



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0064986  
(43) 공개일자 2022년05월19일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 47/68</i> (2017.01)<br/><i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C07K 16/2827</i> (2013.01)<br/><i>A61K 47/6811</i> (2017.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7011569</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년09월07일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년04월07일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2020/058303</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/048725<br/>국제공개일자 2021년03월18일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>201910863109.0 2019년09월12일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인<br/><b>바이오세우스 인크.</b><br/>중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비</p> <p>(72) 발명자<br/><b>수, 이평</b><br/>중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비<br/><b>자이, 티안행</b><br/>중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/><b>한라특허법인(유한)</b></p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **항-PD-L1 단일-도메인 항체 및 그의 유도체 및 용도**

**(57) 요약**

항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄의 상보성 결정 영역(CDR)을 제공하며, 여기서 VHH 쇄의 CDR은 하기를 포함한다: 서열번호 5n+1에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR1; 서열번호 5n+2에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 또는 서열번호 2에 나타낸 바와 같은 서열과 85% 초과 of 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 서열번호 5n+3에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3, 여기서 각각의 n은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다.

(52) CPC특허분류

**A61K 47/6849** (2017.08)

**A61P 35/00** (2018.01)

**G01N 33/57492** (2013.01)

**C07K 2317/569** (2013.01)

**C07K 2317/92** (2013.01)

**C07K 2317/94** (2013.01)

(72) 발명자

**유안, 지준**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**순, 앤디**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**선, 초에 조엔**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

**후양, 웨이펑**

중국 광둥성 519080 주하이 상저우 구 탕지아완 타  
운 케지 7 번가 넘버1 빌딩 4 10비

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 상보성 결정 영역(CDR)으로서, 여기서 VHH 쇠의 CDR이 하기로 이루어지는 CDR:

서열번호 5n+1에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR1;

서열번호 5n+2에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 또는 서열번호 2에 나타낸 바와 같은 서열과 85% 초과와 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및

서열번호 5n+3에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3;

여기서 각각의 n은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다.

#### 청구항 2

제1항에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

CDR2의 아미노산 서열이 서열번호 93에 나타낸 바와 같은, 항-PD-L1 단일-도메인 항체.

#### 청구항 4

항-PD-L1 단일-도메인 항체로서, PD-L1 에피토프에 대한 단일-도메인 항체이고 제2항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠를 갖는 항-PD-L1 단일-도메인 항체.

#### 청구항 5

제2항에 있어서,

항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 아미노산 서열이 서열번호 94에 나타낸 바와 같은, 항-PD-L1 단일-도메인 항체.

#### 청구항 6

제1항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 CDR 영역, 제2항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠, 또는 제4항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체를 포함하는 그룹 중에서 선택된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 7

단일-도메인 항체 융합 단백질로서, N-말단에서부터 C-말단으로 하기 화학식 I에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 단일-도메인 항체 융합 단백질:

화학식 I

Z1-Z2-L-Z3

여기서,

Z1은 제2항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠이고;

Z2는 면역글로불린의 Fc 단편이고;

L은 링커 서열이고;

Z3은 면역조절성 분자 부분이다.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

단일-도메인 항체 융합 단백질의 아미노산 서열이 서열번호 102에 나타낸 바와 같은, 단일-도메인 항체 융합 단백질.

**청구항 9**

(a) 제2항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄, 제4항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 또는 제8항에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질; 및

(b) 검출성 마커, 약물, 독소, 사이토카인, 방사성핵종 또는 효소를 포함하는 그룹 중에서 선택된 커플링 부분을 포함하는 면역접합체.

**청구항 10**

(a) PD-L1 분자의 검출에 사용되는 시약 및 (b) 종양 치료에 사용되는 약물의 제조에서 제4항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체 또는 제8항에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질의 용도.

**청구항 11**

(i) 제1항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄의 CDR, 제2항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄, 제4항에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 제7항에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질, 또는 제9항에 따른 면역접합체; 및

(ii) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 12**

약제, 시약, 검출 플레이트 또는 키트의 제조에서 제2항에 따른 VHH 쇄, 제4항에 따른 단일-도메인 항체, 제5항에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질, 또는 제9항에 따른 면역접합체의 용도로서, 여기서

시약, 검출 플레이트 또는 키트가 샘플 중 PD-L1 단백질의 검출에 사용되고;

약제가 PD-L1 단백질을 발현하는 종양(PD-L1 양성)의 치료 또는 예방에 사용되는 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본원은 생물리학 또는 생물약학의 기술 분야, 및 특히 항-PD-L1 단일-도메인 항체 및 그의 유도체 및 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 세포예정사 1 리간드 1(PD-L1)(또한 CD274로서 공지됨)은 B7 패밀리의 일원이며 PD-1에 대한 리간드이다. PD-L1은 하나의 IgV-유사 영역, 하나의 IgC-유사 영역, 하나의 막관통 소수성 영역 및 30개 아미노산으로 구성된 하나의 세포내 영역을 포함하여, 총 290개 아미노산으로 이루어지는 I형 막관통 단백질이다.

[0003] PD-L1은 면역 반응을 음성적으로 조절하는 효과를 갖는다. 이는 PD-L1이 주로 활성화된 T 세포, B 세포, 대식세포, 수지상 세포 등에서 발현된다는 연구를 통해 밝혀졌다. 림프구 외에, PD-L1은 또한 흉선, 심장, 태반 등과 같은 다수의 다른 조직, 및 흑색종, 간암, 위암, 신세포 암종, 난소암, 결장암, 유방암, 식도암, 두경부암 등과 같은 다양한 비-림프계의 내피 세포에서 발현된다. PD-L1은 자가반응성 T 및 B 세포 및 면역 관용을 조절하는데 일정한 다능성(versatility)을 가지며, 말초 조직에서 T 및 B 세포 반응에 한 역할을 한다. 종양 세포상에서 PD-L1의 높은 발현은 암 환자의 불량한 예후와 관련이 있다.

[0004] PD-L1과 결합된 세포예정사-1(PD-1)(또한 CD279로서 공지됨)은 B7-CD28 슈퍼패밀리의 일원이다. CD279의 세포질

영역은 2개의 티로신 잔기를 함유하며, 이중 하나는 N-말단 부근에서 면역수용체 티로신-기반 억제 동기(ITIM) 중에 위치하고, 다른 하나는 C-말단 부근에서 면역수용체 티로신-기반 전환 동기(ITSM) 중에 위치한다. PD-1은 주로 활성화된 T 림프구, B 림프구 및 대식세포의 표면상에서 발견된다. 정상적인 환경하에서, PD-1은 T 림프구의 기능을 억제하고 Treg 세포의 기능을 촉진하여, 자가면역 반응을 억제하고 자가면역 질병의 발생을 예방할 수 있다. 그러나, 종양 발생하에서 종양 세포에 의해 발현된 PD-L1의 PD-1과의 결합은 림프구를 억제함으로써 종양의 면역 회피를 촉진할 수 있다. PD-L1의 PD-1과의 결합은 다양한 생물학적 변화 및 면역 조절, 예를 들어 림프구의 증식 및 활성화 억제, CD4+ T 세포의 Th1 및 Th17 세포로의 분화 억제, 및 염증성 사이토카인의 방출 억제를 야기할 수 있다.

[0005] 암 진단 및 표적 요법에서 단클론 항체의 성공적인 적용은 종양 요법에 혁신을 일으켰다. 전통적인 단클론 항체 (150 kD)는 큰 분자량을 가지며 이는 항체가 조직을 통해 침투하는 경향을 방해하여 종양 중 유효 농도가 낮고 치료 효과가 불충분할 수 있다. 또한, 전통적인 항체의 긴 개발 기간, 높은 생산 비용, 불충분한 안정성 및 기타 여러 요인으로 인해 임상 적용 및 대중화가 제한된다.

[0006] 단일-도메인 항체는 현재 최소 항체 분자이며, 그 분자량(Fc 없이)은 통상적인 항체의 분자량의 1/10이다. 단클론 항체의 항원 반응성 외에, 단일-도메인 항체는 또한 특유의 기능적 특징, 예를 들어 낮은 분자량, 높은 안정성, 양호한 용해도, 용이한 발현, 높은 조직 침투성, 간단한 인간화 및 낮은 제조 비용을 가지며, 이는 전통적인 항체의 단점을 극복할 수 있다.

[0007] 그러나, 당해 분야에는 PD-L1에 대한 만족스러운 단일-도메인 항체가 여전히 없다. 따라서, 당해 분야에서 PD-L1에 대해 유효한 특이적인 단일-도메인 항체의 개발 필요성이 시급하다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본원의 목적은 PD-L1에 대해 유효한 특이적인 단일-도메인 항체 부류를 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0009] 본원의 첫 번째 태양에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 상보성 결정 영역(CDR)을 제공한다. VHH 쇠의 CDR은 하기로 이루어진다:

[0010] 서열번호 5n+1에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR1;

[0011] 서열번호 5n+2에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR2, 또는 서열번호 2에 나타낸 바와 같은 서열과 85% 초과 서열 일치성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및

[0012] 서열번호 5n+3에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3.

[0013] 각각의 n은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다.

[0014] 또 다른 바람직한 구현예에서, n은 0 또는 1이다.

[0015] 또 다른 바람직한 구현예에서, CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 2, 7, 81, 84, 87, 90, 93, 또는 96에 나타낸 바와 같다.

[0016] 또 다른 바람직한 구현예에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 VHH 쇠의 프레임워크 영역 FR1, FR2, FR3 및 FR4에 의해 분리된다.

[0017] 본원의 두 번째 태양에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠를 제공한다. 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠는 본원의 첫 번째 태양에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0018] 또 다른 바람직한 구현예에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 아미노산 서열은 서열번호 5n+4, 82, 85, 88, 91, 94 또는 97에 나타낸 바와 같다.

[0019] n은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다.

[0020] 상기 아미노산 서열 중 어느 하나는 또한 1-8(바람직하게는 1-5, 보다 바람직하게는 1-3)개 아미노산 잔기의 부가, 결실, 변형 및/또는 치환을 통해 수득되고 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 PD-L1 결합 친화성을 유지할 수 있

는 유도체 서열을 포함한다.

- [0021] 또 다른 바람직한 구현예에서,  $n$ 은 0 또는 1이다.
- [0022] 또 다른 바람직한 구현예에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 아미노산 서열은 서열번호 4, 9, 82, 85, 88, 91, 94 또는 97에 나타난 바와 같다.
- [0023] 본원의 세 번째 태양에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체를 제공한다. 항-PD-L1 단일-도메인 항체는 PD-L1 에피토프에 대한 단일-도메인 항체이며 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠를 갖는다.
- [0024] 본원의 네 번째 태양에서, 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 하기를 포함한 단백질 그룹 중에서 선택된 단백질을 암호화한다: 본원의 첫 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠의 CDR 영역, 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠, 또는 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체.
- [0025] 또 다른 바람직한 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 서열번호  $5n$ , 83, 86, 89, 92, 95 또는 98에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0026]  $n$ 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16이다.
- [0027] 또 다른 바람직한 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함한다.
- [0028] 본원의 다섯 번째 태양에서 발현 벡터를 제공한다. 발현 벡터는 본원의 네 번째 태양에 따른 폴리뉴클레오티드를 함유한다.
- [0029] 또 다른 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 또한 면역글로불린의 Fc 단편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다.
- [0030] 또 다른 바람직한 구현예에서, 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다.
- [0031] 본원의 여섯 번째 태양에서, 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 본원의 다섯 번째 태양에 따른 발현 벡터를 함유하거나, 또는 숙주 세포의 게놈이 본원의 네 번째 태양에 따른 폴리뉴클레오티드와 통합된다.
- [0032] 또 다른 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포를 포함한다.
- [0033] 또 다른 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이, 효모 세포 및 포유동물 세포의 그룹 중에서 선택된다.
- [0034] 본원의 일곱 번째 태양에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 생성 방법을 제공하며, 방법은 하기의 단계를 포함한다:  
 (a) 본원의 여섯 번째 태양에 따른 숙주 세포를, 단일-도메인 항체의 생산에 적합한 조건하에서 배양하고, 이에 의해 항-PD-L1 단일-도메인 항체를 함유하는 배양물을 수득하는 단계; 및  
 (b) 배양물로부터 항-PD-L1 단일-도메인 항체를 분리하거나 회수하는 단계.
- [0037] 또 다른 바람직한 구현예에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체는 서열번호  $5n+4$ , 82, 85, 88, 91, 94 또는 97에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0038]  $n$ 은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다.
- [0039] 본원의 여덟 번째 태양에서, 단일-도메인 항체 융합 단백질을 제공한다. 단일-도메인 항체 융합 단백질은 N-말단에서부터 C-말단으로 하기 화학식 I에 나타난 바와 같은 구조를 갖는다:  
 [화학식 I]  
 $Z1-Z2-L-Z3$   
 화학식에서,  
 $Z1$ 은 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠이고;  
 $Z2$ 는 면역글로불린의 Fc 단편이고;  
 $L$ 은 링커 서열이고;

- [0046] Z3은 면역조절성 분자 부분이다.
- [0047] 또 다른 바람직한 구현예에서, 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다.
- [0048] 또 다른 바람직한 구현예에서, Z2의 아미노산 서열은 서열번호 99에 나타낸 바와 같다.
- [0049] 또 다른 바람직한 구현예에서, Z2의 아미노산 서열은 서열번호 99에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0050] 또 다른 바람직한 구현예에서, L은 GGGGS, (GGGS)<sub>2</sub>, (GGGS)<sub>3</sub>, (GGGS)<sub>4</sub>, (GGGS)<sub>5</sub>, 또는 이들의 조합을 포함하는 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0051] 또 다른 바람직한 구현예에서, L의 아미노산 서열은 서열번호 100에 나타낸 바와 같다.
- [0052] 또 다른 바람직한 구현예에서, L의 아미노산 서열은 서열번호 100에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0053] 또 다른 바람직한 구현예에서, 면역조절성 분자는 TGFβRII 세포외 도메인이다.
- [0054] 또 다른 바람직한 구현예에서, Z3의 아미노산 서열은 서열번호 101에 나타낸 바와 같다.
- [0055] 또 다른 바람직한 구현예에서, Z3의 아미노산 서열은 서열번호 101에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0056] 또 다른 바람직한 구현예에서, 실질적으로 동일함은 최대 50(바람직하게는 1-20, 보다 바람직하게는 1-10, 보다 바람직하게는 1-5, 가장 바람직하게는 1-3)개의 아미노산이 상이함을 가리키며, 상이함은 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 포함한다.
- [0057] 또 다른 바람직한 구현예에서, 실질적으로 동일함은 아미노산 서열과 상응하는 아미노산 서열의 서열 일치성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%임을 가리킨다.
- [0058] 또 다른 바람직한 구현예에서, 단일-도메인 항체 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 102에 나타낸 바와 같다.
- [0059] 본원의 아홉 번째 태양에서, 면역접합체를 제공한다. 면역접합체는
- [0060] (a) 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄, 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질; 및
- [0061] (b) 검출성 마커, 약물, 독소, 사이토카인, 방사성핵종 또는 효소를 포함하는 그룹 중에서 선택된 커플링 부분을
- [0062] 을 포함한다.
- [0063] 또 다른 바람직한 구현예에서, 커플링 부분은 약물 또는 독소이다.
- [0064] 또 다른 바람직한 구현예에서, 커플링 부분은 검출성 마커이다.
- [0065] 또 다른 바람직한 구현예에서, 접합체는 형광 또는 발광 마커, 방사성 마커, MRI(자기 공명 영상화) 또는 CT(전자 컴퓨터 X-선 단층 촬영) 콘트라스트제, 또는 검출성 생성물을 생산할 수 있는 효소, 방사성핵종, 생물독소, 사이토카인(예를 들어 IL-2 및 유사물질), 항체, 항체 Fc 단편, 항체 scFv 단편, 금 나노입자/나노막대, 바이러스 입자, 리포솜, 자기 나노입자, 전구약물 활성화 효소(예를 들어 DT-디아포라제(DTD) 또는 비페닐 하이드릴라제-유사 단백질(BPHL)), 화학요법제(예를 들어 시스플라틴) 또는 임의의 형태의 나노입자 또는 유사물질 중에서 선택된다.
- [0066] 또 다른 바람직한 구현예에서, 면역접합체는 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 다가(예를 들어 2가) VHH 쇄, 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질을 함유한다.
- [0067] 또 다른 바람직한 구현예에서, 다가는 면역접합체의 아미노산 서열이 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 다수의 반복된 VHH 쇄, 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 또는 본원의

여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질을 함유함을 가리킨다.

- [0068] 본원의 열 번째 태양에서, 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질의 용도를 제공하며, 이는 (a) PD-L1 분자의 검출에 사용되는 시약 및 (b) 종양 치료에 사용되는 약물의 제조에 사용된다.
- [0069] 또 다른 바람직한 구현예에서, 검출은 유식 세포측정 및 세포 면역형광 검출을 포함한다.
- [0070] 본원의 열 한 번째 태양에서, 약학 조성물을 제공하며, 이는
- [0071] (i) 본원의 첫 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄의 CDR, 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇄, 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질, 또는 본원의 아홉 번째 태양에 따른 면역접합체; 및
- [0072] (ii) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.
- [0073] 또 다른 바람직한 구현예에서, 약학 조성물은 주사의 형태이다.
- [0074] 또 다른 바람직한 구현예에서, 약학 조성물은 종양 치료용 약물의 제조에 사용되며, 종양은 위암, 간암, 백혈병, 신장 종양, 폐암, 소장 암종, 골암, 전립선암, 결장직장암, 유방암, 결장암, 자궁경부암, 림프종, 부신 종양, 방광 종양 또는 이들의 조합을 포함하는 그룹 중에서 선택된다.
- [0076] 본원의 열 두 번째 태양에서, 하기를 위한 본원의 세 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체, 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질 중 하나 이상의 용도를 제공한다:
- [0077] (i) 인간 PD-L1 분자의 검출을 위한;
- [0078] (ii) 유식 세포측정을 위한;
- [0079] (iii) 세포 면역형광 검출을 위한;
- [0080] (iv) 종양 치료를 위한; 및
- [0081] (v) 종양 진단을 위한.
- [0082] 또 다른 바람직한 구현예에서, 용도는 비-진단학적 및 비-치료학적이다.
- [0083] 본원의 열 세 번째 태양에서, 재조합 단백질을 제공한다. 재조합 단백질은
- [0084] (i) 본원의 두 번째 태양에 따른 중쇄 가변 영역 VHH 쇄의 서열, 본원의 세 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체의 서열, 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질; 및
- [0085] (ii) 발현 및/또는 정제를 지원하는 임의의 태그 서열을 포함한다.
- [0086] 또 다른 바람직한 구현예에서, 태그 서열은 6His 태그, HA 태그, Flag 태그, Fc 태그, HSA 또는 항-HSA 항체 또는 단일-도메인 항체, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0088] 또 다른 바람직한 구현예에서, 재조합 단백질은 PD-L1 단백질에 특이적으로 결합한다.
- [0089] 본원의 열 네 번째 태양에서, 약제, 시약, 검출 플레이트 또는 키트의 제조에 사용되는 본원의 두 번째 태양에 따른 VHH 쇄, 본원의 세 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체, 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질, 또는 본원의 아홉 번째 태양에 따른 면역접합체의 용도를 제공한다.
- [0090] 시약, 검출 플레이트 또는 키트는 샘플 중 PD-L1 단백질의 검출에 사용된다.
- [0091] 약제는 PD-L1 단백질을 발현하는 종양(즉 PD-L1 양성)의 치료 또는 예방에 사용된다.
- [0092] 또 다른 바람직한 구현예에서, 종양은 위암, 림프종, 간암, 백혈병, 신장 종양, 폐암, 소장 암종, 골암, 전립선암, 결장직장암, 유방암, 결장암, 부신 종양 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0093] 본원의 열 다섯 번째 태양에서, 샘플 중 PD-L1 단백질의 검출 방법을 제공하며, 방법은

- [0094] (1) 샘플을 본원의 세 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 또는 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질과 접촉시키는 단계; 및
- [0095] (2) 항원-항체 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 단계
- [0096] 를 포함하고, 여기서 복합체의 형성은 샘플 중 PD-L1 단백질의 존재를 가리킨다.
- [0097] 또 다른 바람직한 구현예에서, 검출은 정성적인 검출 및 정량적인 검출을 포함한다.
- [0098] 본원의 열 여섯 번째 태양에서, 질병의 치료 방법을 제공한다. 방법은 본원의 세 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체, 본원의 여덟 번째 태양에 따른 단일-도메인 항체 융합 단백질, 또는 본원의 아홉 번째 태양에 따른 면역 접합체를 이것이 필요한 피실험자에게 유효량으로 투여함을 포함한다.
- [0099] 또 다른 바람직한 구현예에서, 피실험자는 포유동물을 포함한다.
- [0100] 또 다른 바람직한 구현예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0101] 본원의 범위내에서, 상기 본원의 기술적 특징 및 하기에 구체적으로 기재되는 기술적 특징(예를 들어 구현예)을 서로 조합하여 새로운 또는 바람직한 기술적 해법을 형성시킬 수 있음은 물론이다. 공간적 제약으로 인해, 더 많은 내용을 여기서 반복하지 않는다.

**도면의 간단한 설명**

- [0102] 도 1은 본원의 단일-도메인 항체가 세포 표면상의 인간 PD-L1 단백질에 결합할 수 있고, 항체 일부의 결합 효과가 양성 대조용의 경우와 유사함을 도시한다.
- 도 2는 변형된 단일-도메인 항체가 여전히 세포 표면상의 인간 PD-L1 단백질에 결합할 수 있고, 항체의 결합 효과가 양성 대조용의 경우와 유사함을 도시한다.
- 도 3은 변형된 단일-도메인 항체가 여전히 세포 표면상의 인간 PD-1 단백질에 대한 PD-L1 단백질의 결합을 차단할 수 있고, 항체의 차단 효과가 양성 대조용의 경우와 유사함을 도시한다.
- 도 4는 본원의 단일-도메인 항체가 T 세포를 유효하게 활성화할 수 있고, 활성화 효과가 양성 대조용 항체의 경우 이상임을 도시한다.
- 도 5는 융합 단백질의 도식적 구조 다이어그램을 도시한다.
- 도 6은 본원의 융합 단백질이 세포 표면상의 인간 PD-L1 단백질에 결합할 수 있음을 도시한다.
- 도 7은 본원의 융합 단백질이 세포 표면상의 인간 PD-1 단백질에 대한 PD-L1 단백질의 결합을 차단할 수 있고, 항체의 차단 효과가 양성 대조용의 경우와 유사함을 도시한다.
- 도 8은 본원의 융합 단백질이 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 결합할 수 있음을 도시한다.
- 도 9는 본원의 융합 단백질이 TGFβ/SMAD 신호 경로를 유효하게 차단할 수 있음을 도시한다.
- 도 10은 본원의 융합 단백질이 T 세포를 유효하게 활성화할 수 있고, 활성화 효과가 양성 대조용 항체의 경우 이상임을 도시한다.
- 도 11은 본원의 융합 단백질이 마우스에서 종양 성장을 유효하게 억제할 수 있음을 도시한다.
- 도 12는 본원의 PD-L1-VHH 결정 샘플의 사진을 도시한다.
- 도 13은 본원의 PD-L1-VHH 복합체의 결정 구조를 도시한다(상부 구조는 PD-L1이고 하부 구조는 VHH이다).
- 도 14는 본원의 PD-L1-VHH의 수소 결합 상호작용 계면을 도시한다(상부 구조는 PD-L1이고 하부 구조는 VHH이다).
- 도 15는 본원의 PD-L1-VHH의 소수성 상호작용 계면을 도시한다(상부 구조는 PD-L1이고 하부 구조는 VHH이다).
- 도 16은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 부피에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다.
- 도 17은 접종 27일 후 상이한 약물 그룹의 종양 사진을 도시한다.

도 18은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 중량에 대한 각 약물 그룹의 영향을 도시한다.

도 19는 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 체중에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다.

도 20은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 부피에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다.

도 21은 접종 28일 후 상이한 약물 그룹의 종양 사진을 도시한다.

도 22는 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 중량에 대한 각 약물 그룹의 영향을 도시한다.

도 23은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 체중에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0103] 광범위하고 심도있는 연구와 광범위한 스크리닝 후에, 발명자는 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 한 부류를 개발하였다. 실험 결과는 본원에서 수득된 PD-L1 단일-도메인 항체 및 그의 돌연변이 유도체가 PD-L1과 PD-1간의 상호작용을 유효하게 차단할 수 있고 비교적 양호한 열 안정성을 가짐을 보인다.
- [0104] 구체적으로, 본원은 단일-도메인 항체 유전자 서열을 함유하는 양질의 면역 라이브러리를 획득하기 위해 라마를 면역화하는데 인간-유래된 PD-L1 항원 단백질을 사용하였다. 발명자는 면역 단일-도메인 항체 유전자 라이브러리로부터 비교적 높은 인간화 수준(서열 일치성 >85%)을 보이는 유전자 서열을 갖는 단일-도메인 항체를 스크리닝하였다. PD-L1 단백질 분자를 비오틴화하고, 단일-도메인 항체의 서열을 함유하는 면역 라이브러리를 효모 디스플레이 기술을 사용하여 스크리닝하였으며, 이와 같이 하여 PD-L1에 특이적인 단일-도메인 항체 후보의 유전자를 획득하였다. 이어서 획득된 유전자 및 그의 조작된 돌연변이체를 Expi-CHO 세포로 전달하고, 항체 친화성, PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 차단하는 능력, 열 안정성 및 단일-도메인 항체의 부류 및 패널을 수득하기 위한 T 세포 활성의 활성화의 태양에서 추가로 스크리닝하였으며, 이들은 인간 PD-L1 항원에 대해 높은 결합 특이성으로 시험관내에서 효율적으로 발현될 수 있다.
- [0105] 또한, 실험 결과는 본원의 단일-도메인 항체 서열(표적화 부분으로서)과 IgG1 Fc 단편(연결 부분으로서) 및 TGF-βRII 세포의 도메인(면역조절성 분자 부분으로서)과의 융합에 의해 생성된 융합 단백질이 PD-L1과 고도로 활성이며, PD-L1과 PD-1간의 상호작용을 유효하게 차단할 수 있고, TGF-β/SMAD 신호 경로를 유효하게 차단할 수 있으며, 인간 T 림프구를 유효하게 활성화할 수 있고, 마우스에서 종양 성장을 유효하게 억제할 수 있음을 보인다.
- [0106] 또한, 실험 결과는 본원의 단일-도메인 항체가 마우스에서 피하 이식된 종양의 성장을 현저하게 억제할 수 있고 종양 중량을 감소시킬 수 있음을 보인다. 동일한 몰 투여량에서 종양 성장에 대한 억제 효과는 유사한 분자, 항-PD-L1 단일 도메인 항체 및 TGF-βRII-Fc 융합 단백질의 경우보다 더 높고 동물 질병 모델에 대해 명백한 독성이 없다.
- [0107] 이를 기반으로, 본원이 완료되었다.
- [0108] **본원의 단일-도메인 항체**
- [0109] 본원에 사용되는 바와 같이, "본원의 단일-도메인 항체", "본원의 항-PD-L1 단일-도메인 항체" 및 "본원의 PD-L1 단일-도메인 항체"란 용어는 호환가능하게 사용되며 모두 PD-L1(인간 PD-L1 포함)에 대한 인식 및 결합 특이성을 갖는 단일-도메인 항체를 지칭한다. 서열번호 4, 9, 82, 85, 88, 91, 94 또는 97에 나타난 바와 같은 VIII 쇄의 아미노산 서열을 갖는 단일-도메인 항체가 특히 바람직하다.
- [0110] 본원에 사용되는 바와 같이, "항체" 또는 "면역글로불린"이란 용어는 동일한 구조적 특징을 갖는 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질로, 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진다. 각각의 경쇄는 공유 디설파이드 결합을 통해 중쇄에 연결되고, 상이한 면역글로불린 아이소타입의 중쇄간의 디설파이드 결합의 수가 상이하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇄간 디설파이드 결합을 갖는다. 각각의 중쇄는 한 쪽 단부에 가변 영역(VH), 이어서 다수의 불변 영역을 갖는다. 각각의 경쇄는 한 쪽 단부에 가변 영역(VL)

및 다른 쪽 단부에 불변 영역을 갖고; 각각의 경쇄의 불변 영역은 상응하는 중쇄의 제1 불변 영역과 관련되고 각각의 경쇄의 가변 영역은 상응하는 중쇄의 가변 영역과 관련된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 사이에 계면을 형성한다.

- [0111] 본원에 사용되는 바와 같이, "단일 도메인 항체(VHH)" 및 "나노바디"란 용어는 동일한 의미를 가지며, 항체 중쇄의 가변 영역 클로닝 및 단지 하나의 중쇄 가변 영역만으로 이루어지는 단일 도메인 항체(VHH) 구성을 지칭하고, 단일 도메인 항체는 완전한 기능을 갖는 최소 항원-결합 단편이다. 대개는 경쇄 및 중쇄 불변 영역 1(CH1)이 자연적으로 누락된 항체를 수득한 후에, 항체의 중쇄의 가변 영역을 클로닝하여 단지 하나의 중쇄 가변 영역만으로 이루어지는 단일 도메인 항체(VHH)를 구성한다.
- [0112] 본원에 사용되는 바와 같이, "가변"이란 용어는 항체의 가변 영역의 몇몇 부분의 서열이 상이하여, 특이적인 항원에 대한 다양한 특이적인 항체의 결합 및 특이성이 형성됨을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 전체 가변 영역에 균일하게 분포되지 않는다. 가변성은 CDR 또는 고가변 영역으로서 알려진 경쇄 및 중쇄 가변 영역 중 3개의 단편에 집중된다. 가변 영역의 보다 많이 보존된 부분을 프레임워크 영역(FR)이라 칭한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 4개의 FR을 함유하며, 이들은 대충  $\beta$ -폴딩된 배열로 존재하고 3개의 CDR에 의해 연결되어 연결 루프를 형성하며, 일부의 경우에 부분적인  $\beta$  폴딩된 구조가 형성될 수 있다. 각 쇠 중의 CDR은 FR에 의해 함께 가깝게 결합되어 또 다른 쇠의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위를 형성한다(문헌[Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Volume I, pp. 647-669 (1991)]을 참조하십시오). 불변 영역은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관련되지 않고, 상이한 효과기 기능을 나타낸다, 예를 들어 항체의 항체-의존적인 세포독성에 참여한다.
- [0113] 당업자에 의해 공지된 바와 같이, 면역접합체 및 융합 발현 생성물은 약물, 독소, 사이토카인, 방사성핵종, 효소 및 다른 진단 또는 치료 분자를 본원의 항체 또는 그의 단편에 결합시킴으로써 형성된 접합체를 포함한다. 본원은 또한 항-PD-L1 단백질 항체 또는 그의 단편에 결합된 세포 표면 마커 또는 항원을 포함한다.
- [0114] 본원에 사용되는 바와 같이, "중쇄 가변 영역" 및 "V<sub>H</sub>"란 용어는 호환가능하게 사용된다.
- [0115] 본원에 사용되는 바와 같이, "가변 영역" 및 "상보성 결정 영역(CDR)"이란 용어는 호환가능하게 사용된다.
- [0116] 본원의 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3인 CDR을 포함한다.
- [0117] 본원의 바람직한 구현예에서, 항체의 중쇄는 상기 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0118] 본원에서, "본원의 항체", "본원의 단백질" 또는 "본원의 폴리펩티드"란 용어는 호환가능하게 사용되며 모두 PD-L1 단백질, 예를 들어 중쇄 가변 영역을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드(개시 메티오닌을 함유할 수도, 함유하지 않을 수도 있다)에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0119] 본원은 또한 본원의 항체를 갖는 다른 단백질 또는 융합 발현 생성물을 제공한다. 구체적으로, 본원은 가변 영역이 본원의 항체의 중쇄 가변 영역과 동일하거나 또는 이에 적어도 90% 상동성, 바람직하게는 적어도 95% 상동성인 한, 가변 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 임의의 단백질 또는 단백질 접합체 및 융합 발현 생성물(즉 면역접합체 및 융합 발현 생성물)을 포함한다.
- [0120] 일반적으로, 항체의 항원-결합 성질은 4개의 프레임워크 영역(FR)에 의해 분리된, 중쇄 가변 영역 중에 위치한, 가변 영역(CDR)이라 칭하는 3개의 특정한 영역에 의해 기술될 수 있으며, 4개의 FR의 아미노산 서열은 비교적 보존되고 결합 반응에 직접적으로 참여하지 않는다. 이러한 CDR은 환상 구조를 형성하며 사이에 있는 FR에 의해 형성된  $\beta$  폴드로 인해 공간 구조상 서로 가깝고, 중쇄상의 CDR 및 상응하는 경쇄상의 CDR이 항체의 항원 결합 부위를 구성한다. 동일한 유형의 항체의 아미노산 서열을 비교하여 어느 아미노산이 FR 또는 CDR 영역을 구성하는지를 결정할 수 있다.
- [0121] 본원의 항체의 중쇄의 가변 영역이 특히 중요한데, 그 이유는 가변 영역 중 적어도 일부가 항원에의 결합을 수반하기 때문이다. 따라서, 본원은 항체의 CDR이 여기서 확인된 CDR과 90% 이상(바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상)의 상동성을 갖는 한, CDR을 갖는 항체의 중쇄 가변 영역을 갖는 분자를 포함한다.
- [0122] 본원은 온전한 항체뿐만 아니라, 면역학적으로 활성인 항체 또는 항체들의 단편 및 다른 서열에 의해 형성된 융합 단백질을 포함한다. 따라서, 본원은 또한 항체의 단편, 유도체 및 유사체를 포함한다.
- [0123] 본원에 사용되는 바와 같이, "단편", "유도체" 및 "유사체"란 용어는 본원의 항체와 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 실질적으로 유지하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본원의 폴리펩티드 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 하나

이상의 보존적 또는 비-보존적 아미노산 잔기(바람직하게는 보존적 아미노산 잔기)가 치환되고 이와 같은 치환된 아미노산 잔기가 유전 암호에 의해 암호화될 수도, 암호화되지 않을 수도 있는 폴리펩티드, (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기 중에 치환기를 갖는 폴리펩티드, (iii) 성숙한 폴리펩티드를 또 다른 화합물(예를 들어 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 화합물, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜)에 융합시킴으로써 형성된 폴리펩티드, 또는 (iv) 추가적인 아미노산 서열을 폴리펩티드 서열(예를 들어 리더 서열, 분비 서열, 폴리펩티드 또는 프로단백질 서열의 정제에 사용되는 서열, 또는 6His 태그와 형성된 융합 단백질)에 융합시킴으로써 형성된 폴리펩티드일 수 있다. 본원의 교시에 따라, 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에게 주어진 범위내에 있다.

[0124] 본원의 항체는 상기 PD-L1 단백질 결합 활성 및 CDR을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 상기 용어는 또한 상기 CDR을 함유하고 본원의 항체와 동일한 기능을 갖는 폴리펩티드의 변이체 형태를 포함한다. 이러한 변이체 형태는 (비제한적으로) 하나 이상(대개는 1-50, 바람직하게는 1-30, 보다 바람직하게는 1-20, 가장 바람직하게는 1-10개)의 아미노산의 결실, 삽입 및/또는 치환 및 C-말단 및/또는 N-말단에 하나 이상(대개는 20개 이내, 바람직하게는 10개 이내, 및 보다 바람직하게는 5개 이내)의 아미노산의 부가를 포함한다. 예를 들어, 이 분야에서, 동일하거나 유사한 성질을 갖는 아미노산이 치환에 사용될 때, 단백질의 기능은 대개 변하지 않는다. 또 다른 예의 경우, C-말단 및/또는 N-말단에 하나 이상의 아미노산의 부가는 대개 단백질의 기능을 변화시키지 않는다. 상기 용어는 또한 본원의 항체의 활성 단편 및 활성 유도체를 포함한다.

[0125] 폴리펩티드의 변이체 형태는 상동성 서열, 보존적 변이체, 대립유전자 변이체, 친연 변이체, 유도 변이체, 높은 또는 낮은 엄격성 조건하에서 본원의 항체의 암호화 DNA와 하이브리드화할 수 있는 DNA 암호화된 단백질, 및 본원의 항체에 대한 항혈청을 사용하여 수득된 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다.

[0126] 본원은 또한 다른 폴리펩티드, 예를 들어 단일-도메인 항체 또는 그의 단편을 함유하는 융합 단백질을 제공한다. 거의 완전길이 폴리펩티드 외에, 본원은 또한 본원의 단일-도메인 항체의 단편을 포함한다. 일반적으로, 단편은 본원의 항체의 적어도 약 50개의 연속된 아미노산, 바람직하게는 적어도 약 60개의 연속된 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 약 80개의 연속된 아미노산, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 100개의 연속된 아미노산을 갖는다.

[0127] 본원에서, "본원의 항체의 보존적 변이체"는 본원의 항체의 아미노산 서열과 비교하여 동일하거나 유사한 성질을 갖는 아미노산으로 최대 10개, 바람직하게는 최대 8개, 보다 바람직하게는 최대 5개, 및 가장 바람직하게는 최대 3개의 아미노산이 치환되어 형성된 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 보존적 변이체 폴리펩티드는 표 1에 따른 아미노산의 치환을 통해 가장 잘 생성된다.

[표 1]

초기 잔기	전형적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0129] 본원은 또한 항체 또는 그의 단편 또는 그의 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 본원의 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA의 형태일 수 있다. DNA 형태는 cDNA, 게놈 DNA 또는 인공 합성 DNA를 포함한다. DNA는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. DNA는 암호화 가닥 또는 비-암호화 가닥일 수 있다.

[0131] 본원의 성숙한 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 단지 성숙한 폴리펩티드만을 암호화하는 암호화 서

열, 성숙한 폴리펩티드의 암호화 서열 및 다양한 추가적인 암호화 서열, 및 성숙한 폴리펩티드의 암호화 서열 (및 임의의 추가적인 암호화 서열)뿐만 아니라 비-암호화 서열을 포함한다.

- [0132] "폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드"란 용어는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 추가적인 암호화 및/또는 비-암호화 서열을 또한 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0133] 본원은 또한 상기 서열과 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이며, 두 서열간의 일치성은 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%, 및 보다 바람직하게는 적어도 80%이다. 본원은 특히 엄격한 조건하에서 본원의 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에서, "엄격한 조건"은 (1) 비교적 낮은 이온 강도 및 비교적 높은 온도, 예를 들어 0.2 x SSC, 0.1% SDS 및 60°C에서 하이브리드화 및 용출; 또는 (2) 하이브리드화 중 변성제, 예를 들어 50%(v/v) 포름아미드, 0.1% 송아지 혈청/0.1% 피콜, 42°C 등의 첨가; 또는 (3) 두 서열간의 일치성이 적어도 90% 이상, 및 보다 바람직하게는 95% 이상일 때만 발생하는 하이브리드화를 지칭한다. 또한, 하이브리드화 가능한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드는 성숙한 폴리펩티드와 동일한 생물학적 기능 및 활성을 갖는다.
- [0134] 본원의 항체 또는 그의 단편의 완전길이 뉴클레오티드 서열은 대개 PCR 증폭 방법, 재조합 방법 또는 인공 합성 방법에 의해 수득될 수 있다. 가능한 방법은, 특히 단편 길이가 짧은 경우, 관련 서열을 합성하기 위해 인공 합성 방법을 사용하는 것이다. 대개, 매우 긴 서열을 갖는 단편은 먼저 다수의 작은 단편을 합성하고 이어서 단편을 연결함으로써 수득될 수 있다. 또한, 중쇄의 암호화 서열 및 발현 태그(예를 들어 6His)를 함께 융합시켜 융합 단백질을 형성시킬 수 있다.
- [0135] 일단 관련 서열이 수득되면, 재조합 방법을 사용하여 관련 서열을 대량으로 수득할 수 있다. 관련 서열을 대개는 벡터에 클로닝하고, 이어서 세포로 전달하고, 이어서 통상적인 방법에 의해 증식된 숙주 세포로부터 단리하여, 관련 서열을 수득한다. 본원에 관련된 생물분자(핵산, 단백질 등)는 단리된 형태로 존재하는 생물분자를 포함한다.
- [0136] 현재, 본원의 단백질(또는 그의 단편 또는 그의 유도체)를 암호화하는 DNA 서열을 화학 합성을 통해 완전하게 수득할 수 있다. 이어서 DNA 서열을 당해 분야에 공지된 다양한 기존의 DNA 분자(예를 들어 벡터) 및 세포내에 도입시킬 수 있다. 추가로, 돌연변이를 또한 화학 합성을 통해 본원의 단백질 서열에 도입시킬 수 있다.
- [0137] 본원은 또한 적합한 DNA 서열 및 적합한 프로모터 또는 대조용 서열을 함유하는 벡터에 관한 것이다. 이러한 벡터를 사용하여 적합한 숙주 세포를 단백질을 발현하도록 형질전환시킬 수 있다.
- [0138] 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예를 들어 세균 세포; 또는 하등 진핵생물 세포, 예를 들어 효모 세포; 또는 고등 진핵생물 세포, 예를 들어 포유동물 세포일 수 있다. 전형적인 예는 에스케리키아 콜라이, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움의 세균 세포, 진균 세포, 예를 들어 효모, 드로소필라 S2 또는 Sf9의 곤충 세포, CHO, COS7 및 293 세포의 동물 세포 등일 수 있다.
- [0139] 재조합 DNA에 의한 숙주 세포의 형질전환을 당업자에게 주지된 통상적인 기법에 의해 수행할 수 있다. 숙주 세포가 에스케리키아 콜라이와 같은 원핵생물인 경우, DNA를 흡수할 수 있는 수용성 세포를 지수 증식기 및 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 처리 후에 수확할 수 있으며, 사용된 단계는 당해 분야에 주지되어 있다. 또 다른 방법은 MgCl<sub>2</sub>를 사용하는 것이다. 필요한 경우, 형질전환을 또한 일렉트로포레이션 방법에 의해 수행할 수 있다. 숙주 세포가 진핵생물 세포인 경우, 하기의 DNA 형질감염 방법을 선택할 수 있다: 칼슘 포스페이트 공-침전 방법, 통상적인 기계적 방법, 예를 들어 미세주입, 일렉트로포레이션, 리포솜 패키징 등.
- [0140] 수득된 형질전환체를 통상적인 방법에 의해 배양하여, 본원의 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 사용된 숙주 세포에 따라, 배양물에 사용된 배양 배지를 다양한 통상적인 배양 배지 중에서 선택할 수 있다. 배양을 숙주 세포의 생육에 적합한 조건하에서 수행한다. 숙주 세포를 적합한 세포 밀도로 증식시킨 후에, 선택된 프로모터를 적합한 방법(예를 들어 온도 전환 또는 화학적 유도)에 의해 유도하고, 세포를 일정 기간 동안 추가로 배양한다.
- [0141] 상기 방법에서 재조합 폴리펩티드를 세포에서 또는 세포막상에서 발현시키거나, 또는 세포 밖으로 분비시킬 수 있다. 필요한 경우, 재조합 단백질을 물리적, 화학적 및 다른 특징에 따라 다양한 분리 방법을 통해 분리 및 정제시킬 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 주지되어 있다. 이러한 방법의 예로는 비제한적으로 통상적인 재생 처리, 단백질 침전제(염석 방법) 처리, 원심분리, 삼투성 진균 파괴, 울트라-처리, 한외원심분리, 분자체 크로마토그래피(젤 여과), 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 및

다른 다양한 액체 크로마토그래피 기법 및 이들 방법의 조합이 있다.

- [0142] 본원의 항체를 단독으로 사용할 수 있으며 검출성 마커(진단용), 치료제, PK(단백질 키나제) 변형된 부분 또는 이들 물질의 임의의 조합과 조합하거나 커플링시킬 수 있다.
- [0143] 진단용 검출성 마커는 비제한적으로 형광 또는 발광 마커, 방사성 마커, MRI(자기 공명 영상화) 또는 CT(전자 컴퓨터 X-선 단층촬영) 콘트라스트제, 또는 검출성 생성물을 생산할 수 있는 효소를 포함한다.
- [0144] 본원의 항체와 조합되거나 커플링될 수 있는 치료제는 비제한적으로 1. 방사성핵종; 2. 생물독소; 3. 사이토카인, 예를 들어 IL-2; 4. 금 나노입자/나노막대; 5. 바이러스 입자; 6. 리포솜; 7. 자기 나노입자; 8. 전구약물 활성화 효소(예를 들어 DT-디아포라제(DTD) 또는 비페닐 하이드롤라제-유사 단백질(BPHL)); 9. 화학요법제(예를 들어 시스플라틴) 또는 임의의 형태의 나노입자 등을 포함한다.
- [0145] **본원의 융합 단백질**
- [0146] 본원에 기재된 바와 같이, "본원의 융합 단백질"은 본원의 첫 번째 태양에 기재된 항-PD-L1 단일-도메인 항체 및 면역조절성 분자 부분을 모두 갖는 이중기능성 융합 단백질을 지칭한다.
- [0147] 본원에서, 융합 단백질을 제공하며, 단일-도메인 항체 융합 단백질은 N-말단에서부터 C-말단으로 하기 화학식 I 에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0148] 화학식 I
- [0149] Z1-Z2-L-Z3
- [0150] 화학식에서,
- [0151] Z1은 본원의 두 번째 태양에 따른 항-PD-L1 단일-도메인 항체의 VHH 쇠이고;
- [0152] Z2는 면역글로불린의 Fc 단편이고;
- [0153] L은 링커 서열이고;
- [0154] Z3은 면역조절성 분자 부분이다.
- [0155] 바람직하게, 면역글로불린은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다.
- [0156] 바람직한 구현예에서, 면역글로불린은 IgG1이고, Z2의 아미노산 서열은 서열번호 99에 나타낸 바와 같다. 다른 구현예에서, Z2의 아미노산 서열은 서열번호 99에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0157] 본원에서, L은 가요성 아미노산 링커이다. 바람직하게, L은 GGGGS, (GGGS)<sub>2</sub>, (GGGS)<sub>3</sub>, (GGGS)<sub>4</sub>, (GGGS)<sub>5</sub>, 또는 이들의 조합을 포함하는 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0158] 바람직한 구현예에서, L의 아미노산 서열은 서열번호 100에 나타낸 바와 같다. 다른 구현예에서, L의 아미노산 서열은 서열번호 100에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0159] 본원의 구현예에서, 면역조절성 분자는 TGFβ RII 세포외 도메인이다. 바람직하게, Z3의 아미노산 서열은 서열번호 101에 나타낸다. 다른 구현예에서, Z3의 아미노산 서열은 서열번호 101에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0160] 본원에서, 실질적으로 동일함은 최대 50(바람직하게는 1-20, 보다 바람직하게는 1-10, 보다 바람직하게는 1-5, 가장 바람직하게는 1-3)개의 아미노산이 상이함을 가리키며, 상이함은 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 포함한다.
- [0161] 바람직하게, 실질적으로 동일함은 아미노산 서열과 상응하는 아미노산 서열의 서열 일치성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%임을 가리킨다.
- [0162] 바람직한 구현예에서, 단일-도메인 항체 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 102에 나타낸 바와 같다.
- [0163] TGFβ는 상피-간엽-이행(EMT)의 핵심적인 유도인자이다. 동시에, TGFβ는 종양 미세환경에서 강한 면역억제 효

과를 가지며, 따라서 종양 발생, 전이 및 약물 내성에 중요한 조절 효과를 갖는다.

[0164] 따라서, 본원의 구현예에서, TGFβ 수용체 II는 융합 단백질 중의 면역조절성 분자로서 선택된다. 본원의 융합 단백질은 높은 이중 표적 결합 친화성 및 특이성의 장점을 가지며, 이에 의해 항-종양 면역 기능이 더욱 향상된다.

[0165] **약학 조성물**

[0166] 본원은 또한 조성물을 제공한다. 바람직하게, 조성물은 항체 또는 그의 활성 단편 또는 그의 융합 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학 조성물이다. 일반적으로, 이들 물질을 무독성, 불활성 및 약학적으로 허용가능한 수성 담체 매질 중에서 제형화할 수 있으며, 여기서 pH는 대개 약 5-8, 바람직하게는 약 6-8이지만, pH는 제형화되는 물질의 성질 및 치료하고자 하는 질병 상태에 따라 변할 수 있다. 제형화된 약학 조성물을 통상적인 경로, 예를 들어 (비제한적으로) 종양내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 또는 국소 투여에 의해 투여할 수 있다.

[0167] 본원의 약학 조성물을 PD-L1 단백질 분자의 결합에 직접 사용할 수 있으며, 따라서 종양 치료에 사용할 수 있다. 추가로, 다른 치료제가 또한 동시에 사용될 수 있다.

[0168] 본원의 약학 조성물은 안전하고 유효한 양(예를 들어 0.001-99 중량%, 바람직하게는 0.01-90 중량%, 보다 바람직하게는 0.1-80 중량%)의 본원의 단일-도메인 항체(또는 그의 접합체) 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유한다. 이와 같은 담체는 (비제한적으로) 염수, 완충제, 글루코스, 수, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 포함한다. 약학 제제는 투여 방식과 합치되어야 한다. 본원의 약학 조성물을 주사 형태로 제조할 수 있다, 예를 들어 약학 조성물을 통상적인 방법에 의해, 생리식염수 또는 글루코스 및 다른 보조제를 함유하는 수용액으로 제조한다. 주사 및 용액과 같은 약학 조성물은 멸균 조건하에서 제조되어야 한다. 활성 성분의 투여량은 치료학적 유효량, 예를 들어 하루에 약 10 μg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중이다. 추가로, 본원의 폴리펩티드를 또한 다른 치료제와 함께 사용할 수 있다.

[0169] 약학 조성물이 사용되는 경우, 안전하고 유효한 양의 면역접합체를 포유동물에게 투여하며, 여기서 안전하고 유효한 양은 대개 적어도 약 10 μg/kg 체중이며, 대부분의 경우에 약 50 mg/kg 체중을 초과하지 않는다. 바람직하게, 투여량은 약 10 μg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중이다. 물론, 투여 경로 및 환자의 건강 상태와 같은 인자가 또한 특정 투여량에 대해 고려되어야 하며, 이는 숙련된 의사의 기술 범위내에 있다.

[0170] **표지된 단일-도메인 항체**

[0171] 본원의 바람직한 구현예에서, 단일-도메인 항체는 검출성 마커를 함유한다. 보다 바람직하게, 마커는 동위원소, 콜로이드성 금 마커, 착색된 마커 또는 형광 마커의 그룹 중에서 선택된다.

[0172] 콜로이드성 금 표지화를 당업자에게 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다. 본원의 바람직한 용액 중에서, 항-PD-L1 단일-도메인 항체를 콜로이드성 금으로 표지하여 콜로이드성 금 표지된 단일-도메인 항체를 수득한다.

[0173] 본원의 항-PD-L1 단일-도메인 항체는 높은 특이성과 역가를 갖는다.

[0174] **검출 방법**

[0175] 본원은 또한 PD-L1 단백질의 검출 방법에 관한 것이다. 방법의 단계는 일반적으로 하기와 같다: 세포 및/또는 조직 샘플을 수득하는 단계; 샘플을 배지에 용해시키는 단계; 및 용해된 샘플 중에서 PD-L1 단백질의 수준을 검출하는 단계.

[0176] 본원의 검출 방법에서, 사용된 샘플은 특별히 제한되지 않으며, 전형적인 예는 세포 보존액 중에 세포를 함유하는 샘플이다.

[0177] **키트**

[0178] 본원은 또한 본원의 항체(또는 그의 단편) 또는 검출 플레이트를 함유하는 키트를 제공한다. 본원의 바람직한 구현예에서, 키트는 용기, 사용 설명서, 완충제 등을 포함한다.

[0179] 본원은 또한 PD-L1의 수준을 검출하기 위한 검출 키트를 제공한다. 키트는 PD-L1 단백질을 확인하기 위한 항체, 샘플을 용해시키기 위한 용해 매질 및 검출에 필요한 일반적인 시약 및 완충제, 예를 들어 다양한 완충제, 검출 마커, 검출 기질 등을 포함한다. 검출 키트는 시험관내 진단 기구일 수 있다.

[0180]

**용도**

[0181]

상술한 바와 같이, 본원의 단일-도메인 항체는 생물학적 용도 및 임상 용도에 높은 가치가 있으며, 단일-도메인 항체의 용도는 PD-L1 관련 질병의 진단 및 치료, 기본적인 의학적 연구, 생물학적 연구 등의 분야와 관련된다. 바람직한 용도는 PD-L1에 대한 임상적 진단 및 표적 요법을 위한 것이다.

[0182]

**본원의 주요 장점은 하기를 포함한다:**

[0183]

1) 본원의 단일-도메인 항체는 올바른 공간 구조를 갖는 인간 PD-L1 단백질에 고도로 특이적이다.

[0184]

2) 본원의 단일-도메인 항체는 높은 친화성을 갖는다.

[0185]

3) 본원의 단일-도메인 항체는 생산이 용이하다.

[0186]

4) 단일-도메인 항체는 표적화 및 종양 미세환경에서 TGF-β를 기반으로 PD-1/PD-L1 경로를 억제할 수 있고, T 세포 활성을 복원할 수 있으며, 면역 반응을 향상시킬 수 있고 종양 발생 및 발달 억제 효과를 보다 유효하게 개선시킬 수 있다.

[0187]

5) 본원의 단일-도메인 항체는 명백한 독성이 없다.

[0188]

본원을 실행 실시예와 함께 하기에 추가로 기재할 것이다. 이러한 실행 실시예는 단지 본원을 예시하기 위해 사용될 뿐이며 본원의 범위를 제한하지 않음은 물론이다. 하기의 실행 실시예에서 구체적인 조건이 없는 실험 방법은 대개 통상적인 조건, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)의 조건, 또는 제조사에서 권장하는 조건에 따라 수행된다. 달리 명시되지 않는 한, 백분율 및 부는 중량 백분율 및 중량 기준 부이다.

[0189]

**실시예 1: 단일-도메인 항체 라이브러리의 구성**

[0190]

동물 면역성

[0191]

1 mg의 인간 PD-L1 항원 및 프로인트 항원보강제를, 항원-특이성 단일-도메인 항체를 발현하도록 B 세포를 자극하기 위해서 1주일에 1회 총 4회로 2마리의 람바를 면역화하기 위해서 같은 부피로 혼합하였다. 4회의 면역화 후에, 50 ml의 람바 말초 혈액을 추출하고 림프구 분리 용액으로 분리시켜 림프구를 수득하였다. RNA 추출 시약 트리졸(Invitrogen으로부터 구입)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. cDNA 합성 키트(Invitrogen으로부터 구입)를 역 전사에 사용하여 전체 람바 cDNA를 수득하였다.

[0192]

단일-도메인 항체 유전자 증폭

[0193]

첫 번째 PCR 라운드에서, IgG2 및 IgG3 서열을 cDNA로부터 증폭시켰다:

[0194]

첫 번째 PCR 라운드를 위한 프라이머

**표 1**

[0195]

명칭	서열(5'에서 3'으로)	서열번호
상류 프라이머	GTCCCTGGCTGCTCTCTACAAGG	103
하류 프라이머	GGTACGTGCTGTTGAACGTTC	104

[0196]

첫 번째 PCR 라운드의 생성물에 아가로스 젤 전기영동을 가하고, 750 bp의 단편을 젤 절단 후에 회수하여 두 번째 VHH 서열 증폭 라운드에 사용하였다. 두 번째 PCR 증폭 라운드용 프라이머는 하기와 같았다:

[0197]

두 번째 PCR 라운드를 위한 프라이머

**표 2**

[0198]

명칭	서열(5'에서 3'으로)	서열번호
상류 프라이머	CTAGTGCGGCCGCcTGGAGACGGTGACCTGGGT	105
하류 프라이머	CGCGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG	106

[0199]

두 번째 PCR 라운드의 생성물을 세 번째 PCR 라운드에 대한 기질로서 사용하였으며, 상동성 가치를 VHH 유전자

에 가하였고, 세 번째 PCR 증폭 라운드용 프라이머는 하기와 같았다:

[0200] 세 번째 PCR 라운드를 위한 프라이머

표 3

명칭	서열(5'에서 3'으로)	서열번호
상류 프라이머	ATTTTACTGCTGTTTTATTCGAGCATCTCCGCATTAGCTAAAAGAGAGGCTGAAGCACAGGTGCA GCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG	107
하류 프라이머	AGTTGTCAGTTCTGTGCCCCCTCTCCCGCCACCTCCGCCGACCTCCGCCACCTCCGCCACTGGAGA CGGTGACCTGGGT	108

[0202] 표적 단편을 PCR 정제 키트(QIAGEN으로부터 구입)를 사용하여 회수하였다. 라이브러리 구성

[0203] 선형화된 효모 디스플레이 벡터 및 세 번째 PCR 라운드의 생성물을 혼합하고 사카로마이세스 세레비지아에(ATCC ® 20828)내에 전기형질전환시켜 2마리의 동물로부터 항-PD-L1 단일-도메인 항체 라이브러리를 구성하였으며, 라이브러리 크기는  $4.47 \times 10^7$  및  $4.14 \times 10^7$ 인 것으로 측정되었다.

[0204] **실시예 2: PD-L1 단일-도메인 항체의 스크리닝**

[0205] 인간 PD-L1 단백질의 비오틴화

[0206] 인간 PD-L1 단백질을 적합한 부피의 2차 증류수에 용해시키고, 비오틴을 용해시키고 비오틴 표지화 키트(Thermo로부터 구입)의 제품 설명에 따라 단백질 용액과 혼합하고 이어서 4°C에서 2시간 동안 배양하였다. 탈염 컬럼(Thermo로부터 구입)을 사용하여 과잉의 비오틴을 제거하고, 탈염 컬럼에 의한 전처리 및 샘플의 수집 과정 모두 제품 설명에 따라 단계적으로 수행하였다.

[0207] PD-L1에 특이적으로 결합하는 효모의 MACS 농축

[0208] 실시예 2에서 구성된 VHH 라이브러리를 SD-CAA 증폭 배양 배지(1 L의 SD-CAA 증폭 배양 배지는 6.7 g의 YNB, 5 g의 카사미노산, 13.62 g의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 7.44 g의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  및 2%의 글루코스를 함유하였다)에 접종하였으며, 접종된 효모 세포의 수는 라이브러리 용량을 10배를 초과하였고(초기 증폭 농도는 0.5  $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ 이었다), 배양을 30°C 및 225 rpm에서 밤새 수행하였다. 효모 세포의 라이브러리 용량의 10배를 취하여 3000 rpm에서 5분간 원심 분리시켜(다음의 원심분리 과정은 동일하였다) 배양 배지를 제거하고, 효모 세포를 SD-CAA 유도 배양 배지로 재현탁하고, 초기 농도를 0.5  $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ 로 조절하고, 유도를 밤새 수행하였다. 유도 후 라이브러리의 농도를 측정하고, 효모 세포의 라이브러리 용량의 10배를 취하여 원심분리시켜 배양 배지를 제거하였다. 효모 세포를 50 ml의 세척 완충제(PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA)로 재현탁하고 원심분리시켜 상등액을 제거하였다. 효모 세포를 10 ml의 세척 완충제로 재현탁하였다.

[0209] 비오틴-표지된 PD-L1 단백질(최종 농도 100 nM)을 가하고, 실온에서 30분간 배양하고, 원심분리시키고, 효모 세포를 수집하고 50 ml의 세척 완충제로 3회 세척하였다. 효모 세포를 5 ml의 세척 완충제로 재현탁하고, 200  $\mu\text{l}$ 의 SA 자기 비드(Miltenyi로부터 구입)를 가하고, 세포를 10분간 뒤집어 배양하였다. 효모 및 자기 비드의 혼합물을 세척 완충제로 3회 세척하고 이어서 LS 컬럼(Miltenyi로부터 구입)에 가하였다. LS 컬럼을 자기 스탠드상에 놓고 세척 완충제로 세척하여 비-특이적으로 결합된 효모 세포를 제거하였다. 컬럼을 자기 스탠드로부터 제거하고, 세척 완충제를 가하여 효모를 용출시켰다. 용출된 효모를 원심분리시키고 증폭을 위해 200 ml SD-CAA 증폭 배양 배지로 옮겼다.

[0210] 고-친화성 효모 세포를 수득하기 위한 형광-활성화된 세포 분류

[0211] MACS에 의해 농축된 효모 세포를 SD-CAA 증폭 배양 배지에 접종하였으며, 초기 증폭 농도는 0.5  $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ 이었다. 진탕 플라스크 배양을 30°C 및 225 rpm에서 밤새 수행하였다. 효모 세포를 SD-CAA 유도 배양 배지(1 L의 SD-CAA 유도 배양 배지는 6.7 g의 YNB, 5 g의 카사미노산, 13.62 g의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 7.44 g의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2%의 갈락토스, 2%의 라피노스 및 0.1%의 글루코스를 함유하였다)로 재현탁하였으며, 초기 농도는 0.5  $\text{OD}_{600}/\text{ml}$ 이었고, 유도를 밤새 수행하였다. 항-c-Myc 마우스-유래된 항체(Thermo로부터 구입)를 1:200까지 희석하고 100 nM의 비오틴-표지된 PD-L1 항원을 가하고 실온에서 10분간 배양하였다. 효모를 PBS로 3회 세척하고, 염소 항-마우스 IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 488(Invitrogen으로부터 구입)을 1:500까지 희석하고 스트랩트아비딘

APC-접합된 형광 항체(Invitrogen으로부터 구입)를 가하고 암실에서 4°C에서 15분간 배양하였다. 2 ml의 PBS를 가하여 세포를 재현탁하고, BD FACSAriaIII 장비를, PD-L1 항원에 대해 높은 결합 친화성을 갖는 효모를 수득하기 위한 분류에 사용하였다.

[0212] PD-L1 단일-도메인 항체 후보의 유전자 서열 획득

[0213] MACS 및 FACS 농축에 의해 수득된 PD-L1 항원에 대해 높은 결합 능력을 갖는 효모 액체를 SD-CAA 증폭 배양 배지에서 30°C 및 225 rpm에서 밤새 배양하였다. 효모 플라스미드를 효모 플라스미드 추출 키트(TIANGEN으로부터 구입)의 작동에 따라 추출하였다. 플라스미드를 Top10 수용성 세포(TIANGEN으로부터 구입)로 전기전달에 의해 형질전환시키고, 암피실린 내성 편평 플레이트상에 코팅하고 37°C에서 밤새 배양하였다. 단일 클론을 서열분석을 위해 채취하여 VHH 유전자 서열을 획득하였다.

[0214] 실시예 3: 중쇄 항체의 구성, 발현 및 정제

[0215] VHH 유전자 서열을 인간 IgG1(LALA 돌연변이) Fc 단편에 연결하고 상동성 리콤비나제(Vazyme으로부터 구입) 및 *EcoRI/Not I* 효소를 사용하여 선형화된 pCDNA3.1 벡터로 절단하고, 그 과정을 제품 설명에 따라 수행하였다. 상동성 재조합 생성물을 Top10 수용성 세포로 형질전환시키고, 암피실린 내성 편평 플레이트상에 코팅하고 37°C에서 밤새 배양하고, 단일 클론을 서열분석을 위해 채취하였다.

[0216] 세포 형질감염

[0217] ExpiCHO™ 발현 시스템 키트(Thermo로부터 구입)를 Expi-CHO 세포로 플라스미드를 전달하는데 사용하였으며, 형질감염 방법은 제품 설명에 따랐다; 세포를 5일간 배양하고, 상등액을 수집하고, 단백질을 A 자기 비드(GenScript로부터 구입)를 분류 방법에 따라 표적 단백질의 정제에 사용하였다. 자기 비드를 적합한 부피의 결합 완충제(PBS + 0.1% 트윈 20, pH 7.4)(자기 비드 부피의 1-4배)로 재현탁시키고 이어서 정제하고자 하는 샘플에 가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 배양하고 그 기간 동안 서서히 진탕시켰다. 샘플을 자기 스탠드(Beaver로부터 구입)상에 놓고, 상등액을 제거하고, 자기 비드를 결합 완충제로 3회 세척하였다. 용출 완충제(0.1 M 나트륨 시트레이트, pH 3.2)의 자기 비드 부피의 3-5배를 실온에서 5-10분간 진탕을 위해 가하고, 혼합물을 자기 스탠드상에 다시 놓고, 용출 완충제를 수집하고 중화 완충제(1 M 트리스, pH 8.54)가 있는 수집 튜브로 옮기고 균일하게 혼합하였다.

[0218] 실시예 4: 인간 PD-L1에 대한 정제된 항-PD-L1 항체의 결합

[0219] 인간 PD-L1 cDNA(Sino Biological로부터 구입)의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen으로부터 구입)를 형질감염을 통해 MCS에 클로닝하여 인간 PD-L1을 과발현하는 CHO 세포(CHO-hPD-L1 세포)를 생성시켰다. 배양 확대시킨 CHO-hPD-L1 세포의 세포 밀도를  $2 \times 10^6$  세포/ml로 조절하고, 100 μl의 세포를 96-웰 유동 플레이트의 각 웰에 가하고, 추후 사용을 위해 원심분리시켰다. 정제된 PD-L1 항체를 PBS로 희석하고, 농도가 400 nM에 도달하면 총 12개 점에 대해 3배 희석을 시작하며, 100 μl의 희석된 샘플을 세포가 있는 96-웰 유동 플레이트의 각 웰에 가하고, 4°C에서 30분간 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 100배 희석된 100 μl의 염소 F(ab')<sub>2</sub> 항-인간 IgG-Fc(PE)(Abcam으로부터 구입)를 각 웰에 가하고, 4°C에서 30분간 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. 100 μl의 PBS를 세포 재현탁을 위해 각 웰에 가하고, 검출을 CytoFlex(Bechman) 유식 세포계상에서 수행하고, 상응하는 MFI를 계산하였다.

[0220] 상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 1에 나타내며, 본원의 모든 정제된 샘플 및 CHO-hPD-L1 세포는 결합 활성을 갖고, 일부 정제된 샘플의 결합 활성은 대조용 항체 TECENTRIQ®(아테졸리주맵)(ATE; US20130034559에 기록됨, 또한 243.55.S70으로서 공지됨)의 활성과 유사하였다.

[0221] 실시예 5: PD-L1 항체의 친화성 측정

[0222] ForteBio 친화성 측정을 기존의 방법에 따라 수행하였다(Estep, P et al., solution-based measurement of high-throughput antibody-antigen affinity and epitope classification, MAbs, 2013.5(2): p.270-8). 간단히, 센서를 분석 완충제 중에서 30분간 오프라인으로 평형화하고 이어서 60초간 온라인으로 시험하여 기준선을 확립시키고, 상술한 바와 같이 수득된 정제된 항체를 AHQ 센서상에 온라인으로 로딩하였다. 이어서 센서를 5분간 반응을 위해 100 nM PD-L1 항원에 놓고 이어서 5분간 해리를 위해 PBS로 옮겼다. 1:1 조합 모델을 동적 분석에 사용하였다.

[0223] 후보 분자의 친화성

표 4

[0224]

번호	서열번호	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
C-Ye-02	14	7.98E-08	4.69E+04	3.75E-03
C-Ye-04	9	4.89E-09	1.03E+05	5.05E-04
C-Ye-06	19	1.34E-07	4.35E+04	5.81E-03
C-Ye-17	34	3.96E-07	2.58E+04	1.02E-02
C-Ye-18	4	5.39E-09	8.33E+04	4.49E-04
C-Ye-20	39	4.86E-08	9.06E+04	4.40E-03
C-Ye-24	44	1.95E-08	7.71E+04	1.51E-03
C-Ye-26	49	3.41E-08	9.41E+04	3.21E-03
C-Ye-27	54	5.79E-08	5.45E+04	3.15E-03
C-Ye-30	59	3.94E-08	5.32E+04	2.10E-03
C-Ye-32	64	4.43E-08	5.83E+04	2.58E-03
C-Ye-34	69	2.44E-08	7.81E+04	1.91E-03
C-Ye-39	74	5.03E-07	2.12E+04	1.07E-02
C-Ye-42	79	3.89E-08	5.70E+04	2.22E-03

[0225]

실시예 6: PD-L1 항체의 유전자 변형 C-Ye-18에서 잠재적인 글리코실화 부위를 제거하기 위해, C-Ye-18의 아미노산 서열의 CDRH2 부분을 표 5의 6개의 형태로 점-돌연변이시켰다:

[0226]

C-Ye-18 CDR 영역의 돌연변이 서열

표 5

[0227]

번호	서열번호	CDRH2 영역
C-Ye-18	2	SINSSSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-1	81	SINSGSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-2	84	SISSSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-3	87	SIGSSSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-4	90	SIYSGSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-5	93	SINSDSSSTYYRDSVKG
C-Ye-18-6	96	SINSGSSSTYYRDSVKG

[0228]

이 연구에서, IMGT(<http://www.imgt.org>)를 사용하여 C-Ye-18 CDR 영역의 돌연변이 서열의 인간화 수준을 평가하고, 결과를 표 6에 나타내며, 모든 C-Ye-18 돌연변이체의 인간화 수준은 87%를 초과하였고, 차후 약물 개발을 위한 요건을 충족시킨다.

[0229]

C-Ye-18 CDR 영역의 돌연변이 서열 및 인간의 상동성

표 6

[0230]

번호	생식세포계열	상동성
C-Ye-18	IGHV3-74*01	87.80%
C-Ye-18-1	IGHV3-74*01	88.80%
C-Ye-18-2	IGHV3-74*01	87.80%
C-Ye-18-3	IGHV3-74*01	87.80%
C-Ye-18-4	IGHV3-74*01	87.80%
C-Ye-18-5	IGHV3-74*01	87.80%
C-Ye-18-6	IGHV3-74*01	87.80%

[0231]

단백질 구성 및 발현 정제 방법은 실시예 3의 경우와 동일하였으며, 수득된 단백질의 순도를 HPLC에 의해 검출하였다. HPLC 방법에 따라, 이동상은 150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O이었으며, pH는 7.0이었다. 크로마토그래피 조건: 검출 파장 280 nm, 컬럼 온도 25°C, 유량 0.35 ml/분, 검출 시간 20분, 및 Zenix-C SEC-300 크로마토그래피 컬럼 (SEPAX 4.6 x 300 mm, 3 μm).

[0232] C-ye-10 돌연변이 항체의 순도 검출 결과

표 7

[0233]

번호	단량체 비율(%)
C-ye-18	90.70
C-ye-18-1	97.40
C-ye-18-2	96.40
C-ye-18-3	98.50
C-ye-18-4	73.70
C-ye-18-5	83.00
C-ye-18-6	95.80

[0234]

**실시예 7: 인간 PD-L1에 대한 C-ye-18 돌연변이체 샘플의 결합**이 실험은 정제된 C-ye-18 돌연변이체 샘플 및 CHO-hPD-L1 세포의 결합 활성을 검출하였다. 실험 방법은 실시예 4의 경우와 동일하였다. 실험 결과는 도 2에 있다. C-ye-18 돌연변이체 샘플 및 CHO-hPD-L1 세포는 양호한 결합 활성을 가지며, 그 수준은 C-ye-18 및 대조용 항체 ATE의 수준에 필적하였다.

[0235]

**실시예 8: C-ye-18 돌연변이체 샘플의 친화성 측정**

[0236]

이 실험은 정제된 C-ye-18 돌연변이체 샘플 및 인간 PD-L1의 결합 친화성을 검출하였다. 실험 방법은 실시예 5의 경우와 동일하였다. 실험 결과는 표 8에 나타난다. C-ye-18 돌연변이체 샘플은 인간 PD-L1 단백질과 매우 양호한 결합 활성을 갖는다.

[0237]

C-ye-18 돌연변이체 샘플의 친화성

표 8

[0238]

번호	KD(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
C-ye-18-1	4.13E-09	2.46E+05	1.02E-03
C-ye-18-2	5.41E-09	2.34E+05	1.27E-03
C-ye-18-3	7.03E-09	2.41E+05	1.70E-03
C-ye-18-4	6.40E-09	2.41E+05	1.54E-03
C-ye-18-5	4.08E-09	2.72E+05	1.11E-03
C-ye-18-6	6.00E-09	2.32E+05	1.39E-03

[0239]

**실시예 9: C-ye-18 돌연변이체 샘플에 의한 PD-1에 대한 PD-L1의 결합의 차단**인간 PD-L1 cDNA(Sino Biological로부터 구입)의 pCHO1.0 벡터(Invitrogen으로부터 구입)를 형질감염을 통해 MCS에 클로닝시켜 인간 PD-L1을 과발현하는 CHO 세포(CHO-hPD-1 세포)를 생성시켰다. 배양 확대시킨 CHO-hPD-1 세포의 세포 밀도를  $2 \times 10^6$  세포/ml로 조절하고, 100  $\mu$ l의 세포를 96-웰 유동 플레이트의 각 웰에 가하고, 추후 사용을 위해 원심분리시켰다. 정제된 돌연변이체 샘플을 PBS로 희석하고, 농도가 400 nM에 도달하면 총 12개 점에 대해 3배 희석을 시작하며, 60  $\mu$ l의 희석된 샘플을 96-웰 샘플 희석 플레이트의 각 웰에 가하고, 60  $\mu$ l의 비오틴화된 인간 PD-L1 단백질(AcroBiosystems로부터 구입)을 동시에 각 웰에 가하였으며, 최종 농도는 500 ng/ml이고, 돌연변이체 샘플을 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 100  $\mu$ l의 공-배양 샘플을 세포가 있는 96-웰 유동 플레이트의 각 웰에 가하고, 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. PBS로 100배 희석된 100  $\mu$ l의 스트렙타비딘, R-피코에리쓰린 접합체(Thermo Fisher로부터 구입)를 각 웰에 가하고, 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. 100  $\mu$ l의 PBS를 세포 재현탁을 위해 각 웰에 가하고, 검출을 CytoFlex(Bechman) 유식 세포계상에서 수행하고, 상응하는 MFI를 계산하였다.

[0240]

상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 3에 나타내며, 본원의 모든 돌연변이체 샘플은 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 차단할 수 있고, 차단 수준은 C-ye-18 및 대조용 항체 ATE의 수준에 필적하였다.

[0241]

**실시예 10: C-ye-18 돌연변이체 샘플의 열 안정성**

[0242]

DSC(차동 주사 열량측정)를 사용하여 다양한 항체의 열 안정성을 검출하였다. 샘플을 농축시키고 이어서 PBS로 1 mg/ml로 희석하고 5000x 형광 색상 발색제 사이프로 오렌지(Cypro Orange)(Bio-Rad로부터 구입)를 초순수로

50배 희석하여 100x 형광 색상 발색제 사이프로 오렌지를 획득하였다. 50  $\mu$ l의 각각의 1 mg/ml 샘플을 채취하고, 10  $\mu$ l의 100x 형광 색상 발색제 사이프로 오렌지 및 40  $\mu$ l의 초순수를 가하고 균일하게 혼합하고, 각각 30  $\mu$ l를 96-웰 PCR 플레이트에 가하고, 각 샘플을 3개의 복제된 웰에 가하고, PCR 장비에 놓았다. 온도-상승 프로그램을 하기와 같이 설정하였다: 25°C의 일정한 온도를 5분간 유지시키고, 온도를 0.5°C/분의 속도로 99°C까지 상승시켰다. 프로그램 종료 후에, "용융 곡선" 다이어그램에서 곡선의 최저 점의 온도값, 즉 샘플의 Tm 값을 판독하였다. 구체적인 결과를 하기 표 9에 나타낸다.

[0243] C-ye-18 돌연변이체의 Tm 값

표 9

[0244]

번호	Tm1(°C)	Tm2(°C)	Tm3(°C)
C-ye-18	53.5	67.5	82
C-ye-18-1	60	67.5	82
C-ye-18-2	62.5	67.5	82
C-ye-18-3	58	67	82
C-ye-18-4	48	66	82
C-ye-18-5	66	66-67	82.5
C-ye-18-6	63	67.5	82

[0245] 실시예 11: 혼합된 림프구 반응 실험본 실시예에서, 혼합된 림프구 반응 실험(MLR)을 사용하여 T 세포를 활성화하는 C-ye-18 돌연변이체 샘플의 활성을 검출하였다. 구체적인 실험 방법은 하기와 같았다.

[0246] PBMC 세포(SAILY BIO, SLB-HPB로부터 구입)를 소생시키고, 원심분리하고, 10 ml의 X-VIVO-15 배양 배지(LONZA로부터 구입)로 재현탁하고 세포 배양기에서 37°C에서 2시간 동안 부착 배양시키고, 비부착 세포는 제거하였다. 10 ml의 DC 배양 배지를 가하고, 10 ng/ml GM-CSF(R&D로부터 구입) 및 20 ng/ml IL-4를 배양을 위해 3일간 X-VIVO-15 배양 배지에 가하고, DC 배양 배지 5 ml을 가하고, 세포를 6일 동안 계속 배양하고, DC 성숙 배양 배지를 가하고, 1000 U/ml TNF- $\alpha$ (R&D로부터 구입), 10 ng/ml IL-6(R&D로부터 구입), 5 ng/ml IL-1 $\beta$ (R&D로부터 구입) 및 1  $\mu$ M PGE2(Tocris로부터 구입)를 X-VIVO-15 배양 배지에 가하고, 세포를 2일간 배양하고, 성숙한 DC 세포를 수집하고, 세포 밀도를 X-VIVO-15 배양 배지로 2 x 10<sup>5</sup> 세포/ml로 조절하였다.

[0247] 또 다른 공여자로부터의 PBMC 세포(SAILY BIO, SLB-HPB로부터 구입)를 해동시키고, 원심분리하고 10 ml의 X-VIVO-15 배양 배지로 재현탁하였다. CD4<sup>+</sup> T 세포를 CD4<sup>+</sup> T 세포 분류 키트(Stemcell로부터 구입)로 농축시키고 X-VIVO-15로 재현탁하며, 세포 밀도를 2 x 10<sup>6</sup> 세포/ml로 조절하고, CD4<sup>+</sup> T 세포를 수집된 성숙한 DC 세포와 1:1의 비로 혼합하고, 100  $\mu$ l의 혼합물을 96-웰 U-모양 바닥 플레이트의 각 웰에 가하였다.

[0248] C-ye-18 돌연변이체 샘플을 X-VIVO-15 배양 배지로 희석하고, 농도가 200 nM에 도달하면 총 9개의 점에 대해 3배 희석을 시작하고, 100  $\mu$ l의 혼합 세포를 각 웰에 가하고 5일간 배양하고, 상등액을 수집하고, ELISA(eBioscience로부터 구입) 방법을 사용하여 IFN- $\gamma$  및 IL2의 발현량을 검출하였다.

[0249] 결과를 도 4에 나타내고, C-ye-18 돌연변이체 샘플, C-ye-18-1, C-ye-18-5 및 C-ye-18-6은 모두 MLR 실험에서 비교적 양호한 생물학적 활성을 보이며, 활성화 수준은 대조용 항체 ATE의 수준과 유사하거나 이보다 우수하였다.

[0250] 실시예 12 융합 단백질 PD-L1/TGF $\beta$ R2의 클로닝 및 발현

[0251] 본 실시예에서, TGF $\beta$ R2 세포의 도메인(서열번호 101)을 융합 단백질의 면역조절성 분자 부분으로서 사용하였으며, PD-L1 항체(인간 IgG1 Fc, LALA 돌연변이)(C-ye-18-5, 서열번호 94)를 융합 단백질의 표적화 부분으로서 사용하여 PD-L1 항체/TGF $\beta$ R2 세포의 영역 융합 단백질(PM8001, 서열번호 102)을 형성하였다.

[0252] 분자 클로닝 기술에 따라, 본원의 PD-L1 단백질 항체의 C-말단 아미노산을 (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>G를 통해 TGF $\beta$ R2 세포의 영역에 연결하고 Expi-CHO 발현 시스템을 통해 통상적으로 발현시켰다. 발현 및 정제 방법은 실시예 3에서와 같았으며, 도 5에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 융합 단백질 PM8001을 획득하였다.

[0253] 실시예 13 인간 PD-L1에 대한 PM8001 분자의 결합

- [0254] 정제된 PD-L1 항체(C-ye-18-5, 서열번호 94), PM8001 분자, TGF-βR2-Fc 융합 단백질, 양성 대조용 M7824(W02015/118175 A2) 및 음성 대조용 IgG 단백질의, 세포 표면상의 PD-L1에 대한 결합 활성을 검출하는 방법은 실시예 4의 방법과 같았다. 상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 6에 나타내고, 본원의 PM8001 분자 및 CHO-hPD-L1 세포는 결합 활성을 가지며, 그 결합 활성은 양성 대조용 분자 M7824의 활성과 유사하였다.
- [0255] **실시예 14 PM8001 분자에 의한 PD-1 세포에 대한 PD-L1 단백질의 결합의 차단**
- [0256] 정제된 PD-L1 항체(C-ye-18-5), PM8001 분자, TGF-βR2-Fc 융합 단백질, 양성 대조용 M7824 및 음성 대조용 IgG 단백질에 의한 PD-1 세포에 대한 PD-L1 단백질의 결합 활성의 차단을 검출하기 위한 방법은 실시예 9에서와 같았다. 상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 7에 나타내며, 본원의 PM8001 분자는 PD-1 세포에 대한 PD-L1 단백질의 결합을 차단할 수 있고, 차단 수준은 양성 대조용 분자 M7824의 수준에 필적하였다.
- [0257] **실시예 15 PM8001 분자 및 인간 TGF-β 패밀리 단백질의 ELISA 수준 결합 실험**
- [0258] 인간 TGF-β1(acrobiosystems, TG1-H421), TGF-β2(Pepro Tech, 100-35B) 및 TGF-β3(PeproTech, 100-36E) 단백질을 ELISA 코팅액으로 희석하고 이어서 코팅을 위해 ELISA 플레이트에 4℃에서 밤새 가하였다. 코팅액을 제거하고, 250 μl의 PBST를 3회 세척을 위해 각 웰에 첨가하고, ELISA 플레이트를 추후의 사용을 위해 실온에서 1시간 동안 5% BSA로 차단하였다. 정제된 PD-L1 항체(C-ye-18-5), PM8001 분자, TGF-βR2-Fc 융합 단백질, 및 양성 대조용 M7824에 구배 희석을 가하고 이어서 배양을 위해 실온에서 2시간 동안 차단된 ELISA 플레이트에 가하였다. PBST를 3회 세척을 위해 가하고, 염소 항-인간 Fc-HRP(abcam, ab97225)를 배양을 위해 실온에서 1시간 동안 각 웰에 가하고, PBST를 3회 세척을 위해 가한 후에, ELISA 색상 발색 용액을 가하고 실온에서 3분간 두고, ELISA 종결 용액을 가하고, 450 nm에서 흡광도 값을 판독하였다.
- [0259] 상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 8에 나타내며, 본원의 PM8001 분자는 ELISA 수준에서 인간 TGF-β1 및 TGF-β3 단백질에 비교적 양호한 결합 및 인간 TGF-β2 단백질에 비교적 약한 결합 활성을 갖고, 그 결합 수준은 양성 대조용 분자 M7824에 필적하였다.
- [0260] **실시예 16 TGF-β/SMAD 신호 경로의 차단에서 PM8001 분자의 실험**
- [0261] 적합한 양의 293-TGF-β/SMAD 효과기 세포를 채취하고, 96-웰 세포 배양 백색 바닥 플레이트상에 접종하고 배양을 위해 밤새 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>가 있는 배양기에 두었다. 정제된 PD-L1 항체(C-ye-18-5), PM8001 분자, TGF-βR2-Fc 융합 단백질, 및 양성 대조용 M7824에 구배 희석을 가하고, TGF-β1(Acro Biosystems, TG1-H421)과 혼합하고, 30분간 실온에서 배양하였다. 상기 혼합물을 연속 배양을 위해서 밤새 세포가 있는 백색 바닥 플레이트에 가하였다. Bio-Glo™ 시약(Promega)을 각 구멍에 가하고, 다기능성 미세플레이트 판독기를 사용하여 형광 신호 값을 판독하였다.
- [0262] 상기 방법에 따른 측정 실험에서, 실험 결과를 도 9에 나타내며, 본원의 PM8001 분자는 시험관내에서 TGF-β/SMAD 신호 경로를 차단할 수 있고, 그 차단 수준은 양성 대조용 분자 M7824의 수준에 필적하였다.
- [0263] **실시예 17 혼합된 림프구 반응 실험**
- [0264] 인간 T 림프구의 활성화에서 정제된 PD-L1 항체(C-ye-18-5), PM8001 분자, TGF-βR2-Fc 융합 단백질, 양성 대조용 M7824 및 음성 대조용 IgG 단백질을 검출하기 위해 혼합된 림프구를 사용하는 방법은 실시예 9의 방법과 같았다. 결과를 도 10에 나타내며, 본원의 PM8001 분자는 MLR 실험에서 비교적 양호한 생물학적 활성을 보이며, 그 활성 수준은 양성 대조용 분자 M7824의 수준에 필적하거나 그보다 우수하였다.
- [0265] **실시예 18 마우스에서 PM8001의 약동학적 평가**
- [0266] 6마리의 SD 마우스(절반은 수컷이고 절반은 암컷이다)를 실험에 사용하였으며, 명암 조절을 12시간 마다 수행하였고, 온도는 24±2℃였으며, 습도는 40-70%였고, 마우스는 음료수와 먹이를 자유롭게 마시고 먹었다. 마우스를 Zhejiang Weitong Lihua Experimental Technology Co., Ltd로부터 구입하였다. 실험 당일, PM8001 분자를 SD 마우스의 꼬리 정맥에 10 mg/kg의 투여량으로 1회 주사하였다.
- [0267] 채혈 시점: 혈액을 투여 후 3분, 4시간, 10시간, 24시간, 48시간, 72시간, 120시간, 168시간, 240시간, 336시간, 504시간 및 672시간째에 마우스의 경정맥으로부터 채혈하였다. 전혈 샘플을 2-8℃에서 30분간 두고 12000 rpm에서 5분간 원심분리시켰으며, 혈청을 수집하고 12000 rpm에서 2-8℃에서 5분간 원심분리하고 -80℃에서 보관하였으며, 혈청 중 유리 PM8001의 분자량을 ELISA에 의해 검출하였다. 결과를 표 10에 나타낸다. 본원의

PM8001의 유리 상태 분자는 SD 마우스에서 약 146시간의 반감기를 갖는다.

[0268] SD 마우스에서 PM8001의 T1/2

표 10

[0269]	시험 약물	투여 방식	T1/2
	PM8001	IV	146시간

[0270] **실시예 19 PM8001의 종양 억제 활성에 대한 연구본** 실험에서, 인간 PD-L1을 발현하는 MC38 세포(h-PD-L1 KI MC38)를 PD-L1 트랜스제닉 마우스에서 PM8001의 항-종양 효과 측정에 사용하였다. 먼저, h-PD-L1 KI MC38 종양-함유 마우스 모델을 피하 접종에 의해 확립시켰다. 평균 종양 부피가 80-120 mm<sup>3</sup>일 때 분류를 수행하고, 마우스에게 단일 복강내 주사하에 상이한 항체 및 상이한 투여량의 처리를 제공하고, 각 그룹의 마우스의 종양 부피 및 체중 변화를 총 3주 동안 매주 2회 모니터링하였으며, 투여량 및 투여 방식을 표 11에 나타내고, 마우스의 종양 부피 변화를 도 11에 나타낸다.

[0271] PM8001의 종양 억제 활성의 실험 계획

표 11

[0272]	그룹	투여 용량	투여 부피	투여 농도
	음성 대조용	N/A	10 ml/kg	N/A
	M7824	24 mg/kg	10 ml/kg	2.4 mg/ml
	PM8001	14.7 mg/kg	10 ml/kg	1.47 mg/ml
	C-Ye-18-5	10 mg/kg	10 ml/kg	1 mg/ml
	TGF-βR2-Fc	10 mg/kg	10 ml/kg	1 mg/ml
	C-Ye-18-5+TGF-βR2-Fc	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 ml/kg + 10 ml/kg	1 mg/ml + 1 mg/ml

[0273] 실험 결과를 도 11에 나타낸다. h-PD-L1 KI MC38 접종 후에, 음성 대조군의 종양 부피는 계속해서 증가하였으며, TGF-βR2-Fc 및 C-Ye-18-5 단일-사용 그룹의 종양 성장이 억제된 반면, PM8001 그룹은 TGF-βR2-Fc 및 C-Ye-18-5 그룹보다 양호한 종양 성장 억제를 가졌으며, 이는 PM8001이 현저한 종양 억제 효능을 가지며, 이는 양성 대조군의 효능에 필적하거나 또는 심지어 약간 더 우수함을 가리킨다. **실시예 20 PD-L1 및 단일-도메인 항체 VHH 단편의 복합체의 결정 구조의 확인**

[0274] 이 실험에서, PD-L1 및 단일-도메인 항체 VHH 단편의 복합체의 결정 구조 확인을 위해 X-선 회절 방법을 채택하였다. 인간-유래된 PD-L1-His 태그(서열번호 109)는 에스케리키아 콜라이 원핵생물계에 의해 발현되었다. PD-L1 단일-도메인 항체 융합 단백질(서열번호 110)은 CHO 시스템에 의해 발현되었다. PD-L1 단일-도메인 항체 융합 단백질을 IdeS 효소에 이어서 GingisKhan 효소로 절단 및 정제하고, 최종적으로 PD-L1 단일-도메인 항체 VHH(서열번호 111)를 수득하였다. PD-L1 및 VHH를 1:1의 몰 비로 혼합하여 결정화용 복합체 샘플을 제조하였다. 정제된 복합체를 카복시펩티다제 B로 절단하여 PD-L1의 His 태그를 제거하였다. 복합체(7.5 mg/ml)를 결정화 시약과 1:1의 비로 혼합하고 18°C에서 결정 배양을 수행하였다. 3일 후에, INT 키트 배양 조건하에서 결정이 관찰되었으며, 결정 형태를 도 12에 나타낸다.

[0275] 단결정을 Shanghai Light Source에서 X-선 회절 실험을 위해 선택하였으며, 1.6 Å의 분해능을 갖는 회절 데이터를 획득하였다. XDS 소프트웨어가 데이터 처리에 사용되었다. 분자 교체 방법을, 각각 모델로서 PD-L1(PDB ID: 5jds) 및 VHH(PDB ID: 5m2j) 구조에 대한 결정상 확인을 위해 채택하였다. Refmac5를 결정 구조 정제에 사용하였다. COOT를 모델 검출, 수동 재구성 및 구조 검증에 사용하였다. 복합체 결정은 P21 공간 그룹에 속하며, 결정 세포 매개변수는 a=34.62 Å, b=97.99 Å, c=67.52 Å, α=90.00°, β=90.02°, γ=90.00°이다.

[0276] 구조 분석 후에 수득된 PD-L1-VHH 복합체의 결정 구조를 도 13에 나타낸다. 에피토프 분석은 PD-L1과 VHH간의 주요 수소-결합 상호작용이 PD-L1상의 Tyr56, Asn63, His69, Asp73, Lys75, Ser117, Gly119, Ala121 및 다른 아미노산상에 농축됨을 보인다(도 14). 또한, PD-L1 상의 Tyr56, His69 및 Tyr123 및 VHH 상의 Tyr32, Trp33, Tyr35, Leu45, Trp47, Pro100 및 Tyr103은 소수성 상호작용 계면을 구성한다(도 15).

[0277] **실시예 21 h-PD-L1 녹-인(knock-in) C57BL/6 마우스에서 피하 접종된 h-PD-L1 녹-인 MC38 모델에 대한 PM8001**

**주사의 성장 억제 효과**

- [0278] 이 연구에서, h-PD-L1 녹-인 C57BL/6 마우스에서 피하 접종된 h-PD-L1 녹-인 MC38 마우스 결장암 종양-함유 모델에 대한 복강내 주사를 통해 투여된 PM8001(서열번호 102)의 생체-내 항-종양 효과, 및 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스에서 안전성을 조사하였다.
- [0279] 이 연구에서, h-PD-L1 녹-인 MC38 피하 종양-함유 모델은 h-PD-L1 녹-인 C57BL/6 마우스(GemPharmatech Co, Ltd로부터 구입)에 h-PD-L1 녹-인 MC38 마우스 결장암 세포를 피하 접종함으로써 확립되었다. 접종 10일 후에, 마우스를 종양 부피에 따라 5개의 그룹(그룹당 6마리 마우스)으로 분류하고, 각각 PBS, 14.7 mg/kg PM8001, 10 mg/kg PM8001-NSD(항-인간 PD-L1 VHH), 10 mg/kg PM8001 - TGF-βRII 및 24.6 mg/kg M7824(상기 투여 그룹의 상응하는 몰 투여량은 동일하였다)의 복강내 주사를 가하고, 투여를 3일 간격으로 2회 수행하였다. PM8001, PM8001-NSD, PM8001-TGF-βRII 및 M7824의 종양-함유 마우스에서 항-종양 효과 및 안전성을 조사하였다.
- [0280] 도 16은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 부피에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다. 도 17은 접종 27일 후 상이한 약물 그룹의 종양 사진을 도시한다. 음성 대조용 PBS 그룹에서 마우스의 종양은 빠르게 성장하며, 접종 27일 후에(즉 투여 후 17일째에) 종양 부피는 1500 mm<sup>3</sup> 이상에 도달하고, 이는 이 실험에서 종양 모델이 성공적으로 확립되었음을 가리킨다. 음성 대조용 PBS 그룹과 비교하여, 동일한 몰 투여량의 PM8001, PM8001-NSD, PM8001-TGF-βRII 및 M7824는 종양 성장을 상이한 정도로 억제할 수 있으며, 투여 후 17일째에 상기 그룹의 TGI는 각각 80%, 72%, 15% 및 53%였고; PM8001 주사 그룹은 PM8001-NSD, PM8001-TGF-βRII 및 유사한 분자 그룹 M7824보다 더 높은 종양 성장 억제 효과를 갖는다. 실험의 끝에서, 종양을 채취하여 칭량하였다. PM8001 주사 그룹의 종양 중량은 PM8001-NSD, PM8001-TGF-βRII 및 유사한 분자 그룹 M7824의 중량보다 낮았다. 도 18은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 중량에 대한 각 약물 그룹의 영향을 도시한다.
- [0281] 도 19는 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 체중에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다. 각 그룹에서 마우스의 상태에 이상은 없었으며; 대조군과 비교하여, 각 투여 그룹의 마우스의 체중은 그다지 감소하지 않았고; 실험의 끝에서, 각 그룹의 마우스의 육안 해부학은 주요 장기에 뚜렷한 병변을 보이지 않으며, 이는 이 실험에서 각 그룹의 사용된 약물 투여 용량이 마우스에게 뚜렷한 독성을 나타내지 않음을 가리킨다.
- [0282] **실시예 22 h-PD-L1 녹-인 C57BL/6 마우스에서 피하 접종된 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양 모델에 대한 상이한 투여량의 PM8001의 성장 억제 효과**
- [0283] 이 연구에서, h-PD-L1 녹-인 C57BL/6 마우스(GemPharmatech Co. Ltd로부터 구입)에서 피하 접종된 h-PD-L1 녹-인 MC38 마우스 결장암 종양-함유 모델에 대한 3개의 상이한 투여량의 PM8001 주사의 생체-내 항-종양 효과, 및 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스에서 안전성을 조사하였다.
- [0284] 이 연구에서, h-PD-L1 녹-인 MC38 피하 종양-함유 모델은 h-PD-L1 녹-인 C57BL/6 마우스에 h-PD-L1 녹-인 MC38 마우스 결장암 세포를 피하 접종함으로써 확립되었고, 이 모델을 사용하여 질병 상태에서 시험 제품의 작용 기전 및 안전성 특성과 관련된 항-종양 효과를 평가할 수 있다. 접종 7일 후에, 마우스를 종양 부피에 따라 5개의 그룹(각 그룹당 6마리 마우스)으로 분류하고, 각각 PBS, 상이한 투여량(0.3, 2.1, 14.7 mg/kg)의 PM8001 주사 또는 24.6 mg/kg M7824의 단일의 복강내 주사를 투여하였다. 종양-함유 마우스에서 상이한 투여량의 PM8001의 항-종양 효과 및 안전성을 조사하고 유사한 분자 M7824와 비교하였다.
- [0285] 도 20은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 부피에 대한 상이한 약물 그룹의 영향을 도시한다. 도 21은 접종 28일 후 상이한 약물 그룹의 종양 사진을 도시한다. 음성 대조용 PBS 그룹에서 마우스의 종양은 빠르게 성장하며, 접종 28일 후에 종양 부피는 1300 mm<sup>3</sup> 이상에 도달하고, 이는 이 실험에서 종양 모델이 성공적으로 확립되었음을 가리킨다. 음성 대조용 PBS 그룹과 비교하여, PM8001은 투여량-의존적인 방식으로 종양 성장을 억제할 수 있다. PM8001의 낮은, 중간 및 높은 투여량에서 TGI는 각각 31%, 76% 및 93%이었으며; 동일한 몰 투여량에서, PM8001 그룹(14.6 mg/kg)의 종양 성장 억제 효과는 유사한 분자 M7824 그룹(24.6 mg/kg)의 경우보다 더 높았다. 실험의 끝에서, 종양을 채취하여 칭량하였다. PM8001은 투여량-의존적인 방식으로 종양 중량을 감소시킬 수 있다. 동일한 몰 투여량에서, PM8001 그룹(14.6 mg/kg)의 종양 억제율은 유사한 분자 M7824 그룹(24.6 mg/kg)의 경우보다 더 높았다. 도 22는 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 종양 중량에 대한 각 약물 그룹의 영향을 도시한다.
- [0286] 도 23은 h-PD-L1 녹-인 MC38 종양이 이식된 h-PD-L1 녹-인 마우스의 체중에 대한 상이한 약물 그룹의 효과를 도

시한다. 각 그룹에서 마우스의 상태에 이상은 없었으며; 대조군과 비교하여, 각 투여 그룹의 마우스의 체중은 그다지 감소하지 않았고; 실험의 끝에서, 각 그룹의 마우스의 육안 해부학은 주요 장기에 뚜렷한 병변을 보이지 않으며, 이는 이 실험에서 각 그룹의 사용된 약물 투여 용량이 마우스에게 명백한 독성을 나타내지 않음을 가리킨다.

- [0287] 본원에 언급된 모든 문서는 각각의 문서가 개별적으로 참고로 인용되는 바와 같이, 본원에 참고로 인용된다. 또한, 본원의 상기 교시 내용의 판독 후에, 당업자는 본원에 대해 다양한 변화 또는 수정을 수행할 수 있으며, 이들 균등한 형태는 또한 본원의 첨부된 청구항에 의해 한정되는 범위내에 있음을 이해해야 한다.
- [0288] **본원의 서열 정보**
- [0289] **서열번호 1 C-Ye-18 CDR1 아미노산 서열**
- [0290] GFTFSSYWMY
- [0291] **서열번호 2 C-Ye-18 CDR2 아미노산 서열**
- [0292] SINSSSSSTYYRDSVKG
- [0293] **서열번호 3 C-Ye-18 CDR3 아미노산 서열**
- [0294] AKDPGGYA
- [0295] **서열번호 4 C-Ye-18 VHH 아미노산 서열**
- [0296] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRQAPGKGLEWVSSINSSSSSTYYRDSVKGFRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0297] **서열번호 5 C-Ye-18 VHH 뉴클레오티드 서열**
- [0298] GAGGTGCAGTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGCTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTAATAGTAGTAGTAGACACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0299] **서열번호 6 C-Ye-04 CDR1 아미노산 서열**
- [0300] SGFTFSSYWMY
- [0301] **서열번호 7 C-Ye-04 CDR2 아미노산 서열**
- [0302] SINTSSSSTYYRDSVKG
- [0303] **서열번호 8 C-Ye-04 CDR3 아미노산 서열**
- [0304] AKDPGGYA
- [0305] **서열번호 9 C-Ye-04 VHH 아미노산 서열**
- [0306] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRQAPGKGLEWVSSINTSSSSTYYRDSVKGFRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0307] **서열번호 10 C-Ye-04 VHH 뉴클레오티드 서열**
- [0308] CAGGTGCAGTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGCTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTAATACTAGTAGTAGTAGACACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0309] **서열번호 11 C-Ye-02 CDR1 아미노산 서열**
- [0310] GRTFNNSAMGAMG
- [0311] **서열번호 12 C-Ye-02 CDR2 아미노산 서열**
- [0312] TITWSSGSSFYANSVKG

- [0313] 서열번호 13 C-*Ye*-02 CDR3 아미노산 서열
- [0314] ASRKLGGVTVVTSYDF
- [0315] 서열번호 14 C-*Ye*-02 VHH 아미노산 서열
- [0316] QVQLQESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGRTFNNSAMGAMGWFRQAPGKEREFVATITWSSGSSFYANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASR  
KLGGVTVVTSYDFWGGTQVTVSS
- [0317] 서열번호 15 C-*Ye*-02 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0318] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAATAACTCGGCCATG  
GGCGCATGGGATGGTCCGCCAGGCCAGGAAAGAGCGTGAGTTGTGCGGACAATTACCTGGAGTAGTGGTAGCTCATTTTATGCAAACCTCCGTGAAG  
GGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCATCACGC  
AAATTGGGAGGGGTGTAACGGTAGTTACTTCGTATGACTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0319] 서열번호 16 C-*Ye*-06 CDR1 아미노산 서열
- [0320] GRTFDNYAMGAMG
- [0321] 서열번호 17 C-*Ye*-06 CDR2 아미노산 서열
- [0322] TITWSSGSSFYANSVKG
- [0323] 서열번호 18 C-*Ye*-06 CDR3 아미노산 서열
- [0324] ASRKLGGVTVVTSYDF
- [0325] 서열번호 19 C-*Ye*-06 VHH 아미노산 서열
- [0326] QVQLQESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRTFDNYAMGAMGWFRQAPGKEREFVATITWSSGSSFYANSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCASR  
KLGGVTVVTSYDFWGGTQVTVSS
- [0327] 서열번호 20 C-*Ye*-06 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0328] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCGATAACTATGCCATG  
GGCGCCATGGGATGGTCCGCCAGGCCAGGAAAGAGCGTGAGTTGTGCGGACAATTACCTGGAGTAGTGGTAGCTCATTTTATGCAAACCTCCGTGAAG  
GGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCATCACGC  
AAATTGGGAGGGGTGTAACGGTAGTTACTTCGTATGACTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0329] 서열번호 21 C-*Ye*-09 CDR1 아미노산 서열
- [0330] GRTFSTYAVG
- [0331] 서열번호 22 C-*Ye*-09 CDR2 아미노산 서열
- [0332] GRLTWSGSRTYYADSVKG
- [0333] 서열번호 23 C-*Ye*-09 CDR3 아미노산 서열
- [0334] AADYRSNSTWLSQSPARYEN
- [0335] 서열번호 24 C-*Ye*-09 VHH 아미노산 서열
- [0336] QVQLQESGGGLVQAGDSLGLSCTASGRTFSTYAVGWFRQAPGKGREFVGRLTWSGSRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADYRS  
NSTWLSQSPARYENWGGTQVTVSS
- [0337] 서열번호 25 C-*Ye*-09 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0338] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGACTCTCTGGGACTCTCTGTACAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACCTATGCCGTG  
GGGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCGTGAATTTGTAGGACGCTTACATGGAGCGGAGTAGAACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC  
ACCATCTCCAGAGACAACGCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCCGACTACCGAAGT  
AACAGTACCTGGTCCCTGCAAAGCCCGGCACGTTATGAAAATTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0339] 서열번호 26 C-*Ye*-10 CDR1 아미노산 서열

- [0340] GRTVSNYAMG
- [0341] 서열번호 27 C-*Ye*-10 CDR2 아미노산 서열
- [0342] RITGSGSSTFYADSVKG
- [0343] 서열번호 28 C-*Ye*-10 CDR3 아미노산 서열
- [0344] AADRWRSMVTRSDPREYEN
- [0345] 서열번호 29 C-*Ye*-10 VHH 아미노산 서열
- [0346] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRITVSNYAMGWFRRQAPGKEREFVARITGSGSSTFYADSVKGRFTISRNNLSNTVYQLQMSLKRDTAVYYCAADRWRSMVTRSDPREYENWGQGTQVTVSS
- [0347] 서열번호 30 C-*Ye*-10 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0348] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCGTCAGTAACTATGCCATGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCACGGATTACCGGGAGTGGTAGTAGCACATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAAACAATTGTGCAACCGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACGTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATCGCTGGCGTTCAATGGTGACTAGATCTGACCCGAGGGAGTATGAGAACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0349] 서열번호 31 C-*Ye*-17 CDR1 아미노산 서열
- [0350] GRTVSNYAMG
- [0351] 서열번호 32 C-*Ye*-17 CDR2 아미노산 서열
- [0352] RITGSGSSTFYADSVKG
- [0353] 서열번호 33 C-*Ye*-17 CDR3 아미노산 서열
- [0354] AADRWRSMVTRSDPREYEN
- [0355] 서열번호 34 C-*Ye*-17 VHH 아미노산 서열
- [0356] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRITVSNYAMGWFRRQAPGKEREFVARITGSGSSTFYADSVKGLFTISRNNLSNTVYQLQMSLKRDTAVYYCAADRWRSMVTRSDPREYENWGQGTQVTVSS
- [0357] 서열번호 35 C-*Ye*-17 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0358] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCGTCAGTAACTATGCCATGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCACGGATTACCGGGAGTGGTAGTAGCACATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCTATTCACCATCTCCAGAAACAATTGTGCAACCGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACGTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATCGCTGGCGTTCAATGGTGACTAGATCTGACCCGAGGGAGTATGAGAACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0359] 서열번호 36 C-*Ye*-20 CDR1 아미노산 서열
- [0360] GRTVSNYAMG
- [0361] 서열번호 37 C-*Ye*-20 CDR2 아미노산 서열
- [0362] RITGSGSSTFYADSVKG
- [0363] 서열번호 38 C-*Ye*-20 CDR3 아미노산 서열
- [0364] AADRWRSMVTRSYPREYEN
- [0365] 서열번호 39 C-*Ye*-20 VHH 아미노산 서열
- [0366] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRITVSNYAMGWFRRQAPGKEREFVARITGSGSSTFYADSVKGRFTISRDNKNAVYQLQMSLKPEDTAVYYCAADRWRSMVTRSYPREYENWGQGTQVTVSS
- [0367] 서열번호 40 C-*Ye*-20 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0368] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCGTCAGTAACTATGCCATGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCACGGATTACCGGGAGTGGTAGTAGCACATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC

ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACGCGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATCGCTGGCGT  
TCAATGGTGACTAGATCTTACCCGAGGGAGTATGAGAACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT

- [0369] 서열번호 41 C-*Ye*-24 CDR1 아미노산 서열
- [0370] GRTVSNYAMG
- [0371] 서열번호 42 C-*Ye*-24 CDR2 아미노산 서열
- [0372] RITGSGRTTYADSVKG
- [0373] 서열번호 43 C-*Ye*-24 CDR3 아미노산 서열
- [0374] AADRWRSMVTRSDPREYEN
- [0375] 서열번호 44 C-*Ye*-24 VHH 아미노산 서열
- [0376] QVQLQESGGGVVQAGDSLRLSCVASGRTVSNYAMGWFRQAPGKEREFVARITGSGRTTYADSVKGRFTISRNNLSNTVYVYLMNSLKREDAVYYCAADRWR  
SMVTRSDPREYENWGQGTQVTVSS
- [0377] 서열번호 45 C-*Ye*-24 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0378] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGTGTGGTGCAGGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCGTCAGTAACTATGCCATG  
GGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTGTAGCACGGATTACCGGGAGTGGTGTACCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC  
ACCATCTCCAGAAACAACCTGTGCGAACCGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACGTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATCGCTGGCGT  
TCAATGGTGACTAGATCTGACCCGAGGGAGTATGAGAACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0379] 서열번호 46 C-*Ye*-26 CDR1 아미노산 서열
- [0380] GRTVSNYAMG
- [0381] 서열번호 47 C-*Ye*-26 CDR2 아미노산 서열
- [0382] RITGSGSSTFYADSVKG
- [0383] 서열번호 48 C-*Ye*-26 CDR3 아미노산 서열
- [0384] AADRWRSMVTRSDPRDYEN
- [0385] 서열번호 49 C-*Ye*-26 VHH 아미노산 서열
- [0386] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTVSNYAMGWFRQAPGKEREFVARITGSGSSTFYADSVKGRFTISRNNLSNTVYVYLMNSLKREDAVYYCAADRWR  
SMVTRSDPRDYENWGQGTQVTVSS
- [0387] 서열번호 50 C-*Ye*-26 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0388] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCGTCAGTAACTATGCCATG  
GGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTGTAGCACGGATTACCGGGAGTGGTAGTAGCATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC  
ACCATCTCCAGAAACAACCTGTGCGAACCGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACGTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATCGCTGGCGT  
TCAATGGTGACTAGATCTGACCCGAGGGATTATGAGAACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0389] 서열번호 51 C-*Ye*-27 CDR1 아미노산 서열
- [0390] GRTFSRYAVG
- [0391] 서열번호 52 C-*Ye*-27 CDR2 아미노산 서열
- [0392] AITWSGGYTYADSVKG
- [0393] 서열번호 53 C-*Ye*-27 CDR3 아미노산 서열
- [0394] AVDTRNVIGPRAGDY
- [0395] 서열번호 54 C-*Ye*-27 VHH 아미노산 서열
- [0396] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSRYAVGWFRQAPGLGRDFVAAITWSGGYTYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYYCAVDTRN  
VIGPRAGDYWGQGTQVTVSS

- [0397] 서열번호 55 C-*Ye*-27 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0398] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTAGGTATGCCGTGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGCTGGGGCGTGACTTTGTAGCAGCTATTACCTGGAGTGGTGGTTACACATACTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGTCGATACGAGGAATGTAATCGGCCAAGAGCGGGAGACTACTGGGGCCAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0399] 서열번호 56 C-*Ye*-30 CDR1 아미노산 서열
- [0400] GSTFSRYAVG
- [0401] 서열번호 57 C-*Ye*-30 CDR2 아미노산 서열
- [0402] AITWSGGYTYADSVKVG
- [0403] 서열번호 58 C-*Ye*-30 CDR3 아미노산 서열
- [0404] AVDTRNVIGPRAGDY
- [0405] 서열번호 59 C-*Ye*-30 VHH 아미노산 서열
- [0406] QVQLQESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGSTFSRYAVGWFRQAPGLGRDFVAAITWSGGYTYADSVKGRFTISRDNKNTVYQLMNSLKPEDTAVYYCAVDTRNVIGPRAGDYWGQGTQVTSS
- [0407] 서열번호 60 C-*Ye*-30 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0408] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTCAGTAGGTATGCCGTGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGCTGGGGCGTGACTTTGTAGCAGCTATTACCTGGAGTGGTGGTTACACATACTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGTCGATACGAGGAATGTAATCGGCCAAGAGCGGGAGACTACTGGGGCCAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0409] 서열번호 61 C-*Ye*-32 CDR1 아미노산 서열
- [0410] GRTFSRYAVG
- [0411] 서열번호 62 C-*Ye*-32 CDR2 아미노산 서열
- [0412] AITWSGGYTYADSVKVG
- [0413] 서열번호 63 C-*Ye*-32 CDR3 아미노산 서열
- [0414] AVDTRNVIGPRAGDY
- [0415] 서열번호 64 C-*Ye*-32 VHH 아미노산 서열
- [0416] QVQLQESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGRITFSRYAVGWFRQAPGLGRDFVAAITWSGGYTYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQMSLNVEDTGYYCAVDTRNVIGPRAGDYWGQGTQVTSS
- [0417] 서열번호 65 C-*Ye*-32 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0418] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTAGGTATGCCGTGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGCTGGGGCGTGACTTTGTAGCAGCTATTACCTGGAGTGGTGGTTACACATACTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATCTATCTCCAAATGAACAGCCTGAACGTTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCAGTCGATACGAGGAATGTAATCGGCCAAGAGCGGGAGACTACTGGGGCCAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0419] 서열번호 66 C-*Ye*-34 CDR1 아미노산 서열
- [0420] AASGRITFSRFAMG
- [0421] 서열번호 67 C-*Ye*-34 CDR2 아미노산 서열
- [0422] AISWSGGMIYYTDSVKG
- [0423] 서열번호 68 C-*Ye*-34 CDR3 아미노산 서열
- [0424] AVDTRNVIGPRAGDY

- [0425] 서열번호 69 C-*Ye*-34 VHH 아미노산 서열
- [0426] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITFSRFAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSSGMIYYTDSVKGRFTISRDNAKNMLYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDTRN  
VIGPRAGDYWGQGTQVTSS
- [0427] 서열번호 70 C-*Ye*-34 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0428] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACTTTCAGTAGGTTTGCCATG  
GGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCCGCTATTAGCTGGAGTGGTGGTATGATATACTATAACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC  
ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGTCGATACGAGGAAT  
GTAATCGGCCAAGAGCGGGAGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0429] 서열번호 71 C-*Ye*-39 CDR1 아미노산 서열
- [0430] GRAFSVYPMA
- [0431] 서열번호 72 C-*Ye*-39 CDR2 아미노산 서열
- [0432] RLTYTSNTFYADSVKG
- [0433] 서열번호 73 C-*Ye*-39 CDR3 아미노산 서열
- [0434] AVENRSSWSLQSPARYDD
- [0435] 서열번호 74 C-*Ye*-39 VHH 아미노산 서열
- [0436] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRAFSVYPMAWFRQAPGKEREFIARLTYTSNTFYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVENRSS  
WSLQSPARYDDWGQGTQVTSS
- [0437] 서열번호 75 C-*Ye*-39 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0438] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCATGTACAGCCTCTGGACGCGCCTTCAGTGTCTACCCCATG  
GCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGTTTATAGCAGCTTACGTATACTAGTAACATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACC  
ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGTCGAGAACCGCAGTAGT  
AGTTGGTCCCTGCAAAGCCCGCACGTTATGATGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0439] 서열번호 76 C-*Ye*-42 CDR1 아미노산 서열
- [0440] GRTGSRYAVG
- [0441] 서열번호 77 C-*Ye*-42 CDR2 아미노산 서열
- [0442] AITWSGGYTYADSVKG
- [0443] 서열번호 78 C-*Ye*-42 CDR3 아미노산 서열
- [0444] AVDTRNVIGPRAGDY
- [0445] 서열번호 79 C-*Ye*-42 VHH 아미노산 서열
- [0446] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITGSRYAVGWFRQAPGLGRDFVAAITWSGGYTYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDTRN  
VIGPRAGDYWGQGTQVTSS
- [0447] 서열번호 80 C-*Ye*-42 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0448] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCAACCGGCAGTAGGTATGCCGTG  
GGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGCTGGGGGCTGACTTTGTAGCAGCTATTACCTGGAGTGGTGGTTACACATACTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCC  
ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAAATGAACAGCCTAAAACCTGAAGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGTCGATACGAGGAAT  
GTAATCGGCCAAGAGCGGGAGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0449] 서열번호 81 C-*Ye*-18-1 CDR2 아미노산 서열
- [0450] SINSGSSSTYYRDSVKG
- [0451] 서열번호 82 C-*Ye*-18-1 VHH 아미노산 서열

- [0452] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSGSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0453] 서열번호 83 C-*Ye*-18-1 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0454] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTAATAGTGGTAGTAGTAGCACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0455] 서열번호 84 C-*Ye*-18-2 CDR2 아미노산 서열
- [0456] SISSSSSTYYRDSVKG
- [0457] 서열번호 85 C-*Ye*-18-2 VHH 아미노산 서열
- [0458] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSISSSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0459] 서열번호 86 C-*Ye*-18-2 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0460] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTAGTAGTAGTAGTAGCACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0461] 서열번호 87 C-*Ye*-18-3 CDR2 아미노산 서열
- [0462] SIGSSSSTYYRDSVKG
- [0463] 서열번호 88 C-*Ye*-18-3 VHH 아미노산 서열
- [0464] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSIGSSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0465] 서열번호 89 C-*Ye*-18-3 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0466] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTGGTAGTAGTAGTAGTAGCACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0467] 서열번호 90 C-*Ye*-18-4 CDR2 아미노산 서열
- [0468] SIYSGSSSTYYRDSVKG
- [0469] 서열번호 91 C-*Ye*-18-4 VHH 아미노산 서열
- [0470] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSIYSGSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
- [0471] 서열번호 92 C-*Ye*-18-4 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0472] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGATGTATTGGTCCGTCAGGCTCCAGGAAGGGGCTCGAGTGGGTCTCATCTATTTACAGTGGTAGTAGTAGCACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGAAAAGATCCTGGTGGGTACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCAGT
- [0473] 서열번호 93 C-*Ye*-18-5 CDR2 아미노산 서열
- [0474] SINSDSSSTYYRDSVKG
- [0475] 서열번호 94 C-*Ye*-18-5 VHH 아미노산 서열
- [0476] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS

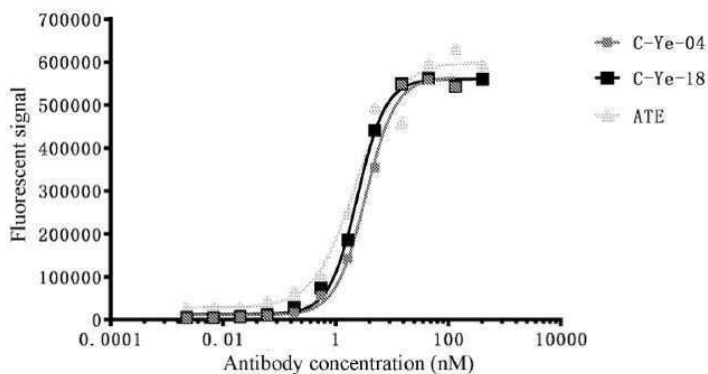
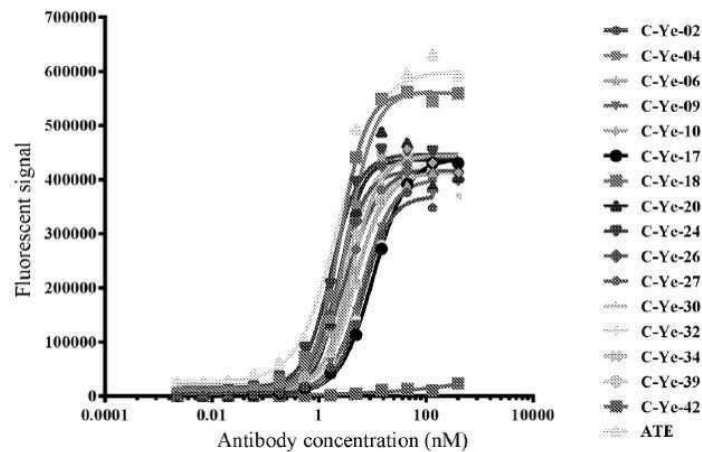
YAKGQGTQVTVSS

- [0477] 서열번호 95 C-Ye-18-5 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0478] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATG  
TATTGGCTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCAGTGGGTCTCATCTATTAATAGTGACAGTAGTAGCACATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC  
ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGCAAAAGATCCTGGTGGG  
TACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0479] 서열번호 96 C-Ye-18-6 CDR2 아미노산 서열
- [0480] SINSGSSSTYYRDSVKG
- [0481] 서열번호 97 C-Ye-18-6 VHH 아미노산 서열
- [0482] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSI SSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKSEDTAVYYCAKDPGG  
YAKGQGTQVTVSS
- [0483] 서열번호 98 C-Ye-18-6 VHH 뉴클레오티드 서열
- [0484] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGATG  
TATTGGCTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCAGTGGGTCTCATCTATTAGTGGTAGTAGTAGCACAATACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC  
ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTATTACTGTGCAAAAGATCCTGGTGGG  
TACGCCAAAGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCAGT
- [0485] 서열번호 99 IgG1 Fc 단편 아미노산 서열
- [0486] DKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
- [0487] 서열번호 100 융합 단백질 링커 아미노산 서열
- [0488] GGGSGGGSGGGSGGGSGG
- [0489] 서열번호 101 TGFβRII 세포의 도메인 아미노산 서열
- [0490] IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKIMKE  
KKKPGETFFMCSSESDECNDNIFSEEYNTSNPD
- [0491] 서열번호 102 PM8001 아미노산 서열
- [0492] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINS DSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKSEDTAVYYCAKDPGG  
YAKGQGTQVTVSSDKHTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMS  
NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKIMKEKKKPGETFFMCSSESDECNDNIFSEEYNTSNPD
- [0493] 서열번호 103 첫 번째 라운드를 위한 상류 프라이머
- [0494] GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
- [0495] 서열번호 104 첫 번째 라운드를 위한 하류 프라이머
- [0496] GGTACGTGCTGTTGAACTGTTC
- [0497] 서열번호 105 두 번째 라운드를 위한 상류 프라이머
- [0498] CTAGTGCGGCCGCcTGGAGACGGTGACCTGGGT
- [0499] 서열번호 106 두 번째 라운드를 위한 하류 프라이머
- [0500] CGCGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
- [0501] 서열번호 107 세 번째 라운드를 위한 상류 프라이머

- [0502] ATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCTCCGCATTAGCTAAAAGAGAGGCTGAAGCACAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG
- [0503] 서열번호 108 세 번째 라운드를 위한 하류 프라이머
- [0504] AGTTGTCAGTTCCTGTGCCCCCTCCTCCCGCCACCTCCGCCGACCTCCGCCACCAcTGGAGACGGTGACCTGGGT
- [0505] 서열번호 109 PD-L1-His tag 아미노산 서열
- [0506] MFTVTVPKDLVYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG  
GADYKRITVKVNAPYHHHHHHH
- [0507] 서열번호 110 PD-L1 단일-도메인 항체 융합 단백질 아미노산 서열
- [0508] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGG  
YAKGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
- [0509] 서열번호 111 PD-L1 단일-도메인 항체 아미노산 서열
- [0510] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGG  
YAKGQGTQVTVSSDK

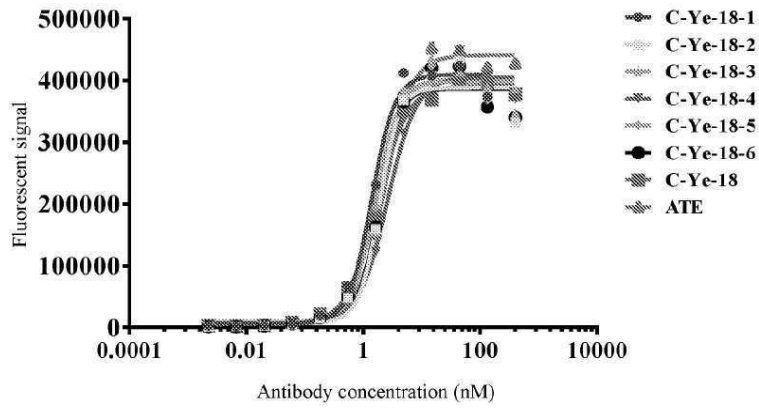
도면

도면1

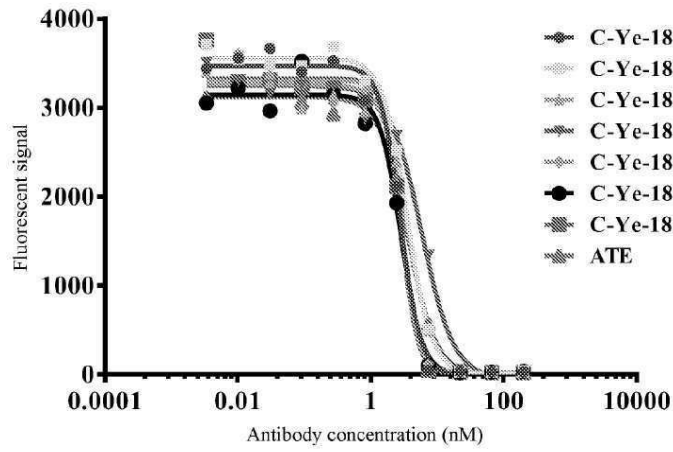


	C-Ye-04	C-Ye-18	ATE
EC50	3.395	2.429	2.266

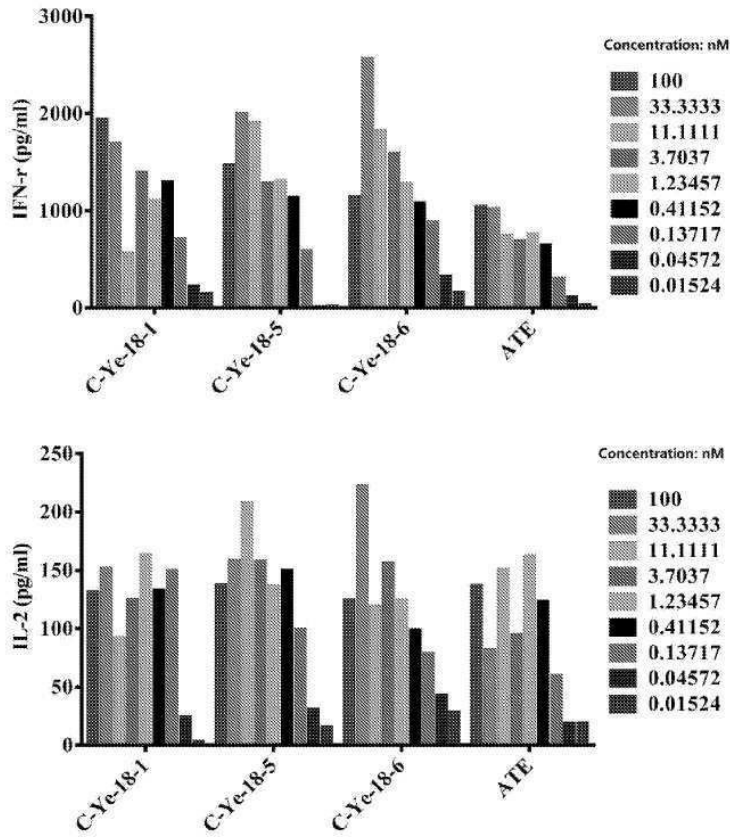
도면2



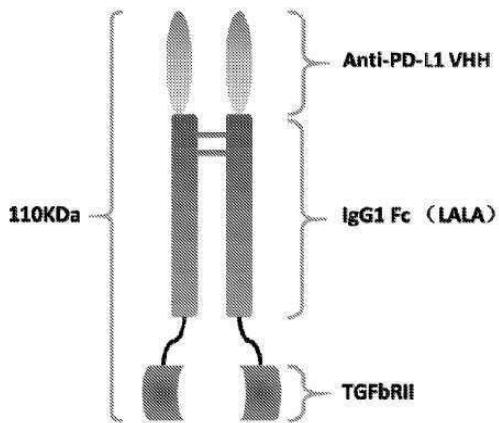
도면3



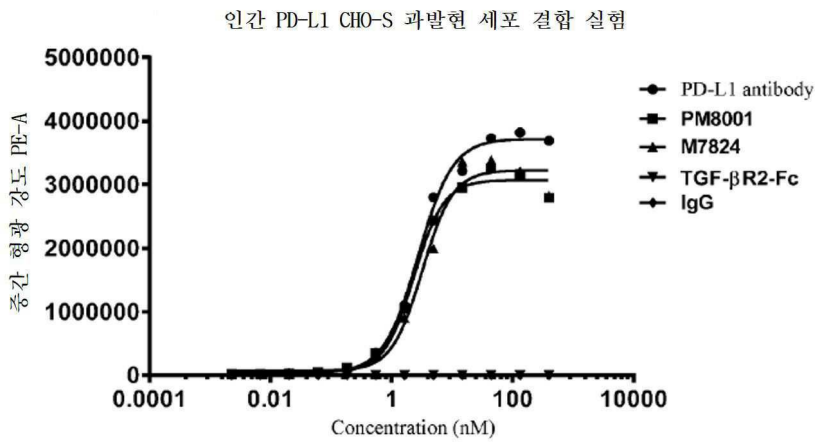
도면4



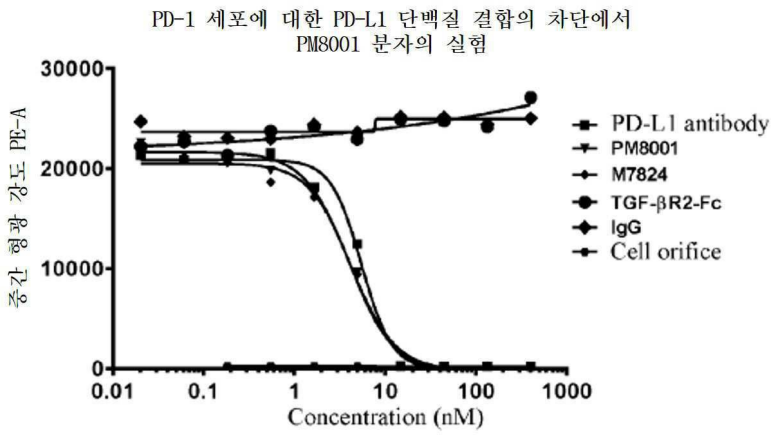
도면5



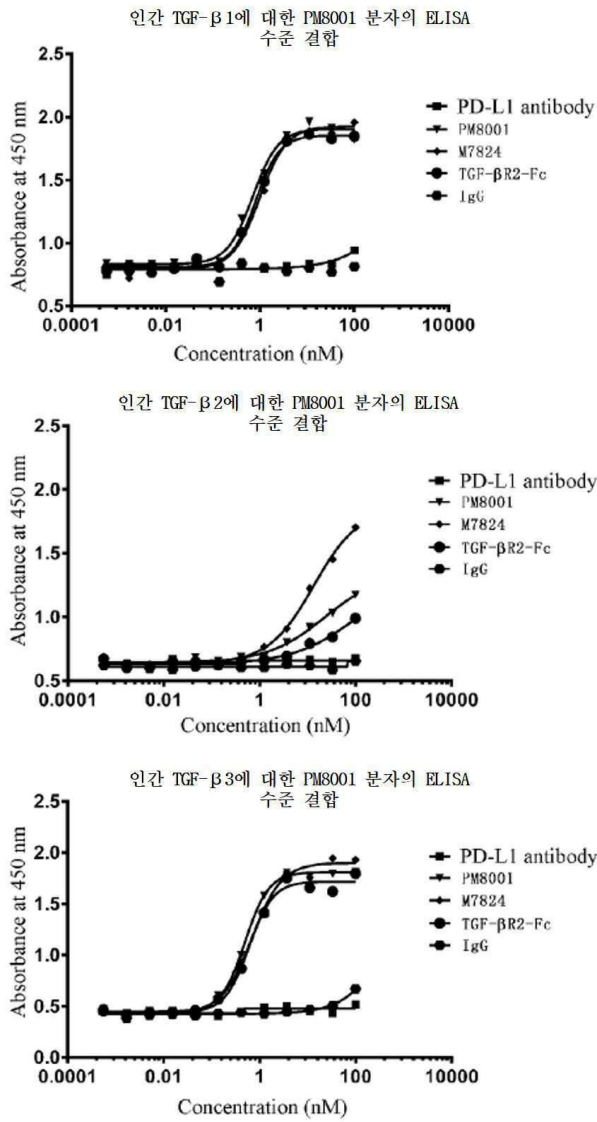
도면6



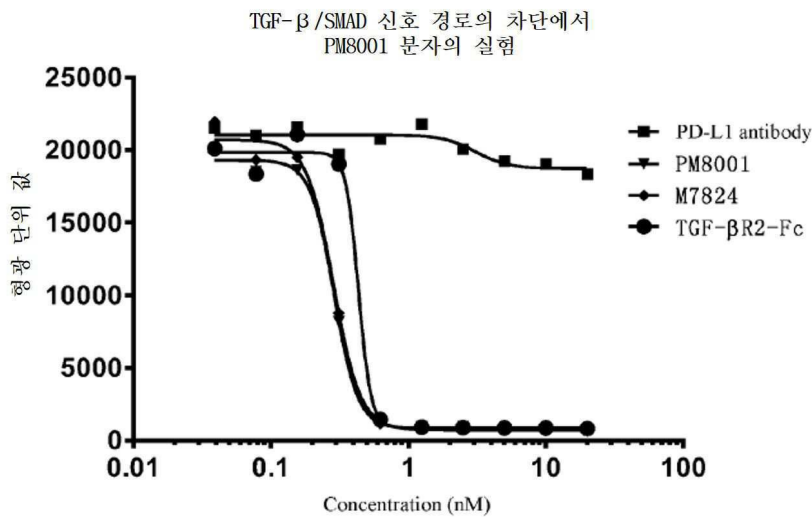
도면7



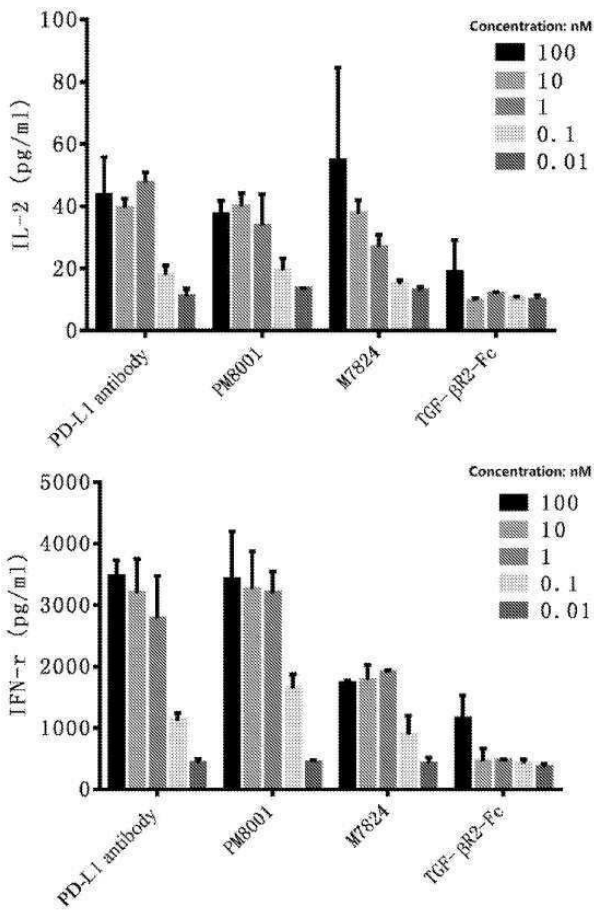
도면8



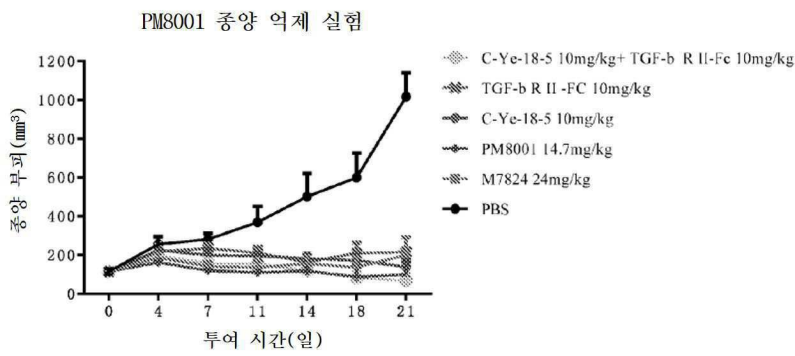
도면9



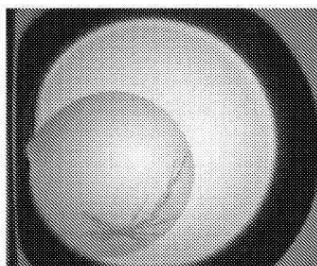
도면10



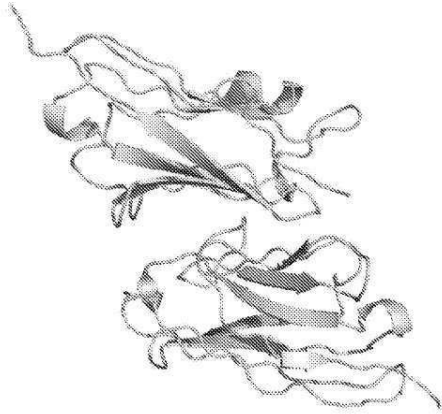
도면11



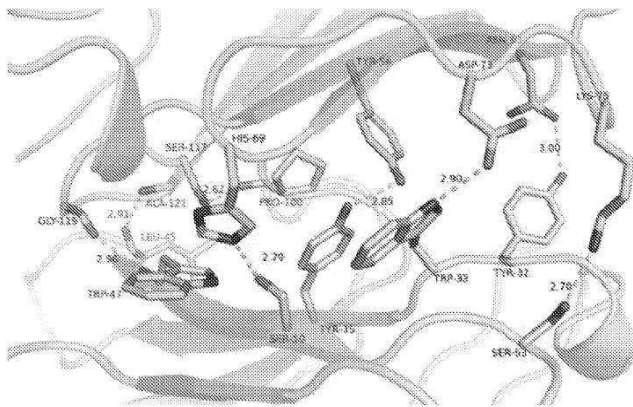
도면12



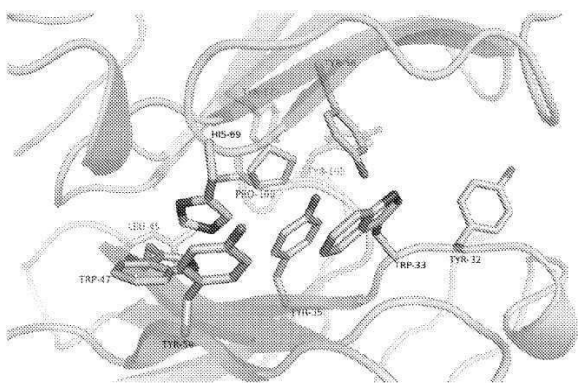
도면13



도면14

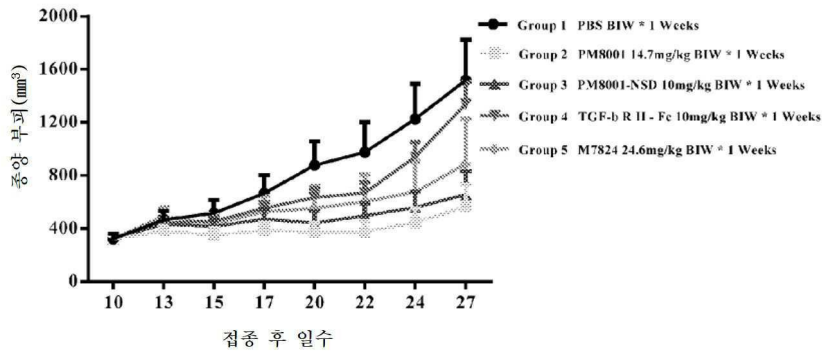


도면15



도면16

h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스에서 h-PD-L1 KI MC38의  
종양 부피에 대한 PM8001의 영향



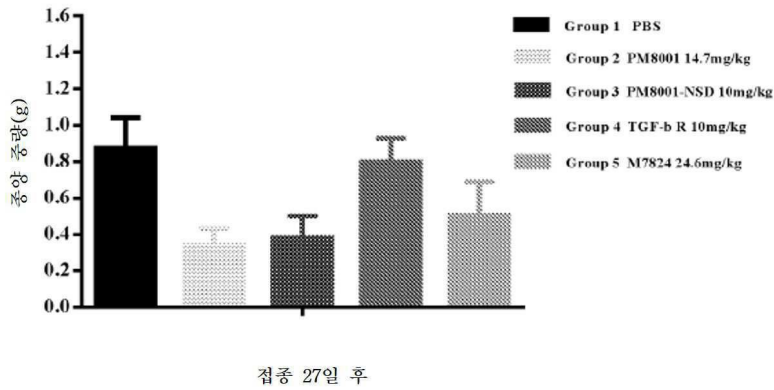
도면17

小鼠肿瘤记录表 The record of mice tumor picture

项目名称 Experiment title	Study on the growth inhibition effect of PM8001 on an hPD-L1 E1 MC38 model inoculated mice model in h-PD-L1 KI C57BL/6 mice					项目编号 Project ID	PM8001
仪器设备 Equipment	Ophthalmic sections Ophthalmic forceps				实验日期 Experiment date		20191114
组别 Group	1	2	3	4	5	6	
Group 1: PBS							
Group 2: PM8001- 14.7mg/kg							
Group 3: PM8001- NSD- 10mg/kg							
Group 4: PM8001- TGF-β- 10mg/kg							
Group 5: M7824- 24.6mg/kg							

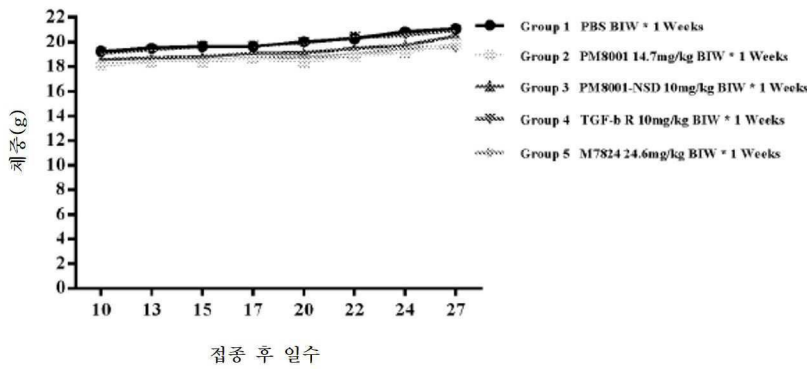
도면18

h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스에서 h-PD-L1 KI MC38의 종양 증량에 대한 PM8001의 영향



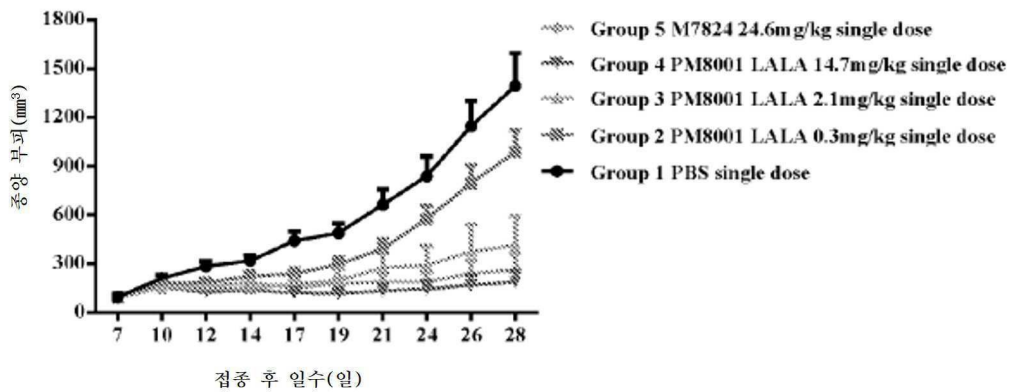
도면19

h-PD-L1 KI MC38이 접종된 h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스의 체중에 대한 PM8001의 영향



도면20

h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스에서 h-PD-L1 KI MC38 종양 세포의 종양 성장에 대한 PM8001 및 M7824의 영향

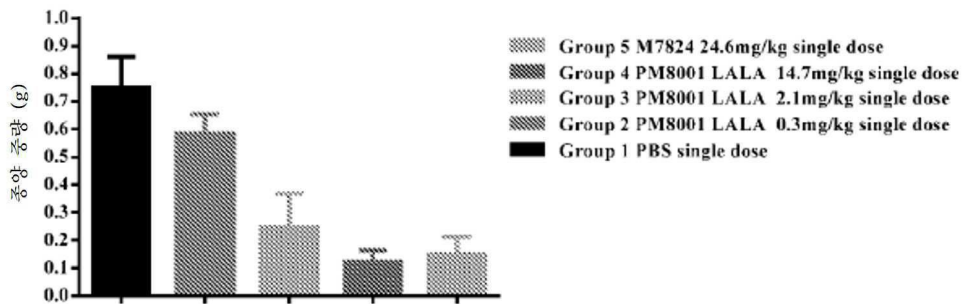


도면21

小鼠肿瘤拍照记录表 The record of mice tumor picture						
项目名称 Experiment title	Study on the growth inhibition effect of PM8001 on an h-PD-L1 KI MC38 model inoculated subcutaneously in h-PD-L1 KI C57BL/6 mice				项目编号 Project ID	PM8001
仪器设备 Equipment	Ophthalmic sensors Ophthalmic forceps				实验日期 Experiment date	20191129
组别 Group	1	2	3	4	5	6
Group 1: PBS						
Group 2: PM8001- LaLa- 0.3mg/kg						
Group 3: PM8001- LaLa- 2.1mg/kg						Tumor free
Group 4: PM8001- LaLa- 14.7mg/kg						Tumor free
Group 5: M7824- 24.6mg/kg						Tumor free

도면22

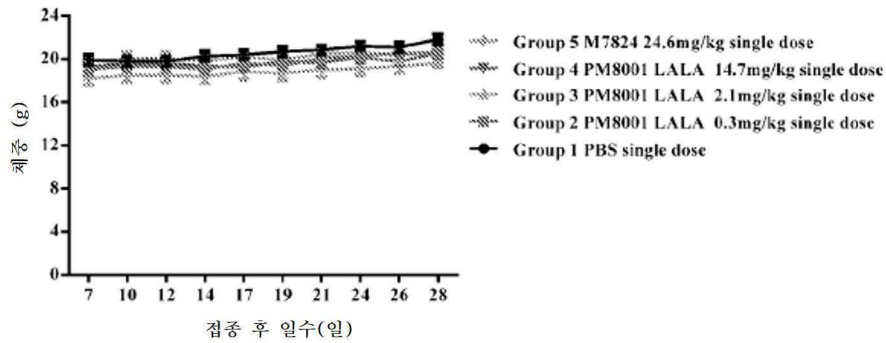
h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스에서 h-PD-L1 KI MC38 종양 세포의 종양 중량에 대한 PM8001 및 M7824의 영향



집종 28일 후

도면23

h-PD-L1 KI MC38 종양 세포가 접종된 h-PD-L1 KI C57BL/6 마우스의 체중에 대한 PM8001 및 M7824의 영향



서열목록

- <110> Biotheus Inc.
- <120> ANTI-PD-L1 SINGLE-DOMAIN ANTIBODY AND DERIVATIVES AND USE THEREOF
- <130> IEC220055PKR
- <150> CN201910863109.0
- <151> 2019-09-12
- <160> 111
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> artificial sequence
- <400> 1
- Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> artificial sequence
- <400> 2
- Ser Ile Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
- 1 5 10 15
- Gly
- <210> 3

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 3  
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala

1 5

<210> 4  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<400> 4

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

1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 5  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<400> 5

gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggagc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc

60

tctgtgcag ccctcggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct cgcgcaggct 120  
 ccaggaagg ggctcagtg ggtctcatct attaatagta gtagtagtag cacatactat 180  
 cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cagcgtgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300

ggtgggtacg ccaagggcca ggggaccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 6

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 7

Ser Ile Asn Thr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212>  
 > PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 8

Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 9

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

Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 10

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc            60  
 tcctgtgcag ccctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct ccgtcaggct            120  
 ccaggaagg ggctcgagt ggtctcatct attaatacta gtagtagtag cacatactat            180  
 cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat            240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct            300  
 ggtgggtacg ccaaaggcca ggggaccag gtcaccgtct ccagt                            345

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 11

Gly Arg Thr Phe Asn Asn Ser Ala Met Gly Ala Met Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 12

Thr Ile Thr Trp Ser Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Asn Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

Phe

<210> 14

<211> 127

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60



1                    5                    10                    15

Gly

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 18

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

Phe

<210> 19  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 19

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

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

20                    25                    30

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

Glu Phe Val Ala Thr Ile Thr Trp Ser Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala  
 50                    55                    60

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Lys Leu Gly Gly Val Val Thr Val Val Thr  
 100                    105                    110

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

115 120 125

<210> 20

<211> 381

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 20

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg caccttcgat aactatgccca tgggcgccat gggatggttc 120

cgccaggcgc cagggaaaga gcgtgagttt gtcgcgacaa ttacctggag tagtggtagc 180

tcattttatg caaactccgt gaagggccga ttaccatct ccagagacaa cgccaagaac 240

acggtgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa cctgacgaca cggccgttta ttactgtgca 300

tcacgcaaat tgggaggggt tgtaacggta gttacttcgt atgacttctg gggccagggg 360

accaggtca ccgtctccag t 381

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 21

Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Val Gly

1 5 10

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 23  
 Ala Ala Asp Tyr Arg Ser Asn Ser Thr Trp Ser Leu Gln Ser Pro Ala  
 1 5 10 15

Arg Tyr Glu Asn  
 20

<210> 24

<211> 127

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 24

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

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

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

Gly Arg Leu Thr 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 Ala 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 Tyr Arg Ser Asn Ser Thr Trp Ser Leu Gln Ser Pro Ala

100 105 110

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

115 120 125

<210> 25

<211> 381

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400>

> 25

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggactc tctgggactc

60

tctgtacag ccctctggacg caccttcagt acctatgccg tggggtggtt cgccaggct 120  
 ccagggaagg ggcgtgaatt tgtaggacgt cttacatgga gcgggagtag aacatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acggccgttt attactgtgc agccgactac 300  
 cgaagtaaca gtacctggtc cctgcaaagc ccggcacgtt atgaaaattg gggccagggg 360  
 acccaggtca ccgtctccag t 381

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 26

Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr Ala Met Gly

1 5 10

<210> 27  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 27

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

1 5 10 15

Gly

<210> 28  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 28

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu

1 5 10 15

Tyr Glu Asn

<210> 29  
 <211> 126

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu

100 105 110

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

115 120 125

<210> 30

<211> 378

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 30

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgtag ccctcggacg caccgtcagt aactatgcca tgggctggtt cgccaggct 120

ccaggaagg agcgtgagtt tgtagcacgg attaccggga gtggtagtag cacattctat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagaaaca acttgtcgaa cacggtgtat 240

ctgcagatga acagcctgaa acgtgaggac acggccgttt attactgtgc agcagatcgc 300

tggcgttcaa tggtgactag atctgaccgg agggagtatg agaactgggg ccaggggacc 360

caggtcaccg tcctccagt 378

<210> 31

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 31  
 Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr Ala Met Gly

1 5 10

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 32

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

1 5 10 15

Gly

<210> 33  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 33

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu

1 5 10 15

Tyr Glu Asn

<210> 34  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu  
 100 105 110  
 Tyr Glu Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 35

<211> 378

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 35

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggacg caccgtcagt aactatgcca tgggctggtt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcacgg attaccggga gtggtagtag cacattctat 180

gcagactccg tgaaggcct attcaccatc tccagaaca acttgtcga cagcgtgtat 240  
 ctgcagatga acagcctgaa acgtgaggac acggccgttt attactgtgc agcagatcgc 300  
 tggcgttcaa tggtagtag atctgacccg agggagtatg agaactgggg ccaggggacc 360  
 caggtcaccg tctccagt 378

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 36

Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr Ala Met Gly  
 1 5 10

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 37

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

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 38

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Tyr Pro Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Tyr Glu Asn

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 39

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

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

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Tyr Pro Arg Glu  
 100 105 110

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

- <210> 40
- <211> 378
- <212> DNA
- <213> artificial sequence
- <400> 40

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggacg caccgtcagt aactatgcca tgggctggtt cgccaggct 120  
 ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcacgg attaccgga gtggtagtag cacattctat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cgcggtgat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcagatcgc 300  
 tggcgttcaa tggtagtag atcttaccg agggagtatg agaactgggg ccaggggacc 360  
 caggtcaccg tctccagt 378

- <210> 41
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> artificial sequence
- <400> 41

Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr Ala Met Gly  
 1 5 10

- <210> 42
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> artificial sequence
- <400> 42

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

Gly

<210> 43  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 43

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu

1 5 10 15  
 Tyr Glu Asn

<210> 44  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 44

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

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Glu  
 100 105 110

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

115 120 125  
 <210> 45

<211> 378  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 45  
 caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggt gtggtgcagg ctggggactc tctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggacg caccgtcagt aactatgcca tgggctggtt cegccaggct 120  
 ccaggaagg agcgtgagtt tgtagcacgg attaccggga gtggtcgtac cacatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagaaca acttgcgaa cacggtgtat 240  
 ctgcagatga acagcctgaa acgtgaggac acggccgttt attactgtgc agcagatcgc 300  
  
 tggcgttcaa tggtgactag atctgaccgc agggagtatg agaactgggg ccaggggacc 360  
 caggtcaccg tctccagt 378

<210> 46  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 46  
 Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr Ala Met Gly  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 47  
 Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly  
  
 <210> 48  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 48  
 Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Asp

1                    5                    10                    15  
 Tyr Glu Asn  
 <210> 49  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 49  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Val Ser Asn Tyr

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

Ala Ala Asp Arg Trp Arg Ser Met Val Thr Arg Ser Asp Pro Arg Asp  
 100                    105                    110  
 Tyr Glu Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115                    120                    125

<210> 50  
 <211> 378  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 50

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggacg caccgtcagt aactatgcca tgggctggtt cegccagget 120  
 ccaggaagg agcgtgagtt ttagcacgg attaccggga gtggtagtag cacattctat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagaaaca acttgtcgaa cacgggtgat 240  
 ctgcagatga acagcctgaa acgtgaggac acggccgttt attactgtgc agcagatcgc 300  
 tggcgttcaa tggtgactag atctgaccgc agggattatg agaactgggg ccaggggacc 360  
 caggtcaccg tctccagt 378

<210> 51  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 51

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

<210> 52  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 52

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

Gly  
 <210> 53  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 53

Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 54  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 54

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr Trp  
                   100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 55

<211> 366

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 55

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt aggtatgccg tgggctggtt ccgccaggct 120

ccagggctgg ggcgtgactt tgtagcagct attacctgga gtggtggtta cacatactat 180

gcggactccg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240

ttgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agtcgatacg 300

aggaatgtaa tcggccaag agcgggagac tactggggcc aggggaccca ggtcaccgtc 360

tccagt 366

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 56

Gly Ser Thr Phe Ser Arg Tyr Ala Val Gly

1 5 10  
 <210> 57  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 57

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

1 5 10 15  
 Gly

<210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 58

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

1 5 10 15  
 <210> 59  
 <211> 122  
 <212>  
 > PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 59

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

1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Leu Gly Arg Asp Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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



Gly

<210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 63

Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 64  
 <211> 122  
 <212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 64

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

Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Leu Gly Arg Asp Phe Val  
 35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Val Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65  
 <211> 366

<212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 65  
 caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt aggtatgccg tgggctggtt cgccaggct 120  
 ccagggctgg ggcgtgactt tgtagcagct attacctgga gtggtggtta cacatactat 180  
 gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgatctat 240  
 ctccaatga acagcctgaa cgttgaggac acgggcgttt attactgcgc agtcgatagc 300

aggaatgtaa tcggccaag agcgggagac tactggggcc aggggacca ggtcacgctc 360  
 tccagt 366

<210> 66  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 66

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Arg Phe Ala Met Gly

1 5 10

<210> 67  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 67

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

1 5 10 15

Gly

<210> 68  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 69  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Arg Phe  
 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 Met Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr Trp

100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 70  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 70

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggacg cactttcagt aggtttgccca tgggctggtt cegccagget 120  
 ccaggaagg agcgtgagtt tgtagccgct attagctgga gtggtggtat gatatactat 180  
 acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa catgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agtcgatagc 300  
 aggaatgtaa tcggccaag agcgggagac tactggggcc aggggacca ggtcacctgc 360

tccagt 366

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 71

Gly Arg Ala Phe Ser Val Tyr Pro Met Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 72

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

1 5 10 15

<210> 73

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 73

Ala Val Glu Asn Arg Ser Ser Ser Trp Ser Leu Gln Ser Pro Ala Arg

1 5 10 15

Tyr Asp Asp

<210> 74

<211> 125

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95  
 Val Glu Asn Arg Ser Ser Ser Trp Ser Leu Gln Ser Pro Ala Arg Tyr  
 100 105 110  
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 75

<211> 375

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 75

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcatgtacag cctctggacg cgccttcagt gtctaccca tggcctggtt ccgccaggct 120

ccaggaagg agcgtgagtt tatagcacgt cttacgtata ctagtaacac attctatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240

cagatgaaca gctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt actgtgcggt cgagaaccgc 300

agtagtagtt ggicctcgca aagcccggca cgttatgatg actggggcca ggggaccag 360

gtcaccgtct ccagt 375

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 76

Gly Arg Thr Gly Ser Arg Tyr Ala Val Gly

1 5 10

<210> 77

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 77  
 Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 78  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 78  
 Ala Val Asp Thr Arg Asn Val Ile Gly Pro Arg Ala Gly Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 79  
 <211> 122  
 <212>  
 > PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 79

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

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 80

<211> 366

<212> DNA

<

213> artificial sequence

<400> 80

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg caccggcagt aggtatgccg tgggctggtt cgcaccaggct 120

ccagggctgg ggcgtgactt tgtagcagct attacctgga gtggtggtta cacatactat 180

gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgatgtat 240

ctgcaaatga acagcctaaa acctgaagac acggccgttt attactgtgc agtcgatacg 300

aggaatgtaa tcggccaag agcgggagac tactggggcc aggggaccca ggtcacctgc 360

tccagt 366

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 81

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

1 5 10 15

Gly

<210> 82

<211> 115

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 82

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95  
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 83

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 83

gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattgct ccgtcaggct 120

ccaggaagg ggctcgagtg ggtctcatct attaatagtg gtagtagtag cacatactat 180

cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300

ggtgggtacg ccaaaggcca ggggaccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 84

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

1 5 10 15

Gly

<210> 85  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213>  
 > artificial sequence  
 <400> 85  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60

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

<210> 86  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 86  
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60  
 tctctgagcag ccctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct cegtcaggct 120  
 ccaggaagg ggctcgagtg ggtctcatct attagtagta gtagtagtag cacatactat 180  
 cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300  
 ggtgggtacg ccaaaggcca ggggaccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 87  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 87

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

1 5 10 15  
 Gly

<210> 88  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 88

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

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

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

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

Val Ser Ser

115  
 <210> 89  
 <211> 345

<212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 89  
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct ccgtcaggct 120  
 ccaggaagg ggcctcagtg ggtctcatct attggtagta gtagtagtag cacatactat 180  
 cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300  
 ggtgggtacg ccaaaggcca ggggacccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 90  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 90  
 Ser Ile Tyr Ser Gly Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 91  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 91  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 92

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 92

gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct ccgtcaggct 120  
 ccaggaagg ggctcgagtg ggtctcatct atttacagtg gtagtagtag cacatactat 180  
 cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300

ggtgggtacg ccaaaggcca ggggacccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 93

Ser Ile Asn Asn Ser Asp Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 94

<211> 115

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 94

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

                  65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

                  100                    105                    110

Val Ser Ser

                  115

<210> 95

<211> 345

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 95

gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattgget cegtcaggct 120

ccaggaagg ggctcgagtg ggtctcatct attaatagtg acagtagtag cacatactat 180

cgagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cagcgtgtat 240

ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300

ggtgggtacg ccaaaggcca ggggaccag gtcaccgtct ccagt 345

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 96

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

1                    5                    10                    15  
 Gly

<210> 97  
 <211> 115  
 <212> PRT

<213  
 > artificial sequence

<400> 97  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                    25                    30  
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
                   50                    55                    60

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

115  
 <210> 98  
 <211> 345  
 <212> DNA

<213> artificial sequence  
 <400> 98

gaggtgcagc tgcaggagtc tggaggagc ttggtgcagc ctggggggtc tctgcgactc 60

tctctgtcag ccctctggatt caccttcagt agctactgga tgtattggct ccgtcaggct 120

ccaggaagg ggctcgagtg ggtctcatct attagtggta gtagtagtag cacatactat 180

cgagactccg tgaagggccg attcacatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatcct 300  
 ggtgggtacg ccaaaggcca ggggacccag gtcaccgtct ccagt 345

- <210> 99
- <211> 226
- <212> PRT
- <213> artificial sequence
- <400> 99

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

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

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

145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly  
 225

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 100

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> 101  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 101

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> 102  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence  
 <400> 102  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
   1                  5                  10                  15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
                   20                  25                  30  
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                  40                  45  
 Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
                   50                  55                  60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
   65                  70                  75                  80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
                   100                  105                  110  
 Val Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
                   115                  120                  125  
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
                   130                  135                  140  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
   145                  150                  155                  160  
  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly



420 425 430  
 Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His  
 435 440 445

Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu  
 450 455 460  
 Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp  
 465 470 475 480  
 Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn  
 485 490 495  
 Pro Asp

<210> 103  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 103  
 gtcttgctg ctcttctaca agg 23

<210> 104  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 104  
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 105  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
 <400> 105  
 ctagtgcggc cgcttgaga cggtagcctg ggt 33

<210> 106  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<400> 106  
 cgcgatccc aggtgcagct gcaggagtct ggrggagg 38

<210> 107

<211> 89  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<400> 107  
 atttttactg ctgttttatt cgcagcatcc tccgcattag ctaaagaga ggctgaagca 60  
 caggtgcagc tgcaggagtc tggrggagg 89

<210> 108  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<400> 108  
 agttgtcagt tctgtgccc cccctcctcc cgcgccact ccgccgcac ctccgccacc 60  
 actggagacg gtgacctggg t 81

<210> 109  
 <211> 123  
 <212>  
 > PRT  
 <213> artificial sequence

<400> 109  
 Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile  
 35 40 45  
 Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr  
 50 55 60  
 Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg

85 90 95  
 Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys  
 100 105 110  
 Val Asn Ala Pro Tyr His His His His His His  
 115 120  
 <210> 110  
 <211> 341  
 <212> PRT  
  
 <213> artificial sequence  
 <400> 110  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 115 120 125  
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
  
 130 135 140  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 145 150 155 160  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 165 170 175

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 195 200 205

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 210 215 220

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 225 230 235 240

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 245 250 255

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 260 265 270

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 275 280 285

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 290 295 300

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 305 310 315 320

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 325 330 335

Ser Leu Ser Pro Gly  
 340

<210> 111

<211> 117

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 111

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

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

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

