins *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 226(3): 889-896] 및 [KS Johnson and RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996]에 기재된 바와 같이 당해 분야에 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0131] f3) 또한, 상기에서 언급된 CDR 중 하나 이상을, 사람 스캐폴드(scaffold) 또는 비-면역글로불린 스캐폴드를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다른 "스캐폴드" 상으로 "이식"시킬 수 있는 것도 또한 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이러한 CDR 이식에 적합한 스캐폴드 및 기술은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0132] g) 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어 "에피토프" 및 "항원 결정인자"는 본 발명의 통상적인 항체 또는 폴리펩타이드와 같은 항원-결합 분자에 의해, 보다 특히 상기 분자의 항원-결합 부위에 의해 인지되는 거대 분자, 예를 들어, 폴리펩타이드의 일부를 나타낸다. 에피토프는 면역글로불린에 대한 최소 결합 부위를 한정하고, 따

라서, 면역글로불린의 특이성의 표적을 나타낸다.

- [0133] 에피토프를 인지하는 항원-결합 분자 (예를 들어, 통상적인 항체 또는 본 발명의 폴리펩타이드)의 일부는 소위 *파라토프*로 불리운다.
- [0134] h) 본 명세서에서 사용되는 용어 "*바이파라토프*" (항원-)결합 분자 또는 "바이파라토프" 폴리펩타이드란, 본 명세서에 정의된 바와 같은 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 의미하고, 여기서, 이들 2개의 가변 도메인은 하나의 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있고, 상기 에피토프는 보통 하나의 일특이적 면역글로불린, 예를 들어, 통상적인 항체 또는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인에 의해 동시에 결합되지 않는다. 본 발명에 따른 바이파라토프 폴리펩타이드는 상이한 에피토프 특이성을 갖고, 동일한 에피토프에 결합하는 상호 상보적 가변 도메인 쌍을 함유하지 않는 가변 도메인으로 구성된다. 따라서, 이들은 LRP5 또는 LRP6에 결합하기 위해 서로 경쟁하지 않는다.
- [0135] i) 특정 에피토프, 항원 또는 단백질 (또는 이의 적어도 하나의 부분, 단편 또는 에피토프)에 "결합할 수 있는", "에 결합할 수 있는", "특이적으로 결합할 수 있는" 또는 "에 특이적으로 결합할 수 있는", "에 대한 친화성을 갖는" 및/또는 "에 대한 특이성을 갖는" 폴리펩타이드 (예를 들어, 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 일반적으로 항원 결합 분자 또는 이의 단편)는 상기 에피토프, 항원 또는 단백질 "에 대한" 또는 "에 대해 지시된" 것으로 일컬어지거나, 이러한 에피토프, 항원 또는 단백질에 대한 "결합" 분자이다.
- [0136] k) 일반적으로, 용어 "특이성"이란, 특정 항원-결합 분자 또는 항원-결합 단백질 (예를 들어, 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 본 발명의 폴리펩타이드)이 결합할 수 있는 상이한 유형의 항원 또는 에피토프의 수를 나타낸다. 항원-결합 단백질의 특이성은 이의 친화성 및/또는 결합활성(avidity)에 기초하여 결정할 수 있다. 항원-결합 단백질과 항원의 해리에 대한 평형 상수(K_D)로 나타낸 친화성은 항원-결합 단백질 상의 에피토프와 항원-결합 부위 사이의 결합 강도에 대한 척도이다: K_D 값이 작을수록, 에피토프와 항원-결합 분자 사이의 결합 강도는 강해진다 (대안적으로, 친화성은 또한 $1/K_D$ 인 친화 상수(K_A)로서 표현될 수 있다). 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이 (예를 들어, 본 명세서의 추가의 기재에 기초함), 친화성은 관심 대상의 특이적인 항원에 따라 공지된 방식 자체로 측정될 수 있다. 결합활성은 항원-결합 분자 (예를 들어, 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 본 발명의 폴리펩타이드)와 관련 항원 사이의 결합 강도의 척도이다. 결합활성은 항원-결합 분자 상의 에피토프와 이의 항원 결합 부위 사이의 친화성과, 항원-결합 분자 상에 존재하는 관련 결합 부위의 수 둘 다와 관련이 있다.
- [0137] 전형적으로, 항원-결합 단백질 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드)은 $10E-5$ 내지 $10E-14$ 몰/리터(M) 이하, 바람직하게는 $10E-7$ 내지 $10E-14$ 몰/리터(M) 이하, 보다 바람직하게는 $10E-8$ 내지 $10E-14$ 몰/리터, 보다 더 바람직하게는 $10E-11$ 내지 $10E-13$ 의 해리 상수(K_D) (예를 들어, 키넥사(Kinexa) 검정으로 측정시; 당해 분야에 공지됨)로 및/또는 적어도 $10E7$ ME-1, 바람직하게 적어도 $10E8$ ME-1, 보다 바람직하게는 적어도 $10E9$ ME-1, 예를 들어, 적어도 $10E11$ ME-1의 결합 상수(K_A)로 결합할 것이다. $10E-4$ M 초과와 임의의 K_D 값은 일반적으로 비-특이적 결합을 나타내는 것으로 고려된다. 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드는 500 nM 미만, 바람직하게는 200 nM 미만, 보다 바람직하게는 10 nM 미만, 예를 들어, 500 pM 미만의 K_D 로 목적하는 항원에 결합할 것이다. 항원 또는 에피토프에 대한 항원-결합 단백질의 특이적 결합은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 검정, 스캐차드 분석(Scatchard analysis) 및/또는 경쟁 결합 검정, 예를 들어, 방사선면역검정(RIA), 효소 면역검정(EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정을 포함하여 임의의 공지된 적합한 방식 자체 및 당해 분야에 공지된 자체의 상이한 변형법으로 측정할 수 있다.
- [0138] l) LRP5 뿐만 아니라 LRP6에 결합할 수 있는 결합 분자와 관련되는 용어 "*교차-반응성*" ("*LRP5/LRP6 교차-반응성*")이란, 이러한 결합 분자가 LRP5 분자에 포함된 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고, 대안적으로 LRP6 분자에 포함된 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 보통, 이러한 교차-반응성은, 이러한 결합 분자에 의해 결합된 상이한 단백질의 에피토프가 유사한 구조 및/또는 서열을 갖는, 예를 들어, 보존된 에피토프를 나타내는, 예를 들어, 동일한 단백질 계열에 속하는 단백질 (예를 들어, LRP 단백질 계열에 속하는 LRP5 및 LRP6)에 의해 공유되는 경우에 일어날 수 있다.
- [0139] m) 아미노산 잔기는 당해 분야에 일반적으로 공지되고 동의된 표준 3 문자 또는 1 문자 아미노산 코드에 따라 표시될 것이다. 2개의 아미노산 서열을 비교하는 경우, 용어 "*아미노산 차이*"란, 제2 서열과 비교하여 기준 서

열의 위치에서 표시된 수의 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 나타낸다. 치환(들)의 경우, 이러한 치환(들)은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환(들)이며, 이러한 보존적 아미노산 치환(들)은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 구조의 다른 아미노산 잔기로 대체되는 것을 의미하고 폴리펩타이드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 대해 거의 또는 본질적으로 어떠한 영향을 미치지 않는다. 이러한 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 국제공개공보 WO 98/49185로부터 당해 분야에 널리 공지되어 있는데, 여기서, 보존적 아미노산 치환은 바람직하게는 하기 그룹 (i) 내지 (v) 내의 하나의 아미노산이 동일한 그룹 내의 또다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 치환이다: (i) 소형의 지방족, 비극성 또는 약간 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (ii) 극성의 음으로 하전된 잔기 및 이들의 (비하전된) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (iii) 극성의 양으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; (iv) 대형의 지방족 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val 및 Cys; 및 (v) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp. 특히 바람직한 보존적 아미노산 치환은 다음과 같다:

- [0140] Ala을 Gly 또는 Ser으로;
- [0141] Arg을 Lys으로;
- [0142] Asn을 Gln 또는 His으로;
- [0143] Asp을 Glu으로;
- [0144] Cys을 Ser으로;
- [0145] Gln을 Asn으로;
- [0146] Glu을 Asp으로;
- [0147] Gly을 Ala 또는 Pro으로;
- [0148] His을 Asn 또는 Gln으로;
- [0149] Ile을 Leu 또는 Val으로;
- [0150] Leu을 Ile 또는 Val으로;
- [0151] Lys을 Arg, Gln 또는 Glu으로;
- [0152] Met을 Leu, Tyr 또는 Ile으로;
- [0153] Phe을 Met, Leu 또는 Tyr으로;
- [0154] Ser을 Thr으로;
- [0155] Thr을 Ser으로;
- [0156] Trp을 Tyr으로;
- [0157] Tyr을 Trp 또는 Phe으로;
- [0158] Val을 Ile 또는 Leu으로.
- [0159] n) 핵산 또는 폴리펩타이드 분자는 - 예를 들어, 이의 본래의 생물학적 공급원 및/또는 수득되는 반응 매질 또는 배양 배지와 비교할 때 - 상기 공급원 또는 배지 중에서 보통 결합되는 적어도 하나의 다른 성분, 예를 들어, 다른 핵산, 다른 단백질/폴리펩타이드, 또다른 생물학적 성분 또는 거대 분자 또는 적어도 하나의 오염물, 불순물 또는 최소 성분으로부터 분리될 때 "본질적으로 분리된 (형태)"인 것으로 고려된다. 특히, 핵산 또는 폴리펩타이드 분자는 적어도 2배, 특히 적어도 10배, 보다 특히 적어도 100배, 1000배 이하 또는 그 이상으로 정제될 때 "본질적으로 분리된"것으로 고려된다. "본질적으로 분리된 형태"인 핵산 또는 폴리펩타이드 분자는 바람직하게는 적절한 기술, 예를 들어, 폴리아크릴아미드-겔 전기영동과 같은 적절한 크로마토그래피 기술을 사용한 측정시 본질적으로 균질하다.
- [0160] o) 예를 들어, 2개의 번역글로불린 단일 가변 도메인 서열 사이의 "서열 동일성"이란, 이들 2개의 서열 사이에 동일한 아미노산 백분율(%)을 나타낸다. 이것은 국제공개공보 WO 08/020079의 제49면 및 제50면에 f) 단락에 기재된 바와 같이 계산되거나 결정될 수 있다. "서열 유사성"이란, 동일하거나 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산의 백분율(%)을 나타낸다.

- [0161] 표적 특이성
- [0162] 본 발명의 폴리펩타이드는 이들 분자 (LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자) 둘 다에 포함된 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 점에서 LRP6 뿐만 아니라 LRP5에 대한 특이성을 갖는다.
- [0163] 본 발명의 분자는 사람 형태의 LRP5 및 LRP6에 결합해야 하며, 바람직하게는 약물 개발과 관련이 있는 다른 종에서의 대응물, 즉, 시노몰구스(cynomolgus) 및 마우스 LRP5 및 LRP6에도 또한 결합해야 한다.
- [0164] 본 발명의 폴리펩타이드
- [0165] 가장 넓은 의미에서, 본 발명은 암 질환의 치료를 위한 신규한 약리학적 활성제를 제공한다. 본 발명에 따른 제제는 상이한 에피토프에서 LRP5 및/또는 LRP6에 결합하는 2개 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 신규한 클래스의 결합 분자, 즉, LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토픽 폴리펩타이드에 속한다. 용어 "교차-반응성" 및 "바이파라토픽"은 상기에 설명되어 있으므로, LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토픽 분자는 LRP5 단백질에 포함된 2개의 상이한 에피토프에서 LRP5에 결합할 수 있고 또한 LRP6 단백질에 포함된 상응하는 2개의 에피토프에서 LRP6에 결합할 수 있는 분자로서 정의될 수 있다.
- [0166] 보다 구체적으로, 본 발명의 폴리펩타이드는 다음을 포함한다:
- [0167] - 에피토프를 통해/Wnt1 신호 전달 경로의 억제를 초래하는 방식으로 LRP6 뿐만 아니라 LRP5에 특이적으로 결합할 수 있어서 (LRP5/LRP6 교차-반응성), Wnt1-구동된 표적 유전자 전사가 억제되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인, 및
- [0168] - 에피토프를 통해/Wnt3a 신호 전달 경로의 억제를 초래하는 방식으로 LRP6 뿐만 아니라 LRP5에 특이적으로 결합할 수 있어서 (LRP5/LRP6 교차-반응성), Wnt3a-구동된 표적 유전자 전사가 억제되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인.
- [0169] 상이한 에피토프 (Wnt1/Wnt3a 신호 전달 관련)에 결합하는, 이러한 폴리펩타이드에 존재하는 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 인해, 이들 분자는 바이파라토픽 결합 분자이다. 이러한 바이파라토픽 결합 모드는 도 1에 개략적으로 나타나 있다.
- [0170] 이러한 맥락에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 도 1 (분자내 결합 모드)에 나타난 바와 같이 이의 LRP5/LRP6 결합 도메인 둘 다를 통해 하나의 단일 LRP5 또는 LRP6 분자에 결합할 수 있는 것으로 추정된다는 것에 특히 주의해야 한다. 그러나, 다른 결합 모드도 또한 일어날 수 있다.
- [0171] 마지막으로, 본 발명의 폴리펩타이드는 LRP5 및 LRP6에 결합하기 위해 DKK1 - LRP5 및 LRP6의 천연 리간드이고 Wnt1 및 Wnt3a 신호 전달을 방해함 - 과 경쟁할 수 있고, 따라서 Wnt1 및 Wnt3a 신호 전달 경로를 억제할 수 있는 것으로 추정된다. 그러나, 이러한 이론도 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0172] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 LRP5 또는 LRP6에 특이적으로 결합하며, 여기서, 이러한 폴리펩타이드는 (a) 다음 CDR 서열을 가짐으로써 정의되는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (i) 내지 (iii)의 그룹으로부터 선택되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0173] (i):
- [0174] CDR1: TYTVG (= 서열번호 1)
- [0175] CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= 서열번호 2)
- [0176] CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= 서열번호 3)
- [0177] [= Wnt1-333E06모드 도메인의 CDR]
- [0178] (ii):
- [0179] CDR1: SYAMG (= 서열번호 4)
- [0180] CDR2: AIRRSGRRYYADSVKG (= 서열번호 5)
- [0181] CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= 서열번호 6)
- [0182] [= Wnt1-333G06 도메인의 CDR]

- [0183] (iii):
- [0184] CDR1: RYTMG (= 서열번호 7)
- [0185] CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 8)
- [0186] CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= 서열번호 9)
- [0187] [= Wnt1-332D03모드 도메인의 CDR]
- [0188] (b) 다음 CDR 서열을 가짐으로써 정의되는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (iv) 및 (v)의 그룹으로부터 선택되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0189] (iv):
- [0190] CDR1: SYAMG (= 서열번호 10)
- [0191] CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 11)
- [0192] CDR3: SPIPYGSLRRRNNDY (= 서열번호 12)
- [0193] [= Wnt3a-093A01 도메인의 CDR]
- [0194] (v):
- [0195] CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)
- [0196] CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)
- [0197] CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= 서열번호 15)
- [0198] [= Wnt3a-367B10 도메인의 CDR].
- [0199] 이러한 면역글로불린 단일 가변 도메인에 대한 용어 "제1" 및 "제2"의 사용은 이들 도메인이 상이한 CDR 서열을 포함할 것이며 상이한 에피토프에 결합할 것이므로 이들 도메인이 단지 상이한 도메인 것을 나타내도록 의도된다. 그러나, 이들 용어는 이러한 폴리펩타이드 사슬 내의 도메인의 정확한 순서 또는 서열을 의미하는 것으로 이해되어서는 안된다. 환원하자면, 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인 (a) 및 (b)는 본 발명의 이러한 폴리펩타이드 내에서 (a) - (b) 순서로 또는 (b) - (a) 순서로 정렬될 수 있다.
- [0200] 용어 "LRP5 또는 LRP6에 특이적으로 결합하는"이란, 면역글로불린 단일 가변 도메인 (a) 및 (b)가 LRP5 및 LRP6에 대하여 교차-반응적인 것을 의미하는 것으로 의도된다. 물론, 이러한 분자의 결합 특성은 이의 (CDR) 서열에 의해 결정되므로, 상기 및 특허청구범위에 설명한 "LRP5 또는 LRP6에 특이적으로 결합하는"의 특징은 단지 본 발명의 유용성을 설명하고 본 발명의 범위를 제한하지 않도록 의도될 뿐이다.
- [0201] 면역글로불린 단일 가변 도메인은 전형적으로 4개의 골격 영역 (각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역 (각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어진다. 하나의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 쇄 내에 위치하기 위해서, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인은 직접 또는 링커 펩타이드에 의해 공유적으로 연결될 필요가 있다.
- [0202] 따라서, 본 발명의 분자의 일반 구조는 또한 다음과 나타낼 수 있다:
- [0203] FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [링커 펩타이드] - FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4
- [0204] 여기서,
- [0205] Fr(a)는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인의 골격 영역을 나타내고,
- [0206] FR(b)는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인의 골격 영역을 나타내고,
- [0207] CDR(a)는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 CDR을 나타내고,
- [0208] CDR(b)는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR을 나타내고,
- [0209] [링커 펩타이드]는 임의로 존재할 수 있는 링커 펩타이드를 나타내고,

- [0210] CDR은 상기에 설명한 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0211] 다시, (a) 및 (b)는 교환될 수 있는 것으로, 즉,
- [0212] FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4 - [링커 펩타이드] - FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4
- [0213] 의 일반 구조를 갖는 분자도 또한 본 발명에 포함되어야 하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0214] 링커 펩타이드는 다음 CDR을 포함하는 제3 도메인, 예를 들어, 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어, A1b11 도메인을 임의로 포함하거나 이들로 이루어진다:
- [0215] CDR(A1b11)1: SFGMS (= 서열번호 16)
- [0216] CDR(A1b11)2: SISGSGSDTYADSVKG (= 서열번호 17)
- [0217] CDR(A1b11)3: GGSLSR (= 서열번호 18)
- [0218] 이것은 다음의 일반 구조를 갖는 본 발명의 폴리펩타이드의 그룹을 생성한다:
- [0219] FR(a)1 - CDR(a)1 - FR(a)2 - CDR(a)2 - FR(a)3 - CDR(a)3 - FR(a)4 - [링커 펩타이드] - FR(A1b11)1 - CDR(A1b11)1 - FR(A1b11)2 - CDR(A1b11)2 - FR(A1b11)3 - CDR(A1b11)3 - FR(A1b11)4 - [링커 펩타이드] - FR(b)1 - CDR(b)1 - FR(b)2 - CDR(b)2 - FR(b)3 - CDR(b)3 - FR(b)4.
- [0220] 다시, 3개의 면역글로불린 단일 가변 도메인 (a), (b) 및 A1b11의 순서는 고정되어 있지 않지만, 상기 도메인이 다음의 순서대로 정렬되어 있는 폴리펩타이드도 또한 포함되어야 한다:
- [0221] (b) - A1b11 - (a)
- [0222] 또한, 폴리펩타이드의 N- 또는 C-말단에서 A1b11 도메인을 갖는 폴리펩타이드 (예를 들어, A1b11 - (a) - (b), A1b11 - (b) - (a), (a) - (b) - A1b11 또는 (b) - (a) - A1b11)도 또한 본 발명에 포함되어야 한다.
- [0223] 3개의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 다음과 같이 정의된 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다:
- [0224] 제1의 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0225] CDR1: TYTVG (= 서열번호 1)
- [0226] CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= 서열번호 2)
- [0227] CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= 서열번호 3)
- [0228] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0229] CDR1: SYAMG (= 서열번호 10)
- [0230] CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 11)
- [0231] CDR3: SPIPYGSLRRRNNYDY (= 서열번호 12)
- [0232] 을 포함하는 폴리펩타이드.
- [0233] 제2의 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0234] CDR1: SYAMG (= 서열번호 4)
- [0235] CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= 서열번호 5)
- [0236] CDR3: ARRVRSSSTRYNTGTWWWEY (= 서열번호 6)
- [0237] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0238] CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)
- [0239] CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)
- [0240] CDR3: DPRGYGVAYVSAYYDY (= 서열번호 15)

- [0241] 을 포함하는 폴리펩타이드.
- [0242] 제3의 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0243] CDR1: RYTMG (= 서열번호 7)
- [0244] CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 8)
- [0245] CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEY (= 서열번호 9)
- [0246] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0247] CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)
- [0248] CDR2: AISWRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)
- [0249] CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEY (= 서열번호 15)
- [0250] 을 포함하는 폴리펩타이드.
- [0251] 물론, 상기에 설명한 변형 - 즉, 링커 펩타이드 및/또는 추가의 도메인을 임의로 포함함, 특히, A1b11 도메인, 상이한 순서의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함함 - 도 또한 이들 3개의 바람직한 실시형태에 적용되어야 한다.
- [0252] 구체적으로 바람직한 실시형태에서, 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인은 2개의 LRP5/LRP6 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인 사이에 위치한다. 따라서, 3개의 구체적으로 바람직한 실시형태는 다음과 같이 예상할 수 있다:
- [0253] 제1의 구체적으로 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0254] CDR1: TYTVG (= 서열번호 1)
- [0255] CDR2: AIRRRGSSTYYADSVKG (= 서열번호 2)
- [0256] CDR3: DTRTVALLQYRYDY (= 서열번호 3)
- [0257] 다음 CDR 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0258] CDR1: SFGMS (= 서열번호 16)
- [0259] CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= 서열번호 17)
- [0260] CDR3: GGSLSR (= 서열번호 18);
- [0261] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0262] CDR1: SYAMG (= 서열번호 10)
- [0263] CDR2: AISWSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 11)
- [0264] CDR3: SPIPYGSLLRRRNNDY (= 서열번호 12)
- [0265] 을 포함하는 폴리펩타이드;
- [0266] 이 순서대로 또는 상기 도메인의 순서는 변할 수 있다.
- [0267] 제2의 구체적으로 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0268] CDR1: SYAMG (= 서열번호 4)
- [0269] CDR2: AIRRSGRRTYYADSVKG (= 서열번호 5)
- [0270] CDR3: ARVRSSSTRYNTGTWWWEY (= 서열번호 6);
- [0271] 다음 CDR 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0272] CDR1: SFGMS (= 서열번호 16)
 [0273] CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= 서열번호 17)
 [0274] CDR3: GGSLSR (= 서열번호 18);
 [0275] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0276] CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)
 [0277] CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)
 [0278] CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= 서열번호 15)

[0279] 을 포함하는 폴리펩타이드;
 [0280] 이 순서대로 또는 상기 도메인의 순서는 변할 수 있다.
 [0281] 제3의 구체적으로 바람직한 실시형태: 다음 CDR 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0282] CDR1: RYTMG (= 서열번호 7)
 [0283] CDR2: AIVRSGGSTYYADSVKG (= 서열번호 8)
 [0284] CDR3: DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (= 서열번호 9);

[0285] 다음 CDR 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0286] CDR1: SFGMS (= 서열번호 16)
 [0287] CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (= 서열번호 17)
 [0288] CDR3: GGSLSR (= 서열번호 18);

[0289] 및 다음 CDR 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0290] CDR1: SYAMG (= 서열번호 13)
 [0291] CDR2: AISWRSGSTYYADSVKG (= 서열번호 14)
 [0292] CDR3: DPRGYGVAYVSAYYEEY (= 서열번호 15)

[0293] 을 포함하는 폴리펩타이드;
 [0294] 이 순서대로 또는 상기 도메인의 순서는 변할 수 있다.
 [0295] 상기에 언급된 CDR 서열은 표 IA, IB 및 IC에 요약되어 있다:

[표 IA]

[0297] Wnt1 신호 전달을 방해하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR 서열:

| | Wnt1-333E06 모드 | Wnt1-333G06 | Wnt1-332D03 모드 |
|------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| CDR1 | TYTVG (서열번호 1) | SYAMG (서열번호 4) | RYTMG (서열번호 7) |
| CDR2 | AIRRRGSSTYYADSVKG (서열번호 2) | AIRRSGRRTYYADSVKG (서열번호 5) | AIVRSGGSTYYADSVKG (서열번호 8) |
| CDR3 | DTRTVALLQYRYDY (서열번호 3) | ARRVRSSTRYNTGTWWWEY (서열번호 6) | DRRGRGENYILLYSSGRYEEY (서열번호 9) |

[0298]
 [0299] [표 IB]

[0300] Wnt3a 신호 전달을 방해하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR 서열:

| | Wnt3a-093A01 | Wnt3a-367B10 |
|------|--------------------------------|--------------------------------|
| CDR1 | SYAMG (서열번호 10) | SYAMG (서열번호 13) |
| CDR2 | AISWSGGSTYYADSVKG (서열번호 11) | AISWRSGSTYYADSVKG (서열번호 14) |
| CDR3 | SPIPYGSLRRRNNYDY (서열번호 12) | DPRGYGVAYVSAYEY (서열번호 15) |

[0301]

[표 IC]

[0302] 혈청 알부민 (Alb11 도메인)에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR 서열:

| | Alb11 도메인 |
|------|--------------------------------|
| CDR1 | SFGMS (서열번호 16) |
| CDR2 | SISGSGSDTLVADSVKG (서열번호 17) |
| CDR3 | GGSLSR (서열번호 18) |

[0303]

[0304] 상기에 설명한 CDR 서열에 추가하여, 본 발명의 폴리펩타이드에 포함되는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 면역글로불린 골격 영역 (FR) 서열을 포함한다. 이들 서열은 바람직하게는 사람에서 면역원성이 아니며, 따라서 바람직하게는 사람 또는 사람화 FR 서열이다. 적합한 사람 또는 사람화 FR 서열은 당해 분야에 공지되어 있다. 구체적으로 바람직한 FR 서열은 완전한 면역글로불린 단일 가변 도메인, 이로써 FR 서열 뿐만 아니라 CDR 서열을 개시하는 이하에 나타난 실시형태로부터 채택될 수 있다.

[0305] 보다 구체적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 VHH 도메인, 바람직하게는 사람화 VHH 도메인인 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다.

[0306] 보다 더 구체적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는

[0307] (a) 다음 서열을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인:

[0308] (i)

[0309] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA

[0310] AIRRRGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA

[0311] DTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSS

[0312] [= Wnt1-333E06모드 도메인; = 서열번호 19]

[0313] (ii)

[0314] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA

[0315] AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA

[0316] ARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSS

[0317] [= Wnt1-333G06 도메인; = 서열번호 20], 및

[0318] (iii)

- [0320] AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA
- [0321] AIVRSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
- [0322] DRRGRGENYILLYSSGRYEYWGQGTLVTVSS
- [0323] [= Wnt1-332D03모드 도메인; = 서열번호 21],
- [0324] (b) 다음 서열을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인 (iv) 및 (v)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인:
- [0325] (iv)
- [0326] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
- [0327] AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
- [0328] SPIPYGSLRLRRNNYDYWGQGTLVTVSS
- [0329] [= Wnt3a-093A01 도메인; = 서열번호 22], 및
- [0330] (v)
- [0331] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA
- [0332] AISWSRSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
- [0333] DPRGYGVAYVSAYEYWGQGTLVTVSS
- [0334] [= Wnt3a-367B10 도메인; = 서열번호 23].
- [0335] 바람직한 실시형태는 하기를 포함하는 폴리펩타이드이다:
- [0336] - 서열번호 19에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 서열번호 22에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인; 또는
- [0337] - 서열번호 20에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인; 또는
- [0338] - 서열번호 21에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인.
- [0339] 따라서, 상기 실시형태는 도식적으로
- [0340] isvd(a) - [링커 펩타이드] - isvd(b)
- [0341] 와 같이 나타낼 수 있으며, 여기서, "isvd"는 각각의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 나타내고, 그렇지 않으면 동일한 정의 및 변형은, 특히, 임의의 링커 펩타이드 및/또는 추가의 도메인, 특히, Alb11 도메인의 존재에 관하여 및 면역글로불린 단일 가변 도메인의 상이한 순서에 관하여 상기에 설명한 바와 같이 적용되어야 한다.
- [0342] 본 발명의 구체적인 실시형태에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 반감기 연장 모이어티 (moiety)를 추가로 포함할 수 있고, 상기 반감기 연장 모이어티는 상기 폴리펩타이드에 공유적으로 연결되어 있고, 알부민 결합 모이어티, 예를 들어, 알부민 결합 펩타이드 또는 알부민 결합 면역글로불린 도메인, 바람직하게는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인, 보다 바람직하게는 Alb11 도메인, 트랜스페린 결합 모이어티, 예를 들어, 항-트랜스페린 면역글로불린 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 분자, 사람 혈청 알부민 및 사람 혈청 알부민의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택된다.
- [0343] 상기에 언급된 Alb11 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열은 다음과 같다:
- [0344] EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW
- [0345] VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI
- [0346] GGSLSRSSQGTLVTVSS
- [0347] (= Alb11 도메인; = 서열번호 24)

- [0348] 사람 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2006/122787 및 WO 2008/028977에 보다 상세하게 기재되어 있다. 사람 혈청 알부민에 결합하는 다른 펩타이드는, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2008/068280, WO 2009/127691 및 WO 2011/095545에 기재되어 있다.
- [0349] 따라서, 본 발명의 3개의 바람직한 구체적인 실시형태는 다음과 같다:
- [0350] 제1의 바람직한 구체적인 실시형태:
- [0351] - 서열번호 19에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0352] - 서열번호 24에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0353] - 서열번호 22에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드;
- [0354] 이 순서대로 또는 상기 3개의 도메인의 순서는 변할 수 있다.
- [0355] 제2의 바람직한 구체적인 실시형태:
- [0356] - 서열번호 20에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0357] - 서열번호 24에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0358] - 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드;
- [0359] 이 순서대로 또는 상기 3개의 도메인의 순서는 변할 수 있다.
- [0360] 제3의 바람직한 구체적인 실시형태:
- [0361] - 서열번호 21에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제1 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0362] - 서열번호 24에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인;
- [0363] - 서열번호 23에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 제2 (LRP5/LRP6 결합) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드;
- [0364] 이 순서대로 또는 상기 3개의 도메인의 순서는 변할 수 있다.
- [0365] 보다 더 구체적으로 바람직한 실시형태에서, 알부민 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인은 2개의 LRP5/LRP6 결합 면역글로불린 단일 가변 도메인 사이에 위치한다.
- [0366] 상기에 언급된 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열은 표 IIA, IIB 및 IIC에 요약되어 있다:
- [0367] [표 IIA]

[0371] Wnt1 신호 전달을 방해하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열:

| VHH ID 서열번호 | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|-------------------------------------|--|-------|--------------------|---------------------------|--|----------------------------------|----------------|
| Wnt1-333E06 모드 서열번호 19 | AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS | TYTVG | WFRQAPG KEREFVA | AIRRRGS STYYADS VKG | RFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA | DTRTVA LLQYRY DY | WGQGT LTVSS |
| Wnt1-333G06 서열번호 20 | AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFS | SYAMG | WFRQAPG KEREFVA | AIRRSGR RTYYADS VKG | RFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA | ARRVRS STRYNT GTWW WEY | WGQGT LTVSS |
| Wnt1-332D03 모드 서열번호 21 | AVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGLTFS | RYTMG | WFRQAPG KEREFVA | AIVRS STYYADS VKG | RFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA | DRRGR GENYILL YSSGRY EY | WGQGT LTVSS |

[0372]

[0373] [표 IIB]

[0374] Wnt3a 신호 전달을 방해하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열:

| VHH ID 서열번호 | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|--------------------------------|--|-------|--------------------|---------------------------|--|---------------------------|----------------|
| Wnt3a-093A01 서열번호 22 | EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGRTFS | SYAMG | WFRQAPG KEREFVA | AISWSGG STYYADS VKG | RFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA | SPIPYGS LLRRRN NYDY | WGQGT LTVSS |
| Wnt3a-367B10 서열번호 23 | EVQLVESG GGLVQPG GSLRLSCAA SGGTFS | SYAMG | WFRQAPG KEREFVA | AISWRSG STYYADS VKG | RFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CAA | DPRGY GVAYVS AYYDY | WGQGT LTVSS |

[0375]

[0376] [표 IIC]

[0377] 혈청 알부민 (A1b11 도메인)에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열:

| VHH ID 서열번호 | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|-------------------------|--|-------|--------------------|---------------------------|--|--------|----------------|
| A1b11 서열번호 24 | EVQLVESG GGLVQPG NSLRLSCA ASGFTFS | SFGMS | WVRQAPG KGLEWVS | SISGSGSD TLYADSV KG | RFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYY CTI | GGSLSR | SSQGT LTVSS |

[0378]

[0379] 상기에 설명한 바와 같이, 본 발명의 폴리펩타이드에 존재하는 (적어도 2개의) 면역글로불린 단일 가변 도메인은 직접, 링커의 사용 없이 또는 링커를 통해 서로 연결될 수 있다. 링커는 바람직하게는 링커 펩타이드이며,

본 발명에 따르면, 적어도 2개의 상이한 면역글로불린 단일 가변 도메인이 이의 표적 에피토프의 각각에 결합할 수 있도록 선택될 것이다.

- [0380] 적합한 링커는 특히 에피토프, 특히 면역글로불린 단일 가변 도메인이 결합해야 하는 표적 분자상의 에피토프 사이의 거리에 의존할 것이다. 이것은 임의로 제한된 정도의 통상적인 실험 후에 본 명세서의 개시 내용에 기초하여 통상의 기술자에게 명백할 것이다.
- [0381] 따라서, 적합한 링커는 아미노산 서열, 예를 들어, 9개 이상의 아미노산, 바람직하게는 적어도 17개의 아미노산, 예를 들어, 약 20 내지 40개의 아미노산의 길이를 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 링커 서열은 자연 발생 서열 또는 비-자연 발생 서열일 수 있다. 치료 목적을 위해 사용되는 경우, 링커는 바람직하게는 본 발명의 폴리펩타이드가 투여되는 대상체에서 비-면역원성이다.
- [0382] 링커 서열의 하나의 유용한 그룹은 국제공개공보 WO 1996/34103 및 WO 1994/04678에 기재된 바와 같이 중쇄 항체의 힌지 영역으로부터 유도된 링커이다. 다른 예는 Ala-Ala-Ala와 같은 폴리-알라닌 링커 서열이다.
- [0383] 링커 서열의 더욱 바람직한 예는, 예를 들어, $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_5$, $(\text{gly}_4\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser})_3$, $(\text{gly}_3\text{ser})_5$, $(\text{gly}_3\text{ser})_7$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$, $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_5$, 및 $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_7$ 을 포함하여 $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$ 링커와 같은 상이한 길이의 Gly/Ser 링커이다.
- [0384] 대안적으로 또는 폴리펩타이드 링커에 추가하여, 본 발명의 폴리펩타이드에 존재하는 적어도 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인은, 바람직하지만 비-제한적인 실시형태에서 상기에서 이미 기재된 바와 같이 추가의 면역글로불린 단일 가변 도메인일 수 있는 또 다른 폴리펩타이드와 같은 또 다른 모이어티를 통해 서로 연결될 수 있다. 이러한 모이어티는 본질적으로 불활성일 수 있거나, 폴리펩타이드의 목적하는 특성을 개선시키는 것과 같은 생물학적 효과를 가질 수 있거나, 하나 이상의 추가의 목적하는 특성을 폴리펩타이드에 부여할 수 있다. 상기에 이미 설명한 바와 같이, (사람) 혈청 알부민 결합 도메인, 예를 들어, Alb11 도메인과 같은 바람직한 추가의 폴리펩타이드 도메인은 폴리펩타이드의 반감기를 증가시킬 것이다.
- [0385] 따라서, 추가의 실시형태에 따르면, 본 발명은 구체적으로는 다음 서열 중 어느 하나를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서, 정확한 아미노산 서열은 하기 표 III으로부터 채택될 수 있다:
- [0386] 서열번호 25 (= 폴리펩타이드 F013500575의 서열),
- [0387] 서열번호 26 (= 폴리펩타이드 F013500571의 서열),
- [0388] 및
- [0389] 서열번호 27 (= 폴리펩타이드 F013500720의 서열).
- [0390] 보다 더 구체적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 다음 분자 그룹으로부터 선택된다:
- [0391] 서열번호 25의 서열을 갖는 폴리펩타이드 F013500575,
- [0392] 서열번호 26의 서열을 갖는 폴리펩타이드 F013500571, 및
- [0393] 서열번호 27의 서열을 갖는 폴리펩타이드 F013500720.
- [0394] **[표 III]**

[0395] 본 발명의 폴리펩타이드의 3개의 구체적인 실시형태의 서열

| ID 서열번호 | 아미노산 서열 (CDR 서열 밑줄 치) |
|----------------------------------|--|
| F013500575 서열번호 25 | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVA <u>AI</u> RRRGSSSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTRTVALLOQRYDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPNSLR SCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLLRRRN NYDYWGQGLTVTVSSA |
| F013500571 서열번호 26 | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA <u>AI</u> RRSGRRTYY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAP GKEREFVAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRG YGVAVVSAYEYWGQGLTVTVSSA |
| F013500720 서열번호 27 | AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA <u>AI</u> VRSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRRGRGENYILLYSSGRYEYWGQ GLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGK EREFVAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPRGYG VAYVSAYEYWGQGLTVTVSSA |

[0396]

[0397] 이전에 설명한 바와 같이, 달리 명시되지 않는다면, 본 발명의 폴리펩타이드는 LRP5/LRP6에 대한 결합이 추가의 모이어티 또는 추가의 폴리펩타이드 도메인에 의해 방해되지 않는한 이러한 추가의 모이어티 및/또는 추가의 폴리펩타이드 도메인을 포함할 수 있다.

[0398] 본 발명의 폴리펩타이드는 글리코실 잔기 또는 변형된 아미노산 측쇄와 같은 변형물을 추가로 함유할 수 있으며, 이들은 이러한 분자의 반감기 및 다른 특성을 증가시키기 위해 폐길화(PEGylated)될 수 있다. 폐길화 바이파라토크 면역글로불린 단일 가변 도메인 작제물에 유용한 기술 및 시약은, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2011/107507로부터 채용될 수 있다.

[0399] 본 발명의 폴리펩타이드는 특정 발현 시스템 (예를 들어, 특정 벡터 또는 숙주 세포)을 사용하여 발현되거나, 봉입체로서 또는 가용성 형태로 발현되거나, 배지 또는 원형질막 주위 공간으로 분비되거나, 세포 내에 함유되거나, 보다 균질한 생성물을 생산하도록 분자를 최적화하기 위해서 변형된 N-말단 서열, 예를 들어, 하나 이상의 N-말단 아미노산의 결실, 또는, 예를 들어, 제1 N-말단 아미노산 (예를 들어, 글루타메이트의 알라닌으로)의 교환을 가질 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는, 예를 들어, 이러한 폴리펩타이드의 면역원성을 보다 감소시키거나 안정성을 보다 증가시키기 위해, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2012/175741, WO 2011/075861 또는 WO 2013/024059에 설명된 바와 같이, 임의의 골격 영역 내의 다른 정의된 위치에서 또는 C-말단 부분에서 추가의 알라닌 (상기 표 III에 나타난 3개의 실시형태를 위해 나타난 바와 같음) 및/또는 추가의 아미노산 교환과 같은 변형된 C-말단 서열을 가질 수 있다.

[0400] 또한, 본 발명의 폴리펩타이드의 반감기는 알부민 도메인을 부가함으로써, 즉, 이들을 알부민 융합 단백질로 전환함으로써 증가될 수 있다. 유용한 알부민 잔기의 예 및 이들을 결합 분자에 부가하는 방법은, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2001/079271 및 WO 2003/059934에 제공된다.

[0401] 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩타이드는 하기 실시예 7.1에 기재된 바와 같이 FACS 결합 검정으로 측정시 10^{-6} 몰/리터 이하, 보다 바람직하게는 10^{-9} 몰/리터 이하, 보다 더 바람직하게는 10^{-10} 내지 10^{-13} 몰/리터의 범위의 결합 (EC50) 값을 가지거나, 하기 실시예 7.3에 설명하는 바와 같이 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정으로 측정시 10^{-9} 몰/리터 이하, 바람직하게는 5×10^{-10} 몰/리터 내지 10^{-12} 몰/리터의 범위의 IC50 값을 가진다.

[0402] 본 발명의 폴리펩타이드는 TNBC, CRC 및 NSCLC와 같은 여러 암 유형의 보다 효과적인 치료를 가능하게 한다.

이들은 개선된 시험관내 특징 (즉, Wnt 경로 억제제의 보다 높은 효능), (예를 들어, 하기 실시예 7 및 8 참조)을 가지고, 현저한 생체내 종양 성장 억제율 특성을 가짐으로써, 예를 들어, 하기 실시예 9 및 10에 나타내는 바와 같이 당해 분야에 기재되어 있는 다른 LRP6 결합 분자와 비교하여 더 높은 생체내 효능을 유도한다.

[0403] 특히, 생체내 Wnt 구동된 종양 모델에 나타난 바와 같이, LRP5/LRP6 교차-반응성 반감기 연장된 바이파라토픽 사람화 VHH 작제물은 생체내 Wnt 신호 전달 및 종양 성장을 억제할 수 있으며, 심지어 해당 분야에 공지된 LRP6 결합제에 의해 동일한 실험 설정하에 달성될 수 없었던 실질적 종양 수축 (즉, 100% 초과 종양 성장 억제율)을 제공한다. 종양 수축 (즉, 종양 퇴행)은 물론 암 환자의 치료를 위한 목적하는 치료 효과 (즉, 효능)이다. 또한, 병리학적 완전 반응 (pCR)을 초래하는 종양 퇴행은 무진행 생존율 및 전체 생존율의 유의미한 개선을 나타내는 인정된 임상적 종점이다.

[0404] 동일한 생체내 실험에서, 어떠한 유의미한 체중 변화도 관찰되지 않았으며 (< 10%), 위장 병리조직학적 분석 결과는 본 발명의 상기 폴리펩타이드의 어떠한 독성 효과도 나타내지 않았다. 이것은 상기에서 논의된 시험관내 DKK1 발현 연구의 관점에서 특히 놀랍다 (즉, 장 점막 궤양 및 체중 감소를 초래함).

[0405] 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 실제로 암 질환의 치료 및 특히 (삼중 음성) 유방암과 같은 높은 미충족 의료 징후에서의 사용을 위한 신규한 치료 옵션을 제공한다.

[0406] 놀랍게도, 본 발명자들은 종래의 경로를 따르지 않음으로써, 즉, LRP6 ("Wnt 신호 전달 매개된 질환의 치료를 위한 표적으로서, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2009/056634에 언급됨)과 같은 하나의 주어진 표적에 대해 높은 특이성/선택성을 갖는 억제제 또는 결합 분자를 개발하려고 시도함으로써 이러한 해결책에 도달하였다. 이와 대조적으로, 본 발명자들은 동시에 2개의 관련 단백질 - LRP6 및 LRP5 - 를 표적화하는 분자를 개발하여, 종래 기술로부터 예상할 수 없었던 상기 현저하게 개선된 시험관내 및 생체내 효과를 달성하였다.

[0407] 이러한 우수성에 대한 근본적인 분자 기작은 완전히 명확하지는 않지만, 이러한 교차-반응성 분자가 Wnt 신호 경로의 매우 복잡한 신호 전달 캐스케이드(cascade)에 부가적이고, 이로 인해 더 강력한 영향을 미칠 수 있다는 것을 - 특정 이론에 구속되지 않고 - 추측할 수 있다.

[0408] 상기 유리한 효과는 하기 실시예 및 거기에 포함된 비교 데이터에 의해 추가로 예시될 것이다.

[0409] 더욱이, 본 발명의 폴리펩타이드는 제조가 용이하고 보다 가용성이며, 이는 통상적인 항체와 비교하여 보다 높은 농도로 저장 및/또는 투여될 수 있다는 것을 의미한다. 이들은 실온에서 안정하고 심지어 극단적인 pH에서도 장기적인 안정성을 가지므로, 냉장 설비의 사용 없이 제조, 저장 및/또는 수송될 수 있어서 비용, 시간 및 환경비용을 절감할 수 있다. 상기 내용 및 이들의 낮은 면역원성으로 인해, 이들은 또한 주사 및 주입 이외의 투여 경로 뿐만 아니라 투여 계획 및 특정 디바이스의 사용에 관한 다양한 옵션을 제공한다.

[0410] *핵산, 벡터, 숙주 세포*

[0411] 추가의 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 벡터 및 핵산 분자 뿐만 아니라, 이를 발현하는 숙주 세포에 관한 것이다. 이들 핵산, 벡터 및 숙주 세포는 본 발명의 폴리펩타이드를 제조하는데 유용하며, 이들의 추가의 측면 및 실시형태는 본 발명의 폴리펩타이드의 제조 방법의 개요와 관련하여 이하에서 추가로 기재될 것이다.

[0412] *치료 용도*

[0413] 이들의 생물학적 특성으로 인해, 본 발명의 폴리펩타이드는 암 및 특발성 폐 섬유증 (IPF)과 같은 과도하거나 또는 비정상적인 세포 증식을 특징으로 하는 질환을 치료하는데 적합하다.

[0414] 예를 들어, 다음의 암, 종양 및 기타 증식성 질환은 본 발명에 따른 폴리펩타이드로 치료될 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다:

[0415] 두경부의 암; 폐의 암, 예를 들어, 비소세포 폐암 (NSCLC) 및 소세포 폐암 (SCLC); 종격의 신생물, 예를 들어, 신경성 종양 및 중간엽 종양; 위장 (GI) 관 암, 예를 들어, 식도, 위 (위암), 췌장, 간 및 담도계 (간세포 암종 (HCC) 포함), 및 소장 및 대장 (예를 들어, 대장암 포함)의 암; 전립선의 암; 고환의 암; 부인암, 예를 들어, 난소암; 유방의 암, 예를 들어, 유방암종, 호르몬 수용체 양성 유방암, Her2 양성 유방암 및 삼중 음성 유방암; 내분비계의 암; 연조직의 육종, 예를 들어, 섬유 육종, 횡문근 육종, 혈관 육종, 카포시 육종; 뼈의 육종, 예를 들어, 골수종, 골육종, 유잉 종양, 섬유 육종, 골연골종, 골모세포종 및 연골모세포종; 중피종; 피부의 암, 예를 들어, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종 및 흑색종; 중추 신경계 및 뇌의 신생물, 예를 들어,

어, 성상세포종, 교모세포종, 신경아교종, 신경모세포종 및 망막모세포종; 림프종 및 백혈병, 예를 들어, B-세포 비호지킨 림프종 (NHL), T 세포 비호지킨 림프종, 만성 B-세포 림프구성 백혈병 (B-CLL), 만성 T 세포 림프구성 백혈병 (T-CLL), 호지킨병 (HD), 거대 과립 림프구 백혈병 (LGL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 골수성/골수성/골수 백혈병 (AML), 급성 림프성/림프모구성 백혈병 (ALL), 다발성 골수종 (MM), 형질세포종 및 골수이형성 증후군 (MDS); 미지의 원발성 부위의 암.

- [0416] 체내의 특정 위치/기원을 특징으로 하는 상기에 언급된 모든 암, 종양, 신 생물 등은 원발성 종양과 이로부터 유도되는 전이성 종양 둘 다를 포함하는 것을 의미한다.
- [0417] 보다 구체적으로, 본 발명의 폴리펩타이드는, 비정상적인 세포 증식이 비정상적인 (활성화된) Wnt 신호 전달에 기인하거나 이를 수반하는 질환, 특히, 암 질환의 치료에 유용하다.
- [0418] 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 특히 고형 종양의 치료, 보다 특히 폐, 간, 결장, 뇌, 갑상선, 췌장, 유방, 난소 및 전립선 암의 치료, 보다 더 특히, 비소세포 폐암 (NSCLC), 삼중 음성 유방암 (TNBC) 및 결장-직장 암 (CRC)의 치료에 유용하다. 특히, 본 발명의 폴리펩타이드는 국소 진행성 또는 전이성 TNBC를 앓고 있는 환자, 전이성 NSCLC 또는 국소 진행성 또는 전이성 CRC를 앓고 있는 환자를 단일 제제로 또는 조합으로 치료하여 무진행 생존율 (PFS) 및 전체 생존율 (OS)을 연장시키는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 유방암 환자의 병리학적 완전 반응 (pCR: 네오아췌반트 전신 치료 완료 후 완전 절제된 유방 검체 및 모든 샘플링된 부위 림프절의 병리조직학적 평가에 의해 잔류 침습성 및 원위치 암의 부재로 정의됨)을 달성하기 위한 네오아췌반트 치료제로서 사용될 수 있다.
- [0419] 본 발명의 폴리펩타이드는 제1 라인, 제2 라인 또는 임의의 추가 라인 치료의 맥락에서 치료 계획에 사용될 수 있다.
- [0420] 본 발명의 폴리펩타이드는 상기에 언급된 질환의 예방, 단기간 또는 장기간 치료에, 임의로 또한 방사선 요법 및/또는 수술과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0421] 마찬가지로, 본 발명의 폴리펩타이드는 특발성 폐 섬유증 (IPF) (문헌 [Konigshoff *et al.* "Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis". *PLoS One* 2008;3(5):e2142] 및 [Lam *et al.* "Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis". *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(2):185-95] 참조)과 같은 Wnt 신호 전달 경로에 연루된 비정상적인 세포 증식에 기인하는 다른 질환의 치료에 특히 유용하다.
- [0422] 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 내부 망막 세포에서의 비정상적인 Wnt 활성화로 인해 비정상적인 새로운 망막 혈관 형성의 증가를 초래하여 당뇨 망막병증의 발병 및 진행으로 이어지게 하는 망막병증의 치료, 특히 당뇨 망막병증의 치료에 특히 유용하다 (문헌 [Chen, Y., *et al.* "Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models" *The Am J Pathol.* 2009; 175(6):2676-85] 및 [Gao *et al.* "Elevated LRP6 levels correlate with vascular endothelial growth factor in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy" *Mol Vis.* 2015;21:665-72] 참조).
- [0423] 마지막으로, Wnt1/Wnt3a 신호 전달 경로의 억제제가 또한 수지상 세포 (DC) 및 수지상 세포 기능에 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여줄 수 있기 때문에, 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 상기에서 이미 설명한 각종 암 질환에서 종양 미세환경에 영향을 미치는데 유용할 뿐만 아니라 면역 및 감염 질환의 치료에도 유용할 수 있다. 종양은 항종양 면역을 능동적으로 억제하고, DC는 암 면역 회피 기작에서 중요한 역할을 한다. 특히, 연구 결과에 따르면, 종양 미세환경에서의 Wnt 리간드는 또한 면역 세포 내의 주위분비 신호 전달을 개시하고 숙주 항종양 면역을 조절할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Hong *et al.* "beta-catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells". *Cancer Res.* 2015;75(4):656-65] 참조).
- [0424] 물론, 상기 내용은 상기 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료학적 유효 용량을 투여함으로써 상기 질환을 치료하는 각종 방법에서의 본 발명의 폴리펩타이드의 용도, 이러한 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 이들 폴리펩타이드의 용도, 본 발명의 이러한 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물, 본 발명의 이러한 폴리펩타이드를 포함하는 약제의 조제 및/또는 제조 등을 포함한다.
- [0425] 다른 활성 물질과의 조합
- [0426] 본 발명의 폴리펩타이드는 단독으로 또는 다른 약리학적 활성 물질, 예를 들어, 최신 또는 표준 치료 화합물,

예를 들면, 세포 증식 억제 또는 세포 독성 물질, 세포 증식 억제제, 항-혈관형성 물질, 스테로이드, 면역 조절제/체크포인트 억제제 등과 조합하여 사용될 수 있다.

[0427] 본 발명에 따른 화합물과 조합하여 투여될 수 있는 세포 증식 억제 및/또는 세포 독성 활성 물질은, 호르몬, 호르몬 유사체 및 항호르몬, 아로마타제 억제제, LHRH 작용제 및 길항제, 성장 인자 (성장 인자, 예를 들어, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 상피 성장 인자 (EGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 사람 상피 성장 인자 (HER, 예를 들어, HER2, HER3, HER4) 및 간 세포 성장 인자 (HGF))의 억제제를 포함하지만 이들에 한정되지 않으며, 억제제는, 예를 들어, (항-)성장 인자 항체, (항-)성장 인자 수용체 항체 및 타이로신 키나제 억제제, 예를 들어, 세톡시맙, 게피티닙, 아파티닙, 닌테다닙, 이마티닙, 라파티닙, 보수티닙 및 트라스투주맙; 항대사물질 (예를 들어, 메토틱세이트, 알티트렉세드와 같은 항폴리산제, 5-플루오로우라실 (5-FU), 카페시타빈 및 젬시타빈과 같은 피리미딘 유사체, 메르캅토포린, 티오구아닌, 클라드리빈 및 펜토스타틴, 시타라빈 (ara C), 플루다라빈 (fludarabine)과 같은 퓨린 및 아데노신 유사체); 항종양 항생제 (예를 들어, 안트라사이클린); 백금 유도체 (예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴); 알킬화제 (예를 들어, 에스트라무스틴, 메클로레타민, 멜팔란, 클로람부실, 부술판, 다카르바진, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 테모졸로마이드, 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴 및 로무스틴, 티오테파); 항유사분열제 (예를 들어, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈 및 빈크리스틴과 같은 빈카 알칼로이드; 및 파클리탁셀, 도세탁셀과 같은 타산); 혈관형성 억제제, 튜블린 억제제; DNA 합성 억제제, PARP 억제제, 토포아이스오머라제 억제제 (예를 들어, 에피도도필로톡신, 예를 들어, 에토포시드 및 에토포포스, 테니포시드, 암사크린, 토포테칸, 이리노테칸, 미톡산트론), 세린/트레오닌 키나제 억제제 (예를 들어, PDK1 억제제, Raf 억제제, A-Raf 억제제, B-Raf 억제제, C-Raf 억제제, mTORC1/2 억제제, PI3K 억제제, PI3K α 억제제, 이중 mTOR/PI3K 억제제, STK33 억제제, AKT 억제제, PLK1 억제제 (예를 들어, 볼라세르딕), CDK 억제제, 오로라 키나제 억제제), 타이로신 키나제 억제제 (예를 들어, PTK2/FAK 억제제), 단백질 단백질 상호 작용 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, FLT3 억제제, BRD4 억제제, IGF-1R 억제제, TRAILR2 작용제, Bcl-xL 억제제, Bcl-2 억제제, Bcl-2/Bcl-xL 억제제, ErbB 수용체 억제제, BCR-ABL 억제제, ABL 억제제, Src 억제제, 라파마이신 유사체 (예를 들어, 에베롤리무스, 템시롤리무스, 리다포롤리무스, 시롤리무스), 안드로겐 합성 억제제, 안드로겐 수용체 억제제, DNMT 억제제, HDAC 억제제, ANG1/2 억제제, CYP17 억제제, 방사성 의약품, 면역 치료제, 예를 들어, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어, CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 및 TIM3 결합 분자/면역글로불린, 예를 들어, 이필리무맙, 니볼루맙, 펌브롤리주맙), 전통적인 종양 백신과 같은 암 백신 (전립선 암의 치료를 위한 세포 기반 백신, 예를 들어, Sipuleucel-T), 개인 맞춤형 신생항원 백신 및 암 살해 바이러스, 및 각종 화학요법제, 예를 들어, 아미포스틴, 아나그렐리드, 클로드로나트, 필그라스틴, 인터페론, 인터페론 알파, 류코보린, 리톡시맙, 프로카바진, 레바미솔, 메스나, 미토테인, 파미드로네이트 및 포르피리이다.

[0428] 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 약물과 조합하여 본 발명의 폴리펩타이드를 사용하는 것을 포함하는 치료 방법이 특히 바람직하다:

[0429] (i) 유방암 환자에서 화학요법 조합 (네오아주반트 설정에서 독소루비신/사이클로포스파미드 조합물 및/또는 카페시타빈/도세탁셀 조합물; 제1 및 이후 라인 치료를 위한 타산/백금 계획 포함)의 존재 또는 부재하의 항-VEGF 항체 (베바시주맙 및 다른 항-혈관형성 물질);

[0430] (ii) 폐암 환자에서 화학요법 조합 (백금 기반 세포독성 조합 요법, 제1 라인 치료에서 젬시타빈/시스플라틴; 제2 라인 치료에서 도세탁셀 또는 페메트렉세드를 포함함)의 존재 또는 부재하의 EGFR 변이체 NSCLC에 대한 EGFR TKI 또는 ALK 전위된 NSCLC에 대한 크리조티닙;

[0431] (iii) 예를 들어, CRC 환자의 치료에 대하여 화학요법 조합 (이리노테칸 포함), 항-VEGF 항체 조합 (베바시주맙 및 다른 항-혈관형성 물질) 또는 레고라페닙 조합의 존재 또는 비존재하의 항-EGFR 항체 (KRAS 야생형 종양에서의 세톡시맙 및 파니투무맙);

[0432] (iv) 예를 들어, 유방암, 폐암 및 CRC 환자에 대하여 항-PD-1 제제, 예를 들어, 펌브롤리주맙 및 니볼루맙, 항-PD-L1 제제, 항-CTLA4 제제, 항-BTLA 제제, 항-LAG3 제제 및 항-TIM3 제제, 예를 들어, 항-PDL1 항체 등을 포함하는 면역 치료제;

[0433] (v) 예를 들어, 유방암 또는 CRC 환자의 치료에 대하여 플라티늄 기반 항신생물제와 같은 화학요법제, 또는 폴린산, 5'-플루오로우라실 및 옥살리플라틴을 포함하는 FOLFOX 화학요법 계획과의 조합, 또는 폴린산, 5'-플루오로우라실, 옥살리플라틴 및 이리노테칸을 포함하는 FOLFOXIRI 화학요법 계획과의 조합.

- [0434] 2개 이상의 물질 또는 기본 제제가 조합된 치료 계획의 일부로서 사용되어야 할 때, 이들은 동일한 투여 경로를 통해 또는 상이한 투여 경로를 통해, 본질적으로 동시에 (즉, 동시에 (simultaneously), 함께 (concurrently)) 또는 상이한 시점에 (예를 들어, 순차적으로, 연속적으로 (successively), 교대로, 연속적으로 (consecutively) 또는 임의의 다른 종류의 대체 계획에 따라) 투여될 수 있다.
- [0435] 상기 물질 또는 기본 제제가 동일한 투여 경로를 통해 동시에 투여되어야 할 때, 이들은 상이한 약제학적 제형 또는 조성물로서 또는 조합된 약제학적 제형 또는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 또한, 2개 이상의 활성 물질 또는 기본 제제가 조합된 치료 계획의 일부로서 사용되어야 할 때, 상기 물질 또는 기본 제제의 각각은 상기 화합물 또는 기본 제제가 단독으로 사용될 때 사용되는 동일한 계획에 따라 동일한 양으로 투여될 수 있으며, 이러한 조합된 사용은 상승작용 효과를 유도하거나 유도하지 않을 수 있다. 그러나, 2개 이상의 활성 물질 또는 기본 제제의 조합된 사용이 상승작용 효과를 유도할 때, 투여될 물질 또는 기본 제제 중 하나, 그 이상 또는 전부의 양을 감소시키면서 목적하는 치료학적 작용을 여전히 달성하는 것도 또한 가능할 수 있다. 이것은, 예를 들어, 이들이 통상의 양으로 사용될 때에 상기 물질 또는 기본 제제의 하나 이상의 사용과 관련되는 임의의 원치않는 부작용을 회피, 제한 또는 감소시키면서 여전히 목적하는 약리 또는 치료 효과를 달성하는데 유용할 수 있다.
- [0436] 물론, 상기 내용은 상기 조합 파트너와 조합된 사용을 위한 본 발명의 폴리펩타이드의 제조 및 제조 방법을 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드와 조합된 사용을 위한 상기에 언급된 조합 파트너의 제조 및 제조 방법도 포함된다. 따라서, 본 발명은 이에 의해, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드와 조합하여 투여하기 위한, 보다 특히 본 발명의 폴리펩타이드와 조합 치료 계획으로 투여하기 위한 면역 조절인자/체크포인트 억제제, 예를 들어, 항-PD1 항체, 예를 들어, 펩트폴리주맙 또는 니볼루맙을 사용하는 방법 또는 사용을 위해 제조하는 방법을 제공한다.
- [0437] 또한, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩타이드 및 상기에 기재된 바와 같은 질환 및 장애의 치료에 사용되는 다른 약물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 다른 성분, 및 하기 기재되는 바와 같은 디바이스를 포함하는 키트를 또한 포함한다.
- [0438] *약제학적 조성물, 투여 방법, 투여량(dosage)*
- [0439] 질환의 상기 치료 방법이 상기 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 포함한다는 것은 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 이러한 조성물이 적어도 하나의 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는, 상기에 서 언급된 질환의 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0440] 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 이를 포함하는 조성물은 사용될 특정 약제학적 제형 또는 조성물에 따라 임의의 적합한 방식으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 이를 포함하는 조성물은, 예를 들어, 정맥내 (i.v.), 피하내 (s.c.), 근육내 (i.m.), 복강내 (i.p.), 경피로, 경구로, 설하로 (예를 들어, 혀 아래에 놓고 점막을 통해 혀 아래 모세혈관망으로 흡수되는 설하 정제, 분무제 또는 소적의 형태로), 비강(내)으로 (예를 들어, 비강 분무제의 형태로 및/또는 에어로졸로서), 국소적으로, 좌약에 의해, 흡입에 의해 또는 임의의 다른 적합한 방식에 의해 유효량 또는 유효 용량으로 투여될 수 있다.
- [0441] 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 이를 포함하는 조성물은 치료 또는 완화될 질환, 장애 또는 병태를 치료 및/또는 완화시키기 위해 적합한 치료 계획에 따라 투여된다. 임상시험은 일반적으로 치료 또는 완화될 질환, 장애 또는 병태, 질환의 중증도, 이의 증상의 중증도, 사용될 본 발명의 특정 폴리펩타이드, 특정 투여 경로 및 사용될 약제학적 제형 또는 조성물, 연령, 성별, 체중, 식이, 환자의 일반적 상태와 같은 인자 및 임상시험에게 널리 공지된 유사한 인자에 따라 적합한 치료 계획을 결정할 수 있을 것이다. 일반적으로, 치료 계획은 치료학적 유효량 또는 용량으로 하나 이상의 본 발명의 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 하나 이상의 조성물의 투여를 포함할 것이다.
- [0442] 일반적으로, 본 명세서에 언급된 질환, 장애 및 병태의 치료 및/또는 완화를 위해, 및 치료될 특정 질환, 장애 또는 병태, 사용될 본 발명의 특정 폴리펩타이드의 효능, 특정 투여 경로 및 사용될 특정 약제학적 제형 또는 조성물에 따라, 본 발명의 폴리펩타이드는 일반적으로 체중 kg 및 용량 당 0.005 내지 20.0 mg, 바람직하게는 0.05 내지 10.0 mg/kg/용량, 보다 바람직하게는 0.5 내지 10 mg/kg/용량의 양으로 연속적으로 (예를 들어, 주입에 의해) 또는 단일 용량 (예를 들어, 주 2회, 매주 마다 또는 매달 마다의 용량: 하기 참조)으로 투여될 것이지만, 특히 이전에 언급된 파라미터에 따라 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 일부 경우에는 상기에서 주어진 최소 용량보다 적게 사용하기에 충분할 수 있는 반면, 다른 경우에는 상한을 초과할 수 있다. 다량으로 투여될

때, 하루에 걸쳐 다수의 보다 적은 용량으로 분할하는 것이 바람직할 수 있다.

[0443] 본 발명의 특정 폴리펩타이드 및 이의 특정 약동학적 및 다른 특성에 따라, 매일 마다, 2일 마다, 3일 마다, 4일 마다, 5일 마다 또는 6일 마다, 매주 마다, 매달 마다 등으로 투여될 수 있다. 투여 계획은 장기의 주간 치료를 포함할 수 있다. "장기"란, 적어도 2주, 바람직하게는 수개월 또는 수년간 지속됨을 의미한다.

[0444] 본 발명의 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 조성물의 효능은, 관련된 특정 질환에 따라 그 자체로 공지된 임의의 적합한 시험관내 검정, 세포-기반 검정, 생체내 검정 및/또는 동물 모델 또는 이의 조합을 사용하여 시험될 수 있다. 적합한 검사 및 동물 모델은 통상의 기술자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 하기 실시예에 사용되는 검정 및 동물 모델을 포함한다.

[0445] 바람직하게, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들 검정 또는 모델 중 적어도 하나에서, 바람직하게는 생체내 모델 중 하나 이상에서 당해 분야에 공지된 통상적인 항체 (예를 들어, 상기 "기술분야" 부분에서 기재된 LRP6 결합제) 보다 우수한 특징을 갖는다.

[0446] 제형

[0447] 약제학적 용도를 위해, 본 발명의 폴리펩타이드는 (i) 적어도 하나의 본 발명의 폴리펩타이드 및 (ii) 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 아췌반트 및/또는 안정화제, 및 (iii) 임의로 하나 이상의 추가의 약리학적 활성 폴리펩타이드 및/또는 화합물을 포함하는 약제학적 제제로서 제형화될 수 있다. "약제학적으로 허용되는"이란, 각각의 물질이 개체에게 투여될 때 임의의 생물학적 또는 다른 바람직하지 않은 효과를 나타내지 않고 각각의 물질이 함유된 약제학적 조성물 중의 임의의 다른 성분 (예를 들어, 약제학적 활성 성분)과 유해한 방식으로 상호작용하지 않는 것을 의미한다. 구체적인 예는 표준 핸드북, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990)]에서 발견할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드는 통상적인 항체 및 항체 단편 및 다른 약제학적 활성 단백질에 대해 임의의 공지된 방식 그 자체로 제형화되어 투여될 수 있다. 따라서, 추가의 실시형태에 따르면, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 아췌반트 및/또는 안정화제, 및 임의로 하나 이상의 추가의 약리학적 활성 물질을 함유하는 약제학적 조성물 또는 제제에 관한 것이다.

[0448] 정맥내, 근육내, 피하 주사 또는 정맥내 주입과 같은 비경구 투여용 약제학적 제제는, 예를 들어, 활성 성분을 포함하고 임의로 추가의 용해 또는 희석 단계 후에 주입 또는 주사에 적합한 멸균 용액, 현탁액, 분산액, 유화액 또는 산제일 수 있다. 이러한 제제에 적합한 담체 또는 희석제는, 예를 들어, 멸균수 및 약제학적으로 허용되는 수성 버퍼 및 용액, 예를 들어, 생리학적 포스페이트-완충된 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액 및 헥스 용액; 물 오일; 글리세롤; 에탄올; 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 및 미네랄 오일, 동물성 오일 및 식물성 오일, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두 오일, 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0449] 본 발명의 폴리펩타이드의 용액은 또한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어, p-하이드록시벤조에이트, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티오메르살, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (의 알칼리 금속 염) 등과 같은 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 함유할 수 있다. 다수의 경우, 등장화제, 예를 들어, 당, 버퍼 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 임의로, 유화제 및/또는 분산제를 사용할 수 있다. 적당한 유동성은, 예를 들어, 리포솜의 형성에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 흡수를 지연시키는 다른 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴도 또한 첨가할 수 있다. 용액은 주사용 바이알, 앰플, 주입용 병 등에 충전할 수 있다.

[0450] 모든 경우, 최종 투여 형태는 멸균 유체이어야 하고, 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 한다. 멸균된 주사 용액은 필요에 따라 상기 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적당한 용매 중에 요구되는 양으로 활성 화합물을 혼합한 후 여과 멸균하여 제조된다. 멸균된 주사 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며, 이러한 기술은 이전에 멸균 여과된 용액 중에 존재하는 임의의 추가의 목적하는 성분 및 활성 성분의 산제를 생성시킨다.

[0451] 일반적으로, 수용액 또는 현탁액이 바람직할 것이다. 일반적으로, 본 발명의 폴리펩타이드와 같은 치료 단백질에 적합한 제형은 적합한 농도 (예를 들어, 0.001 내지 400 mg/ml, 바람직하게는 0.005 내지 200 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.01 내지 200 mg/ml, 보다 바람직하게는 1.0 내지 100 mg/ml, 예를 들어, 1.0 mg/ml (정맥내 투

여) 또는 100 mg/ml (피하 투여)의 단백질 및 용액의 등장성을 제공하기 위한 수성 버퍼, 예를 들어,

[0452] - 포스페이트 완충된 식염수, pH 7.4,

[0453] - 다른 포스페이트 버퍼, pH 6.2 내지 8.2,

[0454] - 아세테이트 버퍼, pH 3.2 내지 7.5, 바람직하게는 pH 4.8 내지 5.5

[0455] - 히스티딘 버퍼, pH 5.5 내지 7.0,

[0456] - 석시네이트 버퍼, pH 3.2 내지 6.6, 및

[0457] - 시트레이트 버퍼, pH 2.1 내지 6.2,

[0458] 및, 임의로, 염 (예를 들어, NaCl) 및/또는 당 (예를 들어, 수크로스 및 트레할로스) 및/또는 다른 다가 알콜 (예를 들어, 만니톨 및 글리세롤)

[0459] 을 함유하는 용액과 같은 완충된 단백질 용액이다.

[0460] 바람직한 완충된 단백질 용액은 220mM 트레할로스를 첨가하여 등장성으로 조정된 25mM 포스페이트 버퍼 (pH 6.5) 중에 용해된 본 발명의 폴리펩타이드를 약 0.05mg/ml로 함유하는 용액이다. 또한, 이러한 용액은 세제와 같은 다른 제제, 예를 들어, 0.02 % Tween-20 또는 Tween-80을 함유할 수 있다. 피하 적용을 위한 제형은 본 발명의 폴리펩타이드를 100mg/ml 이하 또는 심지어 100mg/ml 초과와 같이 상당히 높은 농도로 함유할 수 있다. 그러나, 상기에 주어진 바와 같은 성분 및 이의 양이 단지 하나의 바람직한 옵션을 나타낸다는 것은 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이의 대체물 및 변형물은 즉시 통상의 기술자에게 분명하거나 상기 개시 내용으로부터 출발하여 용이하게 상상할 수 있다.

[0461] 또한, 통상적인 항체 또는 항체 단편과 비교하여, 본 발명의 폴리펩타이드를 사용하는 한가지 주요 이점은 또한 비경구 투여 이외의 경로를 통해 용이하게 투여할 수 있으며, 이러한 투여용으로 용이하게 제형화할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 국제공개공보 WO 2004/041867에 기재된 바와 같이, 이러한 폴리펩타이드는 경구, 비강내, 폐내 및 경피 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0462] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 시린지, 주사기 펜, 마이크로펌프 또는 다른 디바이스와 같은 폴리펩타이드의 투여에 유용한 디바이스와 조합하여 사용될 수 있다.

[0463] 제조 및 정제의 방법

[0464] 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 추가로 제공하며, 이러한 방법은 일반적으로

[0465] - 본 발명의 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건하에서 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 (이하에서는 "본 발명의 핵산"이라 함)을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0466] - 숙주 세포에 의해 발현된 폴리펩타이드를 배양물로부터 회수하거나 분리하는 단계; 및

[0467] - 임의로 본 발명의 폴리펩타이드를 추가로 정제 및/또는 변형 및/또는 제형화하는 단계

[0468] 를 포함한다.

[0469] 본 발명의 핵산은, 예를 들어, 암호화 서열 뿐만 아니라 조절 서열 및 임의로 천연 또는 인공 인트론을 포함하는 DNA 분자일 수 있거나, cDNA 분자일 수 있다. 이것은 원래의 코돈을 가질 수 있거나, 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서의 발현을 위해 특별히 채택된 최적화 코돈 용법을 가질 수 있다. 본 발명의 한 실시형태에 따르면, 본 발명의 핵산은 상기에 정의된 바와 같은 본질적으로 분리된 형태이다.

[0470] 본 발명의 핵산은 또한, 예를 들어, 다시 본질적으로 분리된 형태일 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 YAC와 같은 벡터의 형태이고/이거나, 이러한 벡터에 존재하고/하거나, 이러한 벡터의 일부일 수 있다. 벡터는 본질적으로 발현 벡터, 즉, 시험관내 및/또는 생체내 (예를 들어, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 발현 시스템내) 폴리펩타이드의 발현을 제공할 수 있는 벡터일 수 있다. 이러한 발현 벡터는 일반적으로, 하나 이상의 적합한 조절 요소(들), 예를 들어, 프로모터(들), 인핸서(들), 터미네이터(들) 등에 작동가능하게 연결되는 적어도 하나의 본 발명의 핵산을 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는데 유용하거나 필요한 이러한 조절 요소 및 다른 요소, 예를 들어, 통합 인자(들), 선별 마커(들), 신호 또는 선도 서열(들), 리포터 유전자(들) 등의 구체적인 예는, 예를 들어, 국제공개공보 WO 2006/040153의 제131면 내지 제133면에 기재되어 있다.

- [0471] 본 발명의 핵산은, 본 명세서에 주어진 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 아미노산 서열에 대한 정보에 기초하여, 공지된 방식 그 자체로 (예를 들어, 자동화된 DNA 합성 및/또는 재조합 DNA 기술에 의해) 제조되거나 수득될 수 있다.
- [0472] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하거나 발현할 수 있고/있거나 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 함유하는 숙주 또는 숙주 세포에 관한 것이다. 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 숙주 세포는 세균 세포, 효모 세포, 진균류 세포 또는 포유동물 세포이다.
- [0473] 산업적 규모의 생산의 경우, 면역글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩타이드 및 이를 함유하는 단백질 치료제의 (산업적) 생산에 바람직한 이중 숙주는 대규모의 발현, 생산 및 발효, 특히 대규모의 (생물-)약제학적 발현, 생산 및 발효에 적합한 이. 콜라이 (*E. coli*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 및 사카로마이세스 세레비지에 (*S. cerevisiae*) 균주를 포함한다.
- [0474] 상기 설명한 바와 같은 세포에서 생산되는 본 발명의 폴리펩타이드는 세포내에서 (예를 들어, 세포기질내, 원형질막 주위공간내에서 또는 봉입체내에서) 생산된 후, 숙주 세포로부터 분리되어 임의로 추가로 정제될 수 있거나; 이들은 세포외로 (숙주 세포가 배양되는 배지 내로 분비됨) 생산된 후, 배양 배지로부터 분리되어 임의로 추가로 정제될 수 있다.
- [0475] 폴리펩타이드의 재조합 생산에 사용되는 추가의 방법 및 시약, 예를 들어, 적합한 발현 벡터, 형질전환 또는 형질감염 방법, 선별 마커, 단백질 발현의 유도 방법, 배양 조건 등은 당해 분야에 공지되어 있다. 유사하게, 본 발명의 폴리펩타이드의 제조 방법에 유용한 단백질 분리 및 정제 기술은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0476] 이. 콜라이 및 효모와 같은 간편한 재조합 숙주 유기체내에서의 발효를 통한 본 발명의 폴리펩타이드의 생산은, 일반적으로 고가의 포유동물 세포 배양 시설을 요구하는 통상적인 항체와 비교하여 비용-효율적이다. 또한, 달성가능한 발현 수준은 높으며, 본 발명의 폴리펩타이드의 수율은 1 내지 10 g/l (이. 콜라이) 및 10 g/l 이하 (효모) 및 그 이상의 범위이다.
- [0477] 실시에
- [0478] **실시예 1: 체액성 면역 반응의 유도를 위한 LRP5 및 LRP6에 의한 라마의 면역화**
- [0479] LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 VHH 도메인의 동정을 위해 해결되고 실시되어야 할 라마의 면역화를 위한 몇가지 프로토콜: LRP6 및 LRP5 단백질 (사람 및 마우스)의 재조합 세포외 도메인으로 라마를 초기에 면역시켰다. 그러나, 상기에 언급된 LRP5 재조합 단백질의 기능적 특성화에 의해, Wnt1 클래스 결합 에피토프만 적절히 폴딩되어 있는 것으로 나타났다. 대조적으로, LRP5-Wnt3a 클래스 결합 도메인의 적절한 폴딩에 대한 어떠한 조짐도 없었다. 따라서, 면역화에 적합한 항원을 개발하기 위한 추가의 연구가 필요하였다. 차선택으로서, 사람 LRP5 또는 사람 LRP6으로 안정하게 형질감염된 HEK293 세포로 라마를 면역시켰다. 그러나, 또한 상이한 세포주 (HEK293, CHO 및 NIH-3T3 세포)를 사용하여 일시적인 형질감염 또는 안정한 형질감염에 의해 사람 LRP5의 매우 낮은 발현만을 달성할 수 있었다. 따라서, LRP5의 충분한 발현을 달성하기 위해서는 추가의 연구가 더 필요하였다. 결국, 몇 개의 실패한 시행착오 후에, 이것은 외인성 LRP5 발현을 증가시키도록 의도된 샤페론인 MesDC-2에 의한 HEK293 세포의 안정한 공동 형질감염을 포함하는 프로토콜을 개발함으로써 달성될 수 있었다. 그렇다고 하더라도, 즉, LRP5로 안정하게 형질감염된 세포주의 생성 동안 MesDC-2의 공동 발현시에, 단백질 발현의 불안정성이 반복적으로 관찰되었다. 이로 인해, LRP5 발현이 면역화 및 선별 동안 손실될 수 있다는 문제점이 있었다. 이러한 추가의 문제를 해결하기 위해, LRP5를 발현하는 세포의 계대 배양은 가능한 한 많이 제한되었으며, LRP5를 발현하는 세포를 풍부하게하기 위해서 추가의 세포 분류가 수행되었다.
- [0480] 반대측에서 hMesDC-2 샤페론의 존재 또는 부재하의 LRP5-암호화 DNA 및 LRP6-암호화 DNA로 라마를 추가로 면역시켰다. LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 도메인을 동정하는 기회를 높일 목적으로, 교차-반응성 면역 반응을 향상시키기 위해 여러 라마에 추가적인 보강을 실시하였다.
- [0481] 면역 혈액 (PBL) 샘플을 일정한 간격으로 채취하고, 혈청 반응을 측정하고, 분리된 PBL로부터 총 RNA를 제조하였다. 재조합 단백질에 의한 면역시, LRP5에 대한 낮은 혈청 반응과는 대조적으로, LRP6에 대한 중간 정도의 혈청 반응이 관찰되었다. DNA로 면역시킨 라마에 대해서는 중간 정도의 LRP5 면역 반응이 관찰되었다. 대조적으로, 세포 면역화에 대해서는 매우 낮은 면역 반응이 관찰되었다. 추가로, 합성 라이브러리도 또한 탐구하였다. 그럼에도 불구하고, 최종적으로, 실시예 2에서 개략적으로 설명되는 바와 같이, 다음 단계를 계속하기 위

해 충분한 레퍼토리의 다양성을 달성할 수 있었다.

[0482] **실시예 2: LRP5 및 LRP6 결합 1가 VHH 도메인 (VHH)의 분리**

[0483] 라이브러리 작제:

[0484] 면역 조직을 수집한 후, 즉시 총 RNA를 추출하여 RNA의 완전성 및 농도를 확인하였다. 이들 RNA 조제물로부터 cDNA 샘플을 제조하였다. VHH 암호화 뉴클레오타이드 서열을 1 단계 RT-PCR 반응에서 cDNA 샘플로부터 증폭시켰다. 샘플 중의 IgG2 및 IgG3 cDNA로부터 특이적으로 증폭된 700bp 증폭산물을 아가로스 겔로부터 분리한 후, 네스티드 (nested) PCR 반응에서 주형으로서 사용하였다. 이어서, PCR 산물을 *Sfi*I 및 *Bst*EII로 분해시키고, 파지미드 벡터 pAX50의 상응하는 제한 효소 부위에 연결하였다. 연결 혼합물을 *Escherichia coli* TG-1에 전기천공시켰다. 생성된 형질전환체 풀은 파지 디스플레이 라이브러리의 유전 적 다양성을 구성한다.

[0485] pAX50은 pUC119로부터 유도된 발현 벡터로서, 암피실린에 대한 내성 유전자 및 *lac* 프로모터에 이어서 pIII 단백질 신호 펩타이드의 암호화 서열을 다운스트림 VHH 도메인 클로닝 부위를 갖는 골격에 함유한다. VHH 도메인 암호화 서열을 갖는 프레임에서, 벡터는 C-말단 Myc 및 헥사-히스티딘 태그 및 대장균 파지 pIII 단백질을 암호화한다. 이. 콜라이 TG-1 라이브러리 클론을 헬퍼 파지로 감염시킨 후, pAX50의 존재는 이들 클론으로부터 파지 입자의 생성을 가능하게 하여 개별 VHH 도메인을 pIII 단백질을 갖는 융합 단백질로서 표시한다.

[0486] 선별:

[0487] VHH 도메인-파지미드 라이브러리를 작제하여 선별에 사용하였다. (라마와 사람 LRP5 및 LRP6 사이에) 종 전체에 걸쳐 매우 높은 종 상동성을 고려해 볼 때, 라마에서 증가된 면역 반응이 VHH 도메인의 충분한 다양성을 증가시키는지 여부는 불확실하였다. 따라서, 선별 동안 2개의 합성 라이브러리를 면역 라이브러리와 병행하여 사용하였다.

[0488] 상이한 전략을 다음과 같이 선별 동안 사용하였다:

[0489] - LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 도메인을 동정하는 기회를 높이기 위한 LRP5 및 LRP6 유도된 도구의 교체, 예를 들어, LRP6 유도된 단백질을 갖는 LRP5 면역된 라마로부터의 라이브러리에 대한 선별 또는 합성 라이브러리에 대한 선별 동안 LRP5과 LRP6 단백질 둘 다의 사용.

[0490] - 사람/마우스 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 도메인을 선별하기 위한 종 공급원의 교체 (동일한 전임상 모델에서 (즉, 이중 이식 종양-마우스 모델에서) 치료 범위 (therapeutic window)의 평가에 필요한, 효능, 즉, 종양 성장 억제율 및 안전성 프로파일을 평가할 수 있게 하는 이러한 LRP5 및 LRP6 길항제의 마우스 교차-반응성).

[0491] - 에피토프를 본래의 형태로 유지하기 위한 재조합 단백질에 의한 "용액 중" 선별: 추가의 장애로서, LRP5 및 LRP6 재조합 단백질은 ELISA 결합 플레이트 상에 직접 코팅하는 경우에 적절한 폴딩을 잃는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 재조합 단백질을 비오틴화하고, 기능 검정으로 적절한 폴딩을 확인한 후 "용액 중" 선별에 사용하였다.

[0492] - 수용체의 본래의 형태를 갖도록 LRP5 또는 LRP6을 과발현하는 세포를 사용하는 선별. 놀랍게도, 재조합 단백질의 기능적 데이터가 Wnt3a 결합 에피토프의 적절한 폴딩의 부족을 나타냈기 때문에, 이것은 특히 LRP5의 Wnt3a-클래스 결합 도메인에 대한 결합제의 선별을 개선시키는데 필요한 중요한 전략으로 판명되었다.

[0493] **실시예 3: 1가 VHH의 스크리닝**

[0494] 선별 후, 클론을 96 딥(deep) 웰 플레이트 (1 mL 용적)에서 성장시키고, IPTG를 첨가하여 VHH 발현을 유도하였다. 예를 들어, 국제공개공보 WO 2011/107507에서 보고된 바와 같이 표준 방법에 따라 단일 클론의 원형질막 주위공간 추출물을 제조하고, 사람 LRP6 및 LRP5에 대한 결합을 스크리닝하였다. 초기에, 재조합 LRP5 및 LRP6을 사용하는 결합 ELISA 검정으로 원형질막 주위공간 추출물을 스크리닝하였는데, 이러한 검정은 FACS-기반 결합 검정과 비교하여 민감하고 강력한 높은 처리량의 검정을 나타낸다. 정제 후, 본래의 형태의 LRP5 및 LRP6 수용체에 대한 정제된 VHH의 결합을 확인하기 위해 결합 FACS 검정을 사용하여 ELISA 검정에서 동정된 VHH를 추가로 특성화하였다.

[0495] 일반적으로, ELISA와 FACS 결합 검정 사이에 양호한 상관 관계가 예상된다. 그러나, 이 경우, ELISA 검정에서 가장 양호한 LRP5 및 LRP6 결합 VHH (즉, 재조합 LRP5 또는 LRP6 엑토도메인에 대한 높은 친화성을 가짐)는, 패널 "2" 결합제에 대해 도 2에 도시한 바와 같이, FACS 결합 검정에서 사람 LRP5 및 LRP6에 대해 어떠한 결합이

나 매우 약한 결합도 나타내지 않았다. 상이한 코팅 버퍼 (dPBS 대 바이카보네이트 버퍼) 및 ELISA 설정에서의 차단 용액 (Marvel 대 BSA)의 사용은 관찰된 불일치를 해결하지 못하였다. 대신에, ELISA에서의 매우 약한 결합제는, 패널 "1" 결합제에 대해 도 2에 도시한 바와 같이, LRP5 및 LRP6 발현 세포를 사용하는 결합 FACS 검정에서 LRP5 및 LRP6에 대해 높은 친화성을 나타냈다. 따라서, 이러한 추가의 데이터 및 실험은 두 수용체의 본래의 형태를 인식하는 높은 친화성 결합제의 선별을 가능하게 하였다. 추가로, 이로 인해, 이러한 높은 친화성 결합제는 LRP5 및 LRP6 단백질의 선형 에피토프가 아니라 형태 의존성 에피토프를 인식한다는 것이 확인되었다. 따라서, 이러한 추가의 비일상적 데이터 및 실험은 본래의 형태로 원형질막 상에 발현된 LRP5 및 LRP6에 대해 높은 친화성을 가져야 하는, 치료학적으로 관련된 LRP5 및 LRP6 결합제의 선택을 가능하게 한다.

[0496] 따라서, (i) FACS 결합 검정의 낮은 처리량, (ii) 덜 강력한 검정 설정 및 (iii) LRP5 과발현 세포의 계대 배양시에 재조합 단백질 발현의 손실로 인해 야기된 상기에 기재된 어려움에도 불구하고, 이들 검정은 이어서 높은 친화성 VHH 결합제의 추가 선별 및 특성화에 사용되었다. 간단히 말하면, 정제된 VHH 희석액 (1M에서 1pM 최종 농도의 1:5 연속 희석액)으로 세포를 플레이트 진탕기에서 4°C에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 1x 포스페이 트 완충된 식염수 (PBS) + 10 % 우태아 혈청 (FBS) + 0.05 % 아지드화나트륨으로 이루어진 FACS 버퍼로 세포를 5회 세척한 후, VHH의 골격 영역에 결합하여 시험된 LRP5 및/또는 LRP6 결합제 모두에 결합하는 다클론 마우스 항체와 함께 세포를 4°C에서 30분 내지 1시간 동안 항온처리하였다. FACS 버퍼로 세포를 3회 세척한 후, 표지된 2차 항체 (항-마우스 PE)와 함께 4°C에서 30분 내지 1시간 동안 세포를 항온처리하고, 이어서 FACS 버퍼로 3회 세척 단계를 수행하였다. 형광은 FACS 어레이 (BD)를 사용하여 측정하였다.

[0497] 총 100 개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 계열/클러스터는 결합 FACS 데이터 및 서열 분석에 기초하여 면역 라이브러리 및 합성 기원으로부터 확인하였다. 이의 대표적인 예는 하기에 추가로 나타나 있으며, 서열에 의해 정의된다. VHH를 이. 콜라이에서 발현시키고 정제하였다. 대장균에서의 발현이 불충분한 경우, VHH를 피키아 파스토리스에서 생산하였다. VHH의 발현 및 정제에 대한 간략한 설명은 하기에 추가로 보고한다.

[0498] 이. 콜라이에서의 VHH의 일반적인 발현:

[0499] 암호화 서열을 pAX100 발현 벡터에 클로닝하고, c-Myc 핵사-히스티딘-태그된 단백질로서 이. 콜라이에서 발현시켰다. 관심 대상의 VHH 작제물을 함유하는 이. 콜라이 TG-1 세포를 카나마이신으로 보충된 TB 배지의 진탕 플라스크에서 성장시키고 (37°C, 250 rpm), 발현을 위해 1mM IPTG를 첨가하여 유도하였다. 세포 배양물을 회전시킨 후, 펠릿을 동결-융해시키고 dPBS 중에 재현탁시켜 원형질막 주위공간 추출물을 제조하였다.

[0500] 피키아(피.) 파스토리스에서의 VHH의 일반적인 발현:

[0501] 암호화 서열을 pAX159 발현 벡터에 클로닝하고, c-Myc 핵사-히스티딘-태그된 단백질로서 피. 파스토리스에서 발현시켰다. 관심 대상의 VHH 작제물을 함유하는 피. 파스토리스 X-33 세포를 BGCM (완충된 글리세롤-복합 배지; Invitrogen)에서 성장시켰다 (30°C, 250 rpm). 3일째에, 배지를 BCM (완충된 메탄올-복합 배지; Invitrogen)로 변경하고, 배양물을 추가로 성장시키고, 0.5 용적% 메탄올 (100%)을 첨가하여 규칙적으로 유도하였다. 세포 배양물을 회전시킨 후, 상청액 (분비된 VHH 함유)을 수거하였다.

[0502] VHH 정제:

[0503] 핵사-히스티딘-태그된 VHHs를 고정화 금속 친화성 크로마토그래피 (RoboColumns 100ul Nickel Sepharose™ 6FF, Atoll)에 의해 Tecan EVO150 상에서 정제하고, 250mM 이미 다졸로 컬럼으로부터 용출시키고, 이어서 dPBS쪽으로 탈염시켰다. VHH의 순도 및 완전성은 항-Myc 및 항-VHH 검출을 이용하는 웨스턴 블롯 및/또는 SDS-PAGE에 의해 입증하였다.

[0504] **실시예 4: 정제된 1가 VHH의 시험관내 특성화**

[0505] VHH 스크리닝 후, 하기에 기재된 바와 같은 몇 가지 기능적 및 생물물리학적 검정을 사용하여 LRP5 및 LRP6 발현하는 세포에 대해 높은 친화성을 갖는 정제된 VHH를 특성화하였다:

[0506] 4.1 LRP5 및 LRP6 결합 효능 및 교차-반응성: FACS-기반 DKK1 경쟁 검정

[0507] LRP5/LRP6 교차-반응성 1가 VHH의 특성화 동안, 결합 FACS 검정에서 수득된 데이터가 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서 관찰된 효능과 항상 상관 관계가 없는 것으로 관찰되었는데, 이는 VHH의 빠른 오프-레이트 (off-rate)로 인한 것일 가능성이 높다. 따라서, 이 추가의 검정은 확립될 필요가 있었으며 (즉, DKK1 경쟁 FACS), 이는 LRP5와 LRP6 결합 사이의 비교 및 선택성 및 결합 효능 측정에 대해 보다 신뢰성이 있는 것으로 입증되었다.

목적은 동일한 농도에서 두 수용체의 차단율 달성하기 위해서 유사한 효능을 갖는 LRP5 및 LRP6에 결합하는 기능성 VHH를 선별하는 것이었다. 따라서, 동정된 Wnt1 및 Wnt3a 기능성 VHH를 다음과 같이 DKK-1 경쟁 FACS에서 특성화하였다:

- [0508] FACS-기반 DKK1 경쟁 검정의 경우, 사람 LRP5 또는 사람 LRP6의 안정한 과발현을 갖는 HEK293 세포를 사용하였다. 사람 재조합 DKK1 (rhDKK1 - R&D Systems, Cat 5439-DK/CF)을 1nM의 일정한 최종 농도로 세포에 첨가하였다. rhDKK1 및 LRP5 및/또는 LRP6 결합제 희석액 (정제된 VHH의 1:5 연속 희석액)으로 세포를 플레이트 진탕기에서 4℃에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. 세포를 FACS 버퍼로 3회 세척한 후, 비오틴화된 염소 항-사람 DKK1 (R&D Systems, Cat BAF1096)과 함께 세포를 플레이트 진탕기에서 4℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 FACS 버퍼로 3회 세척한 후, 스트렙타아비딘 PE (BD Biosciences, Cat 554061)과 함께 세포를 암실의 플레이트 진탕기에서 4℃에서 30분 내지 1시간 동안 항온처리하였다. 세포를 FACS 버퍼로 2회 세척하고, FACS 어레이 (BD)를 사용하여 형광을 측정하고, MCF 값을 보고하였다.
- [0509] LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH는 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293에 결합하기 위해서 뿐만 아니라 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293에 결합하기 위해 사람 DKK1과 경쟁할 것으로 예상된다. 대조적으로, LRP5 특이적 VHH는 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293 세포에 결합하지만, 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하지 않거나 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하기 위해 매우 낮은 효능 (> 200nM)으로 사람 DKK1과 경쟁할 것이다 (반대의 경우도 또한 LRP6 특이적 VHH에 동일하게 적용됨). 본 실험의 결과로서, 본 발명의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH는 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293 세포 뿐만 아니라 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하기 위해 사람 DKK1과 경쟁하였다 (즉, DKK1 결합의 완전한 억제에 의한 결합제의 농도 증가에 따른 MCF 값의 감소는 시험된 최고 농도에서 ≤ 60 MCF 값에 상응하였다)는 것을 확인할 수 있었다.
- [0510] 4.2 중 교차-반응성: 마우스 및 시노물구스 원숭이
- [0511] LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH의 선별된 패널이 마우스 및 시노물구스 원숭이 기원의 LRP5 및 LRP6에 결합할 수 있는지를 측정하기 위해, DKK1 경쟁 FACS를 다음과 같이 수행하였다:
- [0512] 마우스 LRP5, 시노물구스 LRP5, 마우스 LRP6 또는 시노물구스 LRP6을 안정하게 발현하는 HEK293 세포와 함께 1 및 0.3 nM hDKK1의 존재하에 VHH의 연속 희석액을 항온처리하였다 (각각 마우스 및 시노물구스의 EC50 값 미만의 농도). 세포에 대한 DKK1의 결합은 상기에 기재한 바와 같이 2차 검출로서 스트렙타아비딘-PE를 갖는 비오틴화된 항-DKK1 항체를 사용하여 검출하였다. 결과적으로, 이러한 교차-반응성을 증명할 수 있었다.
- [0513] 4.3 에피토프 바이닝 (binning)
- [0514] 상이한 에피토프 빈 (bin)을 동정하기 위해, LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH를 차단하는 가장 강력한 Wnt1 신호 전달에 대해 바이닝 실험을 수행하였다. 특히, FACS 기반 검정을 사용하여 LRP5 및 LRP6 수용체 결합에 대해 개별 VHH를 다른 비오틴화된 VHH (기준 VHH로 불림)와 경쟁하는 능력에 대해 분석하였다. 개별 VHH의 연속 희석액을 200pM 또는 500pM 비오틴화된 기준 VHH (EC50 값 미만의 농도)와 함께 사람 LRP5 또는 LRP6을 안정하게 발현하는 HEK293 상에서 항온처리하였다. 세포에 대한 비오틴화된 기준 VHH의 결합은 스트렙타아비딘-PE를 사용하여 검출하였다. LRP5 및 LRP6에 결합하기 위해 기준 VHH와 경쟁하는 VHH는 FACS 어레이를 사용하여 측정된 형광의 감소를 나타낸다.
- [0515] 이들 실험의 결과로서, Wnt1 차단제는 3개의 빈으로 분류할 수 있다. Wnt3a 차단제의 경우, VHH의 낮은 친화성으로 인해 에피토프 바이닝 실험을 수행할 수 없었다.
- [0516] 4.4 Wnt1 및 Wnt3a 수용체 검정
- [0517] Wnt 신호 전달을 억제하는 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH의 능력을 기능적 Wnt1 및 Wnt3a 검정으로 시험하였다. 또한, 이와 관련하여, 확립된 프로토콜을 사용할 수는 없었지만, Wnt1/Wnt3a-LRP5/LRP6 차단 검정과 같은 생화학적 기능적 검정을 확립하기 위해 여러 가지 시도가 필요하였다: 재조합 LRP5 및 LRP6 단백질에서 겪게 되는 어려움 (실시예 1 참조)에 추가하여, 기능성 재조합 Wnt1 리간드 (시판용 포함)를 이용할 수 없다. Wnt 단백질은 많은 보존된 시스테인을 함유하며, 보존된 세린에 붙어 있는 단일-불포화 지방산 (팔미톨레산)에 의해 변형된다. 이러한 번역후 변형은 효율적인 신호 전달 및 Wnt 분비를 위해 필요하다. 구조 분석에 따르면, 팔미톨레산 지질을 함유하는 도메인 중 하나는 Frizzled 수용체에 결합하여 Wnt 리간드와 세포 표면의 LRP5 및 LRP6의 상호 작용을 허용하는 형태 변화를 일으키는데 필요한 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 번역후 변형은 이 단백질을 포함하는 기능적 연구에 필요하지만, 동시에 이러한 지질-기반 번역후 변형은 이들 단백질을 발현 및 정제하는 것을 매우 어렵게 만든다 (낮은 용해도). 따라서, 이는 생화학적 검정을 위한 주요 장애로 판명되었다.

- [0518] 따라서, 정제된 VHH의 특성화를 위해 세포 기반 기능적 검정을 개발하였다: Wnt 베타-락타마제 리포터 유전자 분석. 특히, Wnt1 경로 억제제의 경우, CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F 세포 (Invitrogen, Cat. K1677)를 사람 Wnt1로 형질감염시키고, 사람 Wnt1의 안정한 과발현을 갖는 클론을 선별하였다. Wnt3a 경로 억제를 시험하기 위해, 사람 Wnt3a의 안정한 과발현을 갖는 CellSensor LEF/TCF-bla FreeStyle 293F 세포를 생성하였다. CellSensor® LEF/TCF-bla FreeStyle™ 293 세포주는 FreeStyle™ 293 세포 (Invitrogen)에 안정하게 통합되는 Wnt 유도성 LEF/TCF 프로모터의 제어하에 베타-락타마제 리포터 유전자를 함유한다. 따라서, 이들 세포에서의 Wnt1 또는 Wnt3a의 발현은 베타-락타마제의 구성적 발현 및 이로 인해 효소 활성을 초래한다. 따라서, LRP5/LRP6 교차-반응성 기능성 VHH에 의한 처리는 베타-락타마제 효소 활성의 억제를 유도하는 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 억제를 초래할 것으로 예상된다.
- [0519] 검정의 경우, Wnt1 또는 Wnt3a의 과발현을 갖는 1E06/ml 세포를 384 웰 조직 배양 플레이트에 접종하고, 밤새 37°C에서 항온처리하였다. 다음날, 다양한 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 용액의 연속 희석액을 제조하여, 10nM의 최종 농도로 LiCl의 존재하에 세포에 첨가하였다. 양성 대조군으로서의 DKK1을 200nM의 최종 농도로 세포에 첨가하였다. DKK1 처리는 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 완전한 억제 및 이로 인해 베타-락타마제 효소 활성의 완전한 억제를 초래하였다. 세포를 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 제조업자의 지침 (Invitrogen, Cat K1085)에 따라 베타-락타마제 효소 활성을 측정하였다. 형광 방출의 경우, 표준 형광 플레이트 판독기를 사용하여 460 nm 및 530 nm의 값을 측정하였으며, 460/530 nm 방출 비율을 표시된 처리에 대해 플롯팅하였다. 효능은 양성 대조군 (DKK1; 200nM 최종 농도)에 대해 계산하였다.
- [0520] 50 nM 보다 양호한 충분한 효능과 효능을 가진 총 12개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 Wnt1 차단제를 선별하였다. 주로 낮은 효력을 갖는 14개의 교차-반응성 Wnt3a 차단제를 동정하였다. 단지 하나의 Wnt3a 차단제만이 양호한 효능 (5nM 미만)을 나타냈다.
- [0521] 4.5 Wnt1 및 Wnt3a 인산화 검정
- [0522] Wnt1 차단제 및 가장 강력하고 효능이 뛰어난 Wnt3a 차단제에 대한 각각의 빈으로부터의 가장 강력하고 효능이 뛰어난 리드를 Wnt1 및 Wnt3a 의존성 LRP5 및 LRP6 인산화 검정에서 후속적으로 시험하였다. Wnt1 또는 Wnt3a를 암호화하는 발현 벡터로 공동-형질감염된 Invitrogen (cat K1677)으로부터의 CellSensor LEF/TCF 293F 세포를 인산화 검정에 사용하였다. Wnt-Frizzled-LRP5 또는 -LRP6 복합체 형성이 LRP5 또는 LRP6 인산화 및 후속적인 다운스트림 신호 전달을 초래하기 때문에, 인산화의 정량화는 이러한 신호 전달을 측정하는데 사용될 수 있다. LRP5 및 LRP6 특이적인 판독값 (read-out)을 측정하기 위해, 세포를 용해시키고 면역-침강을 LRP6 또는 LRP5 선택적인 항체 (두 수용체의 세포내 도메인에 대해 유도됨)로 수행하였다. 웨스턴 블롯에서, LRP6와 LRP5 둘 다 인산화된 단백질을 검출하는 다클론 항-포스포-LRP6 (Ser1490) 항체 (Cell Signaling Technology)를 사용하여 인산화된 LRP6 또는 LRP5를 검출하였다. 각각의 빈으로부터의 적어도 하나의 대표적인 VHH를 함유하는 정제된 Wnt1 및 Wnt3a 블로킹 VHH의 선별된 패널을 10 내지 100nM의 최종 농도로 시험하였다. 특히, 세포 용해 및 LRP5 및 LRP6 면역-침전 이전에 차단성 VHH의 존재하에 세포를 밤새 항온처리하였다. 양성 대조군 (DKK1, 1 μ M의 최종 농도)에 대한 웨스턴 블롯 밴드의 정량화를 통해 LRP5 및 LRP6 인산화를 차단하는 Wnt1 및 Wnt3a 차단 VHH의 효능을 계산하였다.
- [0523] 4.6 생물리학적 특성화
- [0524] 실시예 3에 보고된 바와 같이, 이. 콜라이 및 피키아 파스토리스에서 발현 및 정제에 대해 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH를 추가로 특성화하였다. 특히, 1가 리드 패널 VHH에 대한 발현 수율은 0.1 mg/L보다 높으면 허용가능한 것으로 간주하였다. 선별된 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH는 이. 콜라이에서 0.1 내지 8.2 mg/L 범위의 발현을 보였으며, 피키아 파스토리스에서 보다 높은 발현을 보였다 (> 1 mg/L). 발현은 SDS-PAGE 분석에 의해 평가하였다.
- [0525] Lightcycler (Roche)를 사용하여 1가 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH의 열 안정성을 형광-기반 열 이동 검정 (TSA)으로 측정하였다. Sypro Orange의 존재하에 상이한 pH 값에서 VHH를 항온처리하고, 온도 구배를 적용하였다. 열-유도된 언폴딩에 따라, Sypro Orange가 결합하는 단백질의 소수성 패치가 노출되어 형광 강도가 증가한다 (Ex/Em = 465/580 nm). 형광 강도 곡선의 1차 도함수의 변곡점은 용융 온도 (T_m)의 척도로서 작용한다. 모든 VHH의 경우, T_m 은 pH가 증가함에 따라 증가하였으며, pH 6에서 변동이 없고, 전형적인 T_m 패턴이 VHH에 대해 나타났다. LRP5/LRP6 교차-반응성 Wnt1 차단제 VHH 및 Wnt3a 차단제 VHH에 대해 pH 7에서 82°C의 평균을 측정하였다.

였다.

[0526] 분석용 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 LRP5 및 LRP6 VHH에 대한 응집 및 다합체화의 잠재적 발생을 조사하였다. 이를 위해, 0.5 mg/mL의 정제된 VHH 샘플 8ug을 Dionex Ultimate 3000 장비를 통해 Agilent SEC-3 컬럼에 주입하였다. 이동상으로서 L-아르기닌 버퍼 (10mM 포스페이트, 300mM Arg-HCl, pH 6.0)를 사용하고, 1mL/분의 유속을 적용하였다. LRP5/LRP6 VHH 중 어느 것도 SEC 분석 동안 주요 응집 문제를 나타내지 않았다: 프로파일은 대부분의 샘플에서 95% 이상의 단량체를 나타냈다.

[0527] **실시예 5: 반감기 연장된 바이파라토픽 작제물의 생성 및 특성화**

[0528] 도 1에 도시한 바와 같이, LRP5/LRP6 교차-반응성 Wnt1 및 Wnt3a VHH를 바이파라토픽 작제물을 생성하기 위한 빌딩 블록으로서 사용하였다. 혈청 알부민 결합 VHH에 대한 유전자 융합을 반감기 연장 방법으로서 사용하였다. 유연한 링커를 통해 3개의 빌딩 블록 (Wnt1 차단제, Wnt3a 차단제 및 알부민 결합제)을 연결하였다. 실시예 3에 기재한 바와 같이, VHH를 피. 파스토리스에서 생성하고 정제하였다. 예를 들어, 국제공개공보 WO 2012/131078에 보고된 바와 같은 표준 절차에 따라, 생성된 작제물, 즉, 바이파라토픽 반감기 연장된 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물을 C-말단 cMyc-헥사-히스티딘 태그된 VHH 작제물의 형태로 피. 파스토리스 발현 벡터 pAX159에 클로닝하였다. 상이한 배향의 빌딩 블록 및 다양한 링커, 특히, GS-링커를 탐구하였다. LRP6에서의 잠재적 Wnt1와 Wnt3a 결합 부위 사이의 연장된 표면적을 반영하는 모델링 데이터 (즉, 베타-프로펠러 1 및 2는 베타-프로펠러 3에 근접하지 않음)에 기초하여, 비교적 긴 GS-링커를 선별하였다. 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서의 효능에 관한 최상의 결과는 사람 혈청 알부민/HSA 결합 VHH를 중간에 놓음으로써 수득되었다. 35 GS 링커를 사용하였으며, Wnt1 및 Wnt3a VHH 차단제를 바람직한 순서로 정렬하였다.

[0529] 최적의 VHH 결합제 및 결합제 조합물의 선별을 위해, 사람 혈청 알부민 (HSA) 결합 VHH가 LRP5/LRP6 Wnt1-Wnt3a 차단제 사이에 위치하는 라이브러리를 생성하였다. 특히, Wnt1 또는 Wnt3a 검정 (리포터 및 인산화 검정)에서 높은 효능 및 효험을 갖는 높은 친화성 결합제의 패널을 라이브러리에 사용하여, 도 1에 도시된 바와 같이 디자인된 반감기 연장된 바이파라토픽 작제물을 생성하였다. 피키아 파스토리스에서 발현시킨 후 (실시예 3에서 보고된 바와 같음), 정제하고, 이어서 3개의 희석액 (1/100, 1/1000, 1/7000)에서 30uM HSA의 존재하에 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정 (실시예 4에서 기재함)으로 반감기 연장된 바이파라토픽 작제물을 스크리닝하여 효험 및 상대적 효능을 평가하였다. 일반적으로, Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서의 데이터 사이에는 양호한 상관관계가 관찰되었으며, 높은 효능이 다수의 형식에 대해 측정되었다. 리포터 검정과 Wnt1 및 Wnt3a 차단제의 다양성 둘 다에서의 효능을 고려하여, 추가의 특성화를 위해 총 11개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5 및 LRP6 작제물을 선별하였다. 이러한 추가의 특성화 검정을 하기에 기재한다.

[0530] Wnt1/Wnt3a 수용체 검정:

[0531] 30uM HSA 최종 농도의 존재하에 실시예 4.4에 기재한 바와 같이 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정을 수행하였다. 정제된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 작제물을 2.5 μ M로부터 시작하여 12개의 희석액에서 시험하였다. 하기 표 IV에 나타난 바와 같이, 대부분의 작제물은 리포터 검정 둘 다에서 높은 효능 - 1.7 nM 내지 0.16 nM 범위 - 및 완전한 효능을 나타냈다. 본 명세서에서 설명한 VHH 도메인을 억제하는 개별 Wnt1 및 Wnt3a의 서열은 하기 표 V에 제공된다:

[0532] **[표 IV]**

[0533] HSA의 존재하의 리포터 검정에서의 선택된 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 효능 및 효험

| 작제물 | N-말단 | C-말단 | Wnt1 리포터 검정 | | Wnt3a 리포터 검정 | |
|------------|-------------|-------------|----------------------|-------|----------------------|-------|
| | | | IC ₅₀ (M) | % 억제율 | IC ₅₀ (M) | % 억제율 |
| F013500053 | F0129093A01 | F0130333G06 | 2,3E-10 | 102 | 4,1E-10 | 97 |
| F013500039 | F0129093A03 | F0130333E06 | 1,7E-09 | 102 | 1,6E-09 | 82 |
| F013500046 | F0130332D03 | F0129093A01 | 5,1E-10 | 102 | 6,0E-10 | 96 |
| F013500016 | F0130332D03 | F0130367B10 | 3,1E-10 | 102 | 2,7E-10 | 99 |
| F013500018 | F0130332D03 | F0130378B05 | 7,4E-10 | 102 | 1,3E-09 | 98 |
| F013500047 | F0130333E06 | F0129093A01 | 8,8E-10 | 102 | 9,1E-10 | 94 |
| F013500026 | F0130333E06 | F0130367B10 | 3,3E-10 | 102 | 2,6E-10 | 100 |
| F013500021 | F0130333G06 | F0130367B10 | 1,6E-10 | 102 | 1,8E-10 | 102 |
| F013500032 | F0130378A04 | F0130333G06 | 2,4E-10 | 102 | 4,3E-10 | 94 |
| F013500033 | F0130378B05 | F0130333G06 | 1,8E-10 | 102 | 2,5E-10 | 88 |
| F013500030 | F0130378B05 | F0130372C08 | 1,4E-09 | 102 | 1,3E-09 | 96 |

[표 V]

표 IV에 설명한 VHH 도메인의 서열

| VHH ID 특이성 | 아미노산 서열 | 서열번호 |
|----------------------|--|------|
| F0129093A01 Wnt3a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASP IPYGSLLRRRNNYDYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH | 28 |
| F0130333G06 Wnt1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AIRRSGRRYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAR RVRSSSTRYNTGTWWWEYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHH HHH | 29 |
| F0129093A03 Wnt3a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGKEREFVA AINWSGSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAS RSSYAGRTYYELYDYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH | 30 |
| F0130333E06 Wnt1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVAA IRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTR TVALLQYRYDYWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH | 31 |
| F0130332D03 Wnt1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA AINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGRGENYSLLYSSNRYYEWGQGTLLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHH HH | 32 |

| | | |
|----------------------|--|----|
| F0130367B10 Wnt3a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWRSRGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEGTAVYYCAADP RGYGVAVYSAYEYWGQGLTVTVSS <u>GAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 33 |
| F0130378B05 Wnt3a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISRSRGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSS <u>AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 34 |
| F0130378A04 Wnt3a | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AITRTGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGYYYYSSSFYDYWGQGLTVTVSS <u>AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 35 |
| F0130372C08 Wnt1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYGMGWFRQAPGKEREFVA AISWSSGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAK RRGRGSVSPNSSRYNYWGQGLTVTVSS <u>AAAEQKLISEEDLNGAAHHHH</u> <u>HH</u> | 36 |
| F013500016 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA AINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGRGENYSLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVA AISWRSRGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYL QMNSLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAVYSAYEYWGQGLTVTVSS <u>GAAEQ</u> <u>KLISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 37 |
| F013500018 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA AINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGRGENYSLYSSNRYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVA AISRSRGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAADRRVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSS <u>GAAEQ</u> <u>LISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 38 |
| F013500021 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAR RVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWRSRGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTV YLQMNSLRPEGTAVYYCAADPRGYGVAVYSAYEYWGQGLTVTVSS <u>GAA</u> <u>EQKLISEEDLNGAAHHHHHH</u> | 39 |

[0538]

| | | |
|------------|--|----|
| F013500026 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVAA IRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR TVALLQYRYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSRSGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGW FRQAPGKEREFVAAISWRSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLR PEGTAVYYCAADPRGYGVAVVSAYEYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEED LNGAAHHHHHH | 40 |
| F013500030 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYG MGWFRQAPGKEREFVAAISWRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAKRRGRGSPNSSSRNYWGQGLTVTVSSGAAE QKLISEEDLNGAAHHHHHH | 41 |
| F013500032 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AITRTGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGYYYYDSSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLRSRSGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMG WFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSSGAAEQ KLISEEDLNGAAHHHHHH | 42 |
| F013500033 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RVYSTLPPTTSRYNYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWWEYWGQGLTVTVSSG AAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH | 43 |

[0539]

| | | |
|------------|--|----|
| F013500039 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGKEREFVA AINWSGSRITYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAS RSSYAGRTYYELYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTV GWFRQAPGKEREFVAAIRRRGSSTYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAADTRTVALLQYRYDYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEE DLNGAAHHHHHH | 44 |
| F013500046 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSRYTMGWFRQAPGKEREFVA AINRSGGSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADR RGRGENSYLLSSNRYEWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAASPIPYGSLRRRRNNYDYWGQGLTVTVSSGAAE QKLISEEDLNGAAHHHHHH | 45 |
| F013500047 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTVGWFRQAPGKEREFVAA IRRRGSSTYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTR TVALLQYRYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGW FRQAPGKEREFVAAISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCAASPIPYGSLRRRRNNYDYWGQGLTVTVSSGAAEQKLISEE DLNGAAHHHHHH | 46 |
| F013500053 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASP IPYGSLLRRNNYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAIRRSGRRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAARRVRSSTRYNTGTWWEYWGQGLTVTVSSG AAEQKLISEE DLNGAAHHHHHH | 47 |

(주: 표 V 에 기재된 분자는 재조합 발현된 폴리펩타이드의 보다 용이한 정제를 가능하게 하기 위해 myc-헥사-히스티딘 태그 (밑줄 치)를 포함하고; 이러한 태그는 표적에 대한 분자의 결합에 필수적이지 않으며 - 통상적으로 표적에 대한 분자의 결합을 방해하지 않는다)

[0540]

[0541]

실시예 6: VHH 및 VHH 작제물의 서열 최적화

[0542]

서열 최적화는 부모 서열이 사람 IGHV3-IGHJ 생식 세포 공통 서열과 보다 동일하게 되도록 변형되는 과정이다. 예를 들어, 골격 영역에서의 특정 아미노산 (소위 홀마크 잔기 제외)은 단백질 구조, 활성 및 안정성이 보존되는 방식으로 사람 대응물과 교환된다.

[0543]

이러한 돌연변이는 다음과 같이 분류할 수 있다:

[0544]

1. 표준 돌연변이: 이들 위치의 서열 최적화는 VHH의 안정성 또는 활성 또는 친화성을 급격히 변화시킬 것으로 예상되지 않으며, 따라서 이들은 모두 동시에 변형되어 기본 변이체를 생성한다.

[0545]

2. 특이적 돌연변이: 이들 위치의 서열 최적화가 VHH의 안정성 또는 활성 또는 친화성에 영향을 미치는지는 알려지지 않았으므로, 이들은 기본 변이체의 상단에 대해 개별적으로 조사된다.

[0546]

홀마크 잔기는 VHH의 안정성, 활성 및 친화성에 대단히 중요한 것으로 알려져 있으므로, 변형되지 않는다.

[0547]

또한, 번역후 변형 (PTM)에 민감하다는 실험적 증거가 있는 CDR에 존재하는 아미노산은, 단백질 구조, 활성 및 안정성이 온전하게 유지되면서 PTM 부위가 불활성화되는 방식으로 변형되었다. 항체 및 VHH에 대해 기재된 가

장 일반적인 번역후 변형은 하기 표 VI에 열거되어 있다. 아스파라긴 탈아미드화 및 아스파테이트 이성질체화를 연구하기 위해 메티오닌 산화, 고온, 높은 pH 및 장기 저장을 분석하기 위한 H₂O₂ 처리를 포함하는 몇 가지 표준 조건을 적용한 가속 스트레스 연구에서 번역후 변형에 대한 VHH의 민감도를 분석하였다. 표준 절차에 따라 산화, 탈아미드화 및 이성질체화의 백분율을 측정하고, 기준 샘플 (-20℃에서 저장된 VHH)과 비교하였다. 역상 크로마토그래피 (RPC)에서의 전체 단백질 분석 및 질량 분석법 (MS)을 사용한 펩타이드 매핑을 수행하여 잠재적으로 민감한 잔기를 동정하였다. 스트레스 시험 후 VHH에서 관찰된 번역후 변형의 경우, 상응하는 아미노산(들)이 돌연변이되었다.

[표 VI]

잠재적인 번역후 변형 및 이를 잠재적으로 촉발시키는 모티프

| 모티프 | 변형 |
|----------------------|-----------|
| M | Met 산화 |
| N-S/G/H/N/A | Asn 탈아미드화 |
| D-S/G/H | Asp 이성질체화 |
| N-X-S/T-X (X ≠ P) | Asn 글리코실화 |
| Q/E | 피로글루타메이트 |

결과적으로, 상기에서 설명한 작제물에 몇 가지 돌연변이를 도입하지만, 하기 실시예에서 추가로 설명하는 바와 같이, 추가의 시험관내 및 생체내 특성화를 위해 선택된 상기 표 III에 나타낸 3개의 작제물에서는 발생하지 않았다.

실시예 7: 3개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 시험관내 특성화; 다른 LRP6 결합 분자와의 비교

VHH 서열 최적화 후, 3개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물을 재조합적으로 발현 및 정제하고, 하기에 기재하는 바와 같이 몇 가지 기능적 및 생물리학적 검정을 사용하여 특성화하였다.

7.1 FACS 결합 검정

사람 LRP5 및 LRP6에 대한 결합은 도 3a 및 3b에 보고된 바와 같이 FACS 분석에 의해 세포에 대해 측정하였다. 특히, 사람 LRP5의 안정한 과발현을 갖는 HEK293 세포에 대해 사람 LRP5에 대한 결합을 시험하였다. 사람 LRP6 결합의 경우, 사람 LRP6의 안정한 과발현을 갖는 HEK293 세포를 사용하였다. LRP5 및 LRP6 결합제 희석액 (도 3a 및 도 3b에 명시된 최종 농도에 상응하는 결합제의 1:5 연속 희석액)으로 세포를 플레이트 진탕기에서 4℃에서 1.5시간 동안 항온처리하였다. FACS 버퍼 (1x PBS (Invitrogen cat.no.141190-094) + 10% FBS (Sigma cat.no. F7524) + 0.05% 아지드화나트륨)로 세포를 5회 세척한 후, VHH의 골격 영역에 결합하는 다클론 마우스 항체와 함께 세포를 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. FACS 버퍼로 세포를 3회 세척한 후, 표지된 2차 항체 (항-마우스 PE (115-116-071))와 함께 4℃에서 1시간 동안 세포를 항온처리하고, 이어서 FACS 버퍼로 3회 세척 단계를 수행하였다. 형광은 FACS 어레이 (BD)를 사용하여 측정하였다. 사람 LRP5 및 LRP6에 대한 결합은 시험된 최고 농도에서 ≥ 600 MCF 값에 상응한다. 음성 대조군은 비-표적 결합제 (HEK293 세포에서 발현되지 않는 세균 단백질에 결합하는 VHH 작제물)로 이루어졌다. 도 3a 및 3b에 각각 도시된 바와 같이, 사람 LRP5 및 LRP6에 대한 결합은 3개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 시험된 최고 농도에서 각각 ≥ 600 MCF 및 ≥ 1600 MCF 값에 상응한다. 이들 데이터는 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자가 세포 검정 시스템에서 본래의 형태로 사람 LRP5와 사람 LRP6 둘 다에 결합한다는 것을 확인한다. hLRP5 및 hLRP6에 대한 결합의 EC50 값은 하기 표 VII에 보고되어 있다.

[표 VII]

[0557] FACS 결합 검정에 의해 측정된 사람 LRP5 및 LRP6에 대한 결합의 EC₅₀ 값

| FACS 기반 결합 검정 | F013500571 | F013500575 | F013500720 |
|------------------------------|------------|------------|------------|
| hLRP5, EC ₅₀ (nM) | 0.01 | 0.001 | 0.02 |
| hLRP6, EC ₅₀ (nM) | 0.02 | 0.01 | 0.02 |

[0558]

[0559] 7.2 FACS - DKK1 경쟁 검정

[0560] 실시예 4.1에서 기재한 바와 같이, FACS-기반 DKK1 경쟁 검정을 사용하여 3개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 효능 및 효험을 추가로 분석하였다. 사람 LRP5 또는 사람 LRP6의 안정한 과발현을 갖는 HEK293 세포를 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 연속 희석액 (도 4a 및 도 4b에 도시된 최종 농도에 상응하는 1:5 연속 희석액)으로 항온처리하였다. LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH는 각각 도 4a 및 4b에서 도시된 바와 같이 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293에 결합하기 위해서 뿐만 아니라 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293에 결합하기 위해 사람 DKK1과 경쟁하였다. DKK1 결합의 완전한 억제 시험된 최고 농도 ($\geq 10\text{nM}$)에서 달성되었으며, MCF 값 ≤ 60 에 상응한다. 대조적으로, LRP5 특이적 VHH는 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293 세포에 결합하지만, 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하지 않거나 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하기 위해 매우 낮은 효능 ($> 200\text{nM}$)으로 사람 DKK1과 경쟁할 것이다 (반대의 경우도 또한 LRP6 특이적 VHH에 동일하게 적용됨). 본 실험의 결과로서, 본 발명의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH는 사람 LRP5를 과발현하는 HEK293 세포 뿐만 아니라 사람 LRP6을 과발현하는 HEK293 세포에 결합하기 위해 사람 DKK1과 경쟁하였다 (즉, DKK1 결합의 완전한 억제에 의한 결합제의 농도 증가에 따른 MCF 값의 감소는 시험된 최고 농도에서 ≤ 60 MCF 값에 상응하였다)는 것을 확인할 수 있었다. 3개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 hLRP5 및 hLRP6에 결합하기 위한 DKK1 경쟁의 EC₅₀ 값은 하기 표 VIII에 보고되어 있다. 이들 데이터는 사람 LRP5 및 사람 LRP6에 대한 3개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 결합을 확인하였으며, 2개의 수용체 사이에 매우 유사한 친화성을 나타냈다 (DKK1 경쟁 검정에서 IC₅₀ 효능 값으로 본 명세서에서 정의됨). 또한, 본 데이터는 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자가 사람 LRP5 뿐 아니라 사람 LRP6에 본래의 형태로 결합하고 있다는 개념을 강화한다.

[0561] [표 VIII]

[0562] FACS 결합 검정에 의해 측정된 사람 LRP5 및 LRP6에 결합하기 위한 DKK1 경쟁의 IC₅₀ 값

| DKK1 경쟁 검정 | F013500571 | F013500575 | F013500720 |
|------------------------------|------------|------------|------------|
| hLRP5, IC ₅₀ (nM) | 0.03 | 0.03 | 0.3 |
| hLRP6, IC ₅₀ (nM) | 0.01 | 0.1 | 0.2 |

[0563]

[0564] 7.3 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정

[0565] 동일한 검정에서 Wnt1과 Wnt3a 차단제 둘 다의 기능적 시험을 가능하게 하는 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정을 사용하여 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자의 효능 및 효험을 분석하였다. 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정은 프로토콜에서 다음과 같은 변화와 함께 실시예 4.4에 기재한 검정에 기초한다. 384 웰 조직 배양 플레이트에 접종된 Wnt1의 과발현을 갖는 1E06/ml 세포를 500ng/ml의 최종 농도의 재조합 사람 Wnt3a (일반적으로 인정되는 사람 Wnt3a: R&D #5036-WN/CF)로 처리하고, 이어서 세포를 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 다양한 LRP5/LRP6 바이파라토픽 교차-반응성 VHH 용액의 연속 희석액을 제조하고, 10nM의 최종 농도로 LiCl의 존재하에 세포에 첨가하였다. 양성 대조군으로서의 DKK1을 200nM의 최종 농도로 세포에 첨가하였다. DKK1 처리는 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 완전한 억제 및 이로 인해 베타-락타마제 효소 활성의 완전한 억제를 초래하였다. 세포를 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 제조자의 지침에 따라 베타-락타마제 효소 활성을 측정하였다. 실시예 4.4에서 보고된 바와 같이, 형광 방출의 경우, 표준 형광 플레이트 판독기를 사용하여 460 nm 및 530 nm의 값을 획득하였으며, 460/530 nm 방출 비율을 표시된 처리에 대해 플롯팅 하였다. 도 5a에서 "기준선"으로 보고된 형광 비율 [460/535 nm]의 값은 양성 대조군 (DKK1; 200nM 최종 농도)에 의한 처리에 의해 측정된 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 완전한 억제에 상응한다. "Wnt1"로서 보고된 형광 비율

[460/535 nm]의 값은 Wnt1 과발현 세포 (즉, 재조합 사람 Wnt3a로 처리하지 않음)로부터 측정된 Wnt1 경로의 활성화에만 상응한다. "Wnt1 + Wnt3a"로서 보고된 형광 비율 [460/535 nm]의 값은 재조합 사람 Wnt3a로 Wnt1 과발현 세포를 처리함으로써 측정된 Wnt1 및 Wnt3a 경로의 조합된 활성화에 상응한다. 도 5a에 도시된 바와 같이, 3개의 LRP5/LRP6 교차-반응성 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자로 처리함으로써 완전한 억제 (즉, 기준선에 상응하는 형광 비율 [460/535 nm])가 달성된다. 또한, IC₅₀ 값으로 하기 표 IX에 나타난 바와 같이, 높은 효능이 또한 보고되어 있다.

[표 IX]

조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서의 Wnt1 및 Wnt3a 경로 억제의 IC₅₀ 값

| 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정 | F013500571 | F013500575 | F013500720 |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| IC ₅₀ (nM) | 0.05 | 0.2 | 0.06 |

다음으로, LRP5/LRP6 교차-반응성 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자의 효능 및 효험을 국제공개공보 WO 2011/138391 및 WO 2011/119661에 보고된 이전에 개시된 LRP6 결합 분자와 비교하였다:

국제공개공보 WO 2011/138391에는 LRP6에 결합하고 프로펠러 1 (예를 들어, Wnt1)과 프로펠러 3 (예를 들어, Wnt3) 리간드 둘 다의 상호 작용을 억제하는 다가 항체가 개시되어 있다. 이들 다가 LRP6 결합 항체는 제1 수용체 결합 도메인으로서의 IgG 항체 및 제2 수용체 결합 도메인으로서의 scFv 단편으로 이루어진 바이파라토픽 LRP6 결합 분자이며, 여기서, IgG 항체 및 scFv 단편은 링커에 의해 함께 연결되어 있다. 국제공개공보 WO 2011/138391에는 모든 LRP6 결합 분자가 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정 (국제공개공보 WO 2011/138391의 도 18)에서 대략 동일한 효능을 갖는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 이들 다가 LRP6 결합 분자 중 임의의 것을 비교 실험을 위해 선택할 수 있었다. 따라서, 제1 비교 화합물로서 "901" 작제물 (MOR08168IgG1LALA 6475 scfv라고도 하며, 국제공개공보 WO 2011/138391의 도 27에도 또한 나타냄)을 사용하기로 결정하였다.

이러한 "901" 작제물의 유도체는 국제공개공보 WO 2013/067355에 나타나 있다. 구체적으로, 801T 및 802T로 명명된 화합물이 개시되어 있으며 (명세서의 제132면에 개시되어 있음 참조), 여기서, 둘 다는 2개의 LRP6 결합 scFv 도메인 및 반감기 연장 모이어티를 갖는다. 801T 및 802T는 동일한 시험관내 효능 및 생물리학적 특성을 갖는 것으로 보이기 때문에, 이들 중 하나 - 변이체 802T - 만을 다음에 기재하는 실험에 포함하였다.

국제공개공보 WO 2011/119661에는 LRP6에 대한 이특이적 항체 결합 및 다중 Wnt 이소형에 의한 신호 전달 억제가 개시되어 있다. 이들 이특이적 항-LRP6 항체는 LRP6의 2개의 상이한 영역에 결합하고, Wnt1 및 Wnt3a 중에서도 Wnt 이소 형에 의해 유도된 신호 전달을 억제한다. 낚스-인투-홀 (knobs-into-holes) 공학 (문헌 [Atwell *et al.* "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library". *J Mol Biol.* 1997; 270(1):26-35] 참조)을 사용하여 이들 이특이적 항-LRP6 항체를 생산하였다. 국제공개공보 WO 2011/119661의 실시예 11에는 YW211.31.62 및 YW210.09 중쇄 이질이합체를 갖는 IgG 하이브리드가 개시되어 있다. 따라서, 비교 목적으로, YW211.31.62 및 YW210.09 중쇄 이질이합체를 갖는 2개의 이특이적 IgG 하이브리드 항체가 낚스-인투-홀 공학 기술에 의해, 즉, YW210.09의 중쇄의 CH3 상의 손잡이 및 YW211.31.62의 중쇄의 CH3 상의 구멍 또는 그 반대를 생성하도록 조작된 아미노산 변화에 의해 생산되었으며, 본원 명세서에서는 각각 Knob HC YW210.09 및 Knob HC YW211.31.62로서 언급된다. 이들 2개의 작제물은 실시예 4.4에 따른 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정으로 특성화하였다. 예상한 바와 같이, YW211.31.62 및 YW210.09 중쇄 이질이합체를 갖는 2개의 이특이적 IgG 하이브리드는 하기 표 X에 보고되는 바와 같이 Wnt1 및 Wnt3a 검정에서 유사한 효능을 나타냈다. 따라서, 하기에 추가로 제시된 비교예의 경우, Knob HC YW210.09를 제2 비교 화합물로 선별하였다.

[표 X]

[0574] Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서의 Wnt1 및 Wnt3a 경로 억제 IC₅₀ 값

| Wnt 리포터 검정 | Knob HC YW210.09 | Knob HC YW211.31.62 |
|------------------------------|------------------|---------------------|
| Wnt1, IC ₅₀ (nM) | 4.8 | 4.6 |
| Wnt3a, IC ₅₀ (nM) | 0.7 | 0.9 |

[0575]

[0576] 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정을 사용하여, 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 효능 및 효험을 MOR08168IgG1LALA 6475 scfv 바이파라토픽 LRP6 결합 분자, Knob HC YW210.09 이특이적 항-LRP6 분자 및 802T 이특이적 항-LRP6 분자와 비교하였다. 도 5b에 도시된 바와 같이, LRP5/LRP6 교차-반응성 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자 F013500571과 유사한 Knob HC YW210.09 (YW211.31.62 및 YW210.09 중쇄 이질이합체를 갖는 이특이적 IgG 하이브리드 항체)로 처리함으로써 완전한 억제 (즉, 도 5b에서의 기준선에 상응하는 형광 비율 [460/535 nm])가 달성되었다. 그러나, F013500571은 하기 표 XI에 보고되는 바와 같이 보다 높은 효능을 나타냈다. 대신에, MOR08168IgG1LALA 6475 scfv 및 802T 바이파라토픽 LRP6 결합 분자는 완전한 Wnt1 및 Wnt3a 억제의 부족을 나타냈다 (즉, 각각 도 5b 및 도 5c에서의 기준선보다 현저히 높은 형광 비율 [460/535 nm]). 이들 데이터는 MOR08168IgG1LALA 6475 scfv와 802T 바이파라토픽 LRP6 결합 분자들 다 F013500571과 비교할 때 Wnt1 및 Wnt3a 경로 억제에서 현저히 낮은 효능을 갖는다는 것을 나타낸다. 따라서, 하기에 추가로 기재하는 바와 같이 (실시예 9; 생체내 효능 참조), 생체내 실험을 위한 비교 화합물로서 Knob HC YW210.09를 선택하였다.

[0577] [표 XI]

[0578] 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정에서의 Wnt1 및 Wnt3a 경로 억제 IC₅₀ 값

| 조합된 Wnt1 및 Wnt3a 리포터 검정 | F013500571 | Knob HC YW210.09 | MOR08168IgG1LALA 6475 scfv | 802T |
|-------------------------|------------|------------------|----------------------------|------|
| IC ₅₀ (nM) | 0.05 | 1.15 | 0.19 | 0.01 |

[0579]

[0580] 실시예 8: 암 세포주에서의 Wnt 신호 전달 및 생존율에 대한 3개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 효과

[0581] 활성 Wnt 신호 전달을 억제하는 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 능력은, 이전에 기재한 바와 같이 (문헌 [Bafico *et al.* "An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells". *Cancer Cell* 2004;6(5):497-506], [DeAlmeida *et al.* "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo". *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9]) 및 [Akiri *et al.* "Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma". *Oncogene.* 2009; 28(21):2163-72] 참조), 활성 Wnt 신호 전달을 갖는 암 세포주를 사용하여 추가로 특성화하였다. 간단히 말하면, 활성 Wnt 신호 전달을 갖는 암 세포주, PA-1 및 PA-TU-8988을 12-웰 플레이트에 접종하고, 1μM의 최종 농도의 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물로 2일 동안 처리하였다. Wnt 신호 전달을 억제하는 능력은 내인성 Wnt 표적 유전자 Axin2의 mRNA 발현의 억제에 의해 검출되었다. qPCR 발현 분석은 표준 RNA 기술을 사용하여 수행하였다: QIAGEN에 의해 제공된 프로토콜에 따라 QIAGEN RNeasy Mini Kit를 사용하여 RNA 단리를 수행하였다; SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Cat. No. 11754050)를 사용하는 cDNA 합성과, Axin2 TaqMan 프라이머/프로브 (Hs00610344_m1 AXIN2 FAM, Life Technologies) 및 진핵생물 18s 내인성 대조군 VIC-MGB (4319413E-1307061, Applied Biosystems)를 갖는 TaqMan Gene Expression Assay를 사용하는 qPCR.

[0582] 도 6a에 도시된 바와 같이, 3개의 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물로 처리된 PA-TU8988S와 PA-1 암 세포 둘 다는 미처리된 (대조군) 세포와 비교할 때 Axin2 상대적 mRNA 수준을 현저하게 감소시켰다 (즉, 내인성 대조군으로 정규화됨). 이들 데이터는 활성 Wnt 신호 전달을 갖는 암 세포주에서 Wnt 신호 전달을 억제하는 반감기 연장된 바이파라토픽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 능력을 입증하였다. 또한,

세포 생존율에 대한 Wnt 신호 차단 효과의 효과를 PA-TU8988S 및 YAPC 암 세포주에서 조사하였으며, 이 암 세포주의 증식은 활성 Wnt 신호 전달에 의존하는 것으로 이전에 보고되었다 (문헌 [Jiang *et al.* "Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(31):12649-54] 참조). 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물 (1 μ M의 최종 농도) 또는 비교 화합물 802T (1 μ M의 최종 농도)에 의한 처리의 10일 후, Alamar Blue 검정 (Invitrogen, Cat. # DAL1100)을 수행하여 세포 생존율을 측정하였다. 도 6b에 도시된 바와 같이, 3개의 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물로 처리된 PA-TU8988S 암 세포는 미처리된 (대조군) 세포와 비교할 때 현저하게 감소된 생존 세포의 백분율을 나타냈다 ($\geq 75\%$ 감소). 802T 처리시, 세포 생존율에 대한 어떠한 영향도 검출되지 않았다 (도 6b, 우측 다이어그램). 이들 데이터는 활성 Wnt 신호 전달에 의존하는 암 세포의 세포 증식을 억제하는 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물의 능력을 입증하고, 또한 802T와 비교할 때 이들 작제물의 탁월한 효과를 나타낸다.

[0583] 또한, 상기에 기재한 바와 같이, PA-TU8988S (도 6c) 및 YAPC (도 6d) 암 세포주에서 802T와 비교하여 F013500571에 대한 세포 생존율의 용량 의존성을 평가하였다. F013500571 처리시, 세포 생존율에서의 용량 의존성 감소가 검출되었다. 대조적으로, PA-TU8988S와 YAPC 암 세포주 둘 다에서 비교 화합물 802T로 처리할 때 세포 생존율에 대한 어떠한 영향도 나타나지 않았다. 이들 데이터는 반감기 연장된 바이파라토퍽 LRP5/LRP6 교차-반응성 VHH 작제물이 802T와 비교할 때 탁월한 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0584] 실시예 9: 생체내 효능

[0585] LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토퍽 반감기 연장된 VHH 작제물/결합 분자를 Wnt 구동된 종양 모델에서 생체내에서 추가로 특성화하였다. 이들 결합 분자가 생체내에서 종양 성장을 억제 하는지를 측정하기 위해 실험을 수행하였다. 비교 화합물 Knob HC YW210.09의 효능도 또한 동일한 Wnt 구동된 종양 모델을 사용하여 측정하였다. 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 인핸서 (MMTV 프로모터)를 이용한 Wnt 리간드의 형질전환 발현은 마우스에서의 광범위한 유관 증식중에 이어서 6개월까지 형질전환 (TG) 마우스에서의 유방 선암종을 유도한다. 이들 유방 종양은 Wnt 리간드의 글루코코르티코이드 유도된 과발현에 의해 유발되며, 세포내 베타-카테닌 국소화에 의해 평가되는 바와 같이 상피 및 중간엽 마커의 발현 (기저부-유사 표현형) 및 활성 Wnt 신호 전달을 포함하는 TNBC 종양과 유사한 특징을 갖는다. 특히, MMTV-Wnt-1 형질전환 마우스로부터 유도된 유방 종양은 Wnt1 의존적이다. 실제로, 사람 Fc 도메인 (F8CRDhFc)에 융합된 Frizzled8 시스테인-풍부한 도메인 (CRD)을 포함하는 가용성 Wnt 수용체를 사용하는 Wnt 활성의 차단 (문헌 [DeAlmeida *et al.* "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo". *Cancer Res.* 2007;67(11):5371-9] 참조)이 생체내에서 종양 성장을 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서, 효능 실험을 개시하기 전에 2 내지 5 계대 동안 MMTV-Wnt1 형질전환 마우스로부터 단리된 종양을 종양 조각으로서 nude 마우스에서 피하 계대하였다. 이식후 14일 내지 21일 사이에 종양이 약 150 내지 250 mm³의 평균 용적에 도달할 때, 마우스를 그룹당 7마리씩 그룹으로 무작위 추출하고, 화합물을 정맥내 투여하였다. LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토퍽 반감기 연장된 VHH 작제물을, F013500571에 대해 도 7a 및 F013500720에 대해 도 7b에 도시된 투여량으로 마우스에 주 2회 정맥내 투여하였다. 비교 화합물 Knob HC YW210.09도 또한 상기에서 설명한 시험관내 실험에서 이 화합물에 의해 수득된 데이터로 인해, 주당 2회, 그러나 보다 높은 용량, 즉, 30 및 45 mg/kg으로 (도 7c) 정맥내 투여하였다. 종양 용적 및 체중을 효능 실험 동안 모니터링하고, 종양 용적의 중앙값은 도 7a 내지 7c에 보고되어 있다. 종양 성장 억제율 (TGI)는 효능 실험의 종료 시점에서 측정하였다. 특히, 대조군 (도 7a 및 7b에 도시된 실험에서 히스티딘 버퍼 - 20mM 히스티딘 pH 6.5 버퍼 - 로 또는 도 7c에 도시된 실험 동안 시트레이트 버퍼로 마우스를 처리함)과 비교하여 각각의 처리군에 대해 TGI를 측정하였다. 또한, LRP5와 LRP6 길항제의 잠재적인 독성을 평가하기 위해, (십이지장에서부터 직장까지의 GI관 분절의 H&E 염색을 통해) 위장 (GI) 병리조직학적 분석을 효능 실험의 끝에서 수행하였다. 종양 성장 억제율 (TGI), 생체내 효능 연구의 종료 시점에서의 GI 병리조직학적 분석 결과, 체중 감소 (효능 실험의 시작 시점과 비교하여 > 18%의 체중 손실)로 인해 희생될 필요가 있는 마우스의 수에 상응하는 사망률 및 종양 퇴행의 수 (처리 시작 시점에서의 종양 용적 측정치 보다 작은 실험 종료 시점에서의 종양 용적)은 도 7a, 도 7b 및 도 7c에 각각 도시된 실험 및 데이터에 관한 표 XIAA, XIIB 및 XIIC에서 각각의 치료군에 대해 보고되어 있다.

[0586] [표 XIAA]

[0587] 주 2회 정맥내 투여된 F013500571의 생체내 효능 본 실험의 결과도 또한 도 7a에 도시되어 있다.

| | 용량 [mg/kg] | TGI [%] | 퇴행률 [x/7] | 사망률 [x/7] | GI 병리조직학적 평가 |
|------------|---------------|------------|-----------|-----------|--------------|
| 대조군 | 히스티딘 버퍼 | - | - | - | - |
| F013500571 | 10 | 128 | 7 | 0 | 소견 없음 |
| | 4 | 113 | 7 | 0 | 소견 없음 |
| | 2 | 61 | 0 | 0 | 검출되지 않음 |

[0588]

[0589] [표 XIIB]

[0590] 주 2회 정맥내 투여된 F013500720의 생체내 효능 본 실험의 결과도 또한 도 7b에 도시되어 있다.

| | 용량 [mg/kg] | TGI [%] | 퇴행률 [x/7] | 사망률 [x/7] | GI 병리조직학적 평가 |
|------------|---------------|------------|-----------|-----------|--------------|
| 대조군 | 히스티딘 버퍼 | - | - | - | - |
| F013500720 | 1 | 128 | 7 | 0 | 소견 없음 |
| | 0.4 | 60 | 0 | 0 | 소견 없음 |
| | 0.2 | 17 | 0 | 0 | 검출되지 않음 |

[0591]

[0592] [표 XIIC]

[0593] 주 2회 정맥내 투여된 Knob HC YW210.09의 생체내 효능 본 실험의 결과도 또한 도 7c에 도시되어 있다.

| 정맥내 | 용량 [mg/kg] | TGI [%] | 퇴행률 [x/7] | 사망률 [x/7] | GI 병리조직학적 평가 |
|---------------------|---------------|------------|-----------|-----------|--------------|
| 대조군 | 시트레이트 버퍼 | - | - | - | - |
| Knob HC YW210.09 | 30 | 80 | 0 | 0 | - |
| | 45 | 85 | 0 | 0 | 소견 없음 |

[0594]

[0595] 도 7a 내지 7c 및 상기 표 XIIA 내지 XIIC에서 알 수 있는 바와 같이, LRP5/LRP6 교차-반응성 반감기 연장된 바이파라토퍽 VHH 작제물 (2회/주 스케줄에서 1 mg/kg의 F013500720 및 4 및 10 mg/kg의 F013500571)에 의한 처리는 실제로 종양 퇴행 (즉, 종양 수축에 상응하는 > 100 %의 종양 성장 억제율 (TGI); 효능 실험 시작 시점에서의 종양 용적과 비교하여 효능 실험 종료 시점에서의 종양 용적의 감소)를 초래하고, 유의미한 체중 변화가 없었으며 (< 10 %), GI 병리조직학적 분석 후 보고된 어떠한 소견도 없었다. 중요하게, 이와 대조적으로, 3회/주 스케줄에 의해 90 mg/kg에 상응하는, 마우스에서의 심지어 최대 투여 가능한 정맥내 용량/스케줄으로도, LRP6 특이적 결합체 Knob HC YW210.09의 처리시 어떠한 종양 퇴행도 관찰될 수 없었다.

[0596] 상기에서 설명한 실험에서 관찰된 바와 같은 생체내 효능의 차이를 추가로 조사하기 위해, 마우스에 대해 보다 높은 용량의 비교 화합물로 보다 빈번한 투여 (3회/주)를 허용하는 추가의 실험을 설정하였다. 요약하면, 이러

한 보다 높은 노출을 달성하기 위해, 비교 화합물을 하기 표 XIID에 나타난 바와 같이 복강내로 투여하였다:

[표 XIID]

명시된 바와 같이 주 2회 또는 3회 복강내 투여된 Knob HC YW210.09의 생체내 효능

| 복강내 | 용량 [mg/kg] | 스케줄 | TGI [%] | 퇴행률 [x/5] | 사망률 [x/5] |
|---------------------|---------------|-------|------------|-----------|-----------|
| 대조군 | 시트레이 트 버퍼 | 3 회/주 | - | - | - |
| Knob HC YW210.09 | 45 | 2 회/주 | 55 | 1 | 0 |
| | 90 | 2 회/주 | 85 | 0 | 0 |
| | 90 | 3 회/주 | 87 | 0 | 0 |

표 XIID에 나타난 데이터에서 볼 수 있듯이, 이러한 설정에서도 TGI의 측면에서 어떠한 유의미한 효과도 없었다. 환언하면, 이들 실험, 데이터 및 결과는 Knob HC YW210.09와 비교할 때 반감기 연장된 바이파라토픽 VHH 작제물의 보다 높은 효능을 명확하게 나타내며, 본 발명의 폴리펩타이드의 전례없는 능력은 종양 성장을 감소시킬 뿐만 아니라, 심지어 종양 수축을 유도한다. 물론, 종양 수축 (즉, 종양 퇴행)은 암 환자의 치료를 위한 목적하는 치료 효과 (즉, 효능)이다. 실제로, 임상 연구에서, 종양 퇴행을 유도하여 병리학적 완전 반응 (pCR)을 유도하는 치료는 유방암과 같은 미충족 의료 징후에서 무진행 생존율 및 전체 생존율을 유의하게 향상시킨다.

상기 비교예는 또한 LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토픽 반감기 연장된 VHH 작제물이 친화성 또는 K_D 값과 같은 결합 특징의 면에서 탁월할 뿐만 아니라, 생체내 설정에서 매우 유리하고 탁월한 특성을 갖는다는 것을 나타낸다.

다음으로, 화합물 MOR08168IgG1LALA 6475 scfv가 유사한 유리한 효과를 제공할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이러한 목적을 위해, 생체내 내성 연구를 다음과 같이 마우스에서 수행하였다: MOR08168IgG1LALA 6475 scfv 화합물을 주 2회 (2qw) 3 mg/kg으로 정맥내 투여하였다 (국제공개공보 WO 2011/138391의 도 22에 기재된 바와 같은 이중 이식 종양 모델에서 생체내 효능이 검출된 것과 동일한 용량/계획). MOR08168IgG1LALA 6475 scfv에 의한 제1 치료를 1일째에 수행하였고, 6일째부터 시작하여 체중의 유의미한 손실이 마우스에서 검출되었다. 10일째에, MOR08168IgG1LALA 6475 scfv 화합물로 처리된 일부 마우스는 유의미한 체중 감소 (> 10 %)를 나타냈다. 11일째에 마우스를 희생시키고, 위장 (GI) 병리조직학적 분석을 통해 마우스의 결장과 맹장에서 침식에 의한 염증을 확인하였다. 이들 데이터는 MOR08168IgG1LALA 6475 scfv가 효과적인 용량/계획에서 용인되지 않는 것을 시사한다. 따라서, LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토픽 반감기 연장된 VHH 작제물은 치료 범위와 관련하여 탁월하다; 즉, 이들은 어떠한 유의미한 체중 변화도 없이 (<10 %) 종양 퇴행을 유도하고, GI 병리조직학적 분석 후 보고된 어떠한 소견도 없다.

실시예 10: 생체내 Wnt 경로 억제

Wnt 신호 전달에 대한 LRP5/LRP6 교차-반응성 바이파라토픽 반감기 연장된 VHH 작제물/결합 분자의 효과를 추가로 특성화하기 위해, 실시예 9에 기재된 효능 실험의 종료 시점에서 종양을 단리하였다. 특히, 화합물의 마지막 주사 또는 대조군 처리 16시간 후에 종양을 단리하였다. Wnt 신호 전달 억제는 실시예 8에서 기재한 바와 같이 분석된 종양에서 Axin2의 mRNA 발현의 감소에 의해 측정되었다. 대조군에 대한 Axin2 mRNA 발현의 배수 변화는 F013500571의 생체내 효능에 대해 8a에 도시되어 있으며, F013500720의 생체내 효능에 대해 8b에 도시되어 있다. 각각의 처리군에 대한 Axin2 mRNA 감소의 정량화는 하기 표 XIII A 및 XIII B에 보고되어 있다.

[표 XIII A]

[0606] F013500571 처리에 의한 종양에서의 Axin2 mRNA 발현의 감소 본 데이터는 도 7a 및 8a를 참조한다.

| | 용량 [mg/kg] | TGI [%] | Axin2 감소율 (%) |
|------------|------------|---------|---------------|
| 대조군 | 히스티딘 버퍼 | - | |
| F013500571 | 10 | 128 | 83 |
| | 4 | 113 | 77 |
| | 2 | 61 | 35 |

[0607]

[0608] [표 XIIIIB]

[0609] F013500720 처리에 의한 종양에서의 Axin2 mRNA 발현의 감소 본 데이터는 도 7b 및 8b를 참조한다.

| | 용량 [mg/kg] | TGI [%] | Axin2 감소율 (%) |
|------------|------------|---------|---------------|
| 대조군 | 히스티딘 버퍼 | - | |
| F013500720 | 1 | 128 | 92 |
| | 0,4 | 60 | -21 |
| | 0,2 | 17 | 35 |

[0610]

[0611] 도 8a 및 8b 및 표 XIII A 및 XIII B에서 알 수 있는 바와 같이, Axin2 mRNA 발현의 현저한 감소 및 용량 의존적 감소 (특히, F013500571의 처리의 경우)는 대조군과 비교하여 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자로 처리된 종양에서 관찰되었다. 이들 결과는 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자가 실제로 종양 세포에서 Wnt 신호 전달을 억제함으로써 종양 성장을 억제할 수 있다는 것을 시사한다.

[0612] 실시예 11: 산업적 제조 공정

[0613] 11.1 발효: 상기 표 III 및 V에 설명한 임의의 폴리펩타이드는 유도가능한 프로모터의 제어하에 W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294와 같은 상이한 이. 콜라이 균주의 세포질에서 발현될 수 있다. 이러한 프로모터는 lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB로부터 선택될 수 있다. 배양 배지는 바람직하게는 문헌 [Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syltatk, C., Mattes, R., Siemann, M., and Altenbuchner, J.: High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia coli rhaBAD Promoter. Biotechnology and Bioengineering, 73: 95-103 (2001)], [DeLisa, M. P., Li, J. C., Rao, G., Weigand, W. A., and Bentley, W. E.: Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor. Biotechnology and Bioengineering, 65: 54-64.(1999)] 또는 동등물에 따라 충분히 정의되어 있다. 그러나, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린과 같은 아미노산, 또는 대두 펩톤 또는 효모 추출물과 같은 복합 배지 성분에 의한 배지의 보충이 유리할 수 있다. 발효 공정은 유가식 모드로 수행된다. 조건: 온도 30-40 °C, pH 6-7.5, 용존 산소는 20% 이상 유지된다. 초기 C-공급원의 소비 후, 상기에서 언급된 공급 배지 (또는 동등물)를 배양물에 공급한다. 발효기에서의 건조 세포 중량이 40 내지 90 g/L에 도달할 때, 사용되는 프로모터 시스템에 상응하는 적절한 유도물질 (예를 들어, IPTG, 락토오스, 아라비노스)로 배양을 유도한다. 상기 유도는 개별 유도물질을 발효기에 장시간 동안 공급함으로써 펄스된 완전 유도로서 또는 부분 유도로서 수행될 수 있다. 생산 단계는 적어도 4시간 지속되어야 한다. 세포는 보울형 (bowl) 원심분리기, 관상 보울형 (tubular bowl) 원심분리기 또는 디스크 스택 원심분리기에서 원심분리하여 회수하고 배양 상청액은 버린다.

[0614] 11.2 정제: 이. 콜라이 세포 질량은 6 내지 8배 양의 용해 버퍼 (포스페이트 또는 트리스 버퍼, pH 7-8.5) 중

에 재현탁시킨다. 세포 용해는 바람직하게는 고압 균질화에 이어서 보울형, 관상 보울형 또는 디스크 스택 원심분리기로 원심분리하여 세포 잔해물을 제거함으로써 수행한다. 0.22-10 μ m 필터를 사용하여 표적 단백질을 함유하는 상청액을 임의로 여과하고, pH 7-8.5에서 양이온 교환 크로마토그래피 (예를 들어, Toyopearl MegaCap[®] II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF or S HyperCel[™])를 통해 분리한다. pH 7-8.5에서 선형으로 증가하는 NaCl 농도 구배에 의해 용출을 수행한다. 표적 단백질을 함유하는 분획물을 풀링하고, 이어서 5-10mM DTT와 항온처리하여 유리된 시스테인 잔기에 의해 매개되는 이합체화 또는 응집을 방지한다. 0.8-1 M 황산암모늄 또는 2-3 M NaCl을 추가로 첨가한 후, pH 7-8.5에서 친수성 상호작용 크로마토그래피(예를 들어, Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Butyl Sepharose FF, Butyl Toyopearl 650 (S,M,C), Phenyl Toyopearl 650 (S,M,C))를 통해 용액을 분리한다. 5mM DTT의 존재하에 선형으로 감소하는 황산암모늄 또는 NaCl 농도 구배에 의해 pH 7-8.5에서 용출을 수행한다. 최소 90%의 순도 수준으로 표적 단백질을 함유하는 분획물을 풀링하고, 5mM DTT의 존재하에 정용여과하고 대략 5mg/ml로 농축시켜 탈염시킨다. 후속적인 리폴딩은 단백질 용액을 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM 시스타민, 10 mM CHAPS를 사용하여 pH 8.5에서 0.25 내지 1mg/ml의 최종 단백질 농도로 1:5 내지 1:20으로 희석시킴으로써 수행된다. 리폴딩 용액을 실온에서 12 내지 36시간 동안 교반하에 항온처리하고, 이어서 pH 7-8.5에서 양이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C))에 의해 분리한다. pH 7-8.5에서 선형으로 증가하는 NaCl 농도 구배에 의해 용출을 수행한다. 단량체성 표적 단백질을 함유하는 분획물을 풀링하고, 정용여과를 통해 25mM Na-포스페이트, 220mM 내독소 유리 트레할로스 pH 7.5 중에서 제형화한다. 여과에 의해 용액을 멸균하고, 2 내지 8 °C에서 보관한다.

[0615] **실시예 12: 피하내 투여용 약제학적 제형**

[0616] 임의의 본 발명의 상기 바이파라토픽 폴리펩타이드 작제물은 다음과 같은 조성을 갖는 피하 적용을 위한 약제학적 제형의 제조에 선택될 수 있다:

[0617] 약물 성분: 100 mg/ml (1 내지 3 nmol/ml)

[0618] 아세트이트 버퍼: 25 mM

[0619] 트레할로스: 220 mM

[0620] Tween-20: 0.02 %

[0621] 약물 성분은 상기 조성을 갖는 용액으로 제형화하고, 멸균하고, 2 내지 8 °C에서 저장하였다.

[0622] **실시예 13: 사람에서의 약제학적 용도**

[0623] Wnt 신호 전달 억제제에 민감한 암을 앓고 있는 사람과 같은 환자에게 상기 실시예 11.2에서 제조된 용액을 2주 내지 4주 마다 정맥내 주입 (100 내지 200mg 투여량)에 의해 적용한다.

[0624] **실시예 14: 생체의 검정에서 수지상 세포에 의한 염증 촉진성 사이토카인 방출에 대한 Wnt3a-신호 전달 억제의 효과**

[0625] 정보 제공 동의하에 건강한 기증자로부터 PBMC를 수득하였다. 사람 단핵구-유도된 수지상 세포 (Mo-DC)를 다음과 같이 생성하였다: 50 ng/mL GM-CSF 및 50 ng/mL IL-4로 보충된 X-VIVO 배지에서 PBMC를 배양하였다. 배양 24시간 후, 상청액을 조심스럽게 제거하고, 동일한 GM-CSF 및 IL-4로 보충된 X-VIVO 배지로 대체하였다. 4일째에, 상청액을 조심스럽게 제거하고, LPS 단독의 존재하에 또는 사람 Wnt3a 또는 사람 Wnt3a 및 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자와 조합하여 X-VIVO 배지로 대체하였다. 다음날, 상청액을 수거하고, 제조업자의 지침에 따라 ELISA를 통해 TNF-알파의 분석을 실시하였다. 이전에 보고된 바와 같이 (문헌 [Oderup *et al.* "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". *J Immunol.* 2013;190(12): 6126-34] 참조) 및 도 9a에 도시된 바와 같이, Wnt3a는 분화된 수지상 세포 (DC)에 의해 염증 촉진성 사이토카인 분비 (즉, TNF-알파 방출)를 직접 억제한다. DC로부터의 TNF-알파 방출의 Wnt3a 구동된 억제는 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자의 첨가에 의해 회복되었다.

[0626] 이들 데이터는 포맷된 바이파라토픽 및 서열-최적화된 결합 분자가 Wnt3a 처리된 수지상 세포에 의해 TNF-알파 분비를 회복할 수 있게 함으로써 수지상 세포에 대한 Wnt 억제 효과를 억제한다는 것을 나타낸다.

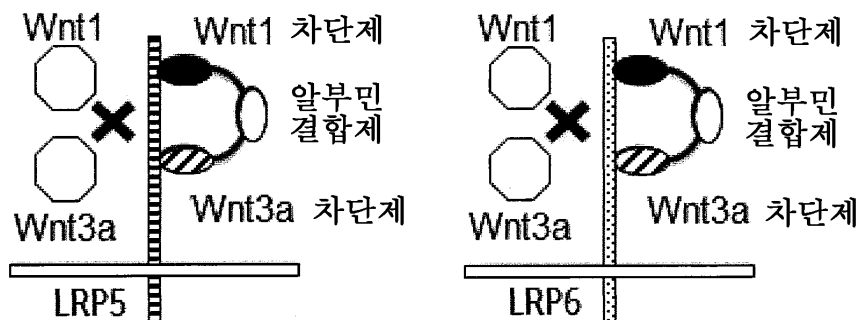
[0627] 종양 미세환경에서 수지상 세포의 Wnt 경로를 차단하는 것이 종양-매개된 면역 억제를 파괴하고 항-종양 면역을

증가시키는 잠재적인 치료학적 접근법일 수 있다는 것에 주목하는 것은 중요하다.

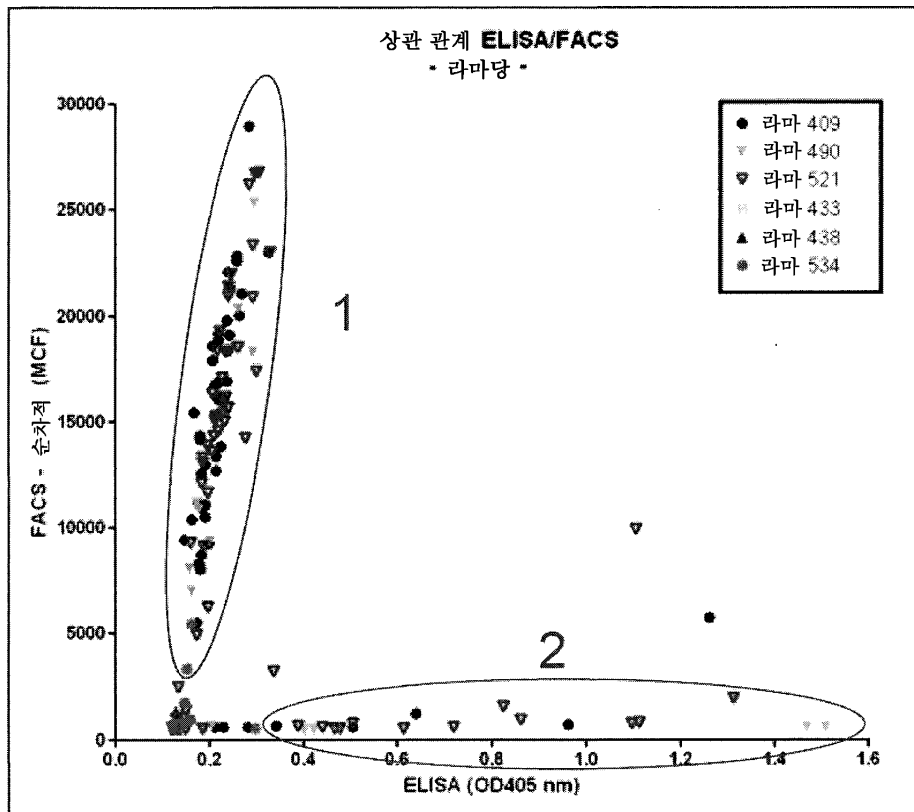
- [0628] T 세포 (이펙터 T 세포)에 대한 DC의 효과를 조사하기 위해, 이전에 기재된 바와 같이 (문헌 [Oderup et al. "Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance". J Immunol. 2013;190(12): 6126-34] 참조), LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자의 존재 또는 부재하의 Wnt3a로 전처리된 DC를 PBMC로부터 분리된 T 세포와 공동-배양하였다. DC/T 세포 공동-배양 3일 후, 상청액을 수거하고, 제조업자의 지침에 따라 ELISA를 통해 IFN 감마의 분석을 수행하였다.
- [0629] IFN-감마 분비는 T 세포 활성화의 마커이다. 도 9b에 도시된 바와 같이, Wnt3a 매개된 DC 억제는 T 세포에 의한 IFN-감마 분비의 감소 (T 세포 기능의 저해)를 초래하며, 이는 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자로 처리함으로써 완전히 복원된다.
- [0630] 요약하면, 이들 데이터는 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자가 수지상 세포에 대한 Wnt 억제 효과를 억제함으로써 T 세포 기능의 회복을 유도한다는 것을 나타낸다.
- [0631] T 세포의 지속적인 활성화/자극은 말단 분화를 유도하여 T 세포 표현형의 고갈, T 세포 기능의 점진적 소실을 초래하는 것으로 알려져 있다. 따라서, DC의 활성화에 의해 매개되는 T 세포에 대한 LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자의 효과는 T 세포 고갈에 의해 한정될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, LRP5/LRP6 교차-반응성 결합 분자의 투여와 T 세포 고갈을 차단하는 면역 체크포인트 억제제의 투여를 조합하는 조합 치료법은, T 세포 기능을 활성화 및 유지시켜 종양 미세환경을 변화시킴으로써 본 발명의 분자의 치료 효과를 뒷받침하는데 도움이 될 것으로 예상된다.

도면

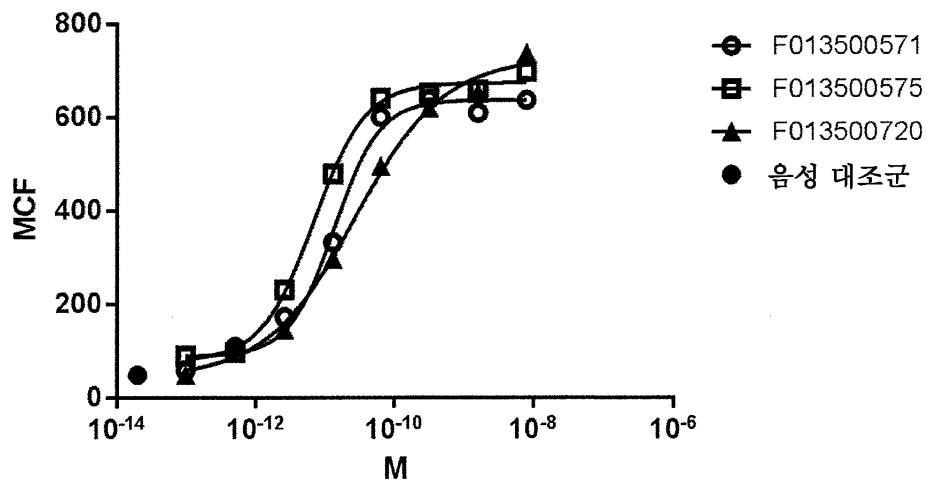
도면1



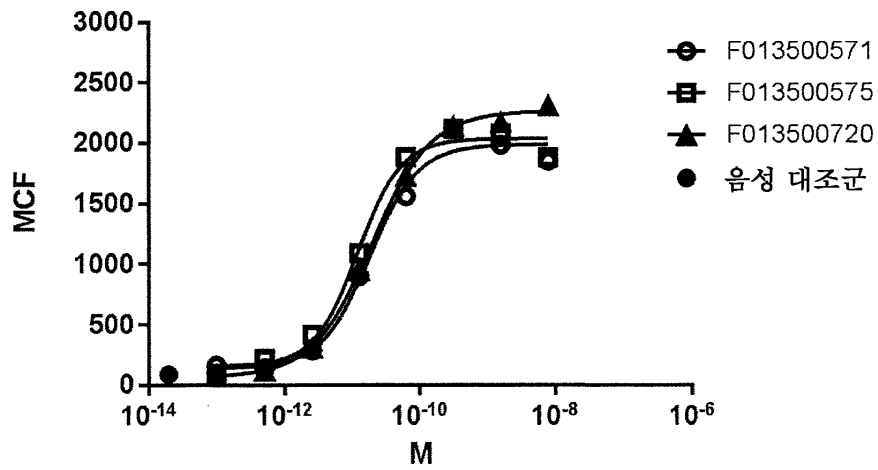
도면2



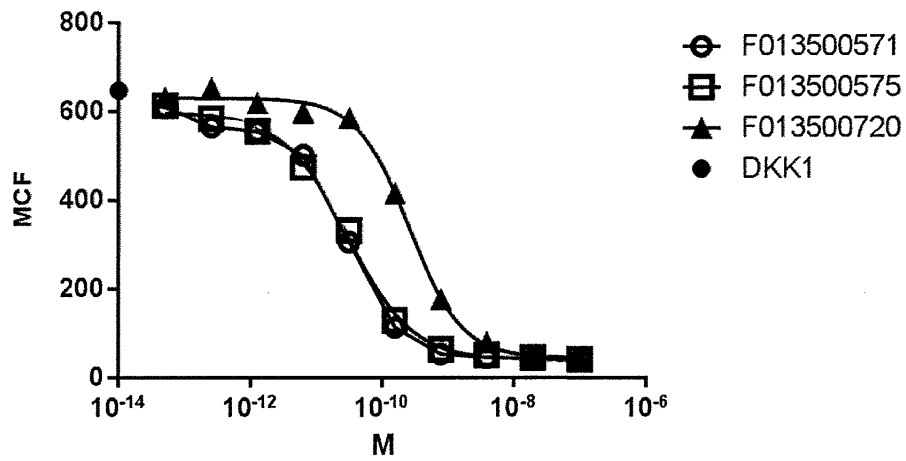
도면3a



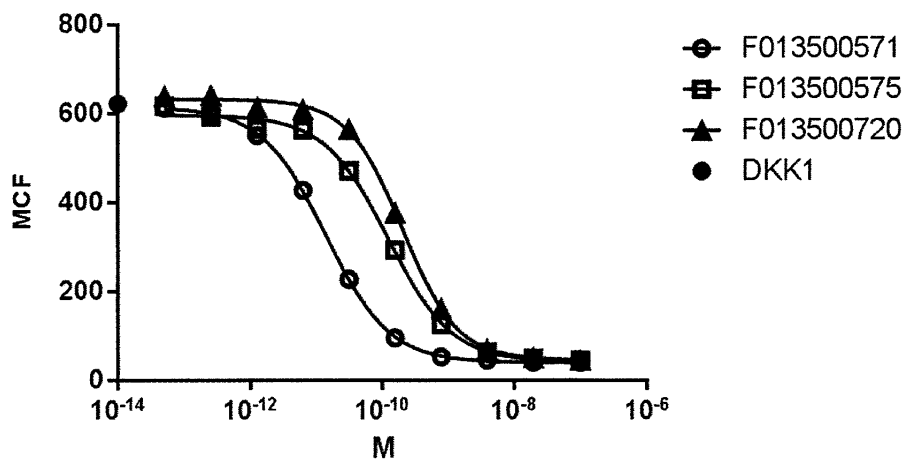
도면3b



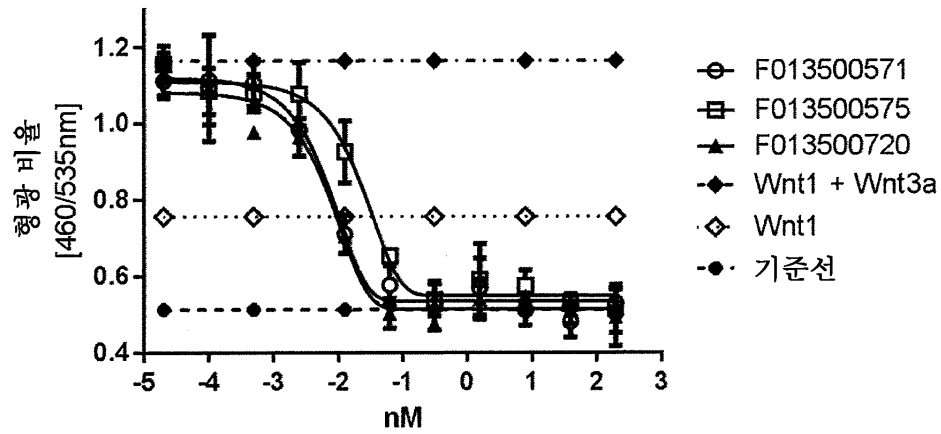
도면4a



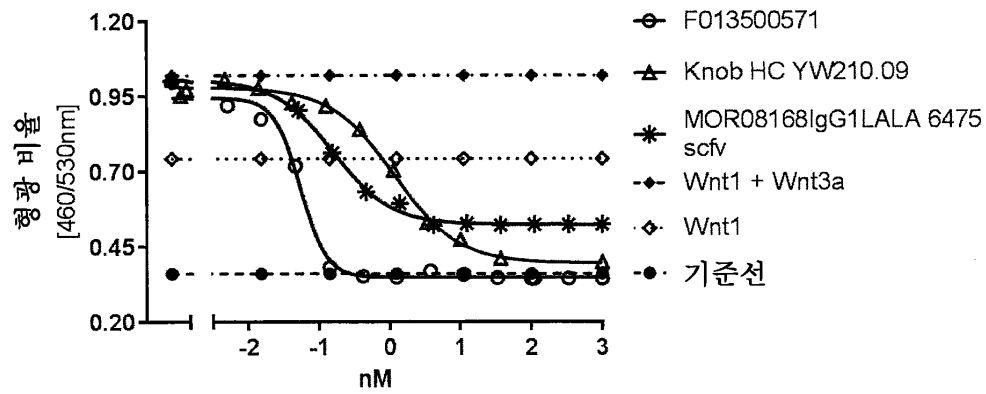
도면4b



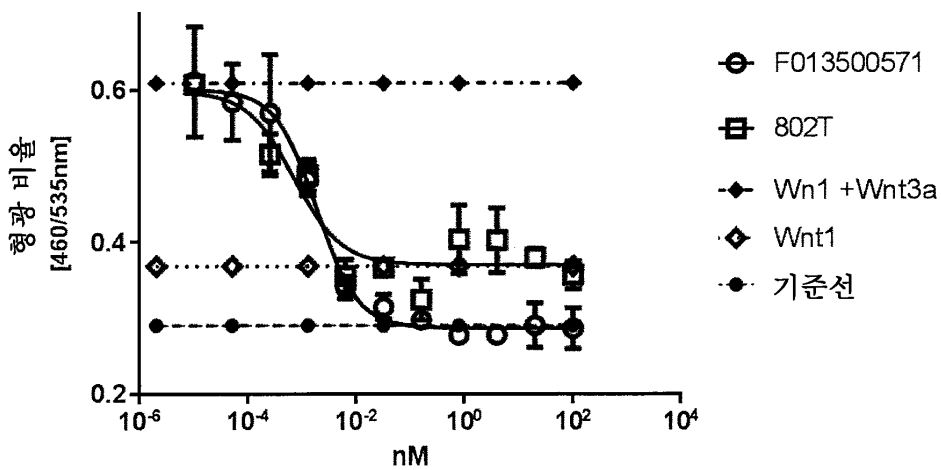
도면5a



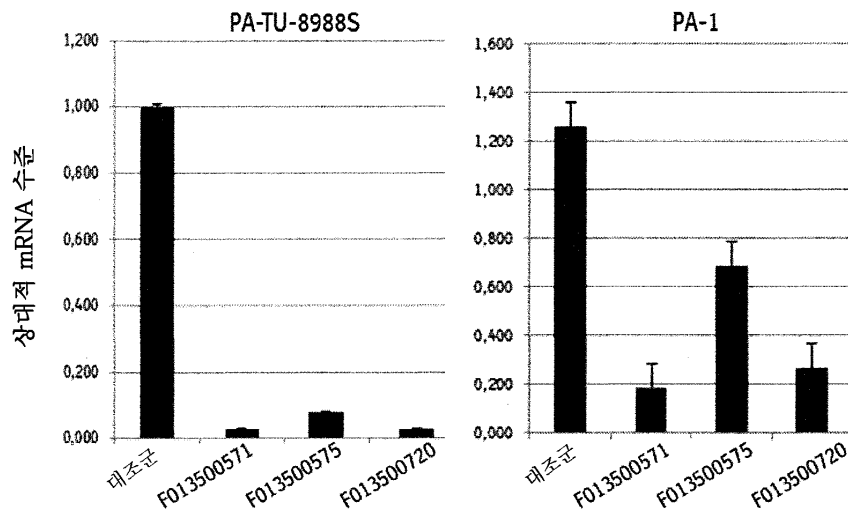
도면5b



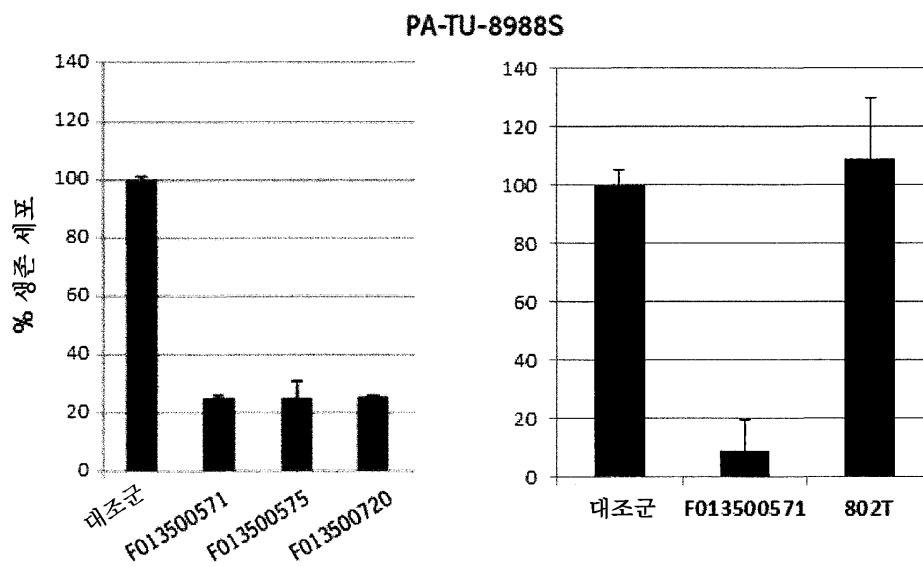
도면5c



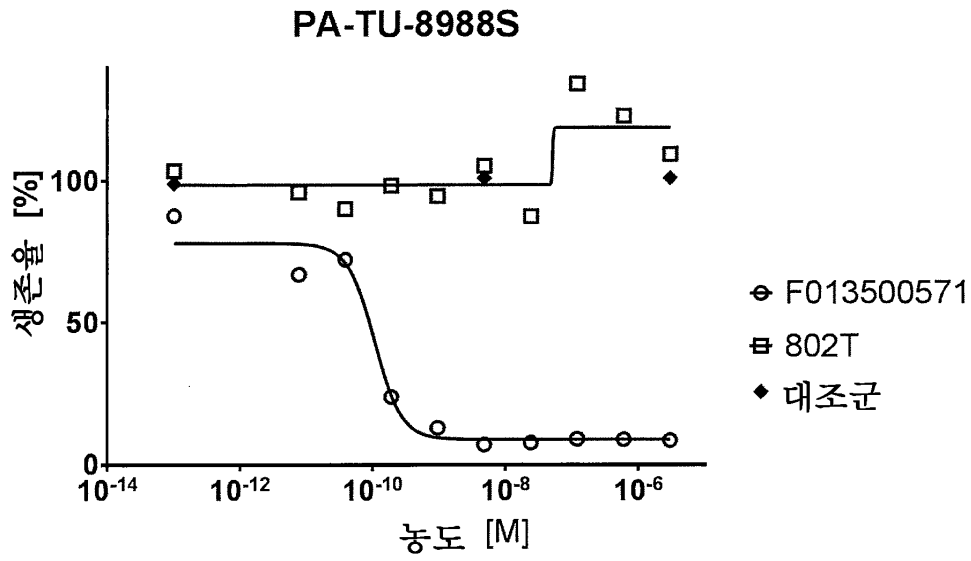
도면6a



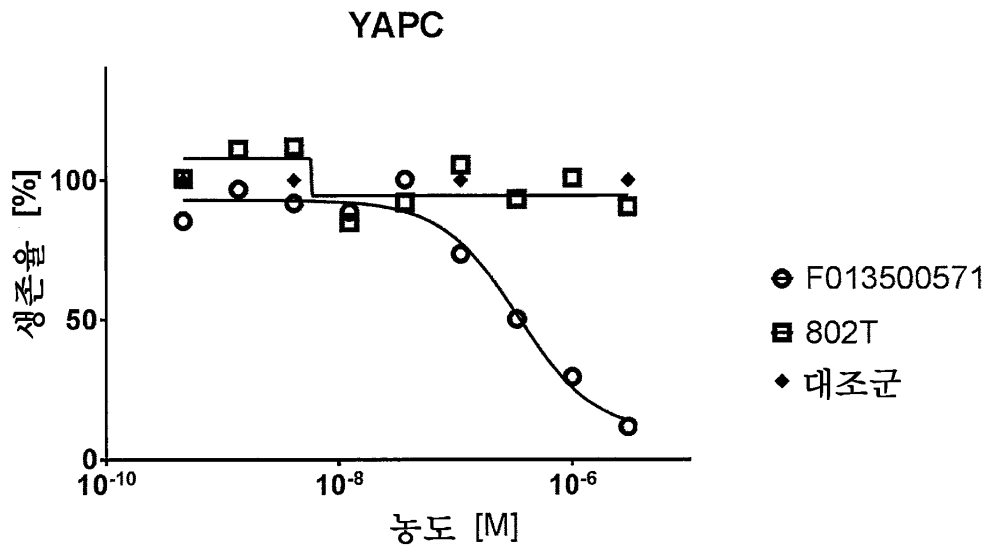
도면6b



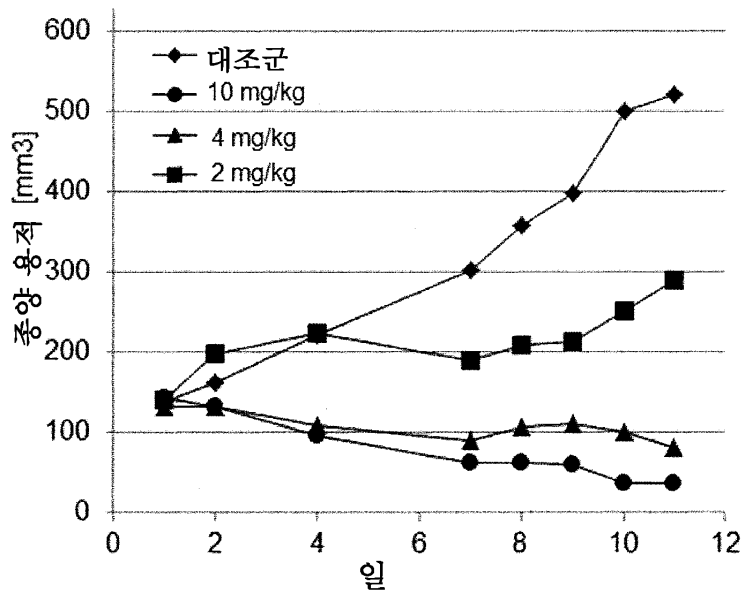
도면6c



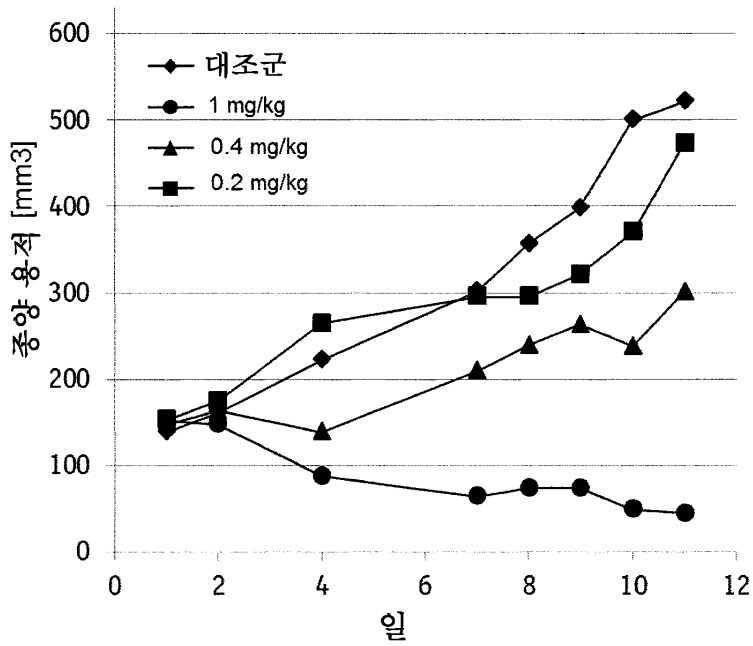
도면6d



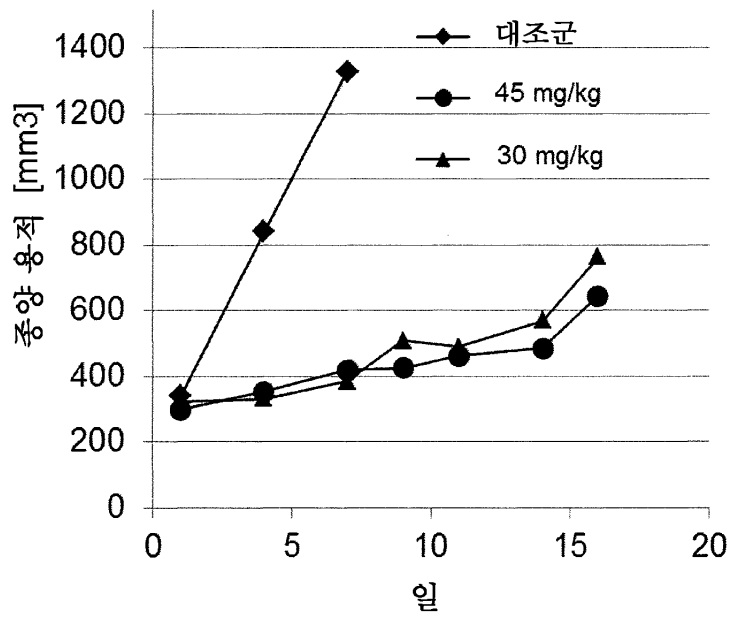
도면7a



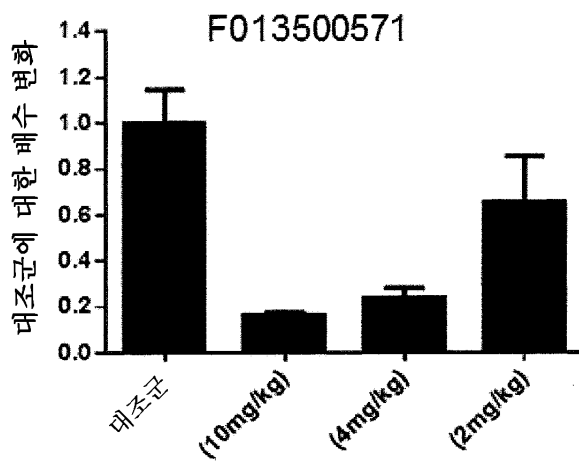
도면7b



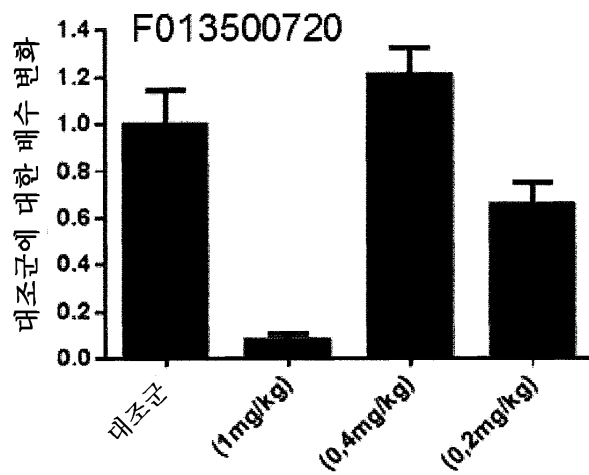
도면7c



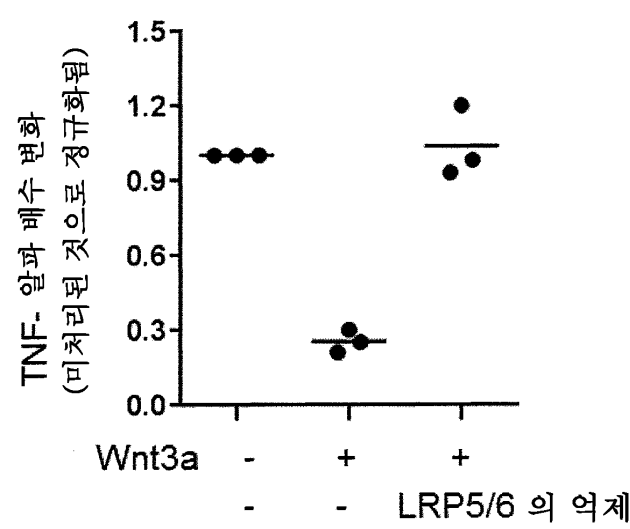
도면8a



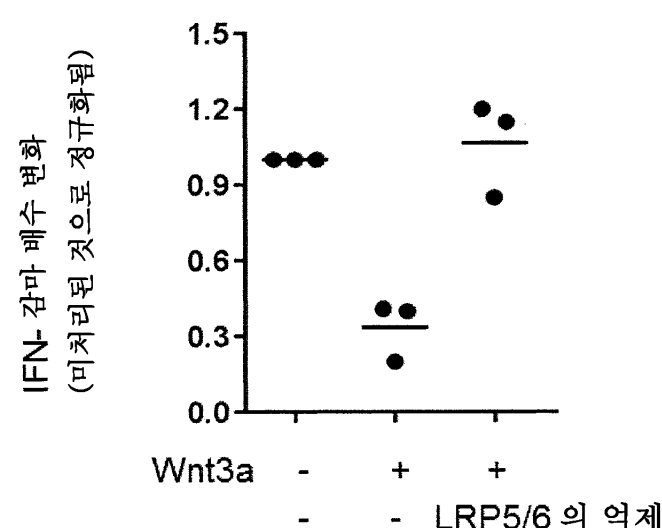
도면8b



도면9a



도면9b



서열 목록

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
- <120> BIPARATOPIC POLYPEPTIDES ANTAGONIZING WNT SIGNALING IN TUMOR CELLS
- <130> P12-0401/WO/1
- <150> 15197999.4
- <151> 2015-12-04
- <160> 47
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Wnt1-333E06mod

<400> 1

Thr Tyr Thr Val Gly

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Wnt1-333E06mod

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Wnt1-333E06mod

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Wnt1-333G06

<400> 4

Ser Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Wnt1-333G06

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Wnt1-333G06

<400> 6

Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Trp

1 5 10 15

Trp Glu Tyr

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Wnt1-332D03mod

<400> 7

Arg Tyr Thr Met Gly

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Wnt1-332D03mod

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Wnt1-332D03mod

<400> 9

Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser Ser Gly

1 5 10 15

Arg Tyr Glu Tyr

20

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Wnt3a-093A01

<400> 10

Ser Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Wnt3a-093A01

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Wnt3a-093A01

<400> 12

Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn Tyr Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Wnt3a-367B10

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Wnt3a-367B10

<

400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Wnt3a-367B10

<400> 15

Asp Pro Arg Gly Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr

1 5 10 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 of Alb11

<400> 16

Ser Phe Gly Met Ser

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 of Alb11

<400> 17

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

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 of Alb11

<400> 18

Gly Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Wnt1-333E06mod

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Wnt1-333G06

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr

100 105 110

Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 21

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Wnt1-332D03mod

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
Ala Ala Ile Val Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser

100 105 110
Ser Gly Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 22

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Wnt3a-093A01

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn

100

105

110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Wnt3a-367B10

<400> 23

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain Alb11

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 435

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500575

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 165 170 175
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 180 185 190
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser

 195 200 205
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 245 250 255
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

 260 265 270
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
305 310 315 320

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr

325 330 335

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
340 345 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
355 360 365

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
370 375 380

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala

385 390 395 400

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg
405 410 415

Arg Arg Asn Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
420 425 430

Ser Ser Ala

435

<210> 26

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500571

<400> 26

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

1 5 10 15

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

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr
 100 105 110
 Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 165 170 175
 Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 180 185 190
 Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

 195 200 205
 Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
 210 215 220
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 245 250 255
 Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr

 260 265 270
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
305 310 315 320

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

325 330 335

Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln
340 345 350

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser
355 360 365

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

385 390 395 400

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr
405 410 415

Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
420 425 430

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

435

<210> 27

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500720

<400> 27

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

1 5 10 15

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

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
 Ala Ala Ile Val Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr

 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ile Leu Leu Tyr Ser
 100 105 110
 Ser Gly Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 165 170 175
 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 180 185 190
 Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

 195 200 205
 Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 225 230 235 240
 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly

 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

325 330 335

Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg
355 360 365

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
370 375 380

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

385 390 395 400

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly
405 410 415

Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
420 425 430

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

435 440

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0129093A01

<400> 28

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

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

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

His His His His His

145

<210> 29

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130333G06

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

85

90

95

Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr

100

105

110

Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala

130

135

140

Ala His His His His His His

145

150

<210> 30

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0129093A03

<400> 30

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35

40

45

Ala Ala Ile Asn Trp Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Ala Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Gly Arg Thr Tyr Tyr Glu Leu Tyr

100

105

110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala

115 120 125
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His

130 135 140
His His His His

145

<210> 31

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130333E06

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30
Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr

100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln

115 120 125
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His

130 135 140
His His

145

<210> 32

<211> 152

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130332D03

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser

100 105 110

Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly

130 135 140

Ala Ala His His His His His His

145 150

<210> 33

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130367B10

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala

115 120 125

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His

130 135 140

His His His His

145

<210> 34

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130378B05

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

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

Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
 115 120 125
 Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His
 130 135 140

His His His His His

145

<210> 35

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130378A04

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

His His His

145

<210> 36

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH domain F0130372C08

<400> 36

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

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

Ala Ala Lys Arg Arg Gly Arg Gly Ser Val Ser Pro Asn Ser Ser Ser
100 105 110

Arg Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

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

His His His His His His
145 150

<210> 37

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500016

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser
100 105 110

Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 | |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| | | | |
| Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| | | | |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| | | | |
| Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile | | | |
| | 370 | 375 | 380 |

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
385 390 395 400

Arg Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly
405 410 415

Tyr Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
420 425 430

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
435 440 445

Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
450 455 460

<210> 38

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500018

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser
100 105 110

Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 165 170 175

 Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 180 185 190
 Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 195 200 205
 Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 225 230 235 240

 Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 245 250 255
 Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 275 280 285
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 290 295 300

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 325 330 335
 Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
 340 345 350
 Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Arg Ser

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| Gly | Gly | Arg | Thr | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile |
| 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Val | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Ala | Asp | Arg | Arg | Val |
| 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | |
| Tyr | Ser | Thr | Leu | Pro | Pro | Thr | Thr | Ser | Arg | Tyr | Asn | Tyr | Trp | Gly | Gln |
| 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | |

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
435 440 445
Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
450 455 460

<210> 39

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> VHH construct F013500021

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 85 | 90 | 95 | |
| Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala | | | |
| 325 | 330 | 335 | |

Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln

340 345 350

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser

355 360 365

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

370 375 380

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

385 390 395 400

Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Pro Arg Gly Tyr

405 410 415

Gly Val Ala Tyr Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

420 425 430

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

435 440 445

Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

450 455 460

<210> 40

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500026

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

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

50 55 60

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Val | Tyr |
| 65 | | | | 70 | | | | 75 | | | | 80 | | | |
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| 85 | | | | 90 | | | | 95 | | | | | | | |
| Ala | Ala | Asp | Thr | Arg | Thr | Val | Ala | Leu | Leu | Gln | Tyr | Arg | Tyr | Asp | Tyr |
| 100 | | | | 105 | | | | 110 | | | | | | | |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 115 | | | | 120 | | | | 125 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
| 130 | | | | 135 | | | | 140 | | | | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val |
| 145 | | | | 150 | | | | 155 | | | | 160 | | | |
| Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Asn | Ser | Leu |
| 165 | | | | 170 | | | | 175 | | | | | | | |
| Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Phe | Gly | Met |
| 180 | | | | 185 | | | | 190 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | Ser | Ser |
| 195 | | | | 200 | | | | 205 | | | | | | | |
| Ile | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Asp | Thr | Leu | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly |
| 210 | | | | 215 | | | | 220 | | | | | | | |
| Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Thr | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln |
| 225 | | | | 230 | | | | 235 | | | | 240 | | | |
| Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Thr | Ile |
| 245 | | | | 250 | | | | 255 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Gly | Ser | Leu | Ser | Arg | Ser | Ser | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser |
| 260 | | | | 265 | | | | 270 | | | | | | | |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 275 | | | | 280 | | | | 285 | | | | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
| 290 | | | | 295 | | | | 300 | | | | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val |

305 310 315 320

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr

325 330 335

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

340 345 350

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr

355 360 365

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

370 375 380

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Gly Thr Ala

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Ala Tyr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

420 425 430

Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly

435 440 445

Ala Ala His His His His His His

450 455

<210> 41

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> VHH construct F013500030

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

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

 100 105 110
 Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

 165 170 175
 Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 180 185 190
 Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 195 200 205
 Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser
 210 215 220
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu

 225 230 235 240
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 245 250 255
 Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val
 260 265 270
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

325 330 335

Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro

340 345 350

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Arg

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Ser Pro Asn Ser Ser Ser Arg Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

420 425 430

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

435 440 445

Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

450 455 460

<210> 42

<211> 460

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500032

<400> 42

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

1 5 10 15

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

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

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
 180 185 190
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 195 200 205

 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 245 250 255
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | |
| Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | |
| 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | |
| 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Gly | |
| 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr | Ala | Met | Gly | Trp | Phe | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | |
| 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | |
| Glu | Arg | Glu | Phe | Val | Ala | Ala | Ile | Arg | Arg | Ser | Gly | Arg | Arg | Thr | Tyr | |
| 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | |
| Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | |
| 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| Lys | Asn | Thr | Val | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Ala | Ala | Arg | Arg | Val | Arg | Ser | Ser | Thr | Arg | |
| 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | | | | |
| Tyr | Asn | Thr | Gly | Thr | Trp | Trp | Trp | Glu | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | |
| 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | | |
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Ala | Ala | Glu | Gln | Lys | Leu | Ile | Ser | Glu | Glu | |
| 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | | |
| Asp | Leu | Asn | Gly | Ala | Ala | His | His | His | His | His | | | | | | |
| 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |
| <210> 43 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <211 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| > 462 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <223> VHH construct F013500033 | | | | | | | | | | | | | | | | |

<400> 43

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Arg Arg Val Tyr Ser Thr Leu Pro Pro Thr Thr Ser Arg
100 105 110

Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

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

180 185 190

Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
195 200 205

Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser
210 215 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu
225 230 235 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

245 250 255

Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val

260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

275 280 285

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

325 330 335

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro

340 345 350

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu

385 390 395 400

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser

405 410 415

Thr Arg Tyr Asn Thr Gly Thr Trp Trp Trp Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

420 425 430

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser

435 440 445

Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

450 455 460

<210> 44

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500039

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Trp Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Gly Arg Thr Tyr Tyr Glu Leu Tyr

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 | |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| | | | |
| Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Arg Thr Phe Ser Thr Tyr Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| | | | |
| Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| | | | |
| Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Ala Ala His His His His His His | | | |
| | 450 | 455 | |

<210> 45

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VHH construct F013500046

<400> 45

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45
Ala Ala Ile Asn Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Ala Asp Arg Arg Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser

100 105 110
Ser Asn Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

145 150 155 160
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

165 170 175
Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

180 185 190

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

195 200 205

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala

245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly

260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

325 330 335

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg

340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser

355 360 365

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

370 375 380

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

385 390 395 400

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Pro Ile Pro

405 410 415

Tyr Gly Ser Leu Leu Arg Arg Arg Asn Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln

420 425 430

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile

435 440 445
 Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 450 455 460
 <210> 46
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VHH construct F013500047
 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Arg Arg Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Thr Arg Thr Val Ala Leu Leu Gln Tyr Arg Tyr Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu

| | | |
|---|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
| Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln | | |
| 225 | 230 | 235 |
| | | 240 |
| Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Pro Ile Pro Tyr Gly Ser Leu Leu Arg | | |
| 405 | 410 | 415 |

Arg Arg Asn Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
420 425 430

Ser Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
435 440 445

Gly Ala Ala His His His His His His
450 455

<210> 47
<211> 462
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> VHH construct F013500053
<400> 47

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

195 200 205

Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser

210 215 220

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu

225 230 235 240

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

245 250 255

Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val

260 265 270

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

275 280 285

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

325 330 335

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro

340 345 350

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Arg Arg Ser Gly Arg Arg

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu

385 390 395 400
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Arg Arg Val Arg Ser Ser

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