



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0003178
(43) 공개일자 2023년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7041823
(22) 출원일자(국제) 2021년04월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년11월28일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/089837
(87) 국제공개번호 WO 2021/218895
국제공개일자 2021년11월04일
(30) 우선권주장
202010359751.8 2020년04월29일 중국(CN)

(71) 출원인
치아타이 티안펑 파마수티컬 그룹 주식회사
중국 지양수 프로빈스 222062 헨원강 시티 위저우
사우스 로드 넘버 369
(72) 발명자
자오, 웨이
중국 지양수 프로빈스 222062 헨원강 시티 위저우
사우스 로드 넘버 369
리, 잉춘
중국 지양수 프로빈스 222062 헨원강 시티 위저우
사우스 로드 넘버 369
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

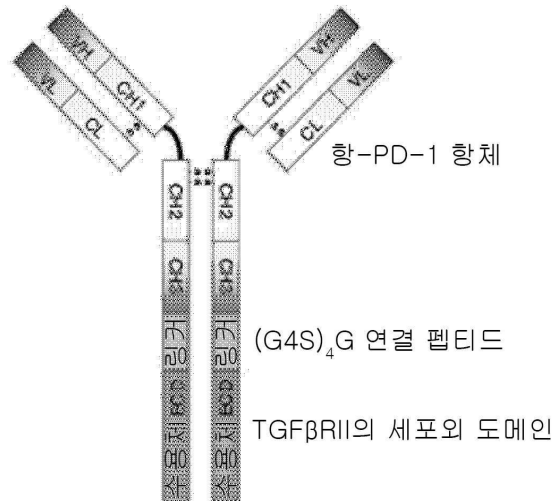
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 PD-1 및 TGF- β 에 대한 이중 기능성 단백질

(57) 요약

본 발명은 PD-1(프로그램화된 사멸 수용체-1) 및 TGF- β (전환성장인자- β)에 결합할 수 있는 이중 기능성 단백질, 및 상기 이중 기능성 단백질의 의학적 용도 및 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/22 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)

(72) 발명자

엘브이, 하일리

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

지, 란샹

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

장, 주언

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

킨, 유

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

장, 시취엔

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

첸, 양주

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

엘브이, 펑

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

리, 티안티안

중국 지양수 프로빈스 222062 렌원강 시티 위저우
 사우스 로드 넘버 369

명세서

청구범위

청구항 1

이중 기능성 단백질로서,

PD-1(프로그래밍된 사멸 수용체-1) 결합 모이어티와 TGF- β (전환성장인자- β) 결합 모이어티를 포함하는 이중 기능성 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PD-1 결합 모이어티는 전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)과 같은 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편인 이중 기능성 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 GFAFSSYD(SEQ ID NO: 1)인 HCDR1, 아미노산 서열이 ISGGGRYT(SEQ ID NO: 2)인 HCDR2 및 아미노산 서열이 ANRYGEAWFAY(SEQ ID NO: 3)인 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 QDINTY(SEQ ID NO: 4)인 LCDR1, 아미노산 서열이 RAN(SEQ ID NO: 5)인 LCDR2 및 아미노산 서열이 LQYDEFPLT(SEQ ID NO: 6)인 LCDR3을 포함하는 이중 기능성 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 7로 표시되고, 및/또는 상기 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 8로 표시되는 이중 기능성 단백질.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 더 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9로 표시되거나 SEQ ID NO: 9로 표시되는 아미노산 서열의 변이체이며, 예를 들어, C-말단 잔기 A가 K로 대체된 SEQ ID NO: 9로 표시되는 아미노산 서열이고, 및/또는 상기 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10으로 표시되거나 SEQ ID NO: 10으로 표시되는 아미노산 서열의 변이체인 이중 기능성 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 TGF- β 결합 모이어티는,

TGF- β 수용체 또는 TGF- β 수용체의 세포외 도메인 또는 세포외 도메인의 결합 단편과 같은 TGF- β 수용체의 결합 도메인이고, 또는

전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)과 같은 TGF- β 에 대한 항체 또는 항원 결합 단편인 이중 기능성 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 TGF- β 결합 모이어티는 SEQ ID NO: 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포의 도메인 폴리펩티드인 이중 기능성 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PD-1 결합 모이어티와 TGF- β 결합 모이어티는 플렉서블 링커, 예를 들어, SEQ ID NO: 12로 표시되는 링커와 같은 GGGGS형 링커를 통해 결합되는 이중 기능성 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중 기능성 단백질은,

(1) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 13으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제1 폴리펩티드; 및

(2) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제2 폴리펩티드를 포함하는 이중 기능성 단백질.

청구항 10

핵산 분자로서,

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 11

약학적 조성물로서,

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중 기능성 단백질, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

악성 종양의 예방 또는 치료에 사용되되, 상기 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 융기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택되고; 또한 선택적으로, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성인 약학적 조성물.

청구항 13

악성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 약물의 제조에서 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제10항에 따른 핵산 분자의 용도로서,

상기 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 융기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택되고; 또한 선택적으로, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성인 이중 기능성 단백질 또는 핵산 분자의 용도.

청구항 14

악성 종양의 예방 또는 치료 방법으로서,

악성 종양에 걸린 개체에게 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제11항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택되고; 또한 선택적으로, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성인 악성 종양의 예방 또는 치료 방법.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제11항에 따른 약학적 조성물의 제조 방법으로서,

상기 방법은,

상기 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 단백질 발현이 허용되는 조건하에서, 상기 숙주 세포를 배양하는 단계;

세포 배양물 및/또는 상층액을 수집하고, 상기 이중 기능성 단백질을 분리 및 정제하는 단계; 및

선택적으로, 분리 및 정제된 이중 기능성 단백질을 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어와 조제하는 단계를 포함하는 이중 기능성 단백질 또는 약학적 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 발명은 2020년 4월 29일에 제출된 출원번호가 202010359751.8인 중국특허출원의 우선권을 주장하는 바, 그 모든 내용은 참조로서 본 발명에 인용된다.

[0003] 본 발명은 대체적으로 항체 약물 분야, 특히 악성 종양의 치료에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 PD-1(프로그램화된 사멸 수용체-1) 및 TGF- β (전환성장인자- β)에 결합할 수 있는 이중 기능성 단백질, 및 상기 이중 기능성 단백질의 의학적 용도를 제공한다.

배경 기술

[0004] T세포는 많은 중요한 막 단백질 면역 분자를 발현하며, 여기서 PD-1(Programmed Death-1, 프로그램화된 사멸 수용체-1, CD279라고도함) 단백질은 면역글로불린 슈퍼패밀리의 CD28 패밀리에 속하며, 이의 리간드(PD-L1, PD-L2)는 B7 패밀리에 속한다. PD-L1은 PD-1에 결합한 후 T세포 면역 기능을 음성적으로 조절하며, 이는 중요한 말초 T세포 억제성 면역 체크 포인트이다. 정상적인 인체 조직에서 PD-L1의 낮은 발현은, 면역 관용을 유지하고 자가 면역 반응을 피한다. 그러나 종양 세포는 PD-L1의 높은 발현(또는 PD-L1 가용성 변이체, 엑소좀 방출)을 통해 T세포 면역 기능을 억제하여, 면역 억제형 종양 면역 미세 환경을 형성한다. PD-1/PD-L1 신호 전달 경로를 차단함으로써, T세포 면역 기능을 회복하고, 종양 세포를 식별하고 죽일 수 있다.

[0005] TGF- β (transforming growth factor- β , 전환성장인자- β)는 다기능 생물학적 활성을 갖는 사이토카인의 일종으로 세포의 증식, 분화, 사멸, 부착, 침입 및 미세 환경을 조절하여 신체의 생리학적 과정을 조절할 수 있다. 전형적인 TGF- β 신호 전달 경로는 먼저 TGF- β 가 $\pm$ 형 TGF- β 수용체(TGF- β RII)에 결합한 후, I형 TGF- β 수용체(TGF- β RI)와 복합체를 형성하여 활성화하고, TGF- β RI 인산화는 R-Smad(Smad1, 2, 3, 5, 8) 구성원을 활성화하며, R-Smad는 다시 Co-Smad(Smad4)와 결합하여 복합체를 형성하여 세포핵으로 전달하여 표적 유전자의 전사를 조절한다.

[0006] 종양 미세 환경에서, TGF- β 의 높은 발현은 종종 침습, 전이, 면역 탈출, 치료 저항성 및 열악한 예후와 관련이 있다(David Charles J et al., TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT.[J]. Cell, 2016, 164(5)). 연구에 따르면, TGF- β 는 Treg 세포를 유도하고 이펙터 T세포를 억제하여 종양 미세 환경을 파괴하고, 종양의 진행을 가속화할 가능성이 있다(Shen Yanan et al., TGF- β regulates hepatocellular carcinoma progression by inducing Treg cell polarization.[J]. Cellular physiology and biochemistry, 2015, 35(4)). 또한 일부 학자

들은 TGF- β 신호 전달이 환자가 항-PD-(L)1 약물 내성을 갖는 원인이라고 생각하고 있다.

[0007] 현재, TGF- β 및 PD-1/PD-L1을 복합 표적으로 하는 연구에 대한 보고가 있지만 이 연구 방향은 전망이 밝기 때문에 추가 연구가 시급하다.

발명의 내용

[0008] 제1 양태에서, 본 발명은 PD-1(프로그램화된 사멸 수용체-1) 결합 모이어티 및 TGF- β (전환성장인자- β) 결합 모이어티를 포함하는 이중 기능성 단백질을 제공한다.

[0009] 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티는 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티는 PD-1에 대한 전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다.

[0010] 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 GFAFSSYD(SEQ ID NO: 1)인 HCDR1, 아미노산 서열이 ISGGGRTY(SEQ ID NO: 2)인 HCDR2 및 아미노산 서열이 ANRYGEAWFAY(SEQ ID NO: 3)인 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 QDINTY(SEQ ID NO: 4)인 LCDR1, 아미노산 서열이 RAN(SEQ ID NO: 5)인 LCDR2 및 아미노산 서열이 LQYDEFPLT(SEQ ID NO: 6)인 LCDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 7로 표시되고, 및/또는 상기 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8로 표시된다. 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 더 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9로 표시되거나 SEQ ID NO: 9로 표시되는 아미노산 서열의 변이체이며, 예를 들어, C-말단 잔기 A가 K로 대체된 SEQ ID NO: 9로 표시되는 아미노산 서열이고, 및/또는 상기 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10으로 표시되거나 SEQ ID NO: 10으로 표시되는 아미노산 서열의 변이체이다.

[0011] 다른 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 니볼루맵(Nivolumab), 펌브로리주맵(Pembrolizumab), 더발루맵(Durvalumab), 토리팔리맵(JS-001), 신틸리맵(ABI308), 캄렐리주맵(Camrelizumab), 티스렐리주맵(BGB-A317), AK105(Akeso Bioscience), 게놀림주맵(GB226), 리주맵(LZM009), HLX-10, BAT-1306, AK103(HX008), AK104(Akeso Bioscience), CS1003, SCT-I10A, F520, SG001, GLS-010, 또는 상기 항체의 항원 결합 단편으로부터 선택된다.

[0012] 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 수용체 또는 TGF- β 수용체의 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 수용체의 세포외 도메인 또는 세포외 도메인의 결합 단편이다. 일부 구체적인 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 SEQ ID NO: 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드이다. 일부 구체적인 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 SEQ ID NO: 11로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 폴리펩티드 또는 펩티드 단편, 또는 본 명세서에 설명된 임의의 단편과 같은 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드의 변이체이다.

[0013] 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 항-TGF- β 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 에 대한 전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다.

[0014] 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티와 TGF- β 결합 모이어티는 플렉서블 링커를 통해 결합된다. 일부 실시형태에서, 상기 플렉서블 링커는 GGS형 링커이다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 플렉서블 링커는 SEQ ID NO: 12로 표시되는 링커이다.

[0015] 일부 실시형태에서, 이중 기능성 단백질은, (1) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 13으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제1 폴리펩티드; 및 (2) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제2 폴리펩티드를 포함한다.

[0016] 제2 양태에서, 본 발명은 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

[0017] 제3 양태에서, 본 발명은 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 상기 약학적 조성물은 악성 종양의 예방 또는 치료에 사용된다. 일부 구체적인 실시형태에

서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.

[0019] 제4 양태에서, 본 발명은 악성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 약물의 제조에서 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제2 양태에 따른 핵산 분자의 용도를 제공한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.

[0021] 제5 양태에서, 본 발명은 악성 종양에 걸린 개체에게 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제3 양태에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 악성 종양의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0022] 일부 실시형태에서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.

[0023] 제6 양태에서, 본 발명은 이중 기능성 단백질의 제조 방법을 제공하며, 상기 이중 기능성 단백질은 PD-1(프로그래밍된 사멸 수용체-1) 결합 모이어티 및 TGF- β (전환성장인자- β) 결합 모이어티를 포함하고, 또한 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질을 포함하며, 상기 방법은,

[0024] 상기 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 단백질 발현이 허용되는 조건하에서, 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0025] 세포 배양물 및/또는 상층액을 수집하고, 상기 이중 기능성 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 구조 모식도를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 PD-1 말단의 생물학적 활성을 리포터 유전자법으로 검출한 결과를 나타내며, 여기서 니볼루맙(Nivolumab)을 대조 샘플로 사용한다.

도 3은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 TGF β 결합 활성을 효소 결합 면역 흡착 측정법으로 검출한 결과를 나타낸다.

서열의 설명

SEQ ID NO: 1-3은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 항-PD-1 항체 부분의 중쇄 가변 영역의 CDR1-CDR3의 서열이다.

SEQ ID NO: 4-6은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 항-PD-1 항체 부분의 경쇄 가변 영역의 CDR1-CDR3의 서열이다.

SEQ ID NO: 7 및 8은 각각 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 항-PD-1 항체 부분의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열이다.

SEQ ID NO: 9 및 10은 각각 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 항-PD-1 항체 부분의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역의 서열이다.

SEQ ID NO: 11은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 TGF- β 결합 모이어티, 즉, 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포의 도메인 폴리펩티드이다.

SEQ ID NO: 12는 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 항-PD-1 항체 부분과 TGF- β 결합 모이

어터 간의 플렉서블 링커이다.

SEQ ID NO: 13은 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 중쇄 부분 서열이고, 중쇄 부분은 항-PD-1 항체 부분의 중쇄, 플렉서블 링커(SEQ ID NO: 12) 및 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포의 도메인 폴리펩티드(SEQ ID NO: 11)로 구성된다.

SEQ ID NO: 14는 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질의 경쇄 부분 서열이고, 경쇄 부분은 항-PD-1 항체 부분의 경쇄로 구성된다.

SEQ ID NO: 15는 SEQ ID NO: 13의 암호화 핵산 서열(신호펩티드를 포함하지 않는 암호화 서열)이다.

SEQ ID NO: 16은 SEQ ID NO: 14의 암호화 핵산 서열(신호펩티드를 포함하지 않는 암호화 서열)이다.

SEQ ID NO: 17 및 18은 각각 대조군 PD1 단일 항체 니볼루맵(Nivolumab)의 중쇄 및 경쇄의 서열이다.

SEQ ID NO: 19 및 14는 각각 다른 대조군 PD1 단일 항체(출원번호가 201610705763.5인 중국특허출원(CN106977602))의 중쇄 및 경쇄의 서열이다.

SEQ ID NO: 20 및 18은 이중 기능성 단백질 대조군인 니볼루맵/TGF- β RII 이중 기능성 단백질의 중쇄 부분 서열 및 경쇄 부분 서열로서, 중쇄 부분은 니볼루맵의 중쇄(SEQ ID NO: 17의 C-말단 아미노산 잔기는 K에서 A로 돌연변이됨), 플렉서블 링커(SEQ ID NO: 12) 및 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포의 도메인 폴리펩티드(SEQ ID NO: 11)로 구성되며, 경쇄 부분은 니볼루맵의 경쇄로 구성된다.

SEQ ID NO: 21 및 22는 실험 대조군 IgG1 단백질의 중쇄 및 경쇄의 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 정의

[0028] 본 발명을 더욱 잘 정의하고 본 발명의 실천 속에서 본 기술 분야의 통상의 기술자들을 지도하기 위해 아래의 정의와 방법을 제공한다. 다르게 명시되지 않은 한, 본 발명에서 사용된 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서에서 인용되는 특허문헌, 학술논문 및 다른 공개 간행물의 모든 내용은 전체적으로 참조로서 본 명세서에 인용된다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 면역글로불린 분자의 가변 영역에 위치한 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 의미한다. 표적은 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 "항체"는 완전한(즉, 전체 길이의) 항체뿐만 아니라, 항원 결합 단편(예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 이의 변이체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중 항체, 선형 항체, 단일 사슬 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체) 및 필요한 특이성 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 면역글로불린 분자의 수정 배치를 포함하며, 항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체 및 공유 변형된 항체를 포함한다.

[0030] 일반적으로, 완전 또는 전체 길이의 항체는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역(CH1, CH2 및 CH3)을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 불변 영역(CL)을 포함한다. 전체 길이의 항체는 IgD, IgE, IgG, IgA 또는 IgM(또는 이들의 서브클래스)과 같은 임의의 종류의 항체일 수 있으나, 항체는 어떠한 특정 유형에 속할 필요는 없다. 중쇄의 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린을 다른 유형으로 지정할 수 있다. 일반적으로, 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 다섯 가지 주요 유형이 있으며, 이러한 유형 중 몇 가지는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2와 같은 서브클래스(동형)로 더 구분될 수 있다. 상이한 면역글로불린 유형에 대응하는 중쇄 불변 영역을 각각 a, d, e, g, 및 m라고 한다. 상이한 유형의 면역글로불린의 서브유닛 구조와 3차원 구조는 공지되어 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원 결합 단편"은 항체 구조에서 항원 결합 능력을 결정하는 부분을 의미한다. 당업자는 항체 구조에서 항원 결합 능력을 결정하는 부분이 CDR이므로, CDR 또한 항원 결합 단편의 핵심 구성 부분임을 이해할 수 있다. 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL) 또는 상기 두 가지를 포함할 수 있다. VH 및 VL 각각은 일반적으로 세 개의 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0032] 당업자들에게 있어서, 상보성 결정 영역(CDR, 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3)이 가변 영역 중 항체의 친화력 및 특이성에 가장 큰 영향을 미치는 영역임은 자명한 것이다. VH 또는 VL의 CDR 서열은 두 가지 일반적인 정의

방식, 즉 코티아(Chothia) 정의 및 카바트(kabat) 정의가 있다. (예를 들어, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani 등, J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); 및 Martin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989) 참조). 주어진 항체의 가변 영역 서열에 있어서, Chothia 정의 또는 Kabat 정의에 따라 VH 및 VL 서열 중의 CDR 서열을 결정할 수 있다.

- [0033] 주어진 항체의 가변 영역 서열에 있어서, 가변 영역 서열의 CDR 서열은 온라인 소프트웨어 Abysis를 이용하여 결정(<http://www.abysis.org/>)하는 등 여러 가지 방식을 통해 분석할 수 있다.
- [0034] 항원 결합 단편의 구현에는, (1) VL-CL 사슬 및 VH-CH1 사슬을 갖는 1가 단편일 수 있는 Fab 단편; (2) 힌지 영역의 이황화다리(즉, Fab'의 이량체)로 연결된 두 개의 Fab' 단편을 갖는 2가 단편일 수 있는 F(ab')₂ 단편; (3) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편; (4) 펩티드 링커를 통해 VH 도메인 및 VL 도메인으로 구성된 단일 폴리펩티드 사슬일 수 있는 단일 사슬 Fv(scFv); 및 (5) 펩티드 링커에 의해 연결된 두 개의 VH 도메인 및 이황화다리를 통해 두 개의 VH 도메인과 결합된 두 개의 VL 도메인을 포함할 수 있는 (scFv)₂를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "Fab 단편", "Fab 부분" 또는 유사한 용어는 완전한 항체를 파파인으로 처리한 후 생성된 항원에 결합할 수 있는 항체 단편을 의미하며 완전한 경쇄(VL-CL), 중쇄 가변 영역 및 CH1 단편(VH-CH1)을 포함한다.
- [0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "단일 사슬 항체(scFv, single chain fragment variable)"는 일반적으로 유전공학 기술을 이용하여 구축된 단일 사슬 구조의 항체를 의미하며, 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 하나의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 유연한 링커 펩티드(linker)는 일반적으로 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이에 설계되어 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 항원에 결합할 수 있는 올바른 형태로 접을 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 용어 "Fc 단편", "Fc 도메인", "Fc 부분" 또는 유사한 용어는 항체 중쇄 불변 영역의 일부분을 의미하고, 힌지 영역(hinge), 불변 영역의 CH2 단편 및 CH3 단편을 포함한다.
- [0038] 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 용어 "특이적 결합"은 항원 에피토프에 대한 항체의 결합과 같은 두 분자 사이의 비랜덤 결합 반응을 의미한다.
- [0039] 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 용어 "단클론 항체"는 기본적으로 균질한 항체 집단에서 획득한 항체를 의미하며, 즉, 소수의 개체에서 자연적으로 발생하는 돌연변이가 있을 수 있다는 점을 제외하고는 집단을 구성하는 각 항체가 동일하다. 본 명세서의 상기 단클론 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 중 또는 특정 항체 클래스 또는 서브 클래스에 속하는 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동이고, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분이 다른 중 또는 다른 항체 클래스 또는 서브 클래스에 속하는 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동인 "키메라" 항체를 포함하며, 원하는 생물학적 활성을 나타낼 수 있는 한 이러한 항체의 단편을 더 포함한다.
- [0040] 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 용어 "동일성"은 두 개의 폴리뉴클레오타이드 서열 사이 또는 두 개의 폴리펩티드 서열 사이의 서열 유사성을 의미한다. 두 서열 사이의 서열 비교 및 동일성 백분율 측정은 national center for biotechnology institute 웹 사이트에서 사용할 수 있는 BLASTN/BLASTP 알고리즘의 기본 설정으로 수행할 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 치료적 치료 및 예방적 치료 또는 예방적 조치가 포함되며, 피험자에게 치료제를 투여하여 상기 질병, 장애, 또는 병증(예를 들어, 암 또는 종양)의 적어도 하나의 증상 또는 증상의 발달을 완화시킨다.
- [0042] 본 명세서에서 사용된 용어 "EC₅₀"은 반수 유효 농도라고도 하며, 일정 노출 시간 후에 최대 효능의 50%를 달성하는 농도를 의미한다.
- [0043] 제1 양태에서, 본 발명은 PD-1(프로그램화된 사멸 수용체-1) 결합 모이어티 및 TGF-β(전환성장인자-β) 결합 모이어티를 포함하는 이중 기능성 단백질을 제공한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티는 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티는 PD-1에 대한 전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다.

- [0045] 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 GFAFSSYD(SEQ ID NO: 1)인 HCDR1, 아미노산 서열이 ISGGGRYT(SEQ ID NO: 2)인 HCDR2 및 아미노산 서열이 ANRYGEAWFAY(SEQ ID NO: 3)인 HCDR3을 포함하며, 상기 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 QDINTY(SEQ ID NO: 4)인 LCDR1, 아미노산 서열이 RAN(SEQ ID NO: 5)인 LCDR2 및 아미노산 서열이 LQYDEFPLT(SEQ ID NO: 6)인 LCDR3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 7로 표시되고, 및/또는 상기 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 8로 표시된다. 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 더 포함하고, 상기 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9로 표시되고, 및/또는 상기 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10으로 표시된다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 9인 변이체, 및/또는 상기 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 10인 변이체이다. 일부 구체적인 실시형태에서, 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 C-말단 잔기 A가 K로 대체된 SEQ ID NO: 9로 표시되는 아미노산 서열이다. 항체 불변 영역에 대한 조작은 당업자에게 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 중쇄 불변 영역은 IgG1가 바람직하지만 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 또는 다른 클래스를 선택할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 불변 영역은 아미노산의 삽입, 결실, 치환 또는 화학적 변형과 같은 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 불변 영역의 임의의 아미노산 잔기는 임의의 동종 이형(allotype)의 아미노산 잔기로 치환될 수 있으며, 바람직하게는, G1m(3) 및/또는 nG1m(1)의 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 불변 영역은 항체 중쇄 불변 영역 C-말단의 라이신 잔기(K) (일반적으로 야생형 IgG1형 항체에서 볼 수 있음)를 알라닌(A) 또는 류신(L)과 같은 소수성 아미노산으로 돌연변이시켜, 프로테아제의 가수분해 절단을 줄이고, 혈청 반감기를 증가시키는 등 이펙터 기능을 변경하는 돌연변이를 포함하고, 이러한 조작은 특히 항체 중쇄 C-말단이 다른 부분에 추가로 융합되는 경우에도 사용할 수 있다. 본 발명의 예시적인 PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질에서 항-PD-1 항체 부분의 중쇄 불변 영역의 C-말단 잔기가 이에 따라 처리된다.
- [0047] 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 수용체 또는 TGF- β 수용체의 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 수용체의 세포외 도메인 또는 세포외 도메인의 결합 단편이다. 일부 구체적인 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 SEQ ID NO: 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드이다. 일부 구체적인 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 SEQ ID NO: 11로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 폴리펩티드 또는 펩티드 단편과 같은 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드의 변이체, 또는 본 명세서에 설명된 임의의 단편이다.
- [0048] 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 항-TGF- β 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, TGF- β 결합 모이어티는 TGF- β 에 대한 전체 길이 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다.
- [0049] 일부 실시형태에서, PD-1 결합 모이어티와 TGF- β 결합 모이어티는 플렉서블 링커를 통해 결합된다. 일부 실시형태에서, 상기 플렉서블 링커는 GGGs형 링커이다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 플렉서블 링커는 SEQ ID NO: 12로 표시되는 링커이다.
- [0050] 일부 실시형태에서, 상기 이중 기능성 단백질은, (1) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 13으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제1 폴리펩티드; 및 (2) 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 14로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)의 동일성을 갖는 두 개의 완전히 동일한 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0051] 비제한적 구현예로서, 본 발명의 이중 기능성 단백질(즉, PD-1/TGF β 이중 기능성 단백질, 이하 "PD1/TGF β RII 융합 단백질" 또는 "PD1/TGF β RII"라고도 함)은 항-PD-1 항체(이의 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역, 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10으로 표시됨), 플렉서블 링커(SEQ ID NO: 12) 및 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드(SEQ ID NO: 11)로 구성될 수 있고, 이의 분자 구조 모식도는 도 1을 참조할 수 있다. 도 1에 도시된 바와 같이, PD1/TGF β RII는 천연 항-PD-1 항체를 기반으로 하며, 중쇄 불변 영역의 CH3 말단에서 플렉서블 링커 및 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포외 도메인 폴리펩티드를 순차적으로 연장한다.

- [0052] PD1/TGFβRII는 본 발명의 예시적 이중 기능성 단백질로, 보고된 니볼루맵/TGF-βRII 융합 단백질에 비해 더 높은 TGFβ 결합 활성 및 PD-1 말단 생물학적 활성, 및 더 나은 종양 억제 효과를 갖는다. 이 밖에, 기존의 PD-1 항체(예를 들어, 니볼루맵(Nivolumab))에 비해 더 낮은 세포 독성 및 부작용을 갖는다. 기존의 PD-1 항체의 세포 독성 및 부작용이 더 크다는 점을 감안할 때, 더 낮은 세포 독성 및 부작용을 갖는 PD1/TGFβRII는 더 높은 용량을 투여하여 TGFβ를 더 잘 억제하고 소모할 수 있으며 용량 안전창이 더 이상적이며 고용량 투여 및 임상 적용을 용이하게 한다.
- [0053] 제2 양태에서, 본 발명은 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0054] 제3 양태에서, 본 발명은 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 캐리어를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 상기 약학적 조성물은 악성 종양을 예방 또는 치료한다. 일부 구체적인 실시형태에서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.
- [0056] 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 활석 분말, 스테아린산 마그네슘 및 미네랄 오일과 같은 윤활제; 습윤제; 유화제; 현탁제; 벤조산, 소르브산 및 프로피온산 칼슘과 같은 방부제; 감미제 및/또는 향미제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0057] 일부 실시형태에서, 본 발명의 약학적 조성물을 정제, 환제, 분말, 파스틸, 엘릭시르, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 좌제 또는 캡슐 등 형태로 조제할 수 있다.
- [0058] 일부 실시형태에서, 생리학적으로 허용 가능한 임의의 투여 방식을 이용하여 본 발명의 약학적 조성물을 전달할 수 있으며, 이러한 투여 방식은 경구 투여, 장관외 투여, 비강 투여, 직장 투여, 복강내 투여, 혈관내 투여, 피하 투여, 경피 투여, 흡입 투여 등을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 일부 실시형태에서, 원하는 순도를 가진 시약과 경우에 따라 약학적으로 허용 가능한 캐리어, 부형제 등을 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 치료용 약학적 조성물을 조제하여 보관할 수 있다.
- [0060] 제4 양태에서, 본 발명은 악성 종양을 예방 또는 치료하기 위한 약물의 제조에서 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제2 양태에 따른 핵산 분자의 용도를 제공한다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.
- [0062] 제5 양태에서, 본 발명은 악성 종양에 걸린 개체에게 제1 양태에 따른 이중 기능성 단백질 또는 제3 양태에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 악성 종양의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 악성 종양은 결직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경계 내분비 악성 종양, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흑색종, 기저세포 피부암, 편평세포 피부암, 용기성피부섬유육종, 메르켈세포암, 교모세포종, 교모종, 육종, 간피종 및/또는 골수이형성증후군으로부터 선택된다. 일부 구체적인 실시형태에서, 상기 악성 종양은 원발성, 전이성, 재발성, 및/또는 난치성이다.
- [0064] 제6 양태에서, 본 발명은 이중 기능성 단백질의 제조 방법을 제공하며, 상기 이중 기능성 단백질은 PD-1(프로그래밍된 사멸 수용체-1) 결합 모이어티 및 TGF-β(전환성장인자-β) 결합 모이어티를 포함하고, 상기 방법은,
- [0065] 상기 이중 기능성 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하고, 단백질 발현이 허용되는 조건하에서, 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [0066] 세포 배양물 및/또는 상층액을 수집하고, 상기 이중 기능성 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함한다.

- [0067] 모순되지 않는 한, 제1 양태에 따른 실시형태 및 기술적 특징은 제6 양태에도 적용된다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 상기 숙주 세포는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포이다.
- [0069] 일부 실시형태에서, 세포 배양물의 원심분리 후 상층액을 수집한다.
- [0070] 일부 실시형태에서, 이중 기능성 단백질의 정제는 친화성 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 중 하나 이상을 사용하여 수행한다. 친화성 크로마토그래피의 일부 실시형태에서, 용리액은 자당 또는 글리세롤을 포함한다. 본 발명의 발명자는 자당 또는 글리세롤을 첨가한 용리액은 융합 단백질의 분해를 줄이는 데 도움이 된다는 것을 발견했다.
- [0071] 아래 실시예는 단지 본 발명의 범위를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다.
- [0072] 실시예
- [0073] 실시예 1: PD1/TGF β RII 융합 단백질의 발현
- [0074] 본 실시예는 본 발명의 PD1/TGF β RII 융합 단백질을 구축하였으며, 구조 모식도는 도 1에 도시된 바와 같다. 신호펩티드가 융합된 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 중쇄 부분(SEQ ID NO: 13) 및 경쇄 부분(SEQ ID NO: 14)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 합성하여 pcDNA3.1 발현 벡터에 클로닝하였다. 일시적 또는 안정적인 형질감염의 표준 프로토콜을 사용하여 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 발현 벡터를 CHO 세포로 공동 형질감염시키고, 형질감염된 세포를 CO₂가 8%인 37℃의 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0075] 인간 TGF- β RII 동종형 B 세포의 도메인 폴리펩티드(SEQ ID NO: 11)는 하기 SEQ ID NO: 13에 포함된다.
- [0076] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
- [0077] 링커의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 12)은 하기 SEQ ID NO: 13에 포함된다.
- [0078] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
- [0079] PD1/TGF β RII 융합 단백질 중쇄의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 13)은 다음과 같다.
- [0080] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSVDMRWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGSGGGSGGGSGGGSGGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQ KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
- [0081] PD1/TGF β RII 융합 단백질 경쇄의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 14)은 다음과 같다.
- [0082] DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFGQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGT KLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
- [0083] 실시예 2: PD1/TGF β RII 융합 단백질의 정제
- [0084] 실시예 1에서 획득한 세포 배양액을 원심분리하여 상층액을 수집하고, Protein A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 제1 단계 정제를 수행하였다. 평형 버퍼는 10 mmol/L 인산염 버퍼이고, pH 6.0이다. 평형 버퍼로 크로마토그래피 컬럼을 3~5 컬럼 부피로 세척한 후, 세포 상층액을 로딩하였다. 로딩 종료 후, 평형 버퍼로 크로마토그래피 컬럼을 세척하였다. 다음 행균 버퍼(0.5 mol/L 염화나트륨+25 mmol/L 인산염 버퍼, pH 7.0)로 행균 후, 다시 평형 버퍼를 사용하여 3~5 컬럼 부피로 평형시켰다. 마지막으로 용리 버퍼(20 mmol/L 구연산염 버퍼 + 5% 자당, pH 3.6)로 크로마토그래피 컬럼을 세척하고, 용리 샘플을 수집하며, 샘플을 2M Tris-염산 버퍼(pH 9.5)로 중화시켰다.
- [0085] 상기 중화된 용리 샘플(pH 6.0)을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하며, 평형 버퍼는 10 mmol/L 구연산염 버퍼 + 10 mmol/L 인산염 버퍼 + 10 mmol/L Tris, pH 6.0이다. 평형 버퍼로 크로마토그래피 컬럼을 3~5 컬럼 부피로 세척한 다음, 상기 중화된 용리 샘플을 로딩하고, 유동 샘플을 수집하며, 로딩 종료 후 평형 버퍼로 크로마토그래피 컬럼을 세척하였다.

- [0086] 상기 음이온 교환 크로마토그래피의 유동 샘플을 양이온 교환 크로마토그래피에 적용하였다. 평형 버퍼는 10 mmol/L 구연산 + 10 mmol/L 인산이수소나트륨 + 10 mmol/L Tris 버퍼, pH 5.0이다. 상기 음이온 크로마토그래피의 유동 샘플을 pH 5.0으로 조정하고, 로딩이 완료된 후 평형액으로 크로마토그래피 컬럼을 3~5 컬럼 부피로 세척하였다. 다음 용리 버퍼(10 mmol/L 구연산염 + 10 mmol/L 인산염 + 10 mmol/L Tris 버퍼, pH 9.0)로 용리하고, 용리액을 수집하였다.
- [0087] 실시예3: 분자 배제 크로마토그래피에 의한 PD1/TGFβRII 융합 단백질 샘플의 검출
- [0088] 실시예 2에서 정제하여 획득한 PD1/TGFβRII 융합 단백질 샘플의 각 성분에 대해 겔 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 분리하였다. 중성 pH의 버퍼를 이동상으로 사용하여 용리하고, 각 분자량 성분은 분자량이 큰 것에서 작은 것으로의 순서로 순차적으로 용리하였다. 크로마토그래피 컬럼은 Thermo MabPac™ SEC-1 300 Å, 5 μm, 7.8*300 mm 스펙의 겔 크로마토그래피 컬럼이고, 이동상은 (20 mmol/L 인산수소이소나트륨 + 300 mmol/L 염화나트륨 + 2% 이소프로판올 용액, pH=7.4)이다. 이동상으로 샘플을 1 mg/mL로 희석하여 시액으로 하고, 시액 50 μL를 정밀하게 측정하여 액체 크로마토그래피에 주입하며, 280 nm 파장에서 검출하였다. 유속은 0.5 mL/min이고, 35분 동안 등용매 용리를 수행하였다.
- [0089] 면적 정규화 방법을 사용하여 결과에 대해 정량적으로 분석하였다. 고분자량 불순물, 면역글로불린 단량체 및 저분자량 불순물의 피크 면적 백분율을 각각 계산하였다. 검출 후, PD1/TGFβRII 융합 단백질 샘플의 고분자량 불순물의 피크 면적 백분율은 0.19%이고, 면역글로불린 단량체의 피크 면적 백분율은 99.81%이며, 저분자량 불순물은 검출되지 않았다.
- [0090] 이하 실시예에 사용된 대조 이중 기능성 단백질(니볼루맵/TGF-βRII 융합 단백질)은 동일한 절차에 따라 제조되고, 니볼루맵의 기존 중쇄 불변 영역의 C-말단 아미노산 잔기는 K에서 A로 변경되며, 본 발명의 예시적인 PD1/TGFβRII 융합 단백질과 일치하다.
- [0091] 실시예4: 리포터 유전자법에 의한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성의 검출
- [0092] 검출 과정은, 로그대수기의 CHO-PDL1-CD3L 세포(중국식품의약품연구원에서 구입)를 취하여, DMED/F12완전 배지로 살아있는 세포 밀도를 5×10^5 세포/mL로 조정하고, 96웰 전체 화이트 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하여, 37℃, 5% CO₂를 포함한 세포 인큐베이터에서 16~20시간 동안 배양하였다. 다음날 Jurkat-PD-1-NFAT 세포(중국식품의약품연구원에서 구입) 현탁액을 제조하고, 2% FBS가 포함된 1640 기초 배지로 살아있는 세포 밀도를 2×10^6 세포/mL로 조정하였다. CHO-PDL1-CD3L 세포가 첨가된 96웰 전체 화이트 플레이트를 인큐베이터에서 꺼내, 상층액을 흡취하여 버리고, Jurkat-PD-1-NFAT 세포 현탁액을 50 μL/웰로 첨가한 후, PD-1 항체(니볼루맵, SEQ ID NO: 17 및 18은 각각 중쇄 및 경쇄의 서열임), 본 발명의 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조된 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 구매 희석액(초기 농도는 200000 ng/mL, 3배 구매 희석, 총 11개의 희석 구매)을 참조하여 상기 96웰 전체 화이트 플레이트에 50 μL/웰로 첨가하여, 37℃, 5% CO₂를 포함한 세포 인큐베이터에서 4~6시간 동안 배양하였다. 배양 동안, Bio-Lite 루시페라제 시약(Vazyme, DD1201-03)을 꺼내 실온에서 녹이고, 배양이 종료된 후, 상기 96웰 전체 화이트 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하고, 실온에서 광을 피하여 2~3분간 배양한 후, 다기능 마이크로플레이트 리더(Thermo, Varioskan Flash)를 이용하여 RLU 값을 판독하였다. Prism 소프트웨어를 이용하여 실험 데이터를 분석하고, 대조군 및 시험 샘플의 용량-반응 곡선을 그려 대조군 및 시험 샘플의 EC₅₀ 값을 획득하며, 시험 샘플의 생물학적 활성을 산출하였다.
- [0093] 시험 샘플 생물학적 활성(%)=(대조군 EC₅₀ 값/시험 샘플 EC₅₀ 값)×100%
- [0094] 본 발명의 실시예의 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성 결과는 표 1 및 도 2에 도시된 바와 같고, 결과는 인간 PD-1의 결합 능력을 유지한다는 것을 나타낸다.

표 1

[0095] PD1/TGFβRII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성

샘플	EC ₅₀ 값(ng/mL)	생물학적 활성
니볼루맵	113.7	100%
PD1/TGFβRII	157.8	72%

- [0096] 실시예5: 효소 결합 면역 흡착 측정법에 의한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 TGFβ 결합 활성의 검출
- [0097] 검출 과정은 다음과 같다.
- [0098] 1) 2 μg/mL의 인간 TGFβ1 단백질(Sinobiological, 10804-H08H)을 항원으로 하여, 고흡착 96웰 플레이트에 100 μL/웰로 코팅하고, 2~8℃에서 밤새 배양하였다.
- [0099] 2) 250 μL/웰 PBST20(0.05% Tween 20을 포함한 PBS 용액)으로 96웰 플레이트를 3회 세척하고, 다음 250 μL/웰 차단액(3% BSA를 포함한 PBS 용액)을 첨가하여, 25℃에서 2시간 동안 배양하였다.
- [0100] 3) 250 μL/웰 PBST20으로 96웰 플레이트를 3회 세척하고, 다음 구배 희석한 본 발명의 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조된 PD1/TGFβRII 융합 단백질(초기 농도 4000 ng/mL, 4배 구배 희석, 총 7개의 희석도)을 100 μL/웰로 첨가하여, 25℃에서 2시간 동안 배양하였다.
- [0101] 6) 250 μL/웰 PBST20으로 96웰 플레이트를 3회 세척하고, 다음 각 웰에 희석액으로 1:3500으로 희석한 HRP-양항 인간 IgG 항체(PE, NEF802001EA) 100 μL를 첨가하여, 25℃에서 1시간 동안 배양하였다.
- [0102] 7) 250 μL/웰 PBST20으로 96웰 플레이트를 5회 세척하고, 다음 TMB 용액을 100 μL/웰로 첨가하여, 암실에서 25℃에서 5분간 배양하였다.
- [0103] 10) 1 mol/L H₂SO₄를 100 μL/웰로 첨가하여 반응을 종결시키고, 실온에서 5분간 방치하였다. 또한 마이크로플레이트 리더(Thermo Scientific, Varioskan Flash)를 통해 450 nm/650 nm 파장에서의 OD 값을 검출하고, Graphpad Prism으로 데이터를 분석하였다.
- [0104] 시험 샘플 결합 활성(%)=(대조군 EC₅₀ 값/시험 샘플 EC₅₀ 값)×100%
- [0105] TGFβ1에 대한 본 발명의 실시예의 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 체외 결합 결과는 표 2 및 도 3에 도시된 바와 같고, ELISA 결과는 TGFβ에 대한 결합 활성을 유지하는 것으로 나타낸다.

표 2

[0106] PD1/TGFβRII 융합 단백질의 TGFβ 결합 활성

샘플	EC ₅₀ 값(pmol/L)
PD1/TGFβRII	397.6

- [0107] 실시예6: 대장암 세포 MC38/hPD-L1 마우스 피하 이식 종양에 대한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 치료 효과
- [0108] C57/PD-1 형질전환 마우스(장쑤젠파마텍(Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd)에서 구입)는 실험 마우스로서, 각 마우스에 3×10⁵ MC38/hPD-L1 세포를 피하 접종하고, 종양이 40~70 mm³ 까지 자라면 종양 부피에 따라 그룹화하고, 복강내 주사(ip) 약물을 2일에 1회씩 총 6회 투여하며, 주사 부피는 0.1 mL/10 g 체중이고, 투여 방안은 표 3과 같으며, 투여 당일을 D0으로 한다. 버니어 캘리퍼스로 주 2회 종양 직경을 측정하고, 아래 공식을 통해 획득한 T/C% 또는 종양 억제율 TGI(%)을 산출하여 약물이 종양 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 실험이 종료되거나 실험의 종점에 도달하거나 또는 종양의 부피가 1500 mm³에 도달하면 CO₂ 마취로 동물을 희생시킨 다음 해부하여 종양을 제거하고 사진을 찍었다.
- [0109] 종양 부피(V) 계산 공식은 $V=1/2 \times a \times b^2$ 이고, a, b는 각각 길이, 너비를 나타내며; $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0) \times 100$ 이고, T, C는 실험 종료시의 치료군 마우스, 음성대조군 마우스의 종양 부피를 나타내고, T₀, C₀는 실험 시작시의 치료군 마우스, 음성대조군 마우스의 종양 부피를 나타내며, 치료군 마우스, 음성대조군 마우스의 T/C 값에 따라 치료군, 음성대조군의 T/C 값을 각각 산출하고; 종양 억제율 (TGI)(%)=100-T/C(%)이다. 결과는 표 4에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조된 PD1/TGFβRII(3.7 mg/kg, IP, 매일 2회, 총 6회)의 D19에서 MC38/hPD-L1 마우스 피하 이식 종양에 대한 종양 억제율은 74%로, 대조군 PD-1 단일 항체보다 우수하며; 종양 보유 마우스는 약물에 잘 견딜 수 있고, 현저한 체중 감소 등의 증상이 나타나지 않았다.

표 3

투여 방안

그룹	투여량 (mg/kg)	투여 방식	투여 부피 (mL/kg)	투여 시간
hIgG4	3.7	복강 주사	10	D0, 2, 4, 6, 8, 10
대조군 PD-1 단일 항체	3	복강 주사	10	D0, 2, 4, 6, 8, 10
PD1/TGF β RII 융합 단백질	3.7	복강 주사	10	D0, 2, 4, 6, 8, 10

표 4

대장암 세포 MC38/hPD-L1 피하 이식 종양에 대한 PD1/TGF β RII의 치료 효과

그룹화	평균 종양 부피(mm ³)		%T/C	% TGI	실험 시작 시 각 군의 동물 수량	실험 종료 시 각 군의 동물 수량
	D0	D19	D19	D19		
hIgG4	55.1±0.8	2650.9±431.4	-	-	10	10
대조군 PD-1 단일 항체	53.1±0.9	1115.2±576.3	57	43	10	10
PD1/TGF β RII 융합 단백질	53.3±0.5	537.0±280.9	26	74	10	10

비고: hIgG4(Sino Biological Inc, HG4K)는 음성 대조군이다. 대조군 PD1 단일 항체는 출원번호가 201610705763.5 인 중국특허출원(CN106977602)의 항체 14C12H1L1이고, 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 본 발명의 SEQ ID NO: 19 및 14로 표시된다.

실시예7: PD1/TGF β RII 융합 단백질의 체외 활성 검출

실시예 1 내지 실시예 3의 방법을 참조하여 본 발명의 예시적인 PD1/TGF β RII 융합 단백질 및 니볼루맵/TGF- β RII 융합 단백질을 일괄적으로 제조하였다. 실시예 4의 리포터 유전자법을 참조하여 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성을 검출하고 비교한 결과, 본 발명의 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성은 니볼루맵/TGF- β RII 융합 단백질보다 우수한 것으로 나타났으며, 결과는 표 5에 도시된 바와 같다. 실시예 5의 효소 결합 면역 흡착 측정법을 참조하여 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 TGF β 결합 활성을 검출하고 비교한 결과, 본 발명의 PD1/TGF β RII 융합 단백질의 TGF β 결합 활성은 니볼루맵/TGF- β RII 융합 단백질보다 우수한 것으로 나타났으며, 결과는 표 6에 도시된 바와 같다. 본 실시예 및 아래 실시예에서 니볼루맵/TGF- β RII 융합 단백질은 내부에서 자체 제조한 것으로, SEQ ID NO: 20 및 18로 표시되는 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는다.

표 5

PD1/TGF β RII 융합 단백질의 PD-1 말단 생물학적 활성

샘플	EC ₅₀ 값(ng/mL)	생물학적 활성
PD1/TGF β RII	282.4	100%
니볼루맵/TGF- β RII	343.8	82%

표 6

PD1/TGF β RII 융합 단백질의 TGF β 결합 활성

샘플	EC ₅₀ 값(ng/mL)	결합 활성
니볼루맵/TGF- β RII	81.48	76%
PD1/TGF β RII	61.74	100%

[0117] 실시예8: MC38/hPD-L1 마우스 이식 종양에 대한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 치료 효과

[0118] 인간화된 PD-1 마우스(베이징바이오사이토텐(Biocytoen Beijing Co., Ltd)에서 구입)는 실험 마우스로서, 각 마우스의 오른쪽 겨드랑이에 4×10^5 MC38/hPD-L1 세포를 접종하고, 종양이 100~300 mm³까지 자라면 무작위로 3개 군으로 나누어, 복강내 주사(ip)를 통해 총 8회 투여하고, 투여 방안은 표 7을 참조하며, 투여한 당일을 D0으로 한다. 매주 2-3회 종양 부피를 측정하고, 마우스 체중을 기록하였다. 버니어 캘리퍼스로 종양 직경을 측정하고, 아래 공식을 통해 T/C(%) 또는 종양 부피 억제율(1-T/C)을 계산하여 약물이 종양 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 종료시, CO₂ 마취로 동물을 희생시킨 다음 해부하여 종양을 제거하고 사진을 찍었다.

[0119] 종양 부피(TV) 계산 공식은 $TV = 1/2 \times a \times b^2$ 이고, a, b는 각각 길이, 너비를 나타내며; 상대 종양 부피(RTV) 계산 공식은 $RTV = (TV_t)/(TV_0)$ 이고, TV₀는 D0일 때 마우스 종양 부피를 나타내며, TV_t는 매번 측정시 마우스 종양 부피를 나타내며; 상대 종양 이식률 T/C(%) 계산 공식은 $T/C(\%) = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ 이고, T_{RTV}는 치료군 RTV를 나타내며, C_{RTV}는 PBS군의 RTV를 나타낸다.

[0120] 결과는 표 8 및 표 9에 도시된 바와 같이, PD1/TGFβRII 및 니볼루맵/TGF-βRII(실시예 7에 나타난 바와 같이 일괄적으로 제조)은 D23에서 MC38/hPD-L1 이식 종양 마우스에 대한 종양 부피 억제율은 각각 46.8% 및 32.3%로, 본 발명의 PD1/TGFβRII의 종양 억제 효과가 니볼루맵/TGF-βRII보다 우수하다는 것을 설명한다. 이 밖에, PD1/TGFβRII군 및 니볼루맵/TGF-βRII군 마우스의 체중은 파동적으로 상승하여, 두 가지 융합 단백질 모두 뚜렷한 독성 반응을 일으키지 않는다는 것을 설명한다.

표 7

[0121] 투여 방안

그룹 별	그룹	투여 부피 (mL/kg)	투여 시간, 투여량	실험 시 작시 각 군의 동 물 수량	실험 종 료시 각 군의 동 물 수량
1	PBS	10	D0, 3, 7, 10(매회 투여량 4mg/kg) D11(매회 투여량 10mg/kg) D14, 17, 21(매회 투여량 20mg/kg)	8	8
2	니볼루맵/TGF-βRII	10	D0, 3, 7, 10(매회 투여량 4mg/kg) D11(매회 투여량 10mg/kg) D14, 17, 21(매회 투여량 20mg/kg)	8	8
3	PD1/TGFβRII	10	D0, 3, 7, 10(매회 투여량 4mg/kg) D11(매회 투여량 10mg/kg) D14, 17, 21(매회 투여량 20mg/kg)	8	8

표 8

[0122] MC38/hPD-L1 이식 종양 마우스 종양 부피(TV)에 대한 PD1/TGFβRII의 영향

그룹 별	종양 부피(mm ³) 평균 값 ± 표준편차								
	D0	D3	D6	D9	D11	D14	D17	D20	D23
1	112 ±28	155 ±33	276 ±90	393 ±136	512 ±219	696 ±384	811 ±441	1071 ±776	1291 ±965
2	111±20	176 ±57	268 ±96	358 ±129	471 ±181	606 ±238	689 ±252	827 ±358	941 ±330
3	112±24	166 ±74	264 ±106	327 ±136	428 ±180	510 ±271	559 ±324	670 ±359	801 ±474

표 9

[0123] MC38/hPD-L1 이식 종양 마우스에 대한 PD1/TGFβRII의 종양 부피 억제율

그룹별	T/C(%)								억제율 1-T/C
	D3	D6	D9	D11	D14	D17	D20	D23	D23
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	110.4%	93.3%	86.9%	85.9%	80.7%	79.7%	70.8%	67.7%	32.3%
3	100.7%	93.3%	80.6%	77.8%	66.3%	62.4%	54.4%	53.2%	46.8%

[0124] 실시예9: 전기 화학적 발광 방법에 의한 사이토카인 분비에 대한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 자극 검출

[0125] RPMI1640 완전 배지로 PBMC 세포 농도를 약 2×10^6 세포/mL로 조절하고, 96웰 세포 배양 플레이트에 100 μL/웰로 첨가하였다. RPMI1640 완전 배지로 IgG1 단백질(SEQ ID NO: 21 및 SEQ ID NO: 22는 각각 중쇄 및 경쇄의 서열, 내부 자체 제조), LPS(SIGMA, L4391-1MG), 본 발명의 PD1/TGFβRII 융합 단백질을 각각 희석하고, 900 μg/mL의 IgG1 단백질; 1 μg/mL의 LPS; 10 μg/mL, 100 μg/mL, 900 μg/mL의 PD1/TGFβRII 융합 단백질을 조제하며, RPMI1640 완전 배지를 음성 대조군으로 사용하였다. 상기 조제된 용액을 각각 100 μL씩 취하여 96웰 세포 배양 플레이트에 첨가하여, 충분히 섞은 후, 37℃, 5% CO₂ 세포 인큐베이터에서 배양하였다. 48시간 후 96웰 플레이트에서 세포 상층액을 취하여, V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (human) 키트(MSD, K15049D-2)를 사용하여 사이토카인 IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α 및 IFN-γ의 함량을 검출하고, 초고감도 다인자 전기 화학적 발광기(MSD, QuickPlexSQ120)로 검출하며, 결과는 표 10에 도시된 바와 같다.

표 10

[0126] 전기 화학적 발광 방법에 의한 사이토카인 분비에 대한 각 테스트 샘플의 자극 검출 결과

그룹화	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)
RPMI1640 완전 배지	9.28 ±5.14	2.86 ±0.61	2118.44 ±315.51	0.65 ±0.32	2.90 ±1.17	2.23 ±0.91
IgG1 단백질	13.72±6.58	3.11 ±0.90	3065.51 ±599.37	0.38 ±0.00	3.37 ±0.91	3.42 ±2.99
LPS	23.42±2.34	2892.00 ±0.00	9792.00 ±0.00	167.79 ±28.95	1456.00 ±0.00	2039.78 ±227.63
PD1/TGFβRII(최종 농도 450 μg/mL)	10.97±1.93	4.02 ±0.35	2613.21 ±322.13	0.38 ±0.00	3.15 ±0.39	39.36 ±31.46
PD1/TGFβRII(최종 농도 50 μg/mL)	6.59±0.25	3.26 ±0.37	2188.06 ±474.45	0.47 ±0.15	2.78 ±0.42	14.02 ±10.96
PD1/TGFβRII(최종 농도 5 μg/mL)	7.90±3.47	3.09 ±0.24	2434.95 ±221.71	0.38 ±0.00	2.65 ±0.22	1.70 ±0.00

[0127] 상기 표의 결과로부터, 본 발명의 PD1/TGFβRII 융합 단백질이 사이토카인 폭풍을 일으킬 가능성이 낮으므로, 피험자에게 투여할 때 면역체계를 과도하게 활성화시켜 전신성 염증을 유발할 위험이 거의 없음을 알 수 있다.

[0128] 실시예 10: 시노몰구스 원숭이에 대한 PD1/TGFβRII 융합 단백질의 독성 시험

[0129] 1회 투여 독성: 본 시험에는 총 4마리의 시노몰구스 원숭이(게막이 원숭이)를 각 군에 2마리씩, 암수 반반으로 2개의 군으로 나누어, 각각 200, 500 mg/kg의 본 발명의 PD1/TGFβRII 융합 단백질을 1회 정맥 주사하고, 14일간 관찰하였다. 시험 동안 일반 관찰과 체중, 음식 섭취량, 체온, II 유도심전도 및 혈압, 혈액학, 혈액생화학, 소변 등의 지표를 검출하고, 시험 종료시 대략적인 해부관찰을 실시하였다.

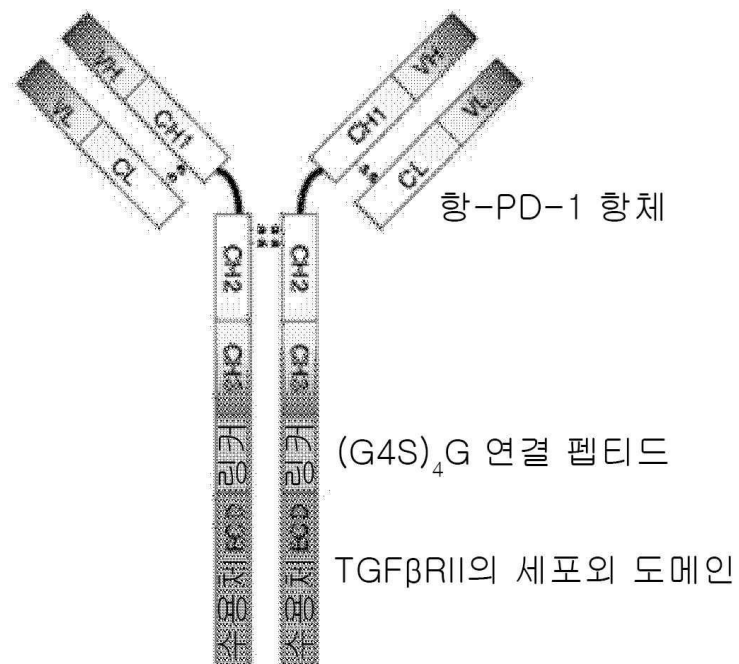
[0130] 투여 후, 각 군의 수컷 원숭이는 음식 섭취량이 일시적으로 감소하여, 시험 8-9일째에 회복할 수 있었다. 시험 14일째에, 각 군의 수컷 원숭이는 RBC, HGB, HCT가 감소되었다. 이 밖에, 다른 지표는 모두 뚜렷한 이상 변화가 없었다. 1회 투여 독성 시험에서, 시노몰구스 원숭이는 200, 500 mg/kg의 본 발명의 PD1/TGFβRII 융합 단백

질을 1회 정맥 주사했으며, MTD는 500 mg/kg이었다.

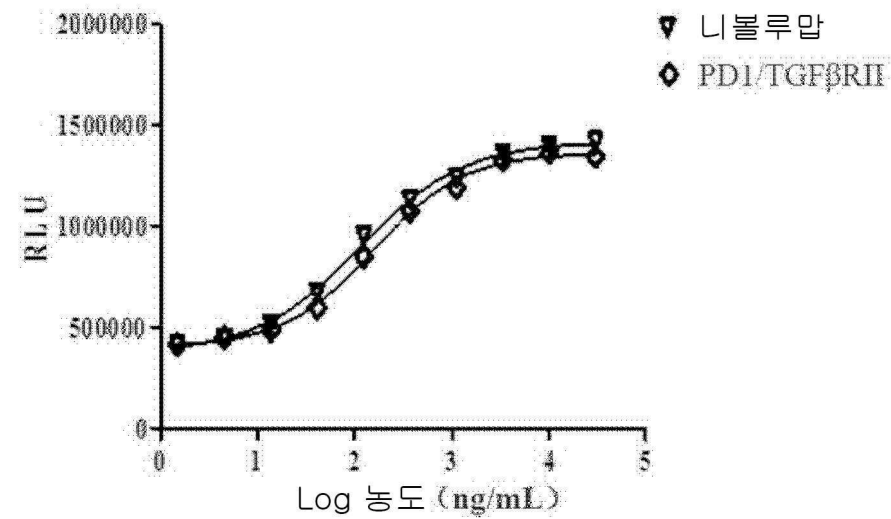
- [0131] 반복 투여 독성: 본 시험은 총 40마리의 시노물구스 원숭이를 각 군에 10마리씩, 암수 반반으로 4개의 군으로 나누며, 각각 블랭크 대조군 및 15, 50, 150 mg/kg 본 발명의 PD1/TGF β R11 융합 단백질군이다. 주 1회씩 4주 (총 5회) 연속 투여하고, 중단 후 4주 동안 관찰하였다.
- [0132] 투여 15일째와 투여 종료시, 50 mg/kg군의 수컷 원숭이와 150 mg/kg군의 수컷, 암컷 원숭이 모두 RBC, HGB, HCT가 감소하고, RET, RET%의 보상적으로 증가했으며; 투여 15일째에 50 mg/kg군의 암컷 원숭이에서도 상기 변화가 나타났다.
- [0133] 투여 종료시, 50 mg/kg군의 수컷 원숭이 1마리는 대략적으로 해부되어 심장 심낭 유착을 보였다. 조직병리학적 검사에서, 150 mg/kg군 시노물구스 원숭이에서 경미 내지 경증 대뇌수막 및 맥락총, 소뇌수막 및 맥락총, 척수 척막, 갑상선, 심장, 뇌하수체 단핵세포 침윤이 보였고, 경미 내지 중증 심장, 간, 방광, 부고환, 정낭선 혈관/혈관 주위 염증이 보였으며; 50 mg/kg군 시노물구스 원숭이에서 경미 내지 중증 대뇌수막, 좌골신경, 갑상선, 심장, 뇌하수체 단핵세포 침윤이 보였고, 경미 내지 중증 심장, 방광, 십이지장, 회장, 직장, 나팔관, 질, 자궁 혈관/혈관 주위 염증이 보였으며; 15 mg/kg군 시노물구스 원숭이에서 경미 내지 경증 대뇌수막 및 맥락총, 소뇌 맥락총, 좌골신경, 갑상선, 심장 단핵 세포 침윤이 보였고, 경미한 심장 혈관/혈관 주위 염증이 보였다. 또한, 50, 150 mg/kg군은 각각 1마리의 시노물구스 원숭이에서 경미한 대퇴골 피사, 후두관 두꺼워짐, 경미 내지 경증 대퇴골간 후두골 소량, 좌골세포 증가가 보였다.
- [0134] 이 밖에, 사망 또는 빈사 동물은 관찰되지 않았으며, 각 군의 시노물구스 원숭이는 일반적으로 양호한 상태였으며, 체중, 음식 섭취량, 체온, II 유도심전도, 호흡수, 혈액 생화학, 안과 검사, 소변 검사, 골수 도말, 장기 중량 및 계수, IgA, IgM, IgG, C3, C4, CIC, 림프구 아군 등 면역 관련 지표, TSH, T3, T4, 장기 중량 및 계수에는 뚜렷한 이상 변화가 없었다.
- [0135] 반복 투여 독성 시험에서, 시노물구스 원숭이에게 15, 50, 150 mg/kg 의 본 발명의 PD1/TGF β R11 융합 단백질 (매주 1회, 연속 4주 투여, 총 5회 투여)을 정맥 주사하고, HNSTD는 150 mg/kg이다. European Medicines Agency에서 니볼루맙(Nivolumab)의 Assessment report의 공개 정보에 따라 니볼루맙의 HNSTD는 50 mg/kg으로 추정되며, 이는 본 발명의 PD1/TGF β R11 융합 단백질의 HNSTD보다 훨씬 낮다. 이로부터 보아낼 수 있다시피, 본 발명의 PD1/TGF β R11 융합 단백질은 낮은 독성을 나타내므로, 상기 융합 단백질이 임상적으로 우수한 안전성을 나타낼 것으로 예상할 수 있음을 알 수 있다.
- [0136] 상기에서 일반적인 설명과 구체적인 실시형태를 사용하여 본 발명을 자세히 설명했지만, 본 발명에 기초하여 일부 수정 또는 개선할 수 있음은 당업자에게 있어서 자명한 것이다. 따라서, 본 발명의 사상을 벗어나지 않고 진행한 이러한 수정 또는 개선은 모두 본 발명의 보호 범위에 속한다.

도면

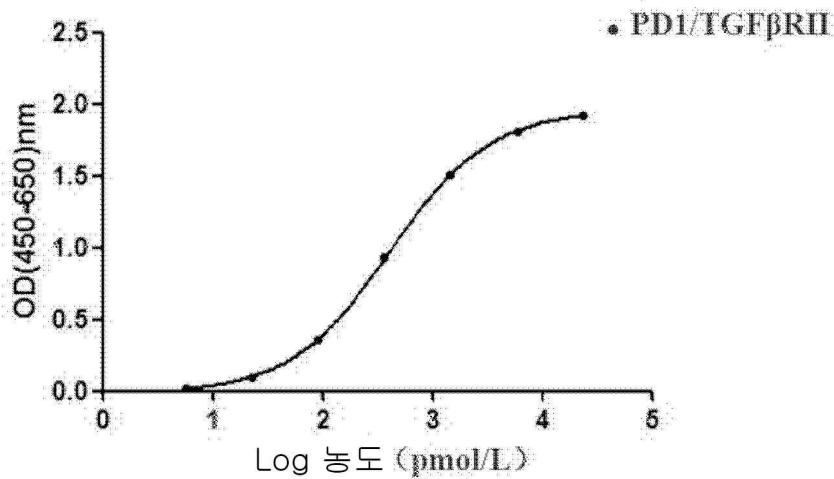
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.

<120> BIFUNCTIONAL PROTEIN AGAINST PD-1 AND TGF- β 1

<130> PI22-034

<150> CN 202010359751.8

<151> 2020-04-29

<160> 22

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 2

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr

1 5
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 3
 Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10
 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 4

Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

1 5
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 5

Arg Ala Asn

1
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 6

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5
 <210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 7

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 Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 9

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala

 325 330

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 10

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 <210> 11
 <211> 136
 <212> PRT
 <
 213> Homo sapiens
 <400> 11
 Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
 1 5 10 15
 Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
 20 25 30
 Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
 35 40 45
 Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
 50 55 60

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

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu

115 120 125

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp

130 135

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly

20

<210> 13

<211> 605

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 13

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 Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

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

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn
465 470 475 480

Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu
485 490 495

Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser
500 505 510

Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu
515 520 525

Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu
530 535 540

Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu
545 550 555 560

Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly
565 570 575

Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn
580 585 590

Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp

[illegible]

195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 15		
<211> 1815		
<212> DNA_RNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> artificial sequence		
<220><223> artificial sequence		
<400> 15		
gaggtacaac tgggtggaatc cgggtggcggc ctcgtgcagc ctggcggcag cctgagactg	60	
agttgtgctg ctcttggett tgccttctcc tcctacgaca tgtcctgggt gcggcaggcc	120	
cctggaaagg gcctggattg ggtggccacc atttccggag gcggcagata cacctactac	180	
cctgactctg tcaagggccg gtccaccatc tccagagaca actccaagaa caacctgtac	240	
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccctgt actactgcgc caaccgttac	300	
ggcgaggctt gggtgccta ctggggccaa ggcaccctcg tgaccgtatc atccgcctcc	360	
acaaagggcc ctctgtgtt ccctctggcc ctttctcca agtctacaag cggaggcacc	420	
gctgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac ccgtgaccgt gtcttggaac	480	
tccggcgctc tgacctctgg agtgcatacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg	540	
tactctctgt ccagcgtggt caccgtgcct agcagcagtc tgggaacca gacatacatc	600	
tgcaacgtga accacaagcc tcctaataca aaagtggaca agaaggtgga gcctaaatcc	660	
tgcgacaaga cccacacctg tcttccttgc cctgctcctg aggccgctgg cgccttct	720	
gtgtttctgt tccccctaa gcccgaaggac accctgatga tctcccgac ccccagggtg	780	
acctgcgtgg tgggtggact gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ctggtacgtg	840	
gatggcgtgg aagtgcaca cgccaagacc aagcctagag aggagcagta caacagcacc	900	
tacagagtgg tctccgtgct gaccgttctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960	
aagtgcagg tgtccaacaa ggccttgcgc gccctatcg agaagaccat ctctaaggct	1020	
aagggccagc ctagagaacc tcaagtgtac accctgcctc catctcgga tgagctgaca	1080	
aagaatcagg tgtctctgac ctgtctggtg aagggttct acccctctga catcgccgtg	1140	
gagtgggagt ctaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccctcc tgtgctggac	1200	
tccgacggct ctttcttct gtactccaag ctgaccgtgg acaagtctag atggcagcag	1260	

ggcaacgtgt tctcctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacacagaaa 1320

tccctgtccc tgtccccctgg cgctggaggc ggtggctccg gcggcggcgg ctccggtggc 1380

ggaggtctcg gaggcggcgg ctctggcatc cccctcacg tgcagaagag cgtcaacaac 1440

gatatgatcg tgaccgacaa caacggagct gtgaagtctc ctcaactgtg caagtctctg 1500

gacgtcatat tctctacctg tgataaccag aagtctctga tgtccaactg cagcatcacc 1560

tccatctgcg agaaacctca agaggtgtgc gtggctgtgt ggcggaagaa cgacgaaaac 1620

atcaccttgg aaaccgtatg tcacgatcct aagctgcctt accacgactt catcctggaa 1680

gatgccgcct ctccaagtg catcatgaaa gagaagaaga aaccggcgga gacctttttc 1740

atgtgctctt gctccagcga cgagtgcac gacaatatca tcttcagcga ggaatacaac 1800

accagcaacc ctgac 1815

<210> 16

<211> 642

<212> DNA_RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 16

gatatccaga tgaccagtc cccctcctcc atgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

ttcacctgca gagcttctca ggacatcaac acctacctgt cctggttcca gcagaagcct 120

ggcaagtctc ctaagaccct gatctacaga gccaacgggc tgggtgccgg cgtgccttct 180

cggttctccg gatctggctc tggccaggat tacacctga ccatctctc tctgcagcct 240

gaggacatgg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tcctctgac attcgccgct 300

ggcaccaagc tggaactgaa gcggaccgtg gccgctccta gcgtgttcat cttccctcct 360

tccgacgaac aactgaagtc cggcaccgcc tctgtggtgt gcctgctgaa caactttac 420

cctagagagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcaaagcgg caactccaa 480

gagtcctgca ccgagcagga cagcaaggac tccacctact ccctgtcttc tacactgacc 540

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac acaccagggc 600

ctgagctccc ctgtgaccaa gtccttcaac agaggcgagt gc 642

<210> 17

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

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

 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

 <210> 18
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 19

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 Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

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

 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

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

 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 20
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

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

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

 465 470 475 480
 Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe

485 490 495
 Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
 500 505 510
 Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
 515 520 525
 Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
 530 535 540

 Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
 545 550 555 560
 Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
 565 570 575
 Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
 580 585 590
 Thr Ser Asn Pro Asp
 595
 <210> 21
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 artificial sequence
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Val
 50 55 60

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

85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Gly Phe Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 22
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial sequence
 <400> 22
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Thr Ser Gln Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Arg
 85 90 95

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

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145

150

155

160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210