



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월22일  
(11) 등록번호 10-1831123  
(24) 등록일자 2018년02월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7006630  
(22) 출원일자(국제) 2015년10월23일  
심사청구일자 2017년07월26일  
(85) 번역문제출일자 2017년03월09일  
(65) 공개번호 10-2017-0070002  
(43) 공개일자 2017년06월21일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/057223  
(87) 국제공개번호 WO 2016/065323  
국제공개일자 2016년04월28일
- (30) 우선권주장  
62/067,908 2014년10월23일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
W02010033913 A1
- (73) 특허권자  
싱 바이오테크놀로지, 엘엘씨  
미국, 플로리다 34667, 허드슨, 스위트 101, 요세  
미트 드라이브 14153
- (72) 발명자  
싱 수난다  
미국, 플로리다 33558, 루츠, 루에 보르데옥스  
4708
- (74) 대리인  
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 2 항

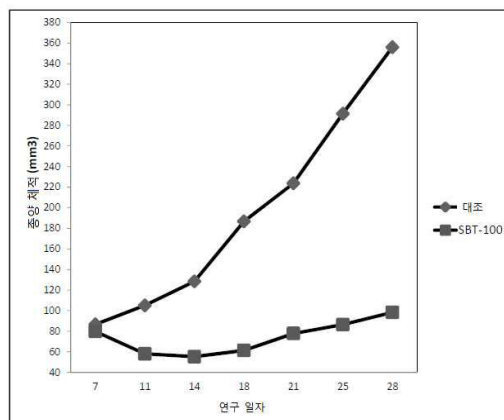
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 세포내 항원에 대해 지향된 단일 도메인 항체

(57) 요약

본 발명은 외인성 표적화 서열 또는 화학적 조성물의 이용 없이, 장애 또는 질환을 치료하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 장애 또는 질환을 유발하는 세포내 성분에 대해 지향되는 단일-도메인 항체(sdAb), 그리고 이들 sdAb를 포함하는 단백질 및 폴리펩티드에 관계한다. 본 발명은 또한, sdAb를 인코딩하는 핵산, sdAb를 포함하는 단백질 및 폴리펩티드, 그리고 sdAb를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명은 예방적, 치료적 또는 진단적 목적을 위한 이들 조성물, sdAb, 그리고 이들 sdAb를 인코딩하는 핵산의 용도를 포함한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

*A61K 39/39558* (2013.01)  
*A61K 45/06* (2013.01)  
*C07K 16/241* (2013.01)  
*C07K 16/30* (2013.01)  
*C07K 16/32* (2013.01)  
*G01N 33/574* (2013.01)  
*G01N 33/6872* (2013.01)  
*G01N 33/6893* (2013.01)  
*C07K 2317/569* (2013.01)

(30) 우선권주장

|            |             |        |
|------------|-------------|--------|
| 62/148,656 | 2015년04월16일 | 미국(US) |
| 62/188,353 | 2015년07월02일 | 미국(US) |
| 62/210,795 | 2015년08월27일 | 미국(US) |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

항-STAT3 단일 도메인 항체 (sdAb), 여기서 상기 항-STAT3 sdAb는 서열 번호:3에서 진술된 아미노산 서열을 포함함.

#### 청구항 2

서열 번호:3에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드.

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

## 청구항 47

삭제

## 청구항 48

삭제

## 청구항 49

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 국제 특허 출원은 2014년 10월 23일자 제출된 미국 특허가출원 번호 62/067,908, 2015년 4월 16일자 제출된 미국 특허가출원 번호 62/148,656, 2015년 7월 2일자 제출된 미국 특허가출원 번호 62/188,353, 그리고 2015년 8월 27일자 제출된 미국 특허가출원 번호 62/210,795에 우선권을 주장하고, 이들의 내용은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 전자 형식으로 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2015년 9월 30일자 창출되고 2015년 10월 22일자 최종 변경된, "Sequence\_Listing\_STP25.txt"라는 표제의 파일로서 제공되는데, 이것은 83,000 바이트 크기이다. 전자 형식의 서열 목록 내에 정보는 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.

### 배경 기술

[0005] 배경

[0006] 더욱 큰 단백질 또는 폴리펩티드에서 단일 항원 결합 단백질로서 또는 항원 결합 도메인으로서 단일-도메인 항체 (sdAb)의 이용은 전통적인 항체 또는 항체 단편의 이용에 비하여 다수의 유의미한 이점을 제공한다. sdAb의 이점은 다음을 포함한다: 높은 친화성 및 높은 선택성으로 항원에 결합하는데 단지 단일 도메인만 필요하다; sdAb는 단일 유전자로부터 발현될 수 있고 번역후 변형을 필요로 하지 않는다; sdAb는 열, pH, 프로테아제 및 다른 변성 작용제 또는 조건에 고도로 안정하다; sdAb는 제조 비용이 저렴하다; 그리고 sdAb는 전통적인 항체가 접근할 수 없는 표적 및 에피토프에 접근할 수 있다.

[0007] 일탈적 세포내 또는 막경유 성분, 예를 들면, 뉴클레오티드 및 단백질에 의해 유발되는 다수의 질환 또는 장애, 예를 들면, 암이 있다. 일탈적 성분의 제거가 이들 질환 또는 장애를 예방하거나 치료하는데 이용될 수 있다. 치료에 가용한 다수의 약리학적 화합물이 있지만, 이들 화합물은 영향을 받지 않은 세포에 무효하거나, 전달불가능하거나, 또는 독성일 수 있다.

[0008] 다른 치료법은 치료적 작용제가 세포막에서 수용체에 의해 인식되어, 치료적 작용제가 세포막을 횡단하고 세포에 들어갈 수 있도록, 외인성 표적화 서열을 내포하는 치료적 단백질 또는 작용제의 이용을 포함한다. 일단 치료적 작용제가 세포 내부에 있게 되면, 치료적 작용제는 질환을 치료하기 위해 표적 성분과 상호작용할 수 있다. 하지만, 외인성 표적화 서열의 이용은 치료적 작용제에 의해 표적화되는 세포 유형을 제한할 수 있고, 그리고 치료적 작용제를 제조하는 비용을 가중시킨다.

[0009] 전술한 이유로 인해, 세포에 들어가기 위해 외인성 표적화 서열 또는 화학적 조성물에 의존하지 않고, 그리고 체내에서 영향을 받은 세포만을 표적으로 하는데 효과적인, 질환을 치료하거나 예방하는 조성물 및 방법이 요구된다.

[0010] 본 발명은 단일-도메인 항체 (sdAb), 그리고 sdAb를 포함하는 단백질 및 폴리펩티드에 관계한다. 이들 sdAb는 장애 또는 질환을 유발하는 세포내 성분에 대해 지향된다. 본 발명은 또한, sdAb를 인코딩하는 핵산, sdAb를 포함하는 단백질 및 폴리펩티드, 그리고 sdAb를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명은 예방적, 치료적 또는 진단적 목적을 위한 이들 조성물, sdAb, 단백질 또는 폴리펩티드의 이용을 포함한다. 본 발명은 또한, 본 발명의

sdAb에 지향된 단일클론 항체의 이용을 포함한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 요약
- [0012] 본 발명의 한 구체예는 세포내 성분에 대해 지향된 단일-도메인 항체 (sdAb)이다. 세포내 성분은 예로서, 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, TNF-알파, 그리고 KRAS일 수 있다.
- [0013] 다른 구체예에서, 본 발명은 항-STAT3 sdAb에 관계한다. 임의선택적으로, 항-STAT3 sdAb는 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0014] 다른 구체예에서, 본 발명은 항-STAT sdAb를 인코딩하는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드, 예를 들면, 예로서, 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 폴리펩티드에 관계한다.
- [0015] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 숙주 세포에 관계하고, 그리고 상기 숙주 세포는 sdAb의 아미노산 서열, 예를 들면, 예로서, 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산을 발현한다.
- [0016] 본 발명의 한 구체예는 sdAb, 또는 폴리펩티드, 그리고 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 조성물이다. 임의선택적으로, sdAb는 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 항-STAT3 sdAb를 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 다른 구체예는 개체에서 STAT3에 의해 매개된 장애를 진단하는 방법인데, 상기 방법은 a) 생물학적 표본을 sdAb, 또는 폴리펩티드와 접촉시키고; b) 생물학적 표본에서 STAT3의 양을 결정하고; 그리고 c) 단계 (b)에서 결정된 양을 표준과 비교하는 단계를 포함하고, 양에서 차이는 장애의 존재를 지시한다.
- [0018] 본 발명의 다른 구체예는 STAT3에 의해 매개된 질환 또는 장애를 예방하거나 치료하고, 또는 이런 질환의 재발을 예방하고, 또는 암, 또는 비정상적인 세포 증식에 의해 유발된 질환의 치료에서 이용을 위한 방법이고, 상기 방법은 항-STAT3 sdAb, 또는 폴리펩티드를 치료가 필요한 개체에 투여하는 것을 포함한다. 임의선택적으로, sdAb는 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 항-STAT3 sdAb를 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호:3 또는 서열 번호:4에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 한 구체예는 항-TNF-알파 sdAb이다. 임의선택적으로, 항-TNF-알파 sdAb는 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명은 또한, 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예는 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 발현하는 숙주 세포이다.
- [0021] 다른 구체예에서, 본 발명은 또한, sdAb 또는 폴리펩티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 조성물이다. 임의선택적으로, sdAb는 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF-알파 sdAb를 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 다른 구체예는 개체에서 TNF-알파에 의해 매개된 장애를 진단하는 방법인데, 상기 방법은 a) 생물학적 표본을 sdAb 또는 폴리펩티드와 접촉시키고; b) 생물학적 표본에서 TNF-알파의 양을 결정하고; 그리고 c) 단계 (b)에서 결정된 양을 표준과 비교하는 단계를 포함하고, 양에서 차이는 장애의 존재를 지시한다.
- [0023] 한 구체예에서, 본 발명은 TNF-알파에 의해 매개된 질환 또는 장애 또는 이런 질환 또는 장애의 재발을 예방하거나 치료하고, 또는 암, 또는 비정상적인 세포 증식에 의해 유발된 질환의 치료에서 이용을 위한 방법을 설명하고, 상기 방법은 항-TNF-알파 sdAb, 또는 폴리펩티드를 치료가 필요한 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 임의선택적으로, 항-TNF-알파 sdAb는 서열 번호:5, 서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드를 포함하고, 상기 단리된 폴리펩티드는 서열 번호:5,

서열 번호:6 또는 서열 번호:7에서 진술된 아미노산 서열을 포함한다.

- [0024] 본 발명의 한 구체예는 항-KRAS sdAb이다. 임의선택적으로, 항-KRAS sdAb는 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 포함한다. 한 양상에서, 본 발명은 단리된 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 단리된 폴리펩티드는 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 양상에서, 본 발명은 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 발현하는 숙주 세포를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 다른 구체예는 sdAb 또는 폴리펩티드, 그리고 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 조성물이다. 임의선택적으로, sdAb는 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 항-KRAS sdAb를 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 추가 구체예는 개체에서 KRAS에 의해 매개된 장애를 진단하는 방법인데, 상기 방법은 a) 생물학적 표본을 sdAb 또는 폴리펩티드와 접촉시키고; b) 상기 생물학적 표본에서 KRAS의 양을 결정하고; 그리고 c) 단계 (b)에서 결정된 양을 표준과 비교하는 단계를 포함하고, 양에서 차이는 장애의 존재를 지시한다. 임의선택적으로, sdAb는 서열 번호: 2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 항-KRAS sdAb를 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호:2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 항-KRAS sdAb를 이용하여 질환을 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 항-KRAS sdAb의 효과량을 치료가 필요한 개체에 투여하는 것을 포함한다.
- [0028] 한 구체예에서, 본 발명은 KRAS에 의해 매개된 질환 또는 장애, 또는 이런 질환 또는 장애의 재발을 예방하거나 치료하고, 또는 암, 또는 비정상적인 세포 증식에 의해 유발된 질환의 치료에서 이용을 위한 방법을 설명하고, 상기 방법은 항-KRAS sdAb 또는 폴리펩티드를 치료가 필요한 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 임의선택적으로, 항-KRAS sdAb는 서열 번호: 2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하고, 그리고 상기 폴리펩티드는 서열 번호: 2에서 진술된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0029] 한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 sdAb를 투여하는 방법을 설명하고, 상기 방법은 정맥내 투여, 근육내 투여, 경구 투여, 직장 투여, 경장 투여, 비경구 투여, 안구내 투여, 피하 투여, 경피 투여, 안약으로서 투여, 비강 스프레이로서 투여, 흡입 또는 분무에 의한 투여, 국소 투여, 그리고 이식가능한 약물로서 투여를 포함한다.
- [0030] 다른 구체예에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 화합물과 합동으로 본 발명의 sdAb를 이용하여, 질환을 치료하거나, 질환을 예방하거나 또는 질환의 재발을 예방하는 방법을 설명한다. 임의선택적으로, 하나 또는 그 이상의 화합물은 전사 저해제이다.
- [0031] 다른 구체예에서, 본 발명은 sdAb의 수준을 측정하는 방법을 설명하고, 상기 방법은 a) sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향된 생쥐 단일클론 항체를 산출하고; b) 개체에서 sdAb의 양을 결정하기 위한 면역검정을 수행하고; 그리고 c) 개체에서 sdAb의 양을 정량하는 단계를 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0032] 도면
- 본 발명의 이런 저런 특징, 양상, 그리고 이점은 다음의 설명, 첨부된 청구항, 그리고 첨부 도면을 참조하면 더욱 잘 이해될 것인데, 여기서:
- 도면 1은 VHH13 항-STAT3 sdAb 발현 벡터 pTT21-stt VHH13의 계통도 지도이고;
- 도면 2는 VHH14 항-STAT3 sdAb 발현 벡터 pTT21-stt VHH14의 계통도 지도이고;
- 도면 3은 항-STAT3 세균 VHH13 STAT3 (서열 번호:3) 및 항-STAT3 세균 VHH14 STAT3 (서열 번호:4)을 이용한 면역침전 검정의 결과를 묘사하고;
- 도면 4는 항-STAT3 세균 VHH13 STAT3 (서열 번호:3)을 이용한 면역침전 검정의 결과를 묘사하고;
- 도면 5는 MDA-MB-231 이종이식 모형에서, 0.5mg/kg/일로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;
- 도면 6은 MDA-MB-231 이종이식 모형에서, 하루 2회 1 mg/kg 내지 하루 2회 2 mg/kg 또는 2mg/kg/일의 범위에서 변하는 용량에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 7은 MDA-MB-231 이종이식 모형에서, 하루 2회 5mg/kg으로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 8은 DU145 이종이식 모형에서, 하루 2회 5mg/kg으로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 9는 PANC-1 이종이식 모형에서, 하루 2회 5mg/kg으로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 10은 MCF-7 이종이식 모형에서, 하루 3회 1mg/kg으로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 11은 BT-474 이종이식 모형에서, 하루 3회 1mg/kg으로 투약된 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해하고;

도면 12는 U937 세포에서 TNF-알파의 세포독성을 도해하고;

도면 13은 U937 세포에서 스타우로스포린의 세포독성을 도해하고; 그리고

도면 14는 항-TNF-알파 sdAb에 의한 TNF-알파 세포독성의 저해를 도해한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 설명
- [0034] 본원에서 이용된 바와 같이, 다음의 용어 및 이들의 변이는 이런 용어가 이용되는 문맥에 의해 상이한 의미가 명확하게 의도되지 않으면, 아래에 제공된 의미를 갖는다.
- [0035] 본원에서 이용된 용어 "a," "an" 및 "the" 및 유사한 지시대상은 문맥 내에서 그들의 용법이 달리 지시하지 않으면, 단수 및 복수 둘 모두를 커버하는 것으로 해석된다.
- [0036] 용어 "항원 결정인자"는 항원 결합 분자 (가령, 본 발명의 sdAb 또는 폴리펩티드) 및 더욱 특히, 항원 결합 분자의 항원 결합 부위에 의해 인식되는 항원 상에 에피토프를 지칭한다. 용어 "항원 결정인자" 및 "에피토프"는 또한, 교체 가능하게 이용될 수 있다. 특이적 항원 결정인자, 에피토프, 항원 또는 단백질에 결합할 수 있고, 친화성을 갖고 및/또는 특이성을 갖는 아미노산 서열은 항원 결정인자, 에피토프, 항원 또는 단백질에 "대항하는" 또는 "지향된" 것으로 일컬어진다.
- [0037] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "포함한다" 및 상기 용어의 변이, 예를 들면, "포함하는" 및 "포함한다"는 다른 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0038] 본원에서 설명된 sdAb, 폴리펩티드 및 단백질은 이른바 "보존성" 아미노산 치환을 내포할 수 있는 것으로 예기 되는데, 이들은 일반적으로, 아미노산 잔기가 유사한 화학 구조의 다른 아미노산 잔기로 대체되고, 그리고 폴리펩티드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 성질에 대해 거의 영향을 주지 않거나 또는 본질적으로 영향을 주지 않는 아미노산 치환으로서 설명될 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 당분야에서 널리 공지된다. 보존성 치환은 다음의 군 (a)-(e) 내에 한 아미노산이 동일한 군 내에 다른 아미노산에 의해 치환되는 치환이다: (a) 작은 지방족, 비극성 또는 약간 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (b) 극성, 음성으로 하전된 잔기 및 이들의 (하전되지 않은) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (c) 극성, 양성으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; (d) 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val 및 Cys; 그리고 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp. 다른 보존성 치환은 Ala의 Gly 또는 Ser로의 치환; Arg의 Lys로의 치환; Asn의 Gln 또는 His로의 치환; Asp의 Glu로의 치환; Cys의 Ser로의 치환; Gln의 Asn으로 치환; Glu의 Asp로의 치환; Gly의 Ala 또는 Pro로의 치환; His의 Asn 또는 Gln으로의 치환; Ile의 Leu 또는 Val로의 치환; Leu의 Ile 또는 Val로의 치환; Lys의 Arg, Gln 또는 Glu로의 치환; Met의 Leu, Tyr 또는 Ile로의 치환; Phe의 Met, Leu 또는 Tyr로의 치환; Ser의 Thr로의 치환; Thr의 Ser로의 치환; Trp의 Tyr로의 치환; Tyr의 Trp로의 치환; 및/또는 Phe의 Val, Ile 또는 Leu로의 치환을 포함한다.
- [0039] 본원에서 이용된 바와 같이, "도메인"은 일반적으로, 항체 사슬의 구형 영역, 그리고 특히 중쇄 항체의 구형 영역, 또는 이런 구형 영역으로 본질적으로 구성되는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0040] sdAb의 아미노산 서열 및 구조는 전형적으로, 4개의 프레임워크 영역 또는 "FR"로 구성되고, 이들은 각각, "프레임워크 영역 1" 또는 "FR1"; "프레임워크 영역 2" 또는 "FR2"; "프레임워크 영역 3" 또는 "FR3"; 그리고 "프레임워크 영역 4" 또는 "FR4"로서 지칭된다. 이들 프레임워크 영역은 3개의 상보성 결정 영역 또는 "CDR"이 끼

어 들고, 이들은 각각, "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1"; "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2"; 그리고 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로서 지칭된다.

- [0041] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "인간화 sdAb"는 자연발생 VHH 서열의 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 인간으로부터 전통적인 4-사슬 항체로부터 VH 도메인 내에 상응하는 위치에서 발생하는 아미노산 잔기 중에서 하나 또는 그 이상에 의해 대체된 sdAb를 의미한다. 이것은 당분야에서 널리 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 가령, sdAb의 FR은 인간 가변 FR에 의해 대체될 수 있다.
- [0042] 본원에서 이용된 바와 같이, "단리된" 핵산 또는 아미노산은 자신이 통상적으로 연관되는 최소한 하나의 다른 성분, 예를 들면, 이의 공급원 또는 매체, 다른 핵산, 다른 단백질/폴리펩티드, 다른 생물학적 성분 또는 거대 분자 또는 오염체, 불순물 또는 마이너 성분으로부터 분리되었다.
- [0043] 용어 "포유동물"은 포유류 (Mammalia) 강 (class)에 속하는 개체로서 규정되고, 그리고 제한 없이, 인간, 가축 및 경작용 동물, 그리고 동물원, 스포츠, 그리고 애완 동물, 예를 들면, 소, 말, 양, 개 및 고양이를 포함한다.
- [0044] 본원에서 이용된 바와 같이, "제약학적으로 허용되는 담체"는 제약학적 투여와 양립성인 임의의 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연 작용제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 적합한 담체는 당해 분야에서 표준 참고 문서인 Remington's Pharmaceutical Sciences의 가장 최신판에서 설명된다. 이런 담체 또는 희석제의 바람직한 실례는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, PBS (인산염 완충된 식염수), 그리고 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 리포솜, 양이온성 지질 및 비수성 운반체, 예를 들면, 고정유 또한 이용될 수 있다. 제약학적으로 활성 물질에 대한 이런 매체와 작용제의 이용은 당분야에서 널리 공지된다. 임의의 전통적인 매체 또는 작용제가 상기 규정된 바와 같은 치료적 작용제와 양립하지 않는 경우가 아닌 한에 있어서, 본 발명의 조성물에서 이의 이용이 예기된다.
- [0045] "정량적 면역검정"은 항체를 이용함으로써, 표본 내에 존재하는 항원의 양을 측정하는 임의의 수단을 지칭한다. 정량적 면역검정을 수행하기 위한 방법은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 특정한 피분석물 표지화 및 탈환 검정 (SALRA), 액체 크로마토그래피, 질량 분광분석법, 형광-활성화된 세포 분류 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0046] 용어 "용액"은 용매 및 용질을 포함하는 조성물을 지칭하고, 그리고 참용액 및 현탁액을 포함한다. 용액의 실례는 액체에서 용해된 고체, 액체 또는 가스, 그리고 액체에서 현탁된 미립자 또는 미셀을 포함한다.
- [0047] 용어 "특이성"은 특정 항원 결합 분자 또는 항원 결합 단백질 분자가 결합할 수 있는 다수의 상이한 유형의 항원 또는 항원 결정인자를 지칭한다. 항원 결합 단백질의 특이성은 친화성 및/또는 결합능에 근거하여 결정될 수 있다. 항원 및 항원 결합 단백질의 해리에 대한 평형 상수 (KD)에 의해 표현된 친화성은 항원 결정인자 및 항원 결합 단백질 상에 항원 결합 부위 사이에 결합 강도에 대한 척도이다: KD의 값이 더욱 적을수록, 항원 결정인자 및 항원 결합 분자 사이에 결합 강도가 더욱 강하다 (대안으로, 친화성은 또한, 1/KD인 친화성 상수 (KA)로서 표현될 수 있다). 당업자에게 명백한 바와 같이, 친화성은 관심되는 특이적 항원에 따라 결정될 수 있다. 결합능은 항원 결합 분자 및 항원 사이에 결합 강도의 척도이다. 결합능은 항원 결정인자 및 항원 결합 분자 상에 이의 항원 결합 부위 사이에 친화성, 그리고 항원 결합 분자 상에 존재하는 관련 결합 부위의 숫자 둘 모두에 관련된다. 항원 또는 항원 결정인자에 항원 결합 단백질의 특이적 결합은 임의의 공지된 방식, 예를 들면, 예로서, 스캐차드 분석 및/또는 경쟁적 결합 분석, 예를 들면, 방사면역검정 (RIA), 효소 면역검정 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정에 의해 결정될 수 있다.
- [0048] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "재조합"은 본 발명의 sdAb를 생산하는데 이용된 유전공학 방법 (예로서, 클로닝, 그리고 증폭)의 이용을 지칭한다.
- [0049] "단일 도메인 항체," "sdAb" 또는 "VHH"는 일반적으로, 3개의 상보성 결정 영역이 끼어드는 4개의 프레임워크 영역으로 구성되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질로서 규정된다. 이것은 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4로서 표현된다. 본 발명의 sdAb는 또한, sdAb 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 전형적으로, sdAb는 낫다, 예를 들면, 라마에서 생산되지만, 당분야에서 널리 공지된 기술을 이용하여 합성적으로 산출될 수도 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 자연발생 중쇄 항체 내에 존재하는 가변 도메인은 또한, 전통적인 4-사슬 항체 내에 존재하는 중쇄 가변 도메인 ("VH 도메인"으로서 지칭됨)으로부터, 그리고 전통적인 4-사슬 항체 내에 존재하는 경쇄 가변 도메인 ("VL 도메인"으로서 지칭됨)으로부터 이들을 구별 짓기 위해 "VHH 도메인"으로서 지칭될 것이다. "VHH" 및 "sdAb"는 본원에서 교체가능하게 이용된다. sdAb 또는 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 넘버링은 Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological

interest," US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)에 의해 제공된 VH 도메인에 대한 일반적인 넘버링에 따른다. 이러한 넘버링에 따라, sdAb의 FR1은 위치 1-30에서 아미노산 잔기를 포함하고, sdAb의 CDR1은 위치 31-36에서 아미노산 잔기를 포함하고, sdAb의 FR2는 위치 36-49에서 아미노산을 포함하고, sdAb의 CDR2는 위치 50-65에서 아미노산 잔기를 포함하고, sdAb의 FR3은 위치 66-94에서 아미노산 잔기를 포함하고, sdAb의 CDR3은 위치 95-102에서 아미노산 잔기를 포함하고, 그리고 sdAb의 FR4는 위치 103-113에서 아미노산 잔기를 포함한다.

[0050] 용어 "합성"은 시험관내 화학적 또는 효소적 합성에 의한 생산을 지칭한다.

[0051] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "표적"은 sdAb에 의해 인식되는 임의의 성분, 항원, 또는 모이어티를 지칭한다. 용어 "세포내 표적"은 세포 내에 존재하는 임의의 성분, 항원, 또는 모이어티를 지칭한다. "막경유 표적"은 세포막 내에 위치되는 성분, 항원, 또는 모이어티이다. "세포외 표적"은 세포 외부에 위치되는 성분, 항원, 또는 모이어티를 지칭한다.

[0052] 본원에서 이용된 바와 같이, "치료 조성물"은 치료 효과를 갖는 것으로 의도되는 물질, 예를 들면, 제약학적 조성물, 유전 물질, 생물체제, 그리고 다른 물질을 의미한다. 유전 물질은 직접적인 또는 간접적인 유전자 치료 효과를 갖는 것으로 의도된 물질, 예를 들면, 유전자 벡터, 유전자 조절인자 요소, 유전자 구조적 요소, DNA, RNA 등을 포함한다. 생물체제는 치료 효과를 갖는 것으로 의도된 생물 (living matter), 또는 생물로부터 유래된 물질을 포함한다.

[0053] 본원에서 이용된 바와 같이, 관용구 "치료 효과량" 및 "예방 효과량"은 질환의 치료, 예방 또는 관리, 또는 질환의 명시적인 증상에서 치료적 유익성을 제공하는 양을 지칭한다. 치료 효과량은 질환, 질환의 증상, 또는 질환을 향한 소인을 구제하거나, 치유하거나, 경감하거나, 완화하거나, 변경하거나, 치료하거나, 개선하거나, 향상시키거나, 또는 이것에 영향을 주는 목적으로, 질환 또는 장애, 질환의 증상, 또는 질환을 향한 소인을 치료할 수 있다. 치료적으로 효과적인 특정한 양은 통상의 의사에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 그리고 당분야에서 공지된 인자, 예를 들면, 예로서, 질환의 유형, 환자의 병력 및 연령, 질환의 시기, 그리고 다른 치료적 작용제의 투여에 따라 변할 수 있다.

[0054] 본 발명은 세포내 성분에 대해 지향되는 단일-도메인 항체 (sdAb)뿐만 아니라 이들 sdAb를 포함하는 단백질과 폴리펩티드 및 이들 단백질과 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드에 관계한다. 본 발명은 또한, 세포간, 관 세포 및 세포외 표적 또는 항원에 대해 지향되는 sdAb에 관계한다. 본 발명은 또한, sdAb를 인코딩하는 핵산, sdAb를 포함하는 단백질 및 폴리펩티드, 그리고 sdAb를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명은 예방적, 치료적 또는 진단적 목적을 위한 이들 조성물, sdAb, 단백질 또는 폴리펩티드의 이용을 포함한다.

[0055] sdAb는 sdAb를 기능적 항원-결합 도메인 또는 단백질로서 이용에 고도로 유리하게 만드는 다수의 독특한 구조적 특징 및 기능적 성질을 갖는다. sdAb는 경쇄 가변 도메인의 부채에서 항원에 기능적으로 결합하고, 그리고 단일, 상대적으로 작은, 기능 항원-결합 구조 단위, 도메인 또는 단백질로서 기능할 수 있다. 이것은 sdAb를 전통적인 항체의 도메인으로부터 구별 짓는데, 이들 도메인은 그들만으로는 항원 결합 단백질 또는 도메인으로서 기능하지 못하고, 항원에 결합하기 위해 전통적인 항체 단편, 예를 들면, Fab 단편 또는 ScFv의 단편과 합동되어야 한다.

[0056] sdAb는 당분야에서 널리 공지된 방법을 이용하여 획득될 수 있다. 가령, sdAb를 획득하기 위한 한 가지 방법은 (a) 낙타를 하나 또는 그 이상의 항원으로 면역화하고, (b) 말초 림프구를 면역화된 낙타로부터 분리하고, 전체 RNA를 획득하고, 상응하는 cDNA를 합성하고, (c) VHH 도메인을 인코딩하는 cDNA 단편의 라이브러리를 구축하고, (d) 단계 (c)에서 획득된 VHH 도메인-인코딩 cDNA를 PCR을 이용하여 mRNA로 전사하고, mRNA를 리보솜 전사 형식으로 전환하고, VHH 도메인을 리보솜 전사에 의해 선별하고, 그리고 (e) VHH 도메인을 적합한 벡터에서 발현하고, 발현된 VHH 도메인을 임의선택적으로 정제하는 것을 포함한다.

[0057] 본 발명의 sdAb를 획득하는 다른 방법은 핵산 합성을 위한 기술을 이용하여 sdAb를 인코딩하는 핵산을 제조하고, 그 이후에 상기 핵산을 생체내에서 또는 시험관내에서 발현하는 것이다. 추가적으로, 본 발명의 sdAb, 폴리펩티드 및 단백질은 이들 단백질, 폴리펩티드 또는 다른 아미노산 서열을 제조하기 위한 합성 또는 반합성 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0058] 본 발명의 sdAb는 일반적으로, 표적의 모든 자연발생 또는 합성 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립형질, 부분 및 단편에, 또는 최소한, 본 발명의 sdAb가 야생형 표적에서 결합하는 항원 결정인자 또는 에피토프와 본질적으로 동일한 하나 또는 그 이상의 항원 결정인자 또는 에피토프를 내포하는 표적의 유사체, 변이체, 돌연변이체,

대립형질, 부분 및 단편에 결합한다. 본 발명의 sdAb는 본 발명의 sdAb가 야생형 표적에 결합하는 친화성 및 특이성과 동일하거나, 또는 이보다 높거나 또는 이보다 낮은 친화성 및/또는 특이성으로, 이런 변이체, 돌연변이체, 대립형질, 부분 및 단편에 결합할 수 있다. 본 발명의 sdAb가 표적의 일부 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립형질, 부분 및 단편에는 결합하지만 다른 것들에는 결합하지 않는다는 것 또한 발명의 범위 내에 있는 것으로 예기된다. 이에 더하여, 본 발명의 sdAb는 인간화될 수 있고, 그리고 일가 또는 다가, 및/또는 다중특이적일 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 sdAb는 표적 단백질의 인산화된 형태뿐만 아니라 표적 단백질의 탈인산화된 형태에 결합할 수 있다. sdAb는 다른 분자, 예를 들면, 알부민 또는 다른 거대분자에 연결될 수 있다.

[0059] 이에 더하여, sdAb가 다가라는 것, 다시 말하면, sdAb가 표적의 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프에 대해 지향되는 2개 또는 그 이상의 단백질 또는 폴리펩티드를 가질 수 있다는 것은 본 발명의 범위 안에 있다. 이런 다가 sdAb에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 예로서, 동일한 에피토프, 실제적으로 동등한 에피토프, 또는 상이한 에피토프에 대해 지향될 수 있다. 상이한 에피토프는 동일한 표적 상에 위치될 수 있거나, 또는 2개 또는 그 이상의 상이한 표적 상에 있을 수 있었다.

[0060] 본 발명의 하나 또는 그 이상의 sdAb의 서열은 하나 또는 그 이상의 링커 서열로 연결되거나 또는 결합될 수 있는 것으로 또한 예기된다. 링커는 예로서, 세린, 글리신 및 알라닌의 조합을 내포하는 단백질 서열일 수 있다.

[0061] 본 발명의 sdAb의 부분, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 대립형질 및/또는 유도체가 설명된 용도에 적합하기만 하면, 이들을 이용하는 것 역시 발명의 범위 내에 있다.

[0062] 본 발명의 sdAb가 치료적 및/또는 진단적 이용에 주로 의도되기 때문에, 이들은 포유류, 바람직하게는 인간 표적에 대해 지향된다. 하지만, 본원에서 설명된 sdAb는 다른 종으로부터 표적, 예를 들면, 영장류 또는 다른 동물 (가령, 생쥐, 쥐, 토끼, 돼지 또는 개)의 하나 또는 그 이상의 다른 종, 그리고 특히, 표적과 연관된 질환 및 장애에 대한 동물 모형으로부터 표적과 교차반응성인 것이 가능하다.

[0063] 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 sdAb를 인코딩하는 핵산에 관계한다. 이런 핵산은 예로서, 유전자 구조체의 형태일 수 있다.

[0064] 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 sdAb를 발현하거나 또는 발현할 수 있고, 및/또는 본 발명의 sdAb를 인코딩하는 핵산을 내포하는 숙주 또는 숙주 세포에 관계한다. sdAb의 서열은 임의의 생물체의 유전체 내로 삽입되어 유전적으로 변형된 생물체 (GMO)를 창출하는데 이용될 수 있다. 실례는 식물, 세균, 바이러스, 그리고 동물을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0065] 본 발명은 본 발명의 sdAb, sdAb를 인코딩하는 핵산, 이런 sdAb를 발현하거나 또는 발현할 수 있는 숙주 세포, sdAb를 내포하는 산물 및 조성물을 제조하거나 또는 산출하기 위한 방법에 더욱 관계한다.

[0066] 본 발명은 본원에서 설명된 sdAb, sdAb를 인코딩하는 핵산, 숙주 세포, 산물 및 조성물의 적용 및 이용에 더욱 관계한다. 이런 산물 또는 조성물은 예로서, 질환의 치료 또는 예방을 위한 제약학적 조성물, 또는 진단적 이용을 위한 산물 또는 조성물일 수 있다. sdAb는 sdAb의 혈청 및 조직 수준을 측정하기 위한 다양한 검정, 예를 들면, ELISA 검정 및 질량 분광분석법 검정에서 이용될 수 있다.

[0067] 다른 양상에서, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 sdAb를 인코딩하는 핵산은 질환을 치료하거나 예방하기 위해 생물체의 유전체 내로 삽입될 수 있다.

[0068] 본 발명은 전반적으로, 예방적, 치료적 및/또는 진단적 목적에 이용될 수 있는 sdAb뿐만 아니라 이런 sdAb 중에서 하나 또는 그 이상을 포함하거나 또는 이것으로 본질적으로 구성되는 단백질 또는 폴리펩티드에 관계한다.

[0069] 본 발명에서 상술된 방법 및 조성물은 본원에서 설명된 질환을 치료하는데 이용될 수 있고, 그리고 본원에서 설명된 또는 만약 그렇지 않으면 당업자에게 공지된 임의의 용량 및/또는 제제에서 뿐만 아니라 본원에서 설명된 또는 만약 그렇지 않으면 당업자에게 공지된 임의의 투여 루트에서 이용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 sdAb, 특히 본 발명의 항-STAT3 VHH, 항-KRAS VHH, 그리고 항-TNF-알파 VHH는 다음을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 악성 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다: 다발성 골수종, 백혈병 (HTLV-1 의존성, 적백혈병, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 그리고 큰 과립성 림프구 백혈병 (LGL), 림프종 (EBV-관련된/버킷, 군상식육종, 피부 T-세포 림프종, 비호지킨 림프종 (NHL), 역형성 큰-세포 림프종 (ALCL), 유방암, 삼중 음성 유방암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 육종, 골육종, 카포시 육종, 유잉 육종, 간세포암, 신경교종, 신경모세포종, 성상세포종, 결장직장암, 윌름 종양, 신장암, 방광암, 자궁내막암, 자궁경부암, 식도암, 피부 편평상피 세포 암, 기저 세포 암, 그리고 임의의 전이성 암. sdAb는 암으로 인한

체중 감소 또는 악액질을 예방하거나 또는 감소시키는데 도움을 주기 위해 암 환자에서 이용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 sdAb, 특히 항-STAT3 및 항-TNF-알파 sdAb는 또한, 질환, 예를 들면, 하지만 제한 없이: 자가면역 질환 (가령, 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, 크론병, 세균 유도된 대장염, 천식, 경피증, 루푸스, 뇌척수염, 동맥염, 맥관염, 사구체신염, 포도막염, 포도망막염, 다발성 경화증), 다낭 신장병, 피부병 (가령, 건선, 원형 탈모증, 아토피성 피부염, 켈로이드/비후 흉터, 지방종, 파제트병, 그리고 광선각화증), 화농성 한선염, 이식 (가령, 실질 기관, 골수, 손, 얼굴, 사지, 임의의 신체 부위), 암 및 노화와 연관된 근이영양증 및 근육 쇠약, 자궁내막증, 황반 변성, 망막 변성, 뇌졸중, 간질, 외상성 뇌 및 척수 손상, 고혈압, 심장 비대, 알츠하이머병, 폐동맥 고혈압, 2형 당뇨병, 그리고 강직성 척추염의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 추가적으로 sdAb는 고아 병을 표적으로 할 수 있다. 이들 희귀한 고아 병의 실례는 삼중 음성 유방암, 췌장암, AML (급성 골수성 백혈병), 두경부암, 다발성 골수종, 그리고 화학내성 암을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

[0072] 바이러스 감염은 감염된 세포에서 세포내 바이러스 단백질을 표적으로 함으로써 치료될 수 있다. 바이러스 단백질, 예를 들면, HIV 역전사효소는 바이러스 생활 주기를 차단할 수 있다. 본 발명의 sdAb는 또한, 세포내 바이러스 단백질, 예를 들면, 에볼라 (Ebola) VP24를 표적으로 하고, 따라서 숙주의 항바이러스 면역 반응을 정지시키는 에볼라 (Ebola)의 능력을 차단할 수 있다. 본 발명의 sdAb는 세포내 분자의 과다발현이 있는 질환을 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 헌팅틴병이 sdAb로 치료될 수 있다.

[0073] 본 발명의 sdAb는 하나 또는 그 이상의 화합물과 함께 이용될 수 있다. 가령, 본 발명의 sdAb는 JAK/STAT 저해제, 예를 들면, 예로서, 쿠르쿠민, 레스베라트롤, 쿠쿠르비타신 A, B, E, I, Q, 플라보피리돌, 테옥시테트란고 마이신, 시클로펜테논 유도체, N-아실호모세린 락톤, 인디루빈 유도체, 메이소인디고, 티르포스틴, 백금-내포 화합물 (가령, IS3-295), 펩티도모방체, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, S3I-201, 포스포티로신 트립티드 유도체, HIV 단백질분해효소 저해제 (가령, 넬피나비르, 인디나비르, 사퀴나비르, & 리토나비르), JSI-124, XpYL, Ac-pYLPQTV-NH2, ISS 610, CJ-1383, 피리메타민, 메트포르민, 아티프리모드, S3I-M2001, STX-0119; N-[2-(1,3,4-옥사디아졸릴)]-4 퀴놀린카복사미드 유도체, S3I-1757, LY5; 5,8-디옥소-6(피리딘-3-일아미노)-5,8,-디히드로-나프탈렌-1-술폰아미드, 위타신스틴, 스타틱, STA-21, LLL-3, LLL12, XZH-5, SF-1066, SF-1087, 17o, 크립토탄시논, FLL32, FLL62, C188-9, BP-1108 및 BP-1075, 갈리엘라락톤, JQ1, 5, 15 DPP, WP1066, 니클로사미드, SD1008, 니푸록사지드, 크립토탄시논, BBI 퀴논, 그리고 록소리트닙 인산염과 함께 이용될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 화합물은 본 발명의 sdAb의 치료적 반응을 증가시키고 이의 유용성을 증강시킬 수 있다. 이에 더하여, sdAb의 유용성은 이것을 펩티드, 펩티도모방체, 그리고 다른 약물, 예를 들면, 예로서 하지만 제한 없이, 시메티딘, 아토르바스타틴, 셀레록시브, 메트포르민, 그리고 시메티딘과 합동함으로써 증가될 수 있다. 이에 더하여, 항-STAT3 sdAb는 방사선 요법에 대하여 방사선내성 암을 방사선감수성 암으로 전환할 수 있다.

[0074] 본 발명의 하나 또는 그 이상의 sdAb가 합동될 수 있거나, 또는 본 발명의 sdAb가 다른 sdAb와 합동될 수 있는 것으로 또한 예기된다.

[0075] 본 발명의 일정한 sdAb는 sdAb 상에 추가 표적화 단백질 서열의 보조 없이, 그리고 sdAb가 세포 표면 수용체에 결합하고 세포막을 횡단하도록 주도하는 외인성 화합물의 보조 없이, 세포막을 횡단하고 세포에 들어갈 수 있는 것으로 예기된다.

[0076] 세포막을 횡단한 후, 이들 sdAb는 막경유 또는 세포내 분자 또는 항원을 표적으로 할 수 있다. 이들 세포내 또는 막경유 표적은 예로서, 단백질, 탄수화물, 지질, 핵산, 돌연변이된 단백질, 바이러스 단백질, 그리고 프리온 일 수 있다. sdAb 표적은 효소, 세포의 구조 단백질, 세포막 분자의 세포내 부분, 소기관의 막 내에 분자, 임의의 유형의 RNA 분자, DNA 또는 염색체의 임의의 영역, 메틸화된 또는 비메틸화된 핵산, 세포의 합성 기전 내에 부분적으로 조립된 분자, 이차 전령물질 분자, 그리고 세포 신호전달 기전 내에 분자로서 기능할 수 있다. 표적은 세포질, 핵, 소기관, 그리고 세포막 내에 모든 분자를 포함할 수 있다. 세포막에서 분비되거나 또는 배치되도록 운명 지어진 분자는 세포를 떠나기 전에, 세포질 내에서 표적화될 수 있다.

[0077] sdAb 표적은 인간, 동물, 식물, 균류, 기생충, 원생생물, 세균, 바이러스, 프리온, 원핵 세포, 그리고 진핵 세포 내에 있을 수 있다. 본 발명의 sdAb에 의해 표적화될 수 있는 세포간 및 세포내 신호전달 분자 및 단백질 군의 일부 실례는 중앙유전자 산물, 호르몬, 사이토킨, 성장 인자, 신경전달물질, 키나아제 (티로신 키나아제, 세린 키나아제, 그리고 트레오닌 키나아제 포함), 포스포타아아제, 유비퀴틴, 환상 뉴클레오타이드, 시클라아제 (아데닐릴 및 구아닐릴), G 단백질, 포스포디에스테라아제, GTP가수분해효소 상과, 면역글로불린 (항체, Fab 단편, 결합제, sdAb), 면역글로불린 상과, 이노시톨 인산염 지질, 스테로이드 수용체, 칼모듈린, CD 군 (가령, CD4, CD8, CD28 등), 전사 인자, TGF-베타, TNF-알파 및 베타, TNF 리간드 상과, 패임 수용체 신호전달 분자, 헤지호

그 수용체 신호전달 분자, Wnt 수용체 신호전달 분자, 톨 유사 수용체 신호전달 분자, 카스파제, 액틴, 미오신, 미오스타틴, 12-리폭시게나아제, 15-리폭시게나아제, 리폭시게나아제 상과, 역전사효소, 바이러스 및 이들의 단백질, 아밀로이드 단백질, 콜라겐, G 단백질 연계된 수용체, 돌연변이된 정상 단백질, 프리온, Ras, Raf, Myc, Src, BCR/ABL, MEK, Erk, Mos, Tpl2, MLK3, TAK, DLK, MKK, p38, MAPK, MEKK, ASK, SAPK, JNK, BMK, MAP, JAK, PI3K, 시클로옥시게나아제, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, Myc, p53, BRAF, NRAS, KRAS, HRAS 및 케모킨이다.

- [0078] KRAS는 포유류 ras 유전자 패밀리로부터 Kirsten ras 종양유전자 동족체이다. KRAS는 작은 GTP가수분해효소 상과의 구성원인 단백질을 인코딩한다. 상기 단백질은 폐 선암종, 점액성 선종, 췌장의 관암종, 그리고 결장직장암종을 비롯한 다양한 악성에 관여한다. 정상적인 조건 하에, Ras 패밀리 구성원은 세포이하 막 구획화-기초된 신호전달 시스템에서 세포 성장 및 분화 이벤트에 영향을 준다. 하지만, 종양원성 Ras는 세포 증식 및 아폽토시스 둘 모두를 제어하는 과정의 조절을 상실할 수 있다.
- [0079] 항-KRAS sdAb는 악성 세포, 예를 들면, 예로서, 결장직장암, 췌장암, 담도암, 폐암, 백혈병, 그리고 다른 전이성 악성에 관련된 세포에서 역할을 교란하기 위해, 야생형 및 돌연변이된 KRAS (G12D)를 표적으로 하도록 개발되었다. 특정 기전에 의해 한정됨 없이, 항-KRAS sdAb는 악성 세포에서 KRAS에 결합하고 KRAS의 하류 신호전달을 차단하는 것으로 생각된다. 추가적으로, 항-KRAS sdAb는 항-EGFR 생물체제 (가령, 세툽시맙 및 파니투무맙)에 내성인 악성을 성공적으로 치료할 수 있다.
- [0080] 당분야에서 널리 공지된 방법을 이용하여, 재조합 인간 돌연변이체 KRAS (G12D) 단백질은 KRAS 또는 돌연변이체 KRAS (G12D), 또는 다른 KRAS 돌연변이체의 에피토프에 대해 지향되거나 또는 이것에 결합할 수 있는 sdAb를 산출하는데 이용되었다. 추가적으로, 다른 KRAS 돌연변이체에 대한 sdAb가 산출될 수 있다. 항-KRAS sdAb를 산출하기 위해, 재조합 전장 인간 KRAS (유전자 ID: 3845)가 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발현되었다.
- [0081] 여러 sdAb가 획득되고 선별검사되었다. KRAS\_13 (서열 번호:1)으로 명명된 한 가지 항-KRAS (G12D) sdAb의 DNA 서열은 아래에 도시된다:
- [0082] 5'Gaggtgcagctggtggagtctggggaggctcggtgcagactggagggtctctgagactctcctgtgcagtttctggaaatcggcagcagctactgcatgggtggttccgccaggtccagggaagaagcgcgaggcggtcgacagctattgtacgtgatggtgccactggctacgcagactacgtgaagggccgatccatctcccagacagcgccaagaacactctgtatctgcaaatgaacaggctgatacctgaggacactgccatctactactgtgcggcagacctgccccaggtgtgttgactcaggcgatttggaaatttggttatcggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca-3'
- [0083] 항-KRAS (G12D) sdAb (서열 번호: 2), KRAS\_13의 아미노산 서열은 아래에 도시되는데, CDR이 밑줄 표시된다:
- [0084] EVQLVESGGGSGVQTGGSLRLSCAVSGNIGSSYCMGWFRQAPGKKREAVARIVRDGATGYADYVKGRFTISRDSAKNTLYLQMNRLIPEDTAIYYCAADLPPGCLTQAIWNFGYRGQGLTVTVSS
- [0085] 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 항-KRAS sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향되는 하나 또는 그 이상의 생쥐 단일클론 항체를 포함한다. 생쥐 단일클론 항체는 당업자에 의해 알려져 있는 방법에 의해 산출될 수 있다, 예를 들면, 생쥐 단일클론 항체는 생쥐 하이브리도마에 의해 생산될 수 있다. 생쥐 단일클론 항체는 진단적 검정에서 이용될 수 있다, 예를 들면, 항체는 환자의 혈청 내에 존재하는 항-KRAS sdAb의 양을 측정하기 위해 면역검정, 예를 들면, ELISA 또는 질량 분광분석법 검정에서 이용될 수 있다. PANC-1 인간 췌장암 세포에서 KRAS (G12D) sdAb의 세포독성은 아래에 설명된 바와 같이 시험되었다.
- [0086] STAT3은 신호 전달 및 전사 기능의 활성화 둘 모두를 보유하는 단백질의 신호 변환기 및 전사 활성체 (STAT) 패밀리의 구성원이다. STAT3은 다양한 사이토킨 및 성장 인자, 예를 들면, EGF, IL-6, PDGF, IL-2 및 G-CSF에 대한 응답으로, 폭넓게 발현되고, 그리고 티로신 및/또는 세린에서 인산화를 통해 DNA 결합 단백질로서 활성화된다. STAT3 인단백질은 STAT 패밀리의 다른 구성원과 동종이합체 및 이형이합체를 형성하고, 그리고 다양한 유전자의 전사를 조절하기 위해 핵으로 전위하고, 그리고 결과적으로, 많은 세포 과정, 예를 들면, 세포 성장, 아폽토시스, 혈관형성, 면역 회피, 그리고 생존에서 핵심적인 역할을 수행한다.
- [0087] 항-STAT3 sdAb는 인산화된 및 비인산화된 STAT3에 의해 유발된 질환을 치료할 뿐만 아니라 질환의 발달 또는 질환의 재발을 예방하기 위해 환자 및 다른 생물체에 제공될 수 있다. 가령, 장기 이식 및 골수 이식을 받은 환자는 그들이 섭취하는 면역억제 약제로 인해, 피부 SCCA 및 BCCA의 더욱 높은 위험에 처해 있다. 항-STAT3 sdAb의 투여는 이러한 위험을 감소시키거나 또는 제거할 수 있다. 재발의 위험에 처해있는 악성에 대해 치료된 환자는 항-STAT3 sdAb로 치료로부터 이익을 얻을 것이다. 가족 병력 및 HLA-유형에 근거하여, 일부 개체는 일부 유형의 자가면역 질환의 증가된 위험에 처해 있을 것이고, 그리고 상기 자가면역 질환이 발달할 위험을 감소시키기 위

한 sdAb로 치료로부터 이익을 얻을 수 있다. 유방암 위험은 최근 NCI 연구에서 증명된 바와 같이, 항-STAT3 약제, 예를 들면, GLG-302의 투여로 감소될 수 있다.

- [0088] STAT3을 저해하는 것에 더하여, 항-STAT3 sdAb는 또한, 분자 사이에 고도의 상동성으로 인해, STAT1, STAT2, STAT4, STAT5a, STAT5b 및 STAT6을 저해할 수 있다.
- [0089] 재조합 인간 STAT3 단백질이 STAT3의 에피토프에 대해 지향되거나 또는 이것에 결합할 수 있는 항-STAT sdAb를 생산하는데 이용되었다. 항-STAT3 sdAb를 산출하기 위해, 재조합 전장 인간 STAT3 (유전자 ID: 6774)이 Sf9 곤충 세포에서 배큘로바이러스에 의해 발현되었다. 항-STAT sdAb은 도면 1 및 2에서 보여지는 바와 같이, 세균 및 포유류 세포 둘 모두에서 발현될 수 있는 벡터 내로 클로닝되었다.
- [0090] 본 발명의 항-STAT3 sdAb는 세포 성장을 저해하기 위해, 예를 들면, 예로서, 암 세포 성장을 억제하기 위해 세포 내부에 STAT3 및 모든 다른 STAT 분자를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 이에 더하여, 항-STAT3 sdAb는 VEGF를 통해 다른 증식성 질환, 예를 들면, 건선 및 황반 변성에서 세포 성장을 저해할 수 있다.
- [0091] 특정 작용 기전에 한정됨 없이, 항-STAT3 sdAb는 항원 제시 세포, 예를 들면, 예로서, 숙주 수지상 세포에서 STAT3 수준을 감소시킴으로써 암 유도된 면역 억제를 제거할 수 있는 것으로 생각된다. STAT3 저해는 환자의 선천성 및 적응성 면역계 (즉, 수지상 세포, 대식세포, 호중구, T 세포, NK 세포, 그리고 B 세포)에 의한 항암 반응을 증진한다.
- [0092] 당분야에서 널리 공지된 방법을 이용하여, 여러 항-STAT sdAb가 획득되고, 그리고 아래에 설명된 바와 같이, 암 세포 성장을 억제하고 암 세포주에서 아폽토시스를 유도하는 능력에 대해 선별검사되었다. 항-STAT3 sdAb의 세포독성 및 항증식성 활성이 시험되었다. 이에 더하여, 항-STAT3 sdAb의 내약성이 시험관내 및 생체내에서 시험되었다. 항-STAT sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향된 생쥐 단일클론 항체의 생산이 아래에 설명된다.
- [0093] VHH13으로 명명된 한 가지 항-STAT3 sdAb의 아미노산 서열 (서열 번호: 3)은 아래에 도시된다:
- [0094] HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
- [0095] ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0096] FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0097] 3개의 CDR은 밑줄 표시된다.
- [0098] VHH14로 명명된 두 번째 항-STAT3 sdAb의 아미노산 서열 (서열 번호: 4)은 아래에 도시된다:
- [0099] QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
- [0100] LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISR DYVKNAVY LQMNTVKPEDAAMYYCAARE
- [0101] GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS
- [0102] 다시 한 번, 3개의 CDR은 밑줄 표시된다. 획득된 다른 항-STAT3 sdAb의 단백질 서열은 다음과 같다:
- [0103] STAT3\_10 (서열 번호: 5):
- [0104] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
- [0105] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISR DYVKNAVY LQMNTVKPEDAAMYYCAARE
- [0106] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS
- [0107] STAT3\_34 (서열 번호: 6):
- [0108] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA
- [0109] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISR DYVKNAVY LQMNTVKPEDAAMYYCAARE
- [0110] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS
- [0111] STAT3\_19 (서열 번호: 7):
- [0112] (1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQAPGKEREGVAA

[0113] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0114] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTQVTVSS

[0115] STAT3\_14 (서열 번호: 8):

[0116] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0117] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0118] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0119] STAT3\_35 (서열 번호: 9):

[0120] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0121] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0122] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0123] STAT3\_9 (서열 번호: 10):

[0124] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0125] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0126] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0127] STAT3\_30 (서열 번호: 11):

[0128] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0129] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0130] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0131] STAT3\_23 (서열 번호: 12):

[0132] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0133] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0134] (98) GWECGETWLDRTAGSHTYWGQGTILVTVSS

[0135] STAT3\_24 (서열 번호: 13):

[0136] (1) EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0137] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0138] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0139] STAT3\_36 (서열 번호: 14):

[0140] (1) DVQLVESGGGSVQAGDSLRLSCVASTYTGCMGWFQAPGKEREGVAA

[0141] (48) LSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDYVKNVYLMQNTVKPEDAAMYCAARE

[0142] (98) GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTILVTVSS

[0143] STAT3\_12 (서열 번호: 15):

[0144] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFQVPGKEREGVSG

[0145] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0146] (101) FDCYRGSWFNRYMNSWGQGTILVTVSS

[0147] STAT3\_16 (서열 번호: 16):

[0148] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFQVPGKEREGVSG

[0149] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTNNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0150] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0151] STAT3\_11 (서열 번호: 17):

[0152] (1) EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0153] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0154] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0155] STAT3\_20 (서열 번호: 18):

[0156] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0157] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0158] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0159] STAT3\_2 (서열 번호: 19):

[0160] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0161] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0162] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0163] STAT3\_15 (서열 번호: 20):

[0164] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0165] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0166] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0167] STAT3\_6 (서열 번호: 21):

[0168] (1) HVQLVESEGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0169] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0170] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGLVTVSS

[0171] STAT3\_33 (서열 번호: 22):

[0172] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0173] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0174] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS

[0175] STAT3\_17 (서열 번호: 23):

[0176] (1) QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0177] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR

[0178] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS

[0179] STAT3\_25 (서열 번호: 24):

[0180] (1) EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

[0181] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMSSLPEDTAMYYCATSR

[0182] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS

[0183] STAT3\_32 (서열 번호: 25):

[0184] (1) DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG

- [0185] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0186] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0187] STAT3\_13 (서열 번호: 26):
- [0188] (1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
- [0189] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0190] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0191] STAT3\_39 (서열 번호: 27):
- [0192] (1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
- [0193] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0194] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0195] STAT3\_4 (서열 번호: 28):
- [0196] (1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
- [0197] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0198] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0199] STAT3\_29 (서열 번호: 29):
- [0200] (1) HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGANGGRSCMGWFRQVPGKEREGVSG
- [0201] (51) ISTGGLITYYADSVKGRFTISQDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCATSR
- [0202] (101) FDCYRGSWFNRYMYNSWGQGTQVTVSS
- [0203] 상응하는 항-STAT3 DNA 서열은 다음과 같다:
- [0204] Stat3\_VHH-10 (서열 번호: 30):
- [0205] 5'-  
gatgtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcagctggaggctctctgagactctcctgtgtagcctctacatacaccggctgcatgggctggttc  
cgccaggctcctgaaaggagcgcgaggagtcgcagctcttagtagccgtggttttgcgggcactataccgactccgtgaagggccgattctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcagcacgggagggatgggagtgcggt  
gagacctggttggaccggaccgccgggggccatacctactggggccaggggaccaggtcacctctcctca-3'
- [0206] Stat3\_VHH-14 (서열 번호: 31):
- [0207] 5'-  
cagggtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcagctggaggctctctgagactctcctgtgtagcctctacatacaccggctgcatgggctggttc  
cgccaggctcctgaaaggagcgcgaggagtcgcagctcttagtagccgtggttttgcgggcactataccgactccgtgaagggccgattctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcagcacgggagggatgggagtgcggt  
gagacctggttggaccggaccgccgggggccatacctactggggccaggggaccctggtcacctctcctca-3'
- [0208] Stat3\_VHH-12 (서열 번호: 32):
- [0209] 5'-  
cagggtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatggtggtcggagctgcatg  
ggctggttccgccagggtccagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgtgtatctgcaaatgaacacgctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacagagtcggtttgac  
tgctatagaggctcttggttcaaccgatatagtataacagttggggccaggggaccctggtcacctctcctca-3'
- [0210] Stat3\_VHH-13 (서열 번호: 33):
- [0211] 5'-  
catgtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaacgggtggtcggagctgcatg

ggctgggttccgccagggttccaggaaggagcgcgaggggggtttctgggtatttcaaccgggtgggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcgggtttgac  
tgctatagaggctcttgggttcaaccgatataatgtataaacagttagggccaggggaccaggtcactgtctcctca-3'

[0212] Stat3\_VHH-20 (서열 번호: 34):

[0213] 5'-  
gatgtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgggtcggagctgcatg  
ggctgggttccgccagggttccaggaaggagcgcgaggggggtttctgggtatttcaaccgggtgggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcgggtttgac  
tgctatagaggctcttgggttcaaccgatataatgtataaacagttagggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0214] Stat3\_VHH-23 (서열 번호: 35):

[0215] 5'-  
cagggtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgtagcctctacataacaccggctgcatgggctgggttc  
cgccagggtcctggaaaggagcgcgaggggagtcgcagctcttagcagccgtgggttttgcggggcactataccgactccgtgaagggccgattctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcagcacgggagggtgggagtcggtt  
gagacctgggtggaccggaccgcccggggccatacctactggggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0216] Stat3\_VHH-24 (서열 번호: 36):

[0217] 5'-  
gagggtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgtagcctctacataacaccggctgcatgggctgggttc  
cgccagggtcctggaaaggagcgcgaggggagtcgcagctcttagtagccgtgggttttgcggggcactataccgactccgtgaagggccgattctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcagcacgggagggtgggagtcggtt  
gagacctgggtggaccgaaccgcccggggccatacctactggggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0218] Stat3\_VHH-25 (서열 번호: 37):

[0219] 5'-  
gagggtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgggtcggagctgcatg  
ggctgggttccgccagggttccaggaaggagcgcgaggggggtttctgggtatttcaaccgggtgggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggtcgattcc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgagcagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcgggtttgac  
tgctatagaggctcttgggttcaaccgatataatgtataaacagttagggccaggggaccaggtcaccgtctcctca-3'

[0220] Stat3\_VHH-19 (서열 번호: 38):

[0221] 5'-  
catgtgcagctggagggtctgggggggggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgtagcctctacataacaccggctgcatgggctgggttc  
cgccagggtcctggaaaggagcgcgaggggagtcgcagctcttagtagccgtgggttttgcggggcactataccgactccgtgaagggccgattctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacgctgccatgtactactgtgcagcacgggagggtgggagtcggtt  
gagacctgggtggaccggaccgcccggggccatacctactggggccaggggaccaggtcaccgtctcctca-3'

[0222] Stat3\_VHH-32 (서열 번호: 39):

[0223] 5'-  
gatgtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgggtcggagctgcatg  
ggctgggttccgccagggttccaggaaggagcgcgaggggggtttctgggtatttcaaccgggtgggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcgggtttgac  
tgctatagaggctcttgggttcaaccgatataatgtataaacagttagggccaggggaccaggtcaccgtctcctca-3'

[0224] Stat3\_VHH-33 (서열 번호: 40):

[0225] 5'-  
cagggtgcagctggagggtctggggagggtcggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtgggtcggagctgcatg  
ggctgggttccgccagggttccaggaaggagcgcgaggggggtttctgggtatttcaaccgggtgggtcttattacatactatgccgactccgtgaagggccgattcc  
accatctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtcgggtttgac  
tgctatagaggctcttgggttcaaccgatataatgtataaacagttagggccaggggaccaggtcaccgtctcctca-3'

- [0226] Stat3\_VHH-36 (서열 번호: 41):
- [0227] 5'-  
gatgtgcagctgggtggagtctgggggaggctcgggtgcagctggagactctctgagactctcctgtgtagcctctacatacacccggtgcatgggctggttc  
cgccaggctcctggaagagcgcgagggagtcgcagctcttagtagccgtggttttgcgggactataccgactccgtgaaggccgatctccatctcc  
cgagactacgtcaagaatgcggtgtatctgcaaatgaacactgtgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcagcacggaggatgggagtcggt  
gagacctggttggaccggaccgcccggggccatacctactggggccaggggaccctggtcactgtctcctca-3'
- [0228] Stat3\_VHH-11 (서열 번호: 42):
- [0229] 5'-  
gtgcagctgggtggagtctgggggaggctcgggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtggtcggagctgcatgggc  
tggttccgccagggttcagggaaggagcgtgagggggtttctggtatttcaaccggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaaggccgatccacc  
atctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtccgtttgactgc  
tatagaggctcttggttcaaccgatatatgtataaacagtggggccaggggaccctggtcactgtctcctca-3'
- [0230] Stat3\_VHH-6 (서열 번호: 43):
- [0231] 5'-  
gtgcagctgggtggagtctgagggaggctcgggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtggtcggagctgcatgggc  
tggttccgccagggttcagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaaggccgatccacc  
atctcccaagacaacaccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtccgtttgactgc  
tatagaggctcttggttcaaccgatatatgtataaacagtggggccaggggaccctggtcaccgtctcctca-3'
- [0232] Stat3\_VHH-1 (서열 번호: 44):
- [0233] 5'-  
gtgcagctgggtggagtctgggggaggctcgggtgcagctggagggtctctgagactctcctgtgcagcctctggagccaatgggtggtcggagctgcatgggc  
tggttccgccagggttcagggaaggagcgcgagggggtttctggtatttcaaccggtggtcttattacatactatgccgactccgtgaaggccgatccacc  
atctcccaagacaacaccaataaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacactgccatgtactactgtgcgacgagtccgtttgactgc  
tatagaggctcttggttcaaccgatatatgtataaacagtggggccaggggaccctggtcactgtctcctca-3'
- [0234] 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 항-STAT3 sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향되는 하나 또는 그 이상의 생쥐 단일클론 항체를 포함한다. 생쥐 단일클론 항체는 당업자에 의해 알려져 있는 방법에 의해 산출될 수 있다, 예를 들면, 생쥐 단일클론 항체는 생쥐 하이브리도마에 의해 생산될 수 있다. 생쥐 단일클론 항체는 진단적 검정에서 이용될 수 있다, 예를 들면, 항체는 환자의 혈청 내에 존재하는 항-STAT3 sdAb의 양을 측정하기 위해 면역검정, 예를 들면, ELISA에서 이용될 수 있다. 상기 방법은 항-STAT3 sdAb에 한정되지 않고, 그리고 본 발명의 sdAb 중에서 한 가지에 대해 지향된 생쥐 항체를 생산하는데 이용될 수 있는 것으로 인지되어야 한다.
- [0235] TNF-알파 유전자는 종양 괴사 인자 (TNF) 상과에 속하는 다중기능성 친염증성 사이토킨을 인코딩한다. 이러한 사이토킨은 주로, 대식세포에 의해 분비된다. 사이토킨은 성장 조절, 분화, 염증, 바이러스 복제, 종양발생, 그리고 자가면역 질환을 비롯한 넓은 스펙트럼의 생물학적 과정의 조절; 그리고 바이러스, 세균, 진균, 그리고 기생충 감염에 관련된다. 종양의 출혈성 괴사를 유도하는 것 이외에, TNF는 종양발생, 종양 전이, 바이러스 복제, 패혈성 쇼크, 열병, 염증, 악액질, 그리고 크론병 및 류마티스성 관절염을 비롯한 자가면역 질환뿐만 아니라 이식편 대 숙주 질환에 관련되는 것으로 밝혀졌다.
- [0236] 본 발명은 세포에 의한 TNF-알파의 분비를 예방하기 위해, 세포 또는 세포막 내부에서 TNF-알파, 특히 인간 TNF-알파에 대해 지향되는 sdAb, 단백질, 그리고 폴리펩티드를 제공한다.
- [0237] 본 발명의 항-TNF-알파 sdAb 및 폴리펩티드는 TNF-알파와 연관되고 및/또는 이것에 의해 매개된 질환 및 장애, 예를 들면, 염증, 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 장 증후군, 다발성 경화증, 애디슨병, 자가면역 간염, 자가면역 이하선염, 당뇨병 유형 1, 부고환염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랭 바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 전신성 홍반성 루푸스, 남성 불임, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 천포창, 건선, 류마티스열, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 척추관절병증, 갑상선염, 맥관염, 그리고 암 및 악액질로 인한 체중 감소의 예방 및/또는 치료에 이용될 수 있는 것으로 예기된다.
- [0238] TNF-알파는 상이한 형태에서 존재한다; 단위체성 형태 및 삼합체성 형태를 비롯한 다합체성 형태가 있다. 본 발

명의 sdAb, 단백질 및 폴리펩티드가 상이한 형태, 다시 말하면, 단위체성 형태 또는 다합체성 형태에서 TNF-알파에 결합하는 것은 본 발명의 범위 안에 있다. 따라서, 본 발명의 sdAb, 단백질 및 폴리펩티드가 TNF-알파에 대해 지향될 때, 이것은 또한, 삼합체성 형태에서 TNF-알파에 대해 지향된 sdAb, 단백질 및 폴리펩티드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

- [0239] TNF에 의한 신호 전달은 3개의 수용체 결합 부위를 내포하는 TNF 분자의 삼합체에 의한 TNF 수용체에 의한 교차 연결을 수반하는 것으로 알려져 있다 (가령, Poppel *et al.*, J. Exp. Med., 174 (1991), 1483-1489를 참조한다).
- [0240] TNF-알파의 에피토프에 대해 지향되거나 또는 이것에 결합할 수 있는 재조합 인간 TNF-알파 단백질이 sdAb를 산출하는데 이용되었다. 항-TNF-알파 sdAb를 산출하기 위해, 재조합 전장 인간 TNF-알파 (유전자 ID: 7124)가 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발현되고 표적 항원으로서 이용되었다.
- [0241] TNF-알파 단백질에 대한 35개 sdAb가 획득되었다. 이들 항-TNF-알파 항체는 서열 상동성에 근거하여 3가지 군으로 나누어졌다.
- [0242] TNF-알파 VHH66 (서열 번호: 45) sdAb로 명명된 첫 번째 항-TNF-알파 sdAb의 아미노산 서열은 아래에 도시된다:
- [0243] HVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
- [0244] GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNDLKPEDTA
- [0245] MYYCAADRRCGSIWYAYKYRG-QGTLVTSS
- [0246] 3개의 CDR은 밑줄 표시된다.
- [0247] TNF-알파 VHH69 (서열 번호: 46) sdAb로 명명된 두 번째 항-TNF-알파 sdAb의 아미노산 서열은 아래에 도시된다:
- [0248] EVQLVESGGGSVLAGGSLRLSCVASGFTSRNYMAWFRQAPGKERE
- [0249] GVATIGTASGSADYYGSVKDRFTISQDNKNTVYLQMNSLKPEDTA
- [0250] MYYCAARTYGTISLTPSDYRWGQGLVTSS
- [0251] 3개의 CDR은 밑줄 표시된다.
- [0252] TNF-알파 VHH62 (서열 번호: 47) sdAb로 명명된 세 번째 항-TNF-알파 sdAb의 아미노산 서열은 아래에 도시된다:
- [0253] QVQLVESGGGPVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE
- [0254] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA
- [0255] VYYCAPDPYAYSTYSYCSWAQGTQGLVTSS
- [0256] 3개의 CDR은 밑줄 표시된다. 밝혀진 다른 항-TNF-알파 sdAb는 아래의 서열을 포함하는데, 다시 한 번, CDR이 밑줄 표시된다:
- [0257] TNF\_2 (서열 번호:48):
- [0258] QVQLVESGGGSVEAGRSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
- [0259] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNDLKPEDTA
- [0260] MYYCAADRRCGSIWYAYKYRGQGTQVTSS
- [0261] TNF\_46 (서열 번호: 49):
- [0262] QVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE
- [0263] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNDLKPEDTA
- [0264] MYYCAADRRCGSIWYAYKYRGQGTQVTSS
- [0265] TNF\_71 (서열 번호: 50):
- [0266] QVQLVESGGGSVEAGGSLRLSCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0267] GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0268] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0269] TNF\_21 (서열 번호: 51):

[0270] QVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0271] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0272] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0273] TNF\_38 (서열 번호: 52):

[0274] EVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0275] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0276] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0277] TNF\_18 (서열 번호: 53):

[0278] EVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0279] GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0280] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0281] TNF\_37 (서열 번호: 54):

[0282] DVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0283] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0284] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0285] TNF\_66 (서열 번호: 55):

[0286] HVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0287] GVATIDIDGLTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0288] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0289] TNF\_68 (서열 번호: 56):

[0290] HVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKERE

[0291] GVATIDIDGLATHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0292] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0293] TNF\_78 (서열 번호: 57):

[0294] HVQLVESGGGSVEAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADRKERE

[0295] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0296] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0297] TNF\_67 (서열 번호: 58):

[0298] HVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCAASGFRYAAYCMGWFRQADGKVRE

[0299] GVATIDIDGQTTHADSVKGRFTISRDNAKNTLSLQMNDLKPEDTA

[0300] MYYCAADRDRCGSIWTYAYKYRGQGTQVTVSS

[0301] TNF\_6 (서열 번호: 59):

[0302] QVQLVESGGGSVQAGGSLRSLCAASGFIDSFGVMAWFRQAPGKERE

[0303] GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA

[0304] MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGQGTQVTVSS

[0305] TNF\_7 (서열 번호: 60):

[0306] DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFIDSFGVMAWFRQTPGKERE

[0307] GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA

[0308] MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGQGTQVTVSS

[0309] TNF\_13 (서열 번호: 61):

[0310] DVQLVESGGGSVQVGGSLTSCAVSGYTDSYGVMWFRQAPGKERE

[0311] GVASIYRNSGITYYPDSVKGRFTISRDNAKNTVLLQMNSLKPEDSA

[0312] TYYCAVRSGSVSTWAGYVYWQGTQVTVSS

[0313] TNF\_60 (서열 번호: 62):

[0314] DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGFIDSFGVMAWFRQAPGKERE

[0315] GVAAVYRRAGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDSA

[0316] MYYCAARTYGSVSSWTGYKYWGRGTQVTVSS

[0317] TNF\_73 (서열 번호: 63):

[0318] DVQLVESGGGSVRAGGSLRLSCTASGDTSKSDCMAWFRQAPGKERE

[0319] RVGAIYTRNGYTHYADSVNGRFTISQDNAKNALYLQMSGLKPEDTA

[0320] MYYCAARFRIYGQCVEDDDIDYWGQGLVTVSS

[0321] TNF\_69 (서열 번호: 64):

[0322] EVQLVESGGGSVLAGGSLRLSCVASGFTSRYNYMAWFRQAPGKERE

[0323] GVATIGTASGSADYYGSVKDRFTISQDNAKNNTVYLQMNSLKPEDTA

[0324] MYYCAARTYGTISLTPSDYRYWGQGLVTVSS

[0325] TNF\_76 (서열 번호: 65):

[0326] QVQVVEYGGGSVQAGETVRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHEWE

[0327] LVSNITTEGITSEASSYADSVRGRFTIFDNAKNMVYLQMNSLKHEDTA

[0328] VYYCAPDPYAYSTYREYCTWAQGTQGLVTVSS

[0329] TNF\_62 (서열 번호: 66):

[0330] QVQLVESGGGPVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0331] LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0332] VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGLVTVSS

[0333] TNF\_43 (서열 번호: 67):

[0334] QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0335] LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0336] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGLVTVSS

[0337] TNF\_15 (서열 번호: 68):

[0338] QVQPVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0339] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0340] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGAQGTLVTVSS

[0341] TNF\_11 (서열 번호: 69):

[0342] QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0343] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0344] VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

[0345] TNF\_17 (서열 번호: 70):

[0346] QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0347] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0348] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0349] TNF\_63 (서열 번호: 71):

[0350] QVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0351] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0352] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0353] TNF\_20 (서열 번호: 72):

[0354] HVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0355] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0356] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0357] TNF\_58 (서열 번호: 73):

[0358] EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0359] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0360] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0361] TNF\_27 (서열 번호: 74):

[0362] EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0363] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0364] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0365] TNF\_28 (서열 번호: 75):

[0366] EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0367] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0368] VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

[0369] TNF\_4 (서열 번호: 76):

[0370] EVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0371] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA

[0372] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0373] TNF\_14 (서열 번호: 77):

[0374] DVQLVESRGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0375] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPETA

[0376] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTLVTVSS

[0377] TNF\_3 (서열 번호: 78):

[0378] DVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHVCE

[0379] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPETA

[0380] VYYCAPDPYAYSTYSDYCSWAQGTQGTQVTVSS

[0381] TNF\_1 (서열 번호: 79):

[0382] DVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGLECE

[0383] LVSTITTEGITSEASSYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPETA

[0384] VYYCAPDPYAYSTYSEYCTWAQGTQGTLVTVSS

[0385] TNF\_45 (서열 번호: 80):

[0386] DVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0387] LVSTITTEGITSEASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPETA

[0388] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTLVTVSS

[0389] TNF\_22 (서열 번호: 81):

[0390] DVQLVESGGGSVQAGETLRLSCTASGFTFAEADMGWYRQAPGHECE

[0391] LVSTITTEGITSVASSYYADSVRGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPETA

[0392] VYYCAPDPYAYSTYSDYCTWAQGTQGTQVTVSS

[0393] 여러 TNF-알파 sdAb의 시험관내 성장 저해가 아래에 설명된 바와 같이 시험되었다. 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 항-TNF-알파 sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향되는 하나 또는 그 이상의 생쥐 단일클론 항체를 포함한다. 생쥐 단일클론 항체는 앞서 설명된 바와 같이, 당업자에 의해 알려져 있는 방법에 의해 산출될 수 있다. 생쥐 단일클론 항체는 환자의 혈청 내에 존재하는 항-TNF-알파 sdAb의 양을 측정하기 위해 진단적 검정, 예를 들면, 예로서 면역검정, 예를 들면, ELISA에서 이용될 수 있다.

[0394] RAF 단백질은 세포 성장, 분화 및 생존을 제어하는 미토젠-활성화 단백질 키나아제 연쇄 반응에 세포의 신호를 전파하는데 중심적인 중간체로서 역할을 하는 세린/트레오닌-특이적 키나아제의 패밀리아이다. BRAF는 성장 인자-유도된 자극 시에 Ras 패밀리의 구성원에 의해 활성화되는 RAF 패밀리의 구성원이다. 활성화 Ras는 cRaf 및 BRAF의 이형이합체화를 유도할 수 있고, 그리고 이것은 성장 인자 신호에 반응하는 세포에서 cRaf 및 BRaf의 관찰된 협동성을 설명할 수 있다. BRAF 유전자 내에 활성화 돌연변이는 큰 백분율의 인간 악성 흑색종에서 및 일정한 비율의 결장암에서 존재한다. 이들 돌연변이 중에서 극대다수는 BRAF의 활성화 분절 내에 잔기 599에서 발린의 글루타민산으로의 변화를 유발한다.

[0395] 악성 세포, 예를 들면, 예로서, 결장암 및 다른 악성에 관련된 세포에서 역할을 교란하기 위해, 야생형 및 돌연변이된 BRAF를 표적으로 하는 항-BRAF sdAb가 개발되었다.

[0396] 당분야에서 널리 공지된 방법을 이용하여, 재조합 인간 BRAF 단백질이 BRAF의 에피토프에 대해 지향되거나 또는 이것에 결합할 수 있는 sdAb를 산출하는데 이용되었다.

[0397] 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 항-BRAF sdAb의 하나 또는 그 이상의 도메인에 대해 지향되는 하나 또는 그 이상의 생쥐 단일클론 항체를 포함한다. 생쥐 단일클론 항체는 당업자에 의해 알려져 있는 방법에 의해 산출될 수 있다. 생쥐 단일클론 항체는 진단적 검정에서 이용될 수 있다, 예를 들면, 항체는 환자의 혈청 내에 존재하는 항-BRAF sdAb의 양을 측정하기 위해 면역검정, 예를 들면, ELISA에서 이용될 수 있다.

# [0398] 실시예

[0399] 실시예 1: 항-STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) SDAB는 STAT3에 결합한다

[0400] 본 실시예에서, STAT3에 대한 2개의 VHH 표적의 친화성이 Octet 기초된 라벨-없는 결합 검정을 이용하여 측정되었다. 항-STAT3 VHH13 (서열 번호:3) sdAb, 항-KRAS (음성 대조) 및 GST-STAT3 (16kDa 일가 항원, Creative BioMart #STAT3-1476H)이 이러한 검정에서 항원 프로브로서 이용되었다. GST-STAT3 단백질은 소수성 단백질에 대해 특이적으로 의도되는 아미노프로필실란 (APS) 덩 및 판독 바이오센서를 이용하여 PBS에서 20 µg/ml로 포획되었다. 프로브는 이후, 지시된 바와 같은 농도에서 GST-STAT3 단백질, 항-STAT3 VHH13 (서열 번호:3) sdAb 또는 항-KRAS와 함께 웰 내로 담가졌다. 항원의 연관물 (온 레이트)이 측정되었다. 센서는 물에서 1% BSA로 쿼칭되었다. 이들 프로브는 검정 완충액 (PBS) 내로 담가졌고, 그리고 해리물 (오프 레이트)이 측정되었다.

[0401] 항원 및 항원 결합 단백질의 해리에 대한 평형 상수에 의해 표시된 친화성 (KD)은 획득된 친화성 상수 (KA)로부터 결정되었고, 그리고 KD는 아래의 표 1에 나타나 있는 바와 같이 1:1 전역 적합 분석 Fortebio 소프트웨어를 이용하여 결정되었다. 친화성은 R2 값 >0.95를 갖는 곡선에 대해 KD 값을 평균화함으로써 결정되었다. 250 nM 항-STAT3 VHH13 데이터 포인트는 이상점이기 때문에 제외되었다. 항-STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) sdAb 친화성은  $1.16 \times 10^{-7}$ 인 것으로 결정되었다. 항-KRAS VHH의 친화성은 결정되지 않았다.

### 표 1

| 국소 적합 분석, 친화성이 $1.16 \times 10^{-7}$ 임을 결정하는데 이용된 강조된 값 |                  |                |                |           |           |           |                   |
|---------------------------------------------------------|------------------|----------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| 센서 유형                                                   | 표본 ID            | 적합 표본 ID       | VHH Conc. (nM) | KD (M)    | kon(1/Ms) | koff(1/s) | 전체 R <sup>2</sup> |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 1000           | 1.168E-07 | 3.16E+05  | 3.69E-02  | 0.985             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 500            | 1.012E-07 | 4.04E+05  | 4.09E-02  | 0.974             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 250            | <1.0E-12  | 4.69E+91  | 5.11E-02  | 0.980             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 125            | 1.474E-07 | 3.09E+05  | 4.55E-02  | 0.991             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 62.5           | 9.921E-08 | 2.71E+05  | 2.69E-02  | 0.975             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-STAT3 VHH13 | STAT3 20 µg/ml | 31.3           | 1.53E-06  | 6.75E+04  | 1.03E-01  | 0.656             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 1000           | 6.75E-08  | 1.19E+04  | 8.01E-04  | 0.917             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 500            | 2.916E-08 | 1.65E+04  | 4.80E-04  | 0.890             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 250            | 4.324E-09 | 8.93E+04  | 3.86E-04  | 0.276             |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 125            | NA        | NA        | NA        | NA                |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 62.5           | NA        | NA        | NA        | NA                |
| APS (아미노프로필실란)                                          | ANTI-kras        | STAT3 20 µg/ml | 31.3           | NA        | NA        | NA        | NA                |

[0402]

[0403] 실시예 2: 면역침전 연구

[0404] STAT3 sdAb의 특이성은 인간 유방암 세포에서 검정되었다. 본 실시예에서, MDA-MB-231 인간 유방암 세포는 50% 내지 70% 합류점까지 성장되었다. 이들 세포는 이후, 얼음 위에서 45 분 동안, 새로 제조된 얼음같이 차가운 용해 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1% NP-40, 10% 글리세롤, 1 mM 바나듐산나트륨, 1 mM 플루오르화나트륨, 1 mM 디티오프레이트, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오르화물, 10 µg/mL 아프로티닌, 10 µg/mL 류펩틴)에서 파괴되었다. 용해물은 이후, 원심분리되고, 상층액이 수집되고, 그리고 단백질 농도가 변형된 로리법 (Bio Rad, Hercules, CA)을 이용하여 결정되었다. 전체 단백질 (1 mg)은 STAT3에 대한 sdAb, 양성 대조 (STAT3, cat#SC-482, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), 또는 음성 대조 (STAT-1, cat# 9172, Cell Signaling, Danvers, MA)를 갖는 1.5 mg의 Dynabeads (Invitrogen)와 함께 4 °C에서 1 시간 동안 배양되었다. 비드는 이후, 세척되었다. 최종 세척 이후에, 60 µl의 용해 완충액이 첨가되었고, 그리고 결과의 상층액은 웨스턴 블롯 분석에 종속되었다. 간단히 말하면, 표본은 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되고 니트로셀룰로오스 막으로 이전되었다. 막은 차단되고, 이후 적절한 일차와 이차 항체와 함께 배양되었다. 양성 대조로서 이용된 항-STAT3 항체는 Cell Signaling (Cat# 4904, Danvers, MA)으로부터 획득되었다. 화학발광 반응은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)로부터 ECL 시스템을 이용하여 수행되었다.

[0405] 도면 3에서 도해된 바와 같이, 내인성 STAT3은 변하는 양에서 시험된 모든 sdAb로 면역침전된다. M은 마커를 내포하는 마커 레인이고, 레인 1은 포유류 세포로부터 생산되고 단리된 STAT3 VHH13 (서열 번호:3)을 내포하였고, 레인 2는 포유류 세포로부터 생산되고 단리된 STAT3 VHH14 (서열 번호:4)를 내포하였고, 레인 3은 세균 세포로부터 생산되고 단리된 STAT3 VHH13 (서열 번호:3)을 내포하였고, 레인 4는 포유류 세포로부터 생산되고 단리된

STAT3 VHH14 (서열 번호:4)를 내포하였고, 라인 5는 양성 STAT3 항체이고, STAT-1이 음성 대조로서 이용된 라인 6은 어떤 띠도 보여주지 않았다.

[0406] 실시예 3: 항-STAT3 세균 VHH13은 구조성으로 활성 STAT3을 내포하는 세포주에 높은 친화성으로 결합한다

[0407] 세균 항-STAT3 VHH13 (서열 번호:3)의 특이성은 인간 (PANC-1 및 DU145) 및 무린 (4T1) 세포주에서 구조성으로 활성화된 STAT3을 이용하여 검정되었다. 상업적인 HeLa 세포는 또한, 인산화된 STAT3을 유도하기 위해 인터페론 감마 (INF- $\gamma$ )로 처리되었다. PC-3 STAT3 무표지 세포주는 음성 대조로서 이용되었다.

[0408] 이들 세포는 50% 내지 70% 합류점까지 성장되고, 이후 얼음 위에서 45 분 동안 앞서 설명된 바와 같이, 새로 제조된 얼음같이 차가운 용해 완충액에서 파괴되었다. 용해물은 이후, 원심분리되고, 상층액이 수집되고, 그리고 단백질 농도가 앞서 설명된 바와 같이 결정되었다. 전체 단백질 (1 mg)은 4 °C에서 1 시간 동안 세균 항-STAT3 VHH13 (서열 번호:3) 또는 음성 대조 (KRAS, Creative Biolabs, Shirley, NY)를 내포하는 1.5 mg의 Dynabeads (Invitrogen)와 함께 배양되었다. 비드는 이후, 세척되었다. 최종 세척 이후에, 60  $\mu$ l의 용해 완충액이 첨가되었고, 그리고 결과의 상층액은 실시예 2에서 설명된 바와 같이 웨스턴 블롯 분석에 중속되었다.

[0409] 도면 4에서 도해된 바와 같이, 내인성 STAT3은 구조성으로 활성화된 STAT3 세포주: PANC-1 (라인 1), DU145 (라인 2), 그리고 4T1 (라인 4)에서 세균 VHH13 STAT3 (서열 번호:3)에 의해 면역침전되었다. 게다가, 세균 VHH13 STAT3 (서열 번호:3)은 HeLa 용해물 (라인 3)에서 포스포-STAT3에 결합하였다. 어떤 띠도 PANC-1 KRAS, 라인 3, 그리고 PC-3 (음성 대조), 라인 6에서 확인되지 않았다.

[0410] 실시예 4: MDA-MB-231 암 세포주에서 항-STAT3 SDAB의 세포독성 연구

[0411] 본 실시예에서, 항-STAT3 sdAb의 항증식성 효과가 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231을 이용하여 검정되었다. 실험을 위해, MDA-MB-231 세포는 이들이 90%의 합류에 도달할 때까지 성장되었다. 상기 시점에서, 세포는 세척되고, 트립신처리되고, 그리고 Coulter 계수기 (Beckman, Brea, CA)를 이용하여 계수되었다. 증식 연구는 3-[4,5-디메틸티알로일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브롬화물 (MTT) 검정을 이용하여 수행되었다. 이를 위해, 세포는 제조업체 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)에 의해 지시된 바와 같이, 웰마다  $5 \times 10^3$ 의 밀도에서 96-웰 평판에 파종되었다. 세포는 24 시간 동안 부착되도록 허용되었고, 그리고 이후, sdAb가 적절한 농도 (다시 말하면, 0, 0.5, 1.0, 10.0, 또는 100  $\mu$ g/ml)에서 첨가되었다. 세포는 3 일자에 계수되었다. 5-일 처리된 세포의 경우에, sdAb를 내포하는 신선한 배지가 3 일자에 다시 채워졌다. 종결의 시점에서, 10  $\mu$ l의 MTT 시약 (0.5 mg/mL)이 제조업체에 의해 지시된 바와 같이, 각 웰에 첨가되었다. 4 시간 배양 기간 후, 100  $\mu$ l의 용해 용액이 첨가되었고, 그리고 평판은 하룻밤 동안 인큐베이터 내에 배치되었다. 모든 이들 평판은 Biotek 평판 판독기 (Winooski, VT)를 이용하여 570 nm 파장에서 판독되었다.

[0412] 모든 데이터는 GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA)을 이용하여 분석되었다. 치료군은 일원 변량분석 (ANOVA)을 이용하여 운반제 대조군과 비교되었다. 유의미한 차이 ( $p < 0.05$ )가 관찰되면, Tukey-Kramer 다중 비교 검증이 수행되었다.

[0413] MTT 실험에 근거하여, 세균 VHH13 항-STAT3 (서열 번호: 3) sdAb는 아래의 표 2-5에서 보여지는 바와 같이, 치료 후 3 및 5 일자에 세포 성장을 저해하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다.

## 표 2

[0414] MDA-MB-231 세포에서 항-STAT3 sdAb로 치료 후 3 일자에 평균 흡광도 (570nm)  $\pm$  S.E.

| 치료      | 대조                | 0.5 $\mu$ g/ml    | 1.0 $\mu$ g/ml    | 10.0 $\mu$ g/ml   | 100 $\mu$ g/ml    | p-값*    |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| H.VHH13 | 0.444 $\pm$ 0.030 | 0.504 $\pm$ 0.043 | 0.545 $\pm$ 0.060 | 0.603 $\pm$ 0.025 | 0.272 $\pm$ 0.011 | 0.001   |
| H.VHH14 | 0.404 $\pm$ 0.011 | 0.485 $\pm$ 0.040 | 0.402 $\pm$ 0.017 | 0.588 $\pm$ 0.020 | 0.416 $\pm$ 0.030 | 0.002   |
| B.VHH13 | 0.550 $\pm$ 0.036 | 0.685 $\pm$ 0.018 | 0.716 $\pm$ 0.023 | 0.355 $\pm$ 0.033 | 0.059 $\pm$ 0.001 | <0.0001 |
| B.VHH14 | 0.593 $\pm$ 0.014 | 0.666 $\pm$ 0.022 | 0.644 $\pm$ 0.045 | 0.456 $\pm$ 0.048 | 0.255 $\pm$ 0.005 | <0.0001 |

[0415] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 3

[0416] 3 일간 치료 후 MDA-MB-231 세포 증식에 대한 항-STAT3 sdAb 치료의 효과

| 치료      | $\mu\text{g/ml}$ | % 저해 | p-값*        |
|---------|------------------|------|-------------|
| H.VHH13 | 0.5              |      | NS          |
|         | 1.0              |      | NS          |
|         | 10.0             |      | NS          |
|         | 100.0            | 38.7 | $P < 0.05$  |
| H.VHH14 | 0.5              |      | NS          |
|         | 1.0              | 0.5  | NS          |
|         | 10.0             |      | NS          |
|         | 100.0            |      | NS          |
| B.VHH13 | 0.5              |      | NS          |
|         | 1.0              |      | NS          |
|         | 10.0             | 35.5 | $P < 0.001$ |
|         | 100.0            | 89.3 | $P < 0.001$ |
| B.VHH14 | 0.5              |      | NS          |
|         | 1.0              |      | NS          |
|         | 10.0             | 23.1 | $P < 0.05$  |
|         | 100.0            | 57.0 | $P < 0.001$ |

[0417] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 4

[0418] MDA-MB-231 세포에서 항-STAT3 sdAb로 치료후 5 일자에 평균 흡광도 (570nm)  $\pm$  S.E.

| 치료      | 대조                | 0.5 $\mu\text{g/ml}$ | 1.0 $\mu\text{g/ml}$ | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ | 100 $\mu\text{g/ml}$ | p-값*    |
|---------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------|
| H.VHH13 | 1.100 $\pm$ 0.088 | 0.955 $\pm$ 0.013    | 0.963 $\pm$ 0.018    | 0.832 $\pm$ 0.028     | 0.721 $\pm$ 0.025    | 0.0012  |
| H.VHH14 | 0.983 $\pm$ 0.023 | 0.890 $\pm$ 0.021    | 0.935 $\pm$ 0.037    | 0.804 $\pm$ 0.015     | 0.797 $\pm$ 0.010    | 0.0007  |
| B.VHH13 | 0.804 $\pm$ 0.046 | 0.761 $\pm$ 0.055    | 0.653 $\pm$ 0.024    | 0.506 $\pm$ 0.030     | 0.083 $\pm$ 0.005    | <0.0001 |
| B.VHH14 | 0.677 $\pm$ 0.015 | 0.733 $\pm$ 0.038    | 0.794 $\pm$ 0.023    | 0.640 $\pm$ 0.011     | 0.549 $\pm$ 0.023    | <0.0001 |

[0419] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 5

[0420] 5 일간 치료 후 MDA-MB-231 세포 증식에 대한 항-STAT3 sdAb 치료의 효과

| 치료      | $\mu\text{g/ml}$ | % 저해 | p-값*        |
|---------|------------------|------|-------------|
| H.VHH13 | 0.5              | 13.2 | NS          |
|         | 1.0              | 12.5 | NS          |
|         | 10.0             | 24.4 | $P < 0.01$  |
|         | 100.0            | 34.5 | $P < 0.001$ |
| H.VHH14 | 0.5              | 9.5  | NS          |
|         | 1.0              | 4.9  | NS          |
|         | 10.0             | 18.2 | $P < 0.001$ |
|         | 100.0            | 18.9 | $P < 0.001$ |

|         |       |      |          |
|---------|-------|------|----------|
|         |       |      |          |
| B.VHH13 | 0.5   | 5.4  | NS       |
|         | 1.0   | 18.8 | NS       |
|         | 10.0  | 37.1 | P< 0.001 |
|         | 100.0 | 89.7 | P< 0.001 |
|         |       |      |          |
| B.VHH14 | 0.5   | 0    | NS       |
|         | 1.0   | 0    | NS       |
|         | 10.0  | 5.5  | NS       |
|         | 100.0 | 18.9 | P< 0.05  |

[0421] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

[0422] 실시예 5: 인간 유방 (MDA-MB-231) 및 췌장 (PANC-1) 암 세포주에서 항-STAT3 SDAB의 세포독성 연구

[0423] 본 실시예에서, 항-STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) 및 VHH14 (서열 번호: 4) sdAb의 항증식성 효과가 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 인간 췌장암 세포주 PANC-1을 이용하여 검증되었다. 실험을 위해, MDA-MB-231 및 PANC-1 세포는 이들이 90% 합류성일 때까지 성장되었다. 상기 시점에서, 세포는 세척되고, 트립신처리되고, 그리고 Coulter 계수기 (Beckman, Brea, CA)를 이용하여 계수되었다. 증식 연구는 앞서 설명된 MTT 검정을 이용하여 수행되었다. 5-일 처리된 세포의 경우에, 항-STAT3 sdAb를 내포하는 신선한 배지가 3 일자에 다시 채워졌다.

[0424] 모든 데이터는 GraphPad InStat 3을 이용하여 분석되었다. 치료군은 일원 변량분석 (ANOVA)을 이용하여 운반제 대조군과 비교되었다. 유의미한 차이 ( $p < 0.05$ )가 관찰되면, Tukey-Kramer 다중 비교 검증이 수행되었다.

[0425] MTT 실험에 근거하여, VHH13 (서열 번호: 3) 및 VHH14 (서열 번호: 4) 둘 모두 아래의 표 6-13에서 보여지는 바와 같이, MDA-MB-231 및 PANC-1 암 세포 둘 모두에서 세포 성장을 저해하는 것으로 밝혀졌다.

## 표 6

[0426] MDA-MB-231 세포에서 sdAb로 치료후 3 일자에 평균 흡광도 (570nm)  $\pm$  S.E.

| 치료      | 실험 | 대조                | 10.0 $\mu$ g/ml   | 100 $\mu$ g/ml    | p-값*    |
|---------|----|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| B.VHH13 | 1  | 0.550 $\pm$ 0.036 | 0.355 $\pm$ 0.033 | 0.059 $\pm$ 0.001 | <0.0001 |
|         | 2  | 0.735 $\pm$ 0.092 | 0.489 $\pm$ 0.019 | 0.449 $\pm$ 0.054 | 0.0355  |
|         | 3  | 0.627 $\pm$ 0.033 | 0.432 $\pm$ 0.060 | 0.078 $\pm$ 0.001 | 0.0002  |
|         | 4  | 0.648 $\pm$ 0.090 | 0.576 $\pm$ 0.061 | 0.063 $\pm$ 0.002 | 0.0011  |
| 전체 평균   |    | 0.640 $\pm$ 0.038 | 0.463 $\pm$ 0.047 | 0.163 $\pm$ 0.10  | 0.0019  |
| B.VHH14 | 1  | 0.593 $\pm$ 0.014 | 0.456 $\pm$ 0.048 | 0.255 $\pm$ 0.005 | 0.0005  |
|         | 2  | 0.624 $\pm$ 0.046 | 0.499 $\pm$ 0.018 | 0.357 $\pm$ 0.019 | 0.0025  |
|         | 3  | 0.816 $\pm$ 0.088 | 0.502 $\pm$ 0.048 | 0.308 $\pm$ 0.021 | 0.0026  |
|         | 4  | 0.729 $\pm$ 0.051 | 0.559 $\pm$ 0.041 | 0.287 $\pm$ 0.021 | 0.0007  |
| 전체 평균   |    | 0.691 $\pm$ 0.051 | 0.504 $\pm$ 0.021 | 0.302 $\pm$ 0.043 | <0.0001 |

[0427] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

## 표 7

[0428]

MDA-MB-231 세포에서 항-STAT3 sdAb로 치료후 5 일자에 평균 흡광도 (570nm)  $\pm$  S.E.

| 치료      | 실험 | 대조                | 10.0 $\mu$ g/ml   | 100 $\mu$ g/ml     | p-값*    |
|---------|----|-------------------|-------------------|--------------------|---------|
| B.VHH13 | 1  | 0.804 $\pm$ 0.046 | 0.506 $\pm$ 0.030 | 0.083 $\pm$ 0.005  | <0.0001 |
|         | 2  | 0.561 $\pm$ 0.024 | 0.417 $\pm$ 0.011 | 0.266 $\pm$ 0.015  | <0.0001 |
|         | 3  | 0.970 $\pm$ 0.048 | 0.814 $\pm$ 0.052 | 0.105 $\pm$ 0.005  | <0.0001 |
|         | 4  | 0.757 $\pm$ 0.118 | 0.665 $\pm$ 0.036 | 0.087 $\pm$ 0.004  | 0.011   |
| 전체 평균   |    | 0.773 $\pm$ 0.084 | 0.601 $\pm$ 0.088 | 0.135 $\pm$ 0.044  | 0.0005  |
|         |    |                   |                   |                    |         |
| B.VHH14 | 1  | 0.677 $\pm$ 0.015 | 0.640 $\pm$ 0.011 | 0.549 $\pm$ 0.023  | 0.0047  |
|         | 2  | 0.456 $\pm$ 0.037 | 0.338 $\pm$ 0.023 | 0.274 $\pm$ 0.032  | 0.0166  |
|         | 3  | 0.983 $\pm$ 0.019 | 0.930 $\pm$ 0.044 | 0.578 $\pm$ 0.039  | 0.0004  |
|         | 4  | 1.092 $\pm$ 0.053 | 0.842 $\pm$ 0.052 | 0.499 $\pm$ 0.036  | 0.0004  |
| 전체 평균   |    | 0.802 $\pm$ 0.145 | 0.688 $\pm$ 0.131 | 0.475 $\pm$ 0.0690 | 0.2022  |

[0429]

\*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 8

[0430]

PANC-1 세포에서 항-STAT3 sdAb로 치료후 3 일자에 평균 흡광도 (570nm)  $\pm$  S.E.

| 치료      | 실험 | 대조                | 10.0 $\mu$ g/ml   | 100 $\mu$ g/ml    | p-값*    |
|---------|----|-------------------|-------------------|-------------------|---------|
| B.VHH13 | 1  | 0.756 $\pm$ 0.045 | 0.432 $\pm$ 0.015 | 0.307 $\pm$ 0.012 | <0.0001 |
|         | 2  | 1.347 $\pm$ 0.189 | 0.491 $\pm$ 0.087 | 0.169 $\pm$ 0.094 | 0.0019  |
|         | 3  | 1.025 $\pm$ 0.056 | 0.493 $\pm$ 0.029 | 0.166 $\pm$ 0.028 | <0.0001 |
| 전체 평균   |    | 1.043 $\pm$ 0.171 | 0.472 $\pm$ 0.020 | 0.214 $\pm$ 0.047 | 0.0034  |
|         |    |                   |                   |                   |         |
| H.VHH13 | 1  | 1.541 $\pm$ 0.097 | 1.066 $\pm$ 0.153 | 0.732 $\pm$ 0.015 | 0.0046  |
|         | 2  | 1.611 $\pm$ 0.119 | 1.353 $\pm$ 0.119 | 0.762 $\pm$ 0.654 | 0.3527  |
|         | 3  | 1.074 $\pm$ 0.040 | 0.897 $\pm$ 0.154 | 0.700 $\pm$ 0.082 | 0.1092  |
| 전체 평균   |    | 1.409 $\pm$ 0.169 | 1.105 $\pm$ 0.133 | 0.731 $\pm$ 0.181 | 0.0238  |
|         |    |                   |                   |                   |         |
| H.VHH14 | 1  | 1.195 $\pm$ 0.205 | 0.920 $\pm$ 0.133 | 0.808 $\pm$ 0.239 | 0.4161  |
|         | 2  | 1.423 $\pm$ 0.038 | 1.183 $\pm$ 0.114 | 0.993 $\pm$ 0.088 | 0.0338  |
|         | 3  | 1.293 $\pm$ 0.169 | 1.163 $\pm$ 0.044 | 0.916 $\pm$ 0.088 | 0.1330  |

|       |               |               |               |        |
|-------|---------------|---------------|---------------|--------|
| 전체 평균 | 1.304 ± 0.066 | 1.089 ± 0.085 | 0.906 ± 0.054 | 0.0188 |
|-------|---------------|---------------|---------------|--------|

[0431] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 9

[0432] PANC-1 세포에서 항-STAT3 sdAb로 치료후 5 일자에 평균 흡광도 (570nm) ± S.E.

| 치료      | 실험 | 대조            | 10.0 µg/ml    | 100 µg/ml     | p-값*    |
|---------|----|---------------|---------------|---------------|---------|
| B.VHH13 | 1  | 0.687 ± 0.047 | 0.433 ± 0.036 | 0.243 ± 0.024 | 0.0004  |
|         | 2  | 1.670 ± 0.196 | 0.869 ± 0.053 | 0.211 ± 0.006 | 0.0004  |
|         | 3  | 1.389 ± 0.044 | 0.627 ± 0.073 | 0.203 ± 0.013 | <0.0001 |
| 전체 평균   |    | 1.249 ± 0.292 | 0.643 ± 0.126 | 0.219 ± 0.012 | 0.0208  |
| H.VHH13 | 1  | 1.462 ± 0.150 | 1.128 ± 0.105 | 0.839 ± 0.117 | 0.0349  |
|         | 2  | 1.792 ± 0.202 | 1.341 ± 0.095 | 0.911 ± 0.079 | 0.0113  |
|         | 3  | 1.605 ± 0.289 | 1.161 ± 0.140 | 0.820 ± 0.005 | 0.0638  |
| 전체 평균   |    | 1.620 ± 0.096 | 1.210 ± 0.066 | 0.857 ± 0.028 | 0.0007  |
| H.VHH14 | 1  | 1.992 ± 0.105 | 1.859 ± 0.033 | 0.095 ± 0.003 | <0.0001 |
|         | 2  | 1.517 ± 0.050 | 1.165 ± 0.015 | 1.169 ± 0.050 | 0.0015  |
|         | 3  | 1.579 ± 0.134 | 1.081 ± 0.103 | 0.998 ± 0.049 | 0.0136  |
| 전체 평균   |    | 1.696 ± 0.149 | 1.368 ± 0.247 | 0.754 ± 0.333 | 0.0967  |

[0433] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 10

[0434] MDA-MB-231 세포 증식에 대한 3 일간의 항-STAT3 sdAb 치료후 평균 성장 저해

| 치료         | 실험 | P-값 <sup>a</sup> | 10.0 µg/ml | P-값 <sup>b</sup> | 100 µg/ml | P-값 <sup>b</sup> |
|------------|----|------------------|------------|------------------|-----------|------------------|
| B.VHH13    | 1  | P< 0.0001        | 35.5       | P< 0.001         | 89.3      | P< 0.001         |
|            | 2  | P= 0.03          | 33.5       | ns               | 38.9      | P< 0.05          |
|            | 3  | P= 0.0001        | 31.1       | P< 0.05          | 87.6      | P< 0.001         |
|            | 4  | P= 0.0001        | 11.1       | ns               | 90.3      | P< 0.01          |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 27.8       |                  | 76.5      |                  |
| B.VHH14    | 1  | P< 0.001         | 23.1       | P< 0.05          | 57.0      | P< 0.001         |
|            | 2  | P= 0.03          | 20.0       | ns               | 42.8      | P< 0.01          |
|            | 3  | P= 0.03          | 38.5       | P< 0.05          | 62.3      | P< 0.01          |
|            | 4  | P= 0.006         | 23.3       | ns               | 60.6      | P< 0.001         |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 26.2       |                  | 55.7      |                  |

[0435] a. 일원 분산 분석 (ANOVA); b. 사후 검증=Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 11

[0436] MDA-MB-231 세포 증식에 대한 5 일간의 항-STAT3 sdAb 치료후 평균 성장 저해

| 치료         | 실험 | P-값 <sup>a</sup> | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> | 100 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> |
|------------|----|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| B.VHH13    | 1  | P< 0.0001        | 37.1                  | P< 0.001         | 89.7                 | P< 0.001         |
|            | 2  | P< 0.0001        | 25.7                  | P< 0.001         | 52.6                 | P< 0.001         |
|            | 3  | P< 0.0001        | 16.1                  | ns               | 89.2                 | P< 0.001         |
|            | 4  | P= 0.001         | 12.2                  | ns               | 88.5                 | P< 0.01          |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 22.8                  |                  | 80.0                 |                  |
| B.VHH14    | 1  | P< 0.0001        | 5.5                   | ns               | 18.9                 | P< 0.05          |
|            | 2  | P= 0.02          | 25.9                  | ns               | 39.9                 | P< 0.05          |
|            | 3  | P= 0.0004        | 5.4                   | ns               | 41.2                 | P< 0.001         |
|            | 4  | P= 0.0004        | 22.9                  | P< 0.05          | 54.3                 | P< 0.001         |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 14.9                  |                  | 38.6                 |                  |

[0437] a. 일원 분산 분석 (ANOVA); b. 사후 검증=Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 12

[0438] PANC-1 세포 증식에 대한 3 일간의 항-STAT3 sdAb 치료후 평균 성장 저해

| 치료         | 실험 | P-값 <sup>a</sup> | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> | 100 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> |
|------------|----|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| B.VHH13    | 1  | P< 0.0001        | 42.9                  | P< 0.001         | 59.4                 | P< 0.001         |
|            | 2  | P= 0.03          | 63.5                  | P< 0.05          | 87.5                 | P< 0.01          |
|            | 3  | P< 0.0001        | 51.9                  | P< 0.001         | 83.8                 | P< 0.001         |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 52.8                  |                  | 76.9                 |                  |
| H.VHH13    | 1  | P= 0.005         | 30.8                  | P< 0.05          | 52.5                 | P< 0.01          |
|            | 2  | P= 0.002         | 16.0                  | ns               | 52.7                 | P< 0.01          |
|            | 3  | P= 0.11          | 16.5                  | ns               | 34.8                 | ns               |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 21.1                  |                  | 46.7                 |                  |
| H.VHH14    | 1  | P= 0.42          | 23.0                  | ns               | 32.4                 | ns               |
|            | 2  | P= 0.03          | 16.9                  | ns               | 30.2                 | P< 0.05          |
|            | 3  | P= 0.13          | 10.1                  | ns               | 29.2                 | ns               |
| 전체 평균 % 저해 |    |                  | 16.7                  |                  | 30.6                 |                  |

[0439] a. 일원 분산 분석 (ANOVA); b. 사후 검증 = Tukey-Kramer 다중 비교 검증

표 13

[0440] PANC-1 세포 증식에 대한 5 일간의 항-STAT3 sdAb 치료후 평균 성장 저해

| 치료      | 실험 | P-값 <sup>a</sup> | 10.0 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> | 100 $\mu\text{g/ml}$ | P-값 <sup>b</sup> |
|---------|----|------------------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| B.VHH13 | 1  | P= 0.0004        | 37.0                  | P< 0.01          | 64.6                 | P< 0.001         |
|         | 2  | P= 0.0004        | 48.0                  | P< 0.01          | 87.4                 | P< 0.001         |

|                       |   |           |             |          |             |          |
|-----------------------|---|-----------|-------------|----------|-------------|----------|
|                       | 3 | P< 0.0001 | 54.9        | P< 0.001 | 85.4        | P< 0.001 |
| <b>전체 평균 %<br/>저해</b> |   |           | <b>46.6</b> |          | <b>79.1</b> |          |
| H.VHH13               | 1 | P= 0.03   | 22.8        | ns       | 42.6        | P< 0.05  |
|                       | 2 | P= 0.01   | 25.2        | ns       | 49.2        | P< 0.01  |
|                       | 3 | P= 0.06   | 27.7        | ns       | 48.9        | ns       |
| <b>전체 평균 %<br/>저해</b> |   |           | <b>25.2</b> |          | <b>46.9</b> |          |
| H.VHH14               | 1 | P= 0.08   | 26.8        | ns       | 14.8        | ns       |
|                       | 2 | P= 0.002  | 23.2        | P< 0.01  | 22.9        | P< 0.01  |
|                       | 3 | P= 0.02   | 31.5        | P< 0.05  | 36.8        | P< 0.05  |
| <b>전체 평균 %<br/>저해</b> |   |           | <b>27.2</b> |          | <b>24.8</b> |          |

[0441] a. 일원 분산 분석 (ANOVA); b. 사후 검증 = Tukey-Kramer 다중 비교 검증

[0442] 실시예 6: 인간 유방암 및 인간 전립선암 세포주에서 STAT3 SDAB의 항증식성 작용

[0443] STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) sdAb의 항증식성 효과는 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 인간 전립선암 세포주 DU145에서 검정되었다. 실험을 위해, 암 세포는 그들이 90% 합류점에 도달할 때까지 성장되었다. 상기 시점에서, 세포는 세척되고, 트립신처리되고, 그리고 Coulter 계수기 (Beckman, Brea, CA)를 이용하여 계수되었다. 증식 연구는 앞서 설명된 MTT 검정을 이용하여 수행되었다.

[0444] MDA-MB-231 세포에 대한 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호: 3) sdAb의 항증식성 성질은 DU145 세포에 대한 이의 작용과 비교되었다. 표 14에서 보여지는 바와 같이, 항-STAT3 (서열 번호:3) sdAb로 처리된 MDA-MB-231 세포는 50.0 및 100 µg/ml에서 각각, 29.6 및 91.2의 평균 성장 저해를 보여주었다. DU145 세포에서, 유사한 성장 저해 (50.0 및 100 µg/ml에 대해 각각, 31.2 및 92.1%)가 표 15에서 진술된 바와 같이 목격되었다.

**표 14**

[0445] MDA-MB-231 유방암 세포에 대한 항-STAT3 세균 VHH13 sdAb의 항증식성 작용

|        | 실험 1<br>흡광도<br>(% 저해) | 실험 2<br>흡광도<br>(% 저해) | 실험 3<br>흡광도<br>(% 저해) | 평균<br>흡광도<br>(% 저해) | p-값*   |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| 대조     | 0.93                  | 1.25                  | 1.46                  | 1.21                |        |
| 50 µg  | 0.82 (12.0)           | 0.99 (20.5)           | 0.64 (56.2)           | 0.82 (32.6)         | NS     |
| 100 µg | 0.07 (93.1)           | 0.12 (90.1)           | 0.14 (90.5)           | 0.11 (91.0)         | <0.001 |

[0446] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

**표 15**

[0447] DU145 전립선암 세포에 대한 항-STAT3 세균 VHH13 sdAb의 항증식성 작용

|        | 실험 1<br>흡광도<br>(% 저해) | 실험 2<br>흡광도<br>(% 저해) | 실험 3<br>흡광도<br>(% 저해) | 평균<br>흡광도<br>(% 저해) | p-값*   |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| 대조     | 1.05                  | 1.58                  | 1.61                  | 1.41                |        |
| 50 µg  | 0.68 (35.7)           | 1.2 (55.5)            | 1.03 (35.8)           | 0.98 (30.5)         | NS     |
| 100 µg | 0.13 (87.4)           | 0.12 (95.7)           | 0.06 (96.1)           | 0.10 (92.7)         | <0.001 |

[0448] \*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

[0449] 실시예 7: 인간 암 세포주에 대한 STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) SDAB의 항증식성 효과

- [0450] 표 16에서 보여지는 바와 같이, 인간 암 세포주: MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BT474 및 DU145를 이용하여 STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) sdAb의 항증식성 효과가 시험되었다.
- [0451] 모든 인간 암 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)으로부터 획득되었다. 세포주는 10% 소 태아 혈청, 2 mM L-글루타민 및 1% 항균성-항진균성 용액 (10 단위/mL 페니실린, 10  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 및 25  $\mu$ g/mL 암포테리신 B)을 내포하는 RPMI 1640 배지 (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, BT474) 또는 MEM-E (DU145)에서 유지되고 배양되었다. 세포는 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>의 가습된 대기에서 유지되었다. 세포 배양 물품은 Life Technologies, Inc, (Grand Island, NY)로부터 획득되었다. MTT 시약은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입되었다.
- [0452] 실험을 위해, 암 세포는 그들이 90% 합류점에 도달할 때까지 성장되었다. 상기 시점에서, 세포는 세척되고, 트립신처리되고, 그리고 Coulter 계수기 (Beckman, Brea, CA)를 이용하여 계수되었다. 증식 연구는 앞서 설명된 바와 같은 MTT 검정을 이용하여 수행되었다.
- [0453] 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 항증식성 성질은 다양한 분류를 대표하는 5가지 유방암 세포에서 평가되었다 (표 34). 표 17에서 보여지는 바와 같이, 치료후 72 시간에서 모든 세포주는 유의미한 성장 저해를 보여주었다. 최대 성장 저해는 모든 세포주에 대해 100 및 200  $\mu$ g/ml 용량에서 확인되었다. 시험된 세포주에서 성장에 대한 반극대 저해 농도 (IC<sub>50</sub>)는 MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, 그리고 BT474 세포주의 경우에 각각, 10.1  $\pm$  2.4, 12.36  $\pm$  1.5, 14.8  $\pm$  1.6, 그리고 25.2  $\pm$  14.7이었다. 이들 데이터는 삼중 음성 유방암 세포주가 에스트로겐/프로게스테론 양성 세포주 (다시 말하면, MCF-7) 또는 HER2 증폭된 세포주 (다시 말하면, BT474)와 비교하여, IC<sub>50</sub>을 달성하기 위해 가장 낮은 농도의 VHH13 (서열 번호:3) sdAb를 필요로 한다는 것을 암시한다.

표 16

유방암 세포주 특징

[0454]

| 세포주        | 질환     | 면역프로필                                                 | 분류          |
|------------|--------|-------------------------------------------------------|-------------|
| MDA-MB-231 | 선암종    | ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup> | 기저; 클라우딘-낮음 |
| MDA-MB-468 | 선암종    | ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , Her2 <sup>-</sup> | 기저          |
| MDA-MB-453 | 전이성 암종 | ER, PR, HER2 <sup>-</sup>                             | 미분류         |
| BT474      | 관암종    | Her2 증폭됨                                              | 루미날 B       |
| MCF-7      | 선암종    | ER <sup>+</sup> , PR <sup>+</sup> , HER2 <sup>+</sup> | 루미날 A       |

표 17

[0455]

항-STAT3 VHH13 (서열 번호: 3) sdAb에 의한 유방암 세포주의 저해

| 세포주   | 치료 ( $\mu$ g/ml) | 평균 Abs | % 저해 | p-값      |
|-------|------------------|--------|------|----------|
| BT474 | 0                | 0.634  |      |          |
|       | 0.39             | 0.322  | 49.3 | P< 0.001 |
|       | 0.78             | 0.462  | 27.2 | P< 0.001 |
|       | 1.56             | 0.502  | 20.8 | P< 0.01  |
|       | 3.13             | 0.446  | 29.7 | P< 0.001 |
|       | 6.25             | 0.469  | 26.1 | P< 0.001 |
|       | 12.5             | 0.363  | 42.7 | P< 0.001 |
|       | 25               | 0.256  | 59.6 | P< 0.001 |
|       | 50               | 0.145  | 77.2 | P< 0.001 |
|       | 100              | 0.046  | 92.8 | P< 0.001 |
|       | 200              | 0.040  | 93.8 | P< 0.001 |
| MCF-7 | 0                | 0.590  |      |          |
|       | 0.39             | 0.818  | 0    |          |
|       | 0.78             | 0.785  | 0    |          |

|                   |      |       |      |          |
|-------------------|------|-------|------|----------|
|                   | 1.56 | 0.823 | 0    |          |
|                   | 3.13 | 0.689 | 0    |          |
|                   | 6.25 | 0.435 | 22.1 | NS       |
|                   | 12.5 | 0.327 | 41.6 | P< 0.01  |
|                   | 25   | 0.212 | 62.1 | P< 0.001 |
|                   | 50   | 0.057 | 89.9 | P< 0.001 |
|                   | 100  | 0.038 | 93.2 | P< 0.001 |
|                   | 200  | 0.040 | 92.9 | P< 0.001 |
|                   |      |       |      |          |
| <b>MDA-MB-468</b> | 0    | 0.253 |      |          |
|                   | 0.39 | 0.311 | 0    |          |
|                   | 0.78 | 0.289 | 0    |          |
|                   | 1.56 | 0.201 | 20.6 |          |
|                   | 3.13 | 0.223 | 11.9 |          |
|                   | 6.25 | 0.230 | 9.1  |          |
|                   | 12.5 | 0.130 | 48.6 | P< 0.001 |
|                   | 25   | 0.067 | 73.5 | P< 0.001 |
|                   | 50   | 0.042 | 83.4 | P< 0.001 |
|                   | 100  | 0.038 | 85.0 | P< 0.001 |
|                   | 200  | 0.040 | 84.4 | P< 0.001 |
|                   |      |       |      |          |
| <b>MDA-MB-231</b> | 0    | 0.502 |      |          |
|                   | 0.39 | 0.603 | 0    |          |
|                   | 0.78 | 0.576 | 0    |          |
|                   | 1.56 | 0.570 | 0    |          |
|                   | 3.13 | 0.445 | 11.4 | P< 0.001 |
|                   | 6.25 | 0.312 | 37.8 | P< 0.001 |
|                   | 12.5 | 0.224 | 55.4 | P< 0.001 |
|                   | 25   | 0.196 | 60.9 | P< 0.001 |
|                   | 50   | 0.130 | 74.2 | P< 0.001 |
|                   | 100  | 0.041 | 91.8 | P< 0.001 |
|                   | 200  | 0.042 | 91.7 | P< 0.001 |

[0456] 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 작용은 또한, 표 18에서 보여지는 바와 같이, 인간 전립선암 세포주 DU145에서 평가되었다. 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 시험된 모든 암 세포에서 용량 의존성 성장 저해를 보여주었다.

### 표 18

[0457] 전립선암 세포주에 대한 항-STAT3 VHH13 sdAb의 효과

|       | 치료 (mg/ml) | 평균 Abs | % 저해 | p-값      |
|-------|------------|--------|------|----------|
| DU145 | 0          | 0.771  |      |          |
| DU145 | 0.39       | 0.906  | 0    |          |
| DU145 | 0.78       | 1.023  | 0    |          |
| DU145 | 1.56       | 0.967  | 0    |          |
| DU145 | 3.13       | 0.783  | 0    |          |
| DU145 | 6.25       | 0.770  | 0    |          |
| DU145 | 12.5       | 0.560  | 27.4 | P< 0.05  |
| DU145 | 25         | 0.359  | 53.5 | P< 0.001 |
| DU145 | 50         | 0.161  | 79.1 | P< 0.001 |
| DU145 | 100        | 0.039  | 95.0 | P< 0.001 |
| DU145 | 200        | 0.039  | 95.0 | P< 0.001 |

[0458] 실시예 8: BALB/C 생쥐에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3)의 최대 내성 용량

[0459] 본 실시예에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 내약성이 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231을 이용하

여 시험 동물에서 검정되었다. 실험을 위해, 총 9마리의 BALB/C 누드 암컷 생쥐 (6 내지 7 주령)는 체중에 따라 3개의 군으로 나누어졌다. (표 19) 생쥐 (n=3)은 운반제 (PBS), 또는 250 또는 500  $\mu\text{g/kg}$  체중/일에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3)을 5 일 동안 제공받았다. 연구 동안, 사망률/이환율이 하루 2회 수행되었다. 체중은 연구의 1, 4 및 6 일자뿐만 아니라 연구 종결의 일자 (13 일자)에 기록되었다. 독성은 운반제 대조 생쥐와 비교하여 체중 측정 및 생쥐 행동에 의해 사정되었다. 치료 시기의 완결 시에, 동물은 치료후 체중 및/또는 전반적인 건강에서 임의의 이상을 확인하기 위해 추가로 1 주 동안 추적되었다.

표 19

최대 내성 용량 연구의 실험 설계

| 군 | # 생쥐 | 치료       | 용량                        | 루트 | 빈도  |
|---|------|----------|---------------------------|----|-----|
| 1 | 3    | PBS 운반제  | ---                       | IP | 5 일 |
| 2 | 3    | 세균 VHH13 | 250 $\mu\text{g/kg}$ b.w. | IP | 5 일 |
| 3 | 3    | 세균 VHH13 | 500 $\mu\text{g/kg}$ b.w. | IP | 5 일 |

표 20에서 예시된 바와 같이, 군 간에 체중에서 어떤 유의미한 차이도 없었고, 그리고 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 투약 수준에서 임의의 약물-관련된 사망과 연관되지 않았다. 추가적으로, 대조 생쥐와 비교하여, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb로 치료된 동물에서 어떤 행동 변화도 관찰되지 않았다.

표 20

평균 체중  $\pm$  S.E

| 군                    | 무작위화            | 1 일자            | 4 일자            | 6 일자            | 13 일자           |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 운반제                  | 17.1 $\pm$ 0.06 | 17.1 $\pm$ 0.07 | 17.8 $\pm$ 0.12 | 18.1 $\pm$ 0.09 | 18.8 $\pm$ 0.20 |
| 250 $\mu\text{g/kg}$ | 17.1 $\pm$ 0.06 | 17.2 $\pm$ 0.03 | 17.2 $\pm$ 0.15 | 17.5 $\pm$ 0.15 | 18.1 $\pm$ 0.21 |
| 500 $\mu\text{g/kg}$ | 17.1 $\pm$ 0.17 | 17.1 $\pm$ 0.09 | 17.8 $\pm$ 0.18 | 18.0 $\pm$ 0.20 | 18.5 $\pm$ 0.18 |
| p-값*                 | > 0.9999        | 0.52            | 0.05            | 0.07            | 0.11            |

\*일원 분산 분석 (ANOVA); Tukey-Kramer 다중 비교 검증

실시에 9: 누드 BALB/C 생쥐 이중이식편 및 인간 유방암과 인간 췌장암 세포에서 세균 항-STAT3 VHH13 (서열 번호:3)의 활성

본 실시예에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 활성이 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231을 이용하여 생쥐에서 평가되었다. 간단히 말하면, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 활성은 MDA-MB-231 인간 유방암 이중이식 모형 및 PANC-1 인간 췌장암 이중이식 모형을 이용하여 평가되었다. 투약 일정은 다음과 같았다: 군 1 (n=6; PBS; IP), 14 일 동안 매일 [QDx14]; 그리고 군 2 (n=12; 500  $\mu\text{g/kg}$  bw; IP), 14 일 동안 매일 [QDx14]. 5 일의 관찰 기간이 약물 투여를 뒤따랐다.

인간 유방암 세포주 (MDA-MB-231 및 PANC-1)는 American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA)으로부터 획득되었다. MDA-MB-231 세포는 10% FBS (Atlanta Biologicals, Flowery Branch, GA) 및 페니실린-스트렙토마이신-글루타민 (Life Technologies, Grand Island, NY)으로 보충된 MEM (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 성장되었다. PANC-1 세포는 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신-글루타민으로 보충된 RPMI 1640 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에서 성장되었다. 모든 세포는 5% CO<sub>2</sub>의 존재에서 37 °C에서 인큐베이터에서 성장되었다.

4 내지 5 주령의 무흉선 누드-Foxnl<sup>tm</sup> 수컷 생쥐는 Harlan Laboratories (Indianapolis, IN)로부터 구입되었다. 동물은 1 주 동안 검역되고, 그리고 12-시간 명암 주기 및 50%의 상대 습도에서 케이지마다 5마리 생쥐가 수용되었다. 식수 및 사료는 동물에 무제한으로 공급되었다. 모든 동물은 병원체-없는 조건 하에 수용되었고, 그리고 실험은 IIT Research Institute Animal Use and Care Committee에 따라서 수행되었다. MDA-MB-231 이중이식 연구의 경우에, 100- $\mu\text{L}$  최종 부피의 MEM 배지에서 세포 ( $4 \times 10^6$ )가 생쥐의 오른쪽 옆구리 내로 피하 주입되었

다. PANC-1 이종이식 연구의 경우에, 100- $\mu$ L 최종 부피의 RPMI 배지에서 세포 ( $5 \times 10^6$ )가 생쥐의 오른쪽 옆구리 내로 피하 주입되었다. 양쪽 모형에 대한 종양 계측은 종양이 촉진가능한 직후에 시작되었다. 그 후에, 종양은 주 2회 계측되었다. 동물은 종양이 75 내지 175 mm<sup>3</sup>의 범위 크기에 도달할 때 무작위화되었고, 대조 (n = 6) 및 치료 (n=12) 군은 증화된 무작위 표본추출 알고리즘을 이용하여 무작위화되었다. 치료 (항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb) 또는 운반제 (PBS)는 무작위화 다음 날 시작되었다. 상기 치료는 충분히 내약성이고 약물-관련된 사망과 연관되지 않았다. 어떤 유의미한 체중 감소도 확인되지 않았다.

[0468] MDA-MB-231 이종이식 연구의 경우에, 무작위화 평균 ( $\pm$ SE) 종양 크기는 대조 및 치료군에 대해 각각, 103.01  $\pm$  11.89 및 102.61  $\pm$  9.60이었다. 무작위로 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각, 32.08  $\pm$  0.76 및 30.27  $\pm$  0.75이었다. 표 21은 전체 연구 동안 평균 체중 ( $\pm$  SE)을 보여준다.

표 21

평균 체중  $\pm$  S.E.

| 치료            | 1 일자            | 6 일자            | 9 일자            | 12 일자           | 16 일자           | 20 일자           |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 운반제           | 31.0 $\pm$ 0.83 | 32.1 $\pm$ 0.76 | 31.9 $\pm$ 0.66 | 32.1 $\pm$ 0.68 | 32.0 $\pm$ 0.71 | 32.5 $\pm$ 0.88 |
| 항-STAT3 VHH13 | 29.2 $\pm$ 0.71 | 30.3 $\pm$ 0.75 | 30.4 $\pm$ 0.79 | 29.9 $\pm$ 0.72 | 30.6 $\pm$ 0.74 | 30.6 $\pm$ 0.77 |
| p-값*          | 0.16            | 0.18            | 0.27            | .09             | 0.28            | 0.17            |

[0470] \* 양측 t 검증

[0471] 투약의 14 일자에, 대조에 대한 평균 종양 크기 ( $\pm$ SE)는 치료군에 대한 118.86  $\pm$  15.94와 대비하여 179.11  $\pm$  19.39이었다. 종결 시점에 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각, 31.98  $\pm$  0.71 및 30.55  $\pm$  0.74이었다. 표 22는 전체 연구 동안 종양 체적 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 치료군에서 % 평균 종양 성장 저해는 33.64%이었다. 종양 배가 시간은 다음과 같았다: 군 1: 44.27 일; 그리고 군 2: 61.06 일. 도면 5는 MDA-MB-231 이종이식 모형에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해한다; 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 유의미한 성장 저해를 보여주었다 (p= 0.047). 따라서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 MDA-MB-231 인간 유방암 모형 시스템에서 화학요법 활성을 갖는다.

표 22

[0472] MDA-MB-231 이종이식 모형에 대한 개별 종양 치수 (mm<sup>3</sup>)

| 군    | 동물 # | 1 일자   | 6 일자   | 9 일자   | 12 일자  | 16 일자  | 20 일자  |
|------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1    | 1    | 117.43 | 141.72 | 135.00 | 139.31 | 127.93 | 133.19 |
|      | 2    | 130.30 | 142.83 | 206.15 | 256.99 | 244.06 | 243.00 |
|      | 3    | 78.00  | 105.97 | 114.04 | 144.06 | 154.50 | 158.94 |
|      | 4    | 118.24 | 162.41 | 171.39 | 225.59 | 181.32 | 217.97 |
|      | 5    | 71.10  | 109.03 | 133.13 | 168.80 | 187.73 | 164.45 |
| 평균   |      | 103.01 | 132.39 | 151.94 | 186.95 | 179.11 | 183.51 |
| S.E. |      | 11.89  | 10.82  | 16.42  | 23.28  | 19.39  | 20.28  |
| 2    | 6    | 123.94 | 114.91 | 129.22 | 176.04 | 170.09 | 162.98 |
|      | 7    | 85.93  | 101.06 | 112.60 | 112.24 | 139.56 | 96.43  |
|      | 8    | 147.34 | 148.72 | 169.69 | 185.08 | 170.07 | 256.71 |
|      | 9    | 115.91 | 103.64 | 108.37 | 141.21 | 144.51 | 119.42 |
|      | 10   | 73.23  | 82.59  | 110.13 | 91.22  | 166.77 | 285.88 |
|      | 11   | 163.73 | 178.23 | 183.79 | 165.52 | 214.28 | 129.51 |
|      | 12   | 75.54  | 83.94  | 103.68 | 119.88 | 104.26 | 99.48  |
|      | 13   | 70.04  | 89.24  | 102.60 | 75.25  | 57.65  | 95.23  |
|      | 14   | 101.62 | 65.09  | 82.02  | 68.01  | 61.41  | 61.83  |
|      | 15   | 67.83  | 62.21  | 59.00  | 77.04  | 65.49  | 82.73  |

|             |    |               |               |               |               |               |               |
|-------------|----|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|             | 16 | 131.93        | 75.28         | 76.21         | 53.55         | 73.66         | 51.61         |
|             | 17 | 74.28         | 109.06        | 111.92        | 89.94         | 58.56         | 100.07        |
| <b>평균</b>   |    | <b>102.61</b> | <b>101.16</b> | <b>112.44</b> | <b>112.92</b> | <b>118.86</b> | <b>128.49</b> |
| <b>S.E.</b> |    | <b>9.6</b>    | <b>9.8</b>    | <b>10.3</b>   | <b>12.9</b>   | <b>15.9</b>   | <b>21.1</b>   |
| <b>P-값</b>  |    | <b>0.98</b>   | <b>0.08</b>   | <b>0.06</b>   | <b>0.01</b>   | <b>0.05</b>   | <b>0.14</b>   |

[0473] PANC-1 이종이식 연구의 경우에, 무작위화 평균 ( $\pm$ SE) 종양 크기는 대조에서  $107.01 \pm 4.54$  및 치료군에서  $110.58 \pm 6.18$ 이었다. 무작위로 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $29.0 \pm 0.81$  및  $28.5 \pm 0.70$ 이었다. 종결 시점에 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $31.2 \pm 0.99$  및  $30.1 \pm 0.75$ 이었다. 표 23은 전체 연구 동안 평균 체중 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 투약의 14 일자에, 대조에 대한 평균 종양 크기 ( $\pm$ SE)는 치료군에 대한  $318.74 \pm 29.76$ 와 대비하여  $287.30 \pm 33.94$ 이었다. 표 24는 전체 연구 동안 종양 체적 ( $\pm$  SE)을 요약한다.

**표 23**

[0474] 평균 체중  $\pm$ S.E.

| 치료      | 2/19               | 2/24               | 2/27               | 3/2                | 3/6                | 3/10               |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 운반제 대조  | 31.0<br>$\pm 0.83$ | 32.1<br>$\pm 0.76$ | 31.9<br>$\pm 0.66$ | 32.1<br>$\pm 0.68$ | 32.0<br>$\pm 0.71$ | 32.5<br>$\pm 0.88$ |
| 항-STAT3 | 29.2<br>$\pm 0.71$ | 30.3<br>$\pm 0.75$ | 30.4<br>$\pm 0.79$ | 29.9<br>$\pm 0.72$ | 30.6<br>$\pm 0.74$ | 30.6<br>$\pm 0.77$ |

[0475] 종양 배가 시간은 다음과 같았다: 군 1: 22.44 일; 그리고 군 2: 23.02 일. 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 PANC-1 인간 체장암 모형 시스템에서 어떤 유의미한 성장 저해도 보여주지 않았다.

**표 24**

[0476] PANC-1 이종이식 모형에 대한 개별 종양 치수 ( $\text{mm}^3$ )

| 군           | 동물 # | 2/19          | 2/24          | 2/27          | 3/2           | 3/6           | 3/10          |
|-------------|------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1           | 1    | 99.77         | 117.96        | 134.67        | 161.27        | 160.79        | 195.58        |
|             | 2    | 117.54        | 137.14        | 221.14        | 241.27        | 303.70        | 321.45        |
|             | 3    | 120.30        | 210.99        | 276.05        | 322.17        | 394.96        | 732.07        |
|             | 4    | 111.65        | 135.91        | 215.87        | 340.97        | 334.08        | 382.06        |
|             | 5    | 90.88         | 96.35         | 165.26        | 156.28        | 223.17        | 314.97        |
|             | 6    | 107.05        | 156.56        | 192.98        | 324.34        | 307.13        | 573.99        |
| <b>평균</b>   |      | <b>107.87</b> | <b>142.49</b> | <b>201.00</b> | <b>257.72</b> | <b>287.30</b> | <b>420.02</b> |
| <b>S.E.</b> |      | <b>11.11</b>  | <b>16.01</b>  | <b>20.00</b>  | <b>34.35</b>  | <b>33.94</b>  | <b>80.34</b>  |
| 2           | 7    | 96.31         | 193.71        | 275.06        | 317.53        | 395.37        | 540.66        |
|             | 8    | 89.24         | 90.03         | 112.43        | 125.51        | 189.63        | 235.08        |
|             | 9    | 80.62         | 148.97        | 196.38        | 187.24        | 299.84        | 530.46        |
|             | 10   | 108.03        | 144.14        | 234.46        | 240.39        | 288.75        | 421.61        |
|             | 11   | 77.66         | 116.21        | 313.19        | 290.38        | 411.66        | 197.67        |
|             | 12   | 129.68        | 143.20        | 290.67        | 224.92        | 261.44        | 343.04        |
|             | 13   | 108.99        | 182.30        | 239.00        | 254.64        | 342.19        | 464.00        |
|             | 14   | 123.27        | 171.03        | 223.34        | 226.88        | 248.69        | 324.30        |
|             | 15   | 144.53        | 136.03        | 198.47        | 226.04        | 247.97        | 273.58        |
|             | 16   | 120.96        | 136.48        | 226.43        | 338.06        | 564.71        | 883.81        |
|             | 17   | 112.69        | 144.76        | 167.12        | 225.70        | 223.06        | 326.19        |
|             | 18   | 134.95        | 189.64        | 193.14        | 248.01        | 351.63        | 364.44        |
| <b>평균</b>   |      | <b>110.58</b> | <b>149.71</b> | <b>222.47</b> | <b>242.11</b> | <b>318.74</b> | <b>408.74</b> |
| <b>S.E.</b> |      | <b>6.18</b>   | <b>8.79</b>   | <b>15.90</b>  | <b>16.30</b>  | <b>29.76</b>  | <b>53.25</b>  |

|     |  |      |      |      |      |      |      |
|-----|--|------|------|------|------|------|------|
| P-값 |  | 0.78 | 0.67 | 0.43 | 0.64 | 0.53 | 0.91 |
|-----|--|------|------|------|------|------|------|

[0477] 실시예 10: MDA-MB-231 이중이식 연구

[0478] 본 실시예에서, MDA-MB-231 인간 유방 이중이식 모형에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 효력이 더욱 평가되었다. 투약 일정은 다음과 같았다: 군 1 (n=4; PBS; IP), 14 일 동안 하루 2회 [BIDx14]; 군 2 (n=4; 1 mg/kg bw; IP), 14 일 동안 하루 2회 [BIDx14]; 군 3 (n=4; 2 mg/kg bw; IP), 14 일 동안 하루 2회 [BIDx14]; 그리고 군 4 (n=4; 2 mg/kg bw; IP), 14 일 동안 하루 1회 [QDx14]. 7 일의 관찰 기간이 투여를 뒤 따랐다.

[0479] 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 무홍선 누드-Foxn1<sup>tm</sup> 암컷 생쥐는 앞서 설명되었다.

[0480] 5x10<sup>6</sup>의 밀도에서 MDA-MB-231 세포는 MEM 배지에서 100-μL의 최종 부피에서 생쥐의 오른쪽 옆구리 내로 피하 주입되었다. 종양 계측은 종양이 촉진가능한 직후에 시작되었다. 그 후에, 종양은 주 2회 계측되었다. 동물은 총화된 무작위 표본추출 알고리즘을 이용하여, 종양이 55 내지 150 mm<sup>3</sup>의 범위 크기에 도달할 때 무작위화된다. 치료 (항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb) 또는 운반체 (PBS)는 무작위화 다음 날 시작되었다.

[0481] 무작위화 평균 (±SE) 종양 크기는 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각, 92.08 ± 13.24, 82.38 ± 5.17, 77.47 ± 7.17, 그리고 104.71 ± 14.64이었다. 표 25에서 보여지는 바와 같이, 무작위로 평균 체중 (± SE)은 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각, 23.65 ± 0.72, 23.45 ± 0.66, 23.10 ± 0.20, 그리고 22.45 ± 1.25이었다.

[0482] 표 26에서 보여지는 바와 같이, 투약의 14 일자에, 대조군에 대한 평균 종양 크기 (±SE)는 치료군 2, 3 및 4에 대해 각각, 67.12 ± 10.66, 58.27 ± 22.54, 그리고 131.44 ± 22.86과 대비하여 221.51 ± 57.32이었다. 종결 (42 일자)의 시점에서 평균 종양 크기 (± S.E.)는 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각, 255.42 ± 65.46, 55.98 ± 6.94, 41.15 ± 13.21, 그리고 145.51 ± 52.32이었다. 종결 시점에 평균 체중 (± SE)은 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각, 24.80 ± 0.49, 23.25 ± 1.20, 24.00 ± 0.32, 그리고 23.2 ± 1.46이었다. 최대 평균 % 순 체중 감소 (일)는 군 1, 2, 3 및 4에 대해 각각, 0.7 (36), 1.5 (23), 1.8 (36), 그리고 2.2 (29)이었다.

[0483] 표 26에서 또한 보여지는 바와 같이, 치료군에서 평균 성장 저해는 군 2, 3 및 4에 대해 각각, 78.3, 75.2, 그리고 55.9이었다. 종양 배가 시간은 군 1: 20.56 일; 군 2: 34.54 일; 군 3: 30.07 일; 그리고 군 4: 27.17 일이었다. 군 2, 3 및 4에 대해 각각, 13.99, 9.52, 그리고 6.61 일의 성장 지연이 있었다. 치료군에 대한 % 치료/대조 값은 군 2: -33.75 (종양 정체); 군 3: -54.4 (종양 퇴행); 그리고 군 4: 10.28 (종양 저해)이었다. 도면 6은 MDA-MB-231 이중이식 모형에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 성장 저해를 도해한다.

[0484] 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 투여는 군 2 (p=0.02) [1 mg/kg; BID x 14] 및 군 3 (p= 0.02) [2 mg/kg; BID x 14]에서 유의미한 성장 저해와 연관되었다. 게다가, 4개의 종양 중에서 3개는 유의미한 퇴행을 보여주었다. 이들 데이터에 근거하여, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 MDA-MB-231 인간 유방암 모형 시스템에서 화학요법 활성을 갖는 것으로 결론된다.

### 표 25

평균 체중 ± S.E.

[0485]

|   |                   | 일자/연구 일      |              |              |              |              |              |              |
|---|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   |                   | 투약           |              |              |              |              | 회복           |              |
|   |                   | 6/23         | 6/26         | 6/29         | 7/2          | 7/6          | 7/9          | 7/15         |
| 군 | 일정                | 20           | 23           | 26           | 29           | 33           | 36           | 42           |
| 1 | PBS; BID x14      | 23.65 ± 0.72 | 23.85 ± 0.60 | 24.18 ± 0.67 | 24.05 ± 0.63 | 24.30 ± 0.67 | 24.13 ± 0.72 | 24.80 ± 0.49 |
| 2 | 1 mg/kg; BID x 14 | 23.45 ± 0.66 | 23.10 ± 0.68 | 23.13 ± 0.74 | 23.13 ± 0.95 | 23.08 ± 1.01 | 23.13 ± 1.09 | 23.25 ± 1.20 |
| 3 | 2 mg/kg; BID x 14 | 23.10 ± 0.20 | 23.10 ± 0.14 | 23.20 ± 0.07 | 23.85 ± 0.39 | 23.80 ± 0.24 | 23.38 ± 0.23 | 24.00 ± 0.32 |
| 4 | 2 mg/kg; QD x 14  | 22.45 ± 1.25 | 22.35 ± 1.32 | 22.58 ± 1.46 | 22.08 ± 1.44 | 22.73 ± 1.47 | 22.55 ± 1.46 | 23.20 ± 1.38 |

표 26

MDA-MB-231 이종이식 모형에 대한 개별 종양 치수 (mm)<sup>3</sup>

| 군 1     | 동물 # | 6/23/15<br>(20) | 6/26/15<br>(23) | 6/29/15<br>(26) | 7/2/15<br>(29) | 7/6/15<br>(33) | 7/9/15<br>(36) | 7/15/15<br>(42) |
|---------|------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
|         | 001  | 93.38           | 119.07          | 159.80          | 197.91         | 210.95         | 243.31         | 265.61          |
|         | 002  | 116.07          | 241.31          | 313.16          | 339.13         | 362.30         | 390.48         | 426.32          |
|         | 003  | 55.67           | 83.45           | 98.22           | 135.50         | 198.19         | 204.96         | 218.29          |
|         | 004  | 104.82          | 112.09          | 118.44          | 111.07         | 114.61         | 115.31         | 111.45          |
| 절대 평균   |      | 92.49           | 138.98          | 172.41          | 195.90         | 221.51         | 238.51         | 255.42          |
| 상대 평균   |      | 100.00%         | 150.27%         | 186.41%         | 211.82%        | 239.51%        | 257.89%        | 276.17%         |
| S.E. 평균 |      | 13.12           | 34.97           | 48.64           | 51.12          | 51.56          | 57.32          | 65.46           |
| % 저해 평균 |      |                 |                 |                 |                |                |                |                 |
| 절대 중간   |      | 99.10           | 115.58          | 139.12          | 166.71         | 204.57         | 224.13         | 241.95          |
| 상대 중간   |      | 100.00%         | 116.62%         | 140.38%         | 168.22%        | 206.42%        | 226.16%        | 244.14%         |
| S.E. 중간 |      | 13.66           | 37.49           | 52.30           | 53.83          | 52.48          | 57.91          | 65.92           |
| % 저해 중간 |      |                 |                 |                 |                |                |                |                 |

[0486]

| 군 2     | 동물 # | 6/23/15<br>(20) | 6/26/15<br>(23) | 6/29/15<br>(26) | 7/2/15<br>(29) | 7/6/15<br>(33) | 7/9/15<br>(36) | 7/15/15<br>(42) |
|---------|------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
|         | 005  | 73.15           | 54.54           | 59.17           | 57.21          | 56.20          | 37.13          | 39.17           |
|         | 006  | 80.11           | 76.56           | 80.34           | 88.75          | 99.09          | 87.42          | 72.18           |
|         | 007  | 97.22           | 79.99           | 78.44           | 59.90          | 55.90          | 53.66          | 60.35           |
|         | 008  | 81.21           | 53.58           | 54.34           | 67.43          | 57.30          | 29.02          | 52.23           |
| 절대 평균   |      | 82.92           | 66.17           | 68.07           | 68.32          | 67.12          | 51.81          | 55.98           |
| 상대 평균   |      | 100.00%         | 79.79%          | 82.09%          | 82.39%         | 80.95%         | 62.48%         | 67.51%          |
| S.E. 평균 |      | 5.09            | 7.03            | 6.62            | 7.14           | 10.66          | 12.93          | 6.94            |
| % 저해 평균 |      | 10.34%          | 52.39%          | 60.52%          | 65.12%         | 69.70%         | 78.28%         | 78.08%          |
| 절대 중간   |      | 80.66           | 65.55           | 68.80           | 63.66          | 56.75          | 45.40          | 56.29           |
| 상대 중간   |      | 100.00%         | 81.27%          | 85.30%          | 78.93%         | 70.36%         | 56.28%         | 69.79%          |
| S.E. 중간 |      | 5.25            | 7.04            | 6.63            | 7.63           | 12.23          | 13.45          | 6.94            |
| % 저해 중간 |      | 18.61%          | 43.28%          | 50.54%          | 61.81%         | 72.26%         | 79.75%         | 76.74%          |
| 군 3     | 동물 # | 6/23/15<br>(20) | 6/26/15<br>(23) | 6/29/15<br>(26) | 7/2/15<br>(29) | 7/6/15<br>(33) | 7/9/15<br>(36) | 7/15/15<br>(42) |
|         | 009  | 56.41           | 43.61           | 33.13           | 31.76          | 34.11          | 50.33          | 18.94           |
|         | 010  | 84.06           | 85.18           | 61.75           | 80.69          | 110.72         | 89.11          | 73.89           |
|         | 011  | 82.87           | 54.78           | 34.92           | 54.38          | 78.47          | 78.68          | 51.30           |
|         | 012  | 86.73           | 44.01           | 23.09           | 16.99          | 9.78           | 18.71          | 20.48           |
| 절대 평균   |      | 77.52           | 56.89           | 38.22           | 45.95          | 58.27          | 59.21          | 41.15           |
| 상대 평균   |      | 100.00%         | 73.39%          | 49.31%          | 59.28%         | 75.17%         | 76.38%         | 53.09%          |
| S.E. 평균 |      | 7.08            | 9.78            | 8.26            | 13.90          | 22.54          | 15.79          | 13.21           |
| % 저해 평균 |      | 16.19%          | 59.06%          | 77.83%          | 76.54%         | 73.69%         | 75.18%         | 83.89%          |
| 절대 중간   |      | 83.46           | 49.39           | 34.02           | 43.07          | 56.29          | 64.51          | 35.89           |
| 상대 중간   |      | 100.00%         | 59.18%          | 40.76%          | 51.60%         | 67.44%         | 77.29%         | 43.00%          |
| S.E. 중간 |      | 7.87            | 10.69           | 8.61            | 14.00          | 22.56          | 16.08          | 13.56           |
| % 저해 중간 |      | 15.78%          | 57.27%          | 75.54%          | 74.17%         | 72.49%         | 71.22%         | 85.17%          |
| 군 4     | 동물 # | 6/23/15<br>(20) | 6/26/15<br>(23) | 6/29/15<br>(26) | 7/2/15<br>(29) | 7/6/15<br>(33) | 7/9/15<br>(36) | 7/15/15<br>(42) |
|         | 013  | 88.56           | 108.35          | 105.80          | 102.94         | 183.39         | 159.78         | 291.06          |
|         | 014  | 78.73           | 51.51           | 54.20           | 70.39          | 84.29          | 55.83          | 42.03           |
|         | 015  | 113.20          | 85.29           | 69.30           | 103.16         | 103.20         | 87.15          | 130.64          |
|         | 016  | 141.91          | 130.82          | 87.49           | 145.68         | 154.89         | 117.63         | 118.31          |
| 절대 평균   |      | 105.60          | 93.99           | 79.20           | 105.54         | 131.44         | 105.10         | 145.51          |
| 상대 평균   |      | 100.00%         | 89.01%          | 75.00%          | 99.94%         | 124.47%        | 99.52%         | 137.79%         |

|         |  |         |        |        |         |         |         |         |
|---------|--|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| S.E. 평균 |  | 14.11   | 16.94  | 11.18  | 15.44   | 22.86   | 22.17   | 52.32   |
| % 저해 평균 |  | -14.18% | 32.37% | 54.06% | 46.13%  | 40.66%  | 55.94%  | 43.03%  |
| 절대 중간   |  | 100.88  | 96.82  | 78.40  | 103.05  | 129.05  | 102.39  | 124.47  |
| 상대 중간   |  | 100.00% | 95.98% | 77.71% | 102.15% | 127.92% | 101.49% | 123.38% |
| S.E. 중간 |  | 14.37   | 17.02  | 11.19  | 15.50   | 22.90   | 22.22   | 53.72   |
| % 저해 중간 |  | -1.80%  | 16.23% | 43.65% | 38.19%  | 36.92%  | 54.32%  | 48.55%  |

실시예 11: 3가지 인간 암 이종이식 모형에 대한 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) SDAB의 효력

- [0490] 본 실시예에서, MDA-MB-231 인간 유방, PANC-1 췌장, 그리고 DU145 전립선암 이종이식 모형에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 효력이 평가되었다.
- [0491] 무흉선 누드-Foxn1<sup>tm</sup> 생쥐, MDA-MB-231 유방암 세포, PANC-1 췌장암 및 DU145 전립선암 세포주는 앞서 설명되었다. 생쥐의 체중은 연구의 1 일자에 17 내지 19 g (34마리 암컷) 및 21 내지 23 g (16마리 수컷) 범위에서 변하였다.
- [0492] 초기 계대 (4 내지 10)에서 세포가 생쥐 내로 이식에 이용되었고 로그 기 성장 동안 수확되었다. MDA-MB-231 ( $5 \times 10^6$ ), DU145 ( $5 \times 10^6$ ), 그리고 PANC-1 ( $1.5 \times 10^6$ )이 100- $\mu$ L의 최종 부피의 배지에서 생쥐의 오른쪽 옆구리 내로 피하 주입되었다. 종양 계측은 종양이 촉진가능한 직후에 시작되었다. 그 후에, 종양은 주 2회 계측되었다.
- [0493] 동물은 종양이 74-120 mm<sup>3</sup> (MDA-MB-231), 89-146 mm<sup>3</sup> (DU145), 또는 60-160 mm<sup>3</sup> (PANC-1)의 범위 크기에 도달할 때, 총화된 무작위 표본추출 알고리즘을 이용하여 무작위화되었다. 치료 (항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb를 내포하고 본원에서 SBT-100으로서 지칭됨) 또는 운반제 (PBS)는 1 일자로서 지칭된, 무작위화 다음 날 시작되었다.
- [0494] 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 0.651 mg/ml의 농도에서 미리 조제된 용액으로서 공급되었고, 그리고 즉석 이용 때까지 -20 °C에서 보관되었다. 원액은 10 mL/kg의 투약 부피에서 5 mg/kg을 제공하기 위해 무균 PBS pH 7.6에서 희석되었다. 작업 용액은 7 일마다 제조되고, 7개 바이알 위에 분취되고, 그리고 4 °C에서 보관되었다. 각 치료 일에, 단지 필요한 바이알만 실온이 되었다. 모든 남아있는 sdAb 물질은 그 다음 투약을 위해 필요에 따라 4 °C에서 유지되었다. 8 일자에, 임의의 남아있는 sdAb 물질은 폐기되고 신선한 배치가 제조되었다.
- [0495] 종양 모형마다 생쥐의 2가지 군 (대조 및 SBT-100)이 표 27에서 도시된 프로토콜에 따라 투약되었다. 투약 일정은 다음과 같았다: 군 1 (n=4; PBS), 14 일 동안 하루 2회 [BIDx14]; 군 2 (n=4; SBT-100, 5 mg/kg bw), 14 일 동안 하루 2회 [BIDx14]. 운반제 (PBS pH 7.6) 및 SBT100 둘 모두 14 일 동안 하루 2회 (6 시간 이격됨) 복막 내 (i.p.) 투여되었다. 투약은 개별 동물 체중에 따라 수행되었다. 7 일의 회복 기간이 투여를 뒤따랐다.

표 27

# 이종이식 연구의 실험 설계

| 모형         | 접종된 세포의 #/생쥐      | 군 | # 생쥐 | 작용제      | 용량 (mg/kg) | 루트 | 일정     |
|------------|-------------------|---|------|----------|------------|----|--------|
| MDA-MB-231 | $5 \times 10^6$   | 1 | 4    | 대조 (PBS) | 0          | IP | BIDx14 |
|            |                   | 2 | 4    | SBT-100  | 5          | IP | BIDx14 |
| PANC-1     | $1.5 \times 10^6$ | 1 | 4    | 대조 (PBS) | 0          | IP | BIDx14 |
|            |                   | 2 | 4    | SBT-100  | 5          | IP | BIDx14 |
| DU145      | $5 \times 10^6$   | 1 | 4    | 대조 (PBS) | 0          | IP | BIDx14 |
|            |                   | 2 | 4    | SBT-100  | 5          | IP | BIDx14 |

- [0496]
- [0497] Study Log Study Director Animal Study Management Software (San Francisco, CA)가 동물을 무작위화하고, 데이터 (가령, 복용량, 체중, 종양 치수, 임상적 관찰 결과)를 수집하고, 그리고 데이터 분석을 수행하는데 이용되었다.
- [0498] MDA-MB-231 종양 이종이식 모형에서, 동물은 접종후 23 일자에 무작위화되었는데, 평균 ( $\pm$ SE) 종양 크기가 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $77.98 \pm 21.58$  및  $84.71 \pm 5.56$ 이었다. 무작위로 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $20.04 \pm 0.62$  및  $23.7 \pm 1.84$ 이었다. 표 28은 전체 연구 동안 평균 체중 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 투약의 최종일 (14 일자)에, 대조군에 대한 평균 종양 크기 ( $\pm$ SE)는 SBT-100 처리된 생쥐에 대해  $83.81 \pm 22.65$ 와 대비하여  $168.28 \pm 51.57$ 이었다. 표 29는 전체 연구 동안 종양 체적 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 종결 (28 일자)의 시점에서 평균 종양 크기 ( $\pm$  S.E.)는 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $270.49 \pm 112.35$  및  $91.72 \pm 33.17$ 이었다. 종결 시점에 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $25.36 \pm 1.07$  및  $24.25 \pm 1.68$ 이었다.

연구의 종결점에서, SBT-100 치료군에서 평균 종양 성장 저해는 85.8% ( $p=0.006$ )이었다. 도면 7은 평균 종양 체적을 도해한다. 종양 배가 시간은 군 1 및 군 2에 대해 각각, 25.78 일 대 111.6 일이었다. 군 2에 대한 % 치료/대조는 13.35 (종양 저해)이었다.

표 28

MDA-MB-231에서 생쥐에 대한 평균 체중

| 군       | 동물 ID | 시기    |        |       |        |        |       |       |
|---------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
|         |       | 투약    |        |       | 회복     |        |       |       |
|         |       | 8/28  | 9/1    | 9/4   | 9/8    | 9/11   | 9/15  | 9/18  |
| 대조      | 001   | 23.40 | 24.80  | 24.80 | 25.00  | 24.70  | 23.30 | 25.10 |
| 대조      | 002   | 22.40 | 22.50  | 22.60 | 22.70  | 22.80  | 20.50 | 23.10 |
| 대조      | 003   | 23.70 | 24.80  | 25.20 | 24.90  | 24.30  | 23.30 | 25.20 |
| 대조      | 004   | 23.70 | 24.70  | 25.10 | 25.30  | 24.90  | 22.90 | 25.40 |
| 평균      |       | 23.30 | 24.20  | 24.38 | 24.45  | 24.18  | 22.53 | 24.70 |
| 중간      |       | 23.55 | 24.75  | 24.85 | 24.90  | 24.50  | 23.10 | 25.15 |
| SD      |       | 0.62  | 1.13   | 1.21  | 1.18   | 0.95   | 1.30  | 1.07  |
| % 변화    |       | 0.00  | 3.82   | 4.66  | 4.89   | 3.73   | -3.36 | 5.97  |
| SBT-100 | 005   | 21.70 | 21.70  | 21.70 | 22.40  | 22.60  | 21.40 | 22.20 |
| SBT-100 | 006   | 25.00 | 24.30  | 24.30 | 24.70  | 25.30  | 24.40 | 25.00 |
| SBT-100 | 007   | 22.50 | 23.00  | 23.10 | 23.10  | 23.80  | 22.80 | 23.70 |
| SBT-100 | 008   | 25.50 | 25.30  | 25.50 | 26.10  | 25.90  | 25.50 | 26.10 |
| 평균      |       | 23.7  | 23.575 | 23.55 | 24.075 | 24.375 | 23.55 | 24.25 |
| 중간      |       | 23.8  | 23.65  | 23.7  | 23.9   | 24.55  | 23.6  | 24.35 |
| SD      |       | 1.84  | 1.56   | 1.63  | 1.66   | 1.46   | 1.84  | 1.68  |
| % 변화    |       | 0.00  | -0.45  | -0.15 | 1.65   | 2.96   | -0.63 | 2.38  |

[0499]

표 29

MDA-MB-231에 대한 종양 체적

| 군       | 동물 ID | 시기    |       |        |        |        |        |        |        |        |
|---------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|         |       | 투약전   |       |        | 투약     |        |        | 회복     |        |        |
|         |       | 8/21  | 8/24  | 8/27   | 9/28   | 9/1    | 9/4    | 9/8    | 9/11   | 9/15   |
| 대조      | 001   | 51.00 | 55.80 | 60.94  | 76.35  | 83.66  | 94.11  | 110.78 | 129.99 | 162.81 |
| 대조      | 002   | 78.19 | 77.22 | 121.13 | 120.73 | 145.12 | 173.21 | 203.15 | 234.08 | 308.70 |
| 대조      | 003   | 57.04 | 57.81 | 75.32  | 81.58  | 93.25  | 114.27 | 191.87 | 242.88 | 265.90 |
| 대조      | 004   | 42.92 | 51.67 | 108.54 | 92.23  | 118.96 | 142.80 | 191.58 | 213.48 | 296.81 |
| 평균      |       | 56.54 | 60.63 | 96.98  | 92.59  | 109.75 | 132.55 | 171.84 | 205.10 | 263.89 |
| 중간      |       | 54.02 | 58.80 | 93.74  | 86.84  | 105.10 | 128.44 | 186.72 | 223.76 | 291.42 |
| SD      |       | 13.71 | 11.36 | 21.58  | 19.91  | 27.42  | 36.92  | 41.83  | 51.57  | 67.78  |
| SBT-100 | 005   | 72.26 | 64.46 | 90.92  | 74.07  | 56.91  | 49.44  | 68.70  | 73.54  | 93.02  |
| SBT-100 | 006   | 61.50 | 63.08 | 80.67  | 78.60  | 71.82  | 67.08  | 67.54  | 115.80 | 116.67 |
| SBT-100 | 007   | 37.41 | 35.15 | 91.93  | 91.55  | 50.02  | 50.32  | 46.10  | 63.85  | 66.57  |
| SBT-100 | 008   | 43.00 | 58.96 | 98.22  | 79.94  | 58.29  | 60.19  | 54.10  | 82.57  | 79.47  |
| 평균      |       | 53.74 | 54.91 | 84.71  | 81.37  | 59.49  | 56.75  | 64.11  | 83.81  | 88.08  |
| 중간      |       | 52.55 | 53.82 | 83.45  | 79.77  | 58.92  | 55.25  | 61.40  | 77.81  | 85.40  |
| SD      |       | 16.09 | 13.57 | 5.56   | 7.49   | 9.18   | 8.43   | 10.21  | 22.86  | 21.96  |
| % 변화    |       | 0.0   | 32.3  | 84.9   | 81.6   | 13.6   | 5.9    | 9.2    | 29.7   | 17.5   |
| p-값     |       | 0.000 | 0.542 | 0.351  | 0.332  | 0.913  | 0.997  | 0.003  | 0.005  | 0.003  |

[0500]

[0501]

DU145 종양 이종이식 모형에서, 동물은 접종후 17 일자에 무작위화되었는데, 평균 ( $\pm$ SE) 종양 크기가 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $111.87 \pm 20.53$  및  $111.23 \pm 25.16$ 이었다. 무작위로 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $29.10 \pm 1.94$  및  $30.68 \pm 1.56$ 이었다. 표 30은 전체 연구 동안 평균 체중 ( $\pm$  SE)을 요약한다.

투약의 최종일 (14 일자)에, 대조군에 대한 평균 종양 크기 ( $\pm$ SE)는 SBT-100 치료된 생쥐에 대해  $364.14 \pm 51.64$ 와 대비하여  $621.81 \pm 276.25$ 이었다. 표 31은 전체 연구 동안 종양 체적 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 종결 (28 일자)의 시점에서 평균 종양 크기 ( $\pm$  S.E.)는 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $819.42 \pm 351.88$  및  $601.83 \pm 131.51$ 이었다. 종결 시점에 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $29.20 \pm 2.33$  및  $29.60 \pm 1.04$ 이었다. 연구의 종결점에서, SBT-100 치료군에서 평균 종양 성장 저해는 26.6% ( $p=0.29$ )이었다. 도면 8은 평균 종양 체적을 도해한다. 종양 배가 시간은 군 1 및 군 2에 대해 각각, 14.57 일 대 18.19 일이었다. 군 2에 대한 % 치료/대조는 74.8이었다.

표 30

DU145에서 생쥐에 대한 평균 체중

| 군       | 동물 ID | 시기    |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         |       | 투약    |       |       |       |       |       |       |
|         |       | 9/4   | 9/8   | 9/11  | 9/15  | 9/18  | 9/22  | 9/25  |
| 대조      | 001   | 29.60 | 28.10 | 29.30 | 28.40 | 28.30 | 29.00 | 29.90 |
| 대조      | 002   | 29.70 | 30.10 | 31.20 | 30.10 | 30.40 | 29.60 | 30.00 |
| 대조      | 003   | 30.80 | 30.10 | 31.00 | 31.70 | 31.20 | 31.10 | 31.10 |
| 대조      | 004   | 26.30 | 25.70 | 26.60 | 25.20 | 26.10 | 26.20 | 25.80 |
| 평균      |       | 29.10 | 28.50 | 29.50 | 28.85 | 28.00 | 29.05 | 29.20 |
| 중간      |       | 29.65 | 28.10 | 30.15 | 29.25 | 28.35 | 29.45 | 29.95 |
| SD      |       | 1.94  | 2.09  | 2.13  | 2.78  | 2.29  | 2.08  | 2.33  |
| % 변화    |       | 0.00  | -2.07 | 1.46  | -0.89 | -0.37 | -0.19 | 0.27  |
| SBT-100 | 005   | 30.90 | 30.20 | 27.90 | 29.80 | 29.90 | 30.50 | 30.10 |
| SBT-100 | 006   | 28.40 | 26.20 | 27.30 | 26.90 | 27.50 | 29.10 | 28.50 |
| SBT-100 | 007   | 31.70 | 31.20 | 31.50 | 30.40 | 30.70 | 31.20 | 30.80 |
| SBT-100 | 008   | 31.70 | 29.70 | 30.20 | 28.20 | 28.10 | 28.80 | 29.00 |
| 평균      |       | 30.68 | 29.33 | 29.23 | 28.83 | 29.05 | 29.90 | 29.60 |
| 중간      |       | 31.30 | 29.95 | 29.05 | 29.00 | 29.00 | 29.90 | 29.65 |
| SD      |       | 1.56  | 2.17  | 1.87  | 1.58  | 1.50  | 1.14  | 1.04  |
| % 변화    |       | 0.00  | -4.47 | -4.74 | -8.00 | -5.23 | -2.38 | -3.40 |

[0502]

표 31

DU145에 대한 종양 체적

| 군       | 동물 ID | 시기    |       |       |        |        |        |        |        |          |          |          |
|---------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
|         |       | 투약전   |       |       |        | 투약     |        |        |        |          |          |          |
|         |       | 8/24  | 8/27  | 8/31  | 9/3    | 9/4    | 9/8    | 9/11   | 9/15   | 9/18     | 9/22     | 9/25     |
| 대조      | 001   | 36.18 | 41.27 | 36.41 | 62.80  | 93.22  | 121.16 | 203.78 | 310.41 | 408.15   | 430.31   | 450.88   |
| 대조      | 002   | 45.05 | 35.98 | 64.98 | 85.50  | 103.83 | 135.42 | 235.62 | 327.76 | 473.14   | 534.48   | 586.97   |
| 대조      | 003   | 46.65 | 22.37 | 88.76 | 127.98 | 141.48 | 213.24 | 304.15 | 800.74 | 1,023.13 | 1,084.05 | 1,198.93 |
| 대조      | 004   | 17.06 | 36.44 | 65.73 | 131.20 | 138.33 | 227.23 | 286.78 | 338.79 | 576.68   | 626.90   | 1,027.90 |
| 평균      |       | 36.98 | 34.02 | 64.47 | 111.87 | 119.22 | 174.26 | 275.84 | 476.93 | 621.81   | 743.95   | 819.42   |
| 중간      |       | 42.11 | 34.22 | 65.38 | 111.74 | 121.08 | 174.33 | 287.79 | 323.27 | 527.49   | 730.89   | 813.93   |
| SD      |       | 13.57 | 8.12  | 20.58 | 20.53  | 24.32  | 53.70  | 80.81  | 392.77 | 278.25   | 311.67   | 361.88   |
| SBT-100 | 005   | 33.80 | 23.32 | 35.67 | 86.02  | 89.21  | 151.32 | 145.67 | 386.82 | 335.85   | 474.31   | 438.89   |
| SBT-100 | 006   | 59.44 | 41.00 | 64.21 | 98.56  | 121.39 | 148.44 | 206.10 | 357.62 | 391.02   | 518.26   | 680.67   |
| SBT-100 | 007   | 42.20 | 35.11 | 77.90 | 144.06 | 145.78 | 115.05 | 106.75 | 248.12 | 316.24   | 454.79   | 528.83   |
| SBT-100 | 008   | 69.37 | 50.19 | 71.23 | 119.28 | 118.70 | 194.16 | 147.52 | 320.22 | 423.48   | 604.72   | 790.86   |
| 평균      |       | 51.23 | 37.40 | 59.75 | 111.23 | 119.77 | 137.39 | 151.50 | 328.22 | 364.14   | 513.01   | 601.83   |
| 중간      |       | 60.87 | 38.06 | 62.72 | 107.42 | 129.05 | 141.30 | 146.80 | 338.92 | 358.43   | 496.26   | 588.75   |
| SD      |       | 15.13 | 11.25 | 19.90 | 25.15  | 23.17  | 18.76  | 43.88  | 59.97  | 51.64    | 65.65    | 131.51   |
| % T/C   |       | 0.0   | -25.9 | 29.1  | 78.8   | 81.7   | 85.4   | 42.1   | 79.6   | 86.9     | 89.9     | 74.8     |
| p-값     |       | 0.225 | 0.643 | 0.747 | 0.970  | 0.980  | 0.238  | 0.034  | 0.372  | 0.116    | 0.197    | 0.291    |

[0503]

[0504]

PANC-1 종양 이종이식 모형에서, 동물은 접종후 22 일자에 무작위화되었는데, 평균 ( $\pm$ SE) 종양 크기가 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $78.74 \pm 40.21$  및  $93.84 \pm 36.31$ 이었다. 무작위로 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $22.50 \pm 1.47$  및  $24.23 \pm 1.63$ 이었다. 표 32는 전체 연구 동안 평균 체중 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 투약의 최종일 (14 일자)에, 대조군에 대한 평균 종양 크기 ( $\pm$ SE)는 SBT-100 치료된 생쥐에 대해  $159.03 \pm 28.01$ 과 대비하여  $204.95 \pm 178.90$ 이었다. 표 33은 전체 연구 동안 종양 체적 ( $\pm$  SE)을 요약한다. 종결 (28 일자)의 시점에서 평균 종양 크기 ( $\pm$  S.E.)는 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $284.77 \pm 288.88$  및  $203.02 \pm 30.34$ 이었다. 종결 시점에 평균 체중 ( $\pm$  SE)은 군 1 및 군 2에 대해 각각,  $27.38 \pm 1.07$  및  $26.23 \pm 1.19$ 이었다. 연구의 종결점에서, SBT-100 치료군에서 평균 종양 성장 저해는 41.78% ( $p=0.35$ )이었다. 도면 9는 평균 종양 체적을 도해한다. 종양 배가 시간은 군 1 및 군 2에 대해 각각, 18.51 일 대 35.70 일이었다. 군 2에 대한 % 치료/대조는 52.79이었다.

표 32

PANC-1에서 생쥐에 대한 평균 체중

| 군       | 동물 ID | 시기    |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         |       | 투약    |       |       | 회복    |       |       |       |
|         |       | 9/9   | 9/11  | 9/15  | 9/18  | 9/22  | 9/25  | 9/29  |
| 대조      | 001   | 26.50 | 26.60 | 26.80 | 27.10 | 26.70 | 26.10 | 27.20 |
| 대조      | 002   | 24.30 | 24.60 | 23.90 | 25.10 | 24.40 | 25.00 | 25.00 |
| 대조      | 003   | 27.60 | 26.50 | 26.30 | 26.20 | 26.10 | 27.50 | 28.20 |
| 대조      | 004   | 26.10 | 25.30 | 24.20 | 25.10 | 24.70 | 25.80 | 26.90 |
| 평균      |       | 22.50 | 22.80 | 23.04 | 24.30 | 24.08 | 25.90 | 27.38 |
| 중간      |       | 25.80 | 25.90 | 25.00 | 25.85 | 25.20 | 26.00 | 27.05 |
| SD      |       | 1.47  | 0.97  | 1.18  | 0.97  | 0.81  | 1.03  | 1.07  |
| % 변화    |       | 0.00  | -0.39 | -3.15 | 9.12  | -2.41 | 1.05  | 4.33  |
| SBT-100 | 005   | 22.60 | 22.80 | 21.40 | 22.50 | 22.60 | 22.50 | 24.00 |
| SBT-100 | 006   | 26.00 | 25.10 | 24.90 | 25.70 | 25.10 | 25.40 | 27.10 |
| SBT-100 | 007   | 23.10 | 22.30 | 22.40 | 22.70 | 23.10 | 23.50 | 25.70 |
| SBT-100 | 008   | 26.20 | 25.00 | 25.20 | 25.40 | 26.20 | 25.40 | 27.00 |
| 평균      |       | 24.23 | 23.80 | 23.48 | 24.08 | 24.25 | 24.30 | 26.23 |
| 중간      |       | 24.15 | 23.90 | 23.65 | 24.05 | 24.10 | 24.45 | 26.40 |
| SD      |       | 1.63  | 1.48  | 1.07  | 1.71  | 1.88  | 1.28  | 1.18  |
| % 변화    |       | 0.00  | -1.71 | -3.14 | -0.63 | 0.13  | 0.39  | 8.39  |

[0505]

표 33

PANC-1에 대한 종양 체적

| 군        | 동물<br>ID | 시기    |       |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|          |          | 투약전   | 투약    |        |        |        |        |        |        |        | 회복     |
|          |          | 8/31  | 9/3   | 9/8    | 9/9    | 9/11   | 9/15   | 9/18   | 9/22   | 9/25   | 9/29   |
| 대조       | 001      | 54.91 | 58.79 | 94.23  | 94.37  | 94.89  | 129.90 | 136.77 | 206.74 | 220.31 | 223.91 |
| 대조       | 002      | 46.39 | 78.43 | 81.99  | 81.62  | 89.44  | 130.01 | 151.06 | 140.52 | 145.62 | 202.22 |
| 대조       | 003      | 0.00  | 27.50 | 57.30  | 55.60  | 99.77  | 107.02 | 142.23 | 140.55 | 168.68 | 187.27 |
| 대조       | 004      | 0.00  | 0.00  | 152.17 | 159.59 | 227.02 | 300.54 | 502.08 | 514.93 | 574.44 | 781.45 |
| 평균       |          | 20.28 | 32.54 | 78.74  | 80.91  | 104.18 | 151.29 | 189.83 | 204.95 | 228.81 | 284.77 |
| 중간       |          | 23.19 | 42.15 | 88.11  | 87.89  | 97.23  | 125.95 | 146.64 | 173.55 | 194.53 | 213.96 |
| SD       |          | 23.48 | 33.13 | 40.21  | 43.18  | 68.52  | 132.48 | 178.63 | 178.90 | 209.56 | 288.80 |
| STAT-100 | 005      | 38.60 | 64.75 | 78.44  | 78.07  | 57.54  | 93.17  | 112.58 | 140.09 | 172.92 | 245.84 |
| STAT-100 | 006      | 40.31 | 37.27 | 68.57  | 73.13  | 76.46  | 113.30 | 130.49 | 182.56 | 205.55 | 188.42 |
| STAT-100 | 007      | 38.71 | 91.27 | 147.61 | 149.02 | 123.95 | 116.01 | 157.50 | 171.29 | 175.68 | 209.97 |
| STAT-100 | 008      | 48.72 | 55.19 | 82.73  | 80.18  | 86.90  | 102.40 | 105.65 | 132.19 | 136.30 | 175.84 |
| 평균       |          | 53.58 | 82.12 | 93.84  | 85.85  | 88.31  | 106.34 | 128.65 | 159.03 | 173.02 | 203.02 |
| 중간       |          | 44.51 | 58.97 | 78.59  | 80.62  | 81.88  | 107.89 | 121.73 | 155.59 | 174.89 | 195.19 |
| SD       |          | 21.82 | 23.82 | 36.31  | 35.69  | 27.84  | 12.49  | 23.05  | 39.01  | 29.10  | 39.34  |
| % TC     |          | 0.0   | 0.0   | 42.6   | 44.2   | 27.4   | 34.4   | 39.0   | 49.7   | 51.0   | 52.8   |
| p-값      |          | 0.174 | 0.319 | 0.927  | 0.917  | 0.296  | 0.272  | 0.298  | 0.350  | 0.343  | 0.355  |

[0506]

[0507]

실시에 12: ER+/PR+ (MCF-7) 인간 유방 종양 이종이식 모형에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) SDAB의 효력

[0508]

본 실시예는 누드 생쥐에서 MCF-7 인간 유방 종양 이종이식 모형에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 효력을 보여준다.

[0509]

암컷 무흉선 누드 생쥐 (Cr1:NU(Ncr)-Foxn1<sup>tm</sup>, Charles River)는 연구의 1 일자에 12 주령이고 23.0 내지 30.1 g의 체중 (BW) 범위를 가졌다. 이들 동물은 앞서 설명된 바와 같이 사양되고 수용되었다.

[0510]

MCF-7 인간 유방 암종 세포는 앞서 설명된 바와 같이 획득되고 배양되고, 그리고 생쥐 이종이식에 이용되었다. 종양 세포 이식의 3 일 전에, 에스트로겐 펠렛 (0.36 mg 에스트라디올, 60-일 방출, Innovative Research of America, Sarasota, FL)이 살균된 트로카를 이용하여 각 시험 동물의 견갑골 사이에 피하 이식되었다.

[0511]

이식에 이용된 종양 세포는 로그 기 성장 동안 수확되고, 그리고  $1 \times 10^8$  세포/mL의 농도에서 인산염 완충된 식염수 (PBS)에서 재현탁되었다. 이식 당일, 각 시험 생쥐는 오른쪽 옆구리에서 피하 이식된  $1 \times 10^7$  MCF-7 세포 (0.1 mL 세포 현탁액)를 제공받았고, 그리고 종양 성장은 평균 크기가  $100-150 \text{ mm}^3$ 의 표적 범위에 접근함에 따라서 모니터링되었다. 21 일 후 (연구 1 일자로서 지정됨), 이들 동물은 108 내지  $144 \text{ mm}^3$ 의 범위에서 변하는 개별 종양 체적 및 117 내지  $123 \text{ mm}^3$ 의 범위에서 변하는 군 평균 종양 체적을 갖는 4마리 생쥐로 각각 구성되는 2가지 군으로 분류되었다.

[0512]

항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 1 mL 분취량에서 0.41867 mg/mL의 농도에서 미리 조제된 즉석 투약 용액으로서 제공되고 필요 때까지  $-20^\circ\text{C}$ 에서 보관되었다. 0.41867 mg/mL 용액은 23.88 mL/kg의 투약 부피에서 1 mg/kg 용량을 제공하였다. 각 치료 일에, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 필요한 바이알만 실온으로 해동되었다. 모든 남아있는 투약 현탁액은 그 다음 투약을 위해 필요에 따라  $4^\circ\text{C}$ 에서 유지되었다.

[0513]

무흉선 누드 생쥐의 2가지 군은 표 34에서 도시된 프로토콜에 따라 투약되었다. 모든 운반제 (대조) 및 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb 용량은 14 일 동안 6 시간의 간격을 두고 하루 3회 복막내 (i.p.) 투여되고, 2회 용량이 1 일자에 전달되고, 그리고 1회 용량이 15 일자의 아침에 전달되었다 (tid x 14, 첫 2 일자 투약). 운반제 및 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb에 대한 투약 부피는 20 그램의 체중당 0.478 mL (23.88 mL/kg)이고 각 개별 동물의 체중에 척도화되었다. 군 1은 운반제를 제공받았고, 그리고 종양 이식 및 진행에 대한 벤치마크 군으로서 뿐만 아니라 대조로서 역할을 하였다. 군 2는 1 mg/kg에서 항-STAT3 세균 VHH13

(서열 번호:3) sdAb가 제공되었다.

표 34

연구를 위한 프로토콜 설계

| 군 | n | 치료 섭생 |       |    |                      |
|---|---|-------|-------|----|----------------------|
|   |   | 작용제   | mg/kg | 루트 | 일정                   |
| 1 | 4 | 운반제   | -     | ip | tid x 14 , 첫 2 일자 투약 |
| 2 | 4 | VHH13 | 1     | ip | tid x 14 , 첫 2 일자 투약 |

종양은 주 2회 계측되었고, 그리고 각 동물은 신생물이 미리 결정된 종결점 체적 (1000 mm<sup>3</sup>)에 도달한 때 또는 연구의 종결점, 39 일자 중에서 어느 쪽이든 먼저 발생하는 시점에서 안락사되었다. 종양이 종결점 체적에 도달한 때에, 동물은 안락사의 일자와 함께, 종양 진행 (TP)의 사유로 안락사된 것으로 기록되었다. 각 생쥐에 대한 종결점까지 시간 (TTE)은 다음의 공식에 의해 계산되었다:

$$TTE = \frac{\log_{10}(\text{종결점 체적}) - b}{m}$$

여기서 TTE는 일자로서 표시되고, 종결점 체적은 mm<sup>3</sup>으로 표시되고, b는 인터셉트 (intercept)이고, 그리고 m은 로그-변환된 종양 성장 데이터 세트의 선형 회귀에 의해 획득된 라인의 기울기이다. 데이터 세트는 분석에서 이용된 종결점 체적을 초과한 첫 번째 관찰 결과 및 이러한 종결점 체적의 획득을 바로 선행하는 3회 연속 관찰 결과로 구성된다. 계산된 TTE는 동물이 종양 크기로 인해 안락사되는 일자인 TP 일자보다 통상적으로 적다. 종결점 체적에 도달하지 않았던 동물은 연구의 최종일 (D39)에 동등한 TTE 값이 배정되었다. 치료-관련된 (TR) 원인으로 죽은 것으로 분류된 임의의 동물은 사망 일자에 동등한 TTE 값이 배정되었다. 비-치료-관련된 (NTR) 원인으로 죽은 것으로 분류된 임의의 동물은 TTE 계산으로부터 배제되었다.

치료 효력은 종양 성장 지연 (TGD)으로부터 결정되었는데, 이것은 대조군과 비교하여 치료군에 대한 중간 TTE (일자)에서 증가로서 규정된다:

$$TGD = T - C$$

대조군에 비하여 중간 TTE에서 증가 퍼센트는 아래와 같이 규정된다:

$$\%TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$$

여기서:

T = 치료군에 대한 중간 TTE이고, 그리고

C = 지정된 대조군에 대한 중간 TTE이다.

각 군에서 치료 효력은 중간 종양 체적, MTV(n)에 의해 지시될 수 있는데, 이것은 종양이 종결점 체적을 획득하지 못한 남아있는 동물의 숫자 (n)에서 연구의 최종일 (D39)에서 중간 종양 체적으로서 규정되었다.

치료 효력은 또한, 연구 동안 관찰된 퇴행 반응의 발생률 및 크기로부터 결정될 수 있다. 치료는 동물에서 종양의 부분적인 퇴행 (PR) 또는 완전한 퇴행 (CR)을 유발할 수 있다. PR 반응에서, 종양 체적은 연구의 경과 동안 3회 연속 계측에서 D1 체적의 50% 또는 그 이하이었고, 그리고 이들 3회 계측 중에서 하나 또는 그 이상에서 13.5 mm<sup>3</sup>와 동등하거나 또는 이보다 컸다. CR 반응에서, 종양 체적은 연구의 경과 동안 3회 연속 계측에서 13.5 mm<sup>3</sup>보다 적었다. 연구의 종결점에서 CR 반응을 갖는 임의의 동물은 종양-없는 생존자 (TFS)로서 추가적으로 분

류되었다.

[0526] 동물은 첫 5 일 동안 매일, 이후 나머지 연구 기간 동안 주 2회 계량되었다. 이들 생쥐는 건강 및 임의의 불리한 치료 관련된 TR 부작용의 명시적인 징후에 대해 빈번하게 관찰되었고, 그리고 주목할 만한 임상적 관찰 결과가 기록되었다. 개별 체중 감소가 프로토콜에 따라 모니터링되었고, 그리고 1회 계측의 경우에 30%를 초과하는, 또는 3회 계측의 경우에 25%를 초과하는 체중 감소를 갖는 임의의 동물은 건강의 사유로 TR 사망자로서 안락사되었다. 군 평균 체중이 회복되면, 투약이 더욱 낮은 용량에서 또는 덜 빈번한 투약 일정에서 상기 군에서 재개될 수 있다. 허용되는 독성은 연구 동안 20%보다 적은 군 평균 BW 상실 및 10마리의 치료된 동물 사이에서 1마리보다 많지 않은 TR 사망, 또는 10%로서 규정되었다. 더욱 큰 독성을 유발하는 임의의 투약 섭생은 최대 내성 용량 (MTD)을 초과하는 것으로 고려된다. 사망은 임상적 징후 및/또는 부검에 의해 증거된 바와 같이 치료 부작용에 기인하면 TR로서 분류되거나, 또는 투약 기간 동안 또는 최종 투약의 14 일 이내에 원인불명으로 인해 TR로서 또한 분류될 수 있었다. 사망은 이러한 사망이 치료-관련되기 보다는 종양 모형에 관련된다는 증거가 있으면 NTR로서 분류되었다. NTR 사망은 NTRa (사고 또는 인간 오차로 인해), NTRm (침입 또는 전이에 의한 부검-확증된 종양 살포로 인해), 그리고 NTRu (원인불명으로 인해)로서 더욱 분류된다.

[0527] 윈도우즈용 Prism 6.07 (GraphPad)이 그래픽적 분석에 이용되었다. 통계는 작은 표본 크기로 인해 이용되지 않았다.

[0528] 군별로 개별 생쥐에 대한 TTE 값을 보여주기 위해 산점도가 구축되었다; 이러한 플롯은 NTR 사망을 보여주는데, 이들은 모든 다른 도면으로부터 배제되었다. 개별 동물, 군 중간 및 평균 종양 체적은 시간의 함수로서 플롯팅되었다. 동물이 종양 크기 또는 TR 사망으로 인해 연구로부터 빠져나갈 때, 이의 최종 기록된 종양 체적은 차후 시점에서 중간 체적을 계산하는데 이용된 데이터와 함께 포함되었다. 시간과 대비하여 연구 중에 있는 각 군에서 동물의 백분율을 보여주기 위해 카플란 마이어 플롯이 구축되었다. 종양 성장 곡선은 동일한 군에서 2번의 TR 사망이 일어나면 절단되었다. 연구의 경과에 걸쳐 군 평균 BW 변화는 1 일자로부터 퍼센트 변화,  $\pm$  SEM으로서 도표화되었다. 종양 성장 및 BW 변화 곡선은 군 내에 사정가능한 생쥐 중에서 절반 이상이 연구로부터 빠져나간 후에 절단되었다. 도면 10은 본 연구에서 평균 종양 체적을 도해한다.

[0529] 표 35는 생쥐에 대한 평균 BW 상실, TR 및 NTR 사망을 제공한다. 임상적 징후는 표 36-38에서 보여지는 바와 같이, 관찰될 때 기록되었다. 어떤 TR 사망도 연구 동안 일어나지 않았다. 체중 상실은 가변적이고, 각 군에서 1마리 동물에 대해 심각하고, 그리고 에스트로겐 효과로부터 발생하였다. 체중 감소, 확대된 자궁 뿔, 그리고 방광 결정을 비롯한 임상적 관찰 결과는 양쪽 군에서 존재하였고, 그리고 에스트로겐 효과에 또한 기인하였다. 에스트로겐 독성은 각 군에서 2번의 비-치료 관련된 사망을 유발하였다. 연구 동안 평가된 치료는 수용가능하게 용인되었다.

### 표 35

[0530] 반응 요약

| 군 | n | 치료 섭생 |       |    |                  | 중간 TTE | T-C | %TGD | MTV(n) D39 | 퇴행 |    |     | 평균 BW<br>최하점 | 사망 |      |
|---|---|-------|-------|----|------------------|--------|-----|------|------------|----|----|-----|--------------|----|------|
|   |   | 작용제   | mg/kg | 루트 | 일정               |        |     |      |            | PR | CR | TFS |              | TR | NT R |
| 1 | 2 | 운반제   | -     | ip | tidx14, 첫 2일자 투약 | 23.2   | ... | ...  | ...        | 0  | 0  | 0   | -15.6% 25일자  | 0  | 2    |
| 2 | 2 | VHH13 | 1     | ip | tidx14, 첫 2일자 투약 | 32.9   | 9.7 | 42   | ...        | 0  | 0  | 0   | -21.8% 32일자  | 0  | 2    |

표 36

제중

| 제중                                      |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |              |              |              |        |    |
|-----------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|----|
| 군 1: 운반제 (ip, tid x 14, 첫 2일자 투약)       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |              |              |              |        |    |
| 일자                                      | 연구일   | 072715 | 072815 | 072915 | 073015 | 073115 | 080315 | 080615 | 081015 | 081315 | 081715 | 082015 | 082415       | 082715       | 083115       | 090315 |    |
| A#                                      | 1     | 27.50  | 28.60  | 28.10  | 29.40  | 29.40  | 28.50  | 28.40  | 26.50  | 26.60  | 27.20  | 25.80  | 25.80        | 25.80        | 25.80        | 25.80  | 39 |
| 2                                       | 26.30 | 27.30  | 27.40  | 29.50  | 29.40  | 26.80  | 26.40  | 26.50  | 26.60  | 27.20  | 27.20  | 25.80  | 25.80        | 25.80        | 25.80        | 36     | 39 |
| 3                                       | 30.10 | 31.00  | 30.50  | 27.50  | 31.10  | 29.50  | 28.20  | 26.00  | 22.60  | 23.60  | 23.60  | 23.80  | TP on 081715 | TP on 081715 | TP on 082015 |        |    |
| 4                                       | 23.00 | 24.20  | 24.40  | 30.00  | 25.00  | 28.80  | 28.40  | 26.50  | 26.60  | 27.20  | 27.20  | 25.80  | 25.80        | 25.80        | 25.80        |        |    |
| 평균                                      | 26.7  | 27.8   | 27.6   | 27.9   | 28.2   | 28.2   | 27.3   | 26.3   | 24.6   | 25.4   | 23.8   |        |              |              |              |        |    |
| STDEV                                   | 2.9   | 2.8    | 2.5    | 2.2    | 2.6    | 1.9    | 1.3    | 0.4    | 2.9    | 2.5    | 2.5    |        |              |              |              |        |    |
| n                                       | 4     | 4      | 4      | 4      | 4      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2      | 1      |        |              |              |              |        |    |
| 군 2: VHH13(1 mg/kg, tid x 14, 첫 2일자 투약) |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |              |              |              |        |    |
| 일자                                      | 연구일   | 072715 | 072815 | 072915 | 073015 | 073115 | 080315 | 080615 | 081015 | 081315 | 081715 | 082015 | 082415       | 082715       | 083115       | 090315 |    |
| A#                                      | 1     | 28.90  | 29.30  | 28.50  | 29.60  | 28.80  | 28.70  | 27.80  | 28.30  | 28.20  | 28.80  | 29.00  | 28.90        | 28.90        | 28.90        | 39     |    |
| 2                                       | 25.30 | 27.80  | 26.40  | 26.40  | 26.40  | 25.90  | 25.80  | 27.80  | 28.30  | 28.20  | 28.80  | 29.00  | 28.90        | 28.90        | 28.90        | 36     | 39 |
| 3                                       | 27.20 | 25.40  | 23.90  | 23.90  | 26.40  | 25.90  | 25.80  | 27.80  | 28.30  | 28.20  | 28.80  | 29.00  | 28.90        | 28.90        | 28.90        |        |    |
| 4                                       | 27.60 | 27.50  | 27.10  | 27.10  | 26.40  | 25.90  | 25.80  | 27.80  | 28.30  | 28.20  | 28.80  | 29.00  | 28.90        | 28.90        | 28.90        | 24.20  |    |
| 평균                                      | 27.3  | 27.3   | 26.5   | 27.8   | 27.4   | 27.2   | 26.6   | 27.2   | 26.4   | 25.4   | 25.4   | 24.6   | 25           | 21.2         | 23.8         | 24.2   |    |
| STDEV                                   | 1.5   | 1.6    | 1.9    | 1.7    | 1.3    | 1.4    | 1.1    | 1.6    | 2.6    | 4.9    | 6.3    | 5.5    | 5.5          | 5.5          | 5.5          |        |    |
| n                                       | 4     | 4      | 4      | 4      | 4      | 3      | 3      | 3      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2            | 2            | 1            | 1      | 1  |

[0531]

표 37

중앙 계측

| 캘리포스 계측                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 군 1: 윤반제(ip, tid x 14, 첫 2일자 투약)        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 일자                                      | 0722N | 0723N | 0801N | 0802N | 0803N | 0804N | 0805N | 0806N | 0807N | 0808N | 0809N | 0810N | 0811N |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 군 2: VHH13(1 mg/kg, tid x 14, 첫 2일자 투약) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 일자                                      | 0722N | 0723N | 0801N | 0802N | 0803N | 0804N | 0805N | 0806N | 0807N | 0808N | 0809N | 0810N | 0811N |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |
| 연구일                                     | 1     | 4     | 8     | 11    | 14    | 17    | 20    | 23    | 26    | 29    | 32    | 35    | 38    |

[0532]

표 38

종양 체적

| 종양 체적                                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|-----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 군 1: 운반제(ip, tid x 14, 첫 2일자 투약)        |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 일자                                      | 07:27/15              | 14                    | 08:03/15              | 08:06/15              | 08:10/15              | 08:13/15              | 08:17/15              | 08:20/15              | 08:24/15              | 08:27/15              | 08:31/15              | 09:03/15              |                       |                       |
| 연구용 A#                                  | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) |
| 1                                       |                       | 196                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 2                                       | 108                   | 221                   | 384                   | 527                   | 650                   | 650                   | 1080                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 3                                       | 113                   | 245                   | 405                   | 690                   | 726                   | 726                   | 787                   | 1008                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 4                                       | 126                   | 270                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 평균                                      | 122.6                 | 232.8                 | 394.5                 | 563.3                 | 689                   | 689                   | 933.3                 | 1008                  |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| SEM                                     | 8.1                   | 15.8                  | 10.5                  | 36.8                  | 38                    | 38                    | 146.8                 |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| n                                       | 4                     | 4                     |                       |                       | 222221                |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 군 2: VHH13(1 mg/kg, tid x 14, 첫 2일자 투약) |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 일자                                      | 07:27/15              | 14                    | 08:03/15              | 08:06/15              | 08:10/15              | 08:13/15              | 08:17/15              | 08:20/15              | 08:24/15              | 08:27/15              | 08:31/15              | 09:03/15              |                       |                       |
| 연구용 A#                                  | TV (mm <sup>3</sup> ) | 07:30/15              | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) | TV (mm <sup>3</sup> ) |
| 1                                       | 108                   | 196                   | 320                   | 405                   | 405                   | 405                   | 550                   | 864                   | 1099                  |                       |                       |                       |                       |                       |
| 2                                       | 108                   | 126                   | 196                   | 196                   | 288                   | 288                   | 405                   | 405                   | 500                   | 500                   | 864                   | 1099                  |                       |                       |
| 3                                       | 126                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 4                                       | 126                   | 144                   | 245                   | 320                   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| 평균                                      | 117                   | 155.3                 | 253.7                 | 307                   | 346.5                 | 346.5                 | 477.5                 | 634.5                 | 799.3                 |                       |                       |                       |                       |                       |
| SEM                                     | 5.2                   | 21                    | 36.1                  | 60.7                  | 58.5                  | 58.5                  | 72.5                  | 229.5                 | 299.3                 |                       |                       |                       |                       |                       |
| n                                       | 4                     | 3                     | 3                     |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |

[0533]

[0534]

대조군에서 및 또한, 치료군에서 4마리 생쥐 중에서 2마리가 에스트로겐 독성으로 죽었기 때문에, 어떤 통계학적 결론도 결정될 수 없었다. 가용한 데이터에 따르면, 중간 종양 성장 및 평균 종양 체적이 대조군과 비교할 때 치료군에서 감소되었다. 이러한 차이는 14 일간의 치료 동안뿐만 아니라 연구의 25 일자까지 존재하였다. 대조군은 1000 mm<sup>3</sup>의 종양 체적에 도달하는데 25 일이 소요된 반면, 치료군은 1000 mm<sup>3</sup>의 종양 체적에 도달하는데 36 일이 소요되었다. 이것은 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb가 생체내에서 MCF-7 종양의 성장을 늦춘다는 것을 암시한다. 연구 내내 대조군 및 치료군 둘 모두 유사한 체중을 유지하였다. 이것은 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb가 체중 감소에 대하여 독성을 유발하지 않았다는 것을 암시한다.

[0535]

실시예 13: 이종이식 생쥐에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) SDAB로 인간 HER2+ (BT474) 유방암의 치료

[0536]

본 실시예에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb의 효력이 CB.17 SCID 생쥐에서 BT474 인간 유방 종양

이종이식편에서 결정되었다.

[0537] 옆구리에  $1\text{ mm}^3$  BT474 종양 단편의 이종이식편을 내포하는 8-12 주령 CB.17 SCID 생쥐의 2가지 군은 종양이  $100\text{-}150\text{ mm}^3$ 의 평균 크기에 도달한 때에, 표 39에서 도시된 프로토콜에 따라 치료되었다. 모든 운반제 (PBS 대조) 및 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb (표 39에서 SB-01로서 도시됨) 용량은 14 일 동안 6 시간의 간격을 두고 하루 3회 복막내 (i.p.) 투여되고, 2회 용량이 1 일자에 전달되었다 (tid x 14, 첫 2 일자 투약). 운반제 및 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb에 대한 투약 부피는 20 그램의 체중당 0.478 mL (23.88 mL/kg)이고 각 개별 동물의 체중에 척도화되었다. 군 1은 운반제를 제공받았고, 그리고 종양 이식 및 진행에 대한 벤치마크 군으로서 뿐만 아니라 대조로서 역할을 하였다. 군 2는 1 mg/kg에서 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb가 제공되었다.

표 39

연구 프로토콜

| 군              | N | 섭생 1  |     |       |    |                     |
|----------------|---|-------|-----|-------|----|---------------------|
|                |   | 작용제   | 운반제 | mg/kg | 루트 | 일정                  |
| 1 <sup>#</sup> | 4 | 운반제   |     | -     | ip | tid x 14, 첫 2 일자 투약 |
| 2              | 4 | SB-01 |     | 1     | ip | tid x 14, 첫 2 일자 투약 |

[0538]

[0539] 연구의 첫 14 일 동안, 치료군은 항-STAT3 B VHH13을 제공받았고, 그리고 대조군은 운반제만을 제공받았다. 표 40에서 보여지는 바와 같이, 이러한 시간 동안, 치료군은 연구 내내 체중을 유지하고 획득한 반면, 대조군은 연구 내내 더욱 낮은 체중을 가졌다. 이것은 치료군이 체중 감소에 대하여 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb로부터 독성을 경험하지 않았다는 것을 암시한다. 군 평균 종양 체적 및 중간 종양 체적 둘 모두 유사하고, 그리고 연구의 15 일자에 정확하게 동일하였다. 연구의 59 일자에, 양쪽 군은 700 입방  $\text{mm}^3$ 의 종양 체적에 도달 하였다. 이것은 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb가 대조군과 비교할 때 생체내에서 BT474 종양의 성장을 감소시키지 않았다는 것을 암시한다. 도면 11은 군 평균 종양 체적을 도해한다.

표 40

[0540]

BT474 반응 요약

| 군              | n | 치료 섭생 1 |     |       |    |                  | 중간 TTE | T-C  | % TGD | Stat 징후 | MTV (n) 60일 자 | PR | CR | TF S | BW 최하 점   | TR | NTR n | NTR |
|----------------|---|---------|-----|-------|----|------------------|--------|------|-------|---------|---------------|----|----|------|-----------|----|-------|-----|
|                |   | 작용제     | 운반제 | mg/kg | 루트 | 일정               |        |      |       |         |               |    |    |      |           |    |       | NTR |
| 1 <sup>#</sup> | 4 | 운반제     |     | -     | ip | tidx14, 첫 2일자 투약 | 49.2   | ...  | -     |         | 288 (2)       | 0  | 0  | 0    | -9.1% (3) | 0  | 0     | 0   |
| 2              | 4 | SB-01   |     | 1     | ip | tidx14, 첫 2일자 투약 | 60.0   | 10.8 | 22    |         | 550 (3)       | 0  | 0  | 0    | ...       | 0  | 0     | 0   |

[0541] # - 대조군

[0542] 실시예 14: 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) SDAB에 대해 지향된 생쥐 단일클론 항체의 생산

[0543] 본 실시예에서, 본 발명의 sdAb에 대한 생쥐 단일클론 항체가 산출되었다. 이용된 동물은 BALB/c 암컷 생쥐, 8-10 주령이었다. 수용성 어쥬번트가 이용되었다 (CBL). 이용된 HAT 및 HT는 Sigma-Aldrich로부터 획득되었다.

[0544] 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb는 3마리 생쥐를 면역화하고 하이브리도마 세포주를 만드는데 이용되었다. 이들 생쥐는 수용성 어쥬번트로 각각 3회 면역화되었다. 1마리 생쥐에서, 혈청 역가가 1/51200에 도달하였다. 이들 생쥐는 희생되었고, 그리고 하이브리도마 세포주가 비장 세포를 골수종 세포주 Sp2/0와 융합함으로써 만들어졌다.

[0545] 융합된 세포는 한계 희석에 의해 96 웰 평판 내로 파종되었다. 이들 융합된 세포는 HAT의 존재에서 배양되었고, 그리고 651개의 단일 클론이 시험되었다. 651개의 단일 클론 중에서, 항-STAT3 세균 VHH13 (서열 번호:3) sdAb 항원에 특이적으로 결합하는 27개의 양성 클론이 확인되었다.

[0546] 실시예 15: PANC-1 인간 췌장암 세포에서 KRAS (G12D) 단일 도메인 항체의 세포독성

[0547] 본 실시예는 인간 췌장암 세포주 PANC-1을 이용하여 항-KRAS (G12D) (서열 번호:2) sdAb의 항증식성 효과를 보여준다. 실험을 위해, PANC-1 세포는 이들이 90%의 합류에 도달할 때까지 성장되었다. 상기 시점에서, 증식 연구는 앞서 설명된 바와 같은 MTT 검정을 이용하여 수행되었다.

[0548] 처리후 3 일에 PANC-1 세포에서 항-KRAS (G12D) (서열 번호:2) sdAb의 항증식성 성질은 표 41에서 도시된다. 항-KRAS (G12D) (서열 번호:2) sdAb로 처리된 PANC-1 세포는 50.0 및 100  $\mu$ g/ml에서 각각 19.9 및 37.7의 평균 성장 저해를 보여주었다.

#### 표 41

[0549] PANC-1 암 세포에서 항-KRAS (G12D) (서열 번호:2) sdAb의 항증식성 작용

|                | 평균 Abs $\pm$ SE   | % 저해 |
|----------------|-------------------|------|
| 대조             | 0.281 $\pm$ 0.017 |      |
| 50 $\mu$ g/ml  | 0.225 $\pm$ 0.006 | 19.9 |
| 100 $\mu$ g/ml | 0.175 $\pm$ 0.016 | 37.7 |

[0550] 따라서, 항-KRAS (G12D) (서열 번호:2) sdAb는 PANC-1 인간 췌장암 세포에서 용량 의존성 성장 저해를 보여주었다.

[0551] 실시예 16: TNF-알파 SDAB에 의한 시험관내 성장 저해

[0552] 본 실시예는 TNF-알파 농도, 그리고 TNF-알파 기능의 저해의 평가를 결정하기 위한 방법 개발을 보여준다. U937 인간 폐 림프모구 세포주에서 활성의 계측가능한 조정을 증명하는데 필요한 TNF-알파의 농도는 Promega의 Cell Titer-Glo<sup>®</sup> 발광 세포 생존력 검정을 이용하여, 대사적으로 활성 세포의 존재를 신호하는 존재하는 ATP의 정량에 의해 평가되었다.

[0553] U937 세포는 90  $\mu$ L/웰의 총 부피에서 투명한 폴리스티렌 96-웰 미소배양 평판 (Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup> 96-웰 편평 바닥 평판, Cat. #3997)에 파종되었다. 37  $^{\circ}$ C 및 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기에서 가습된 인큐베이터에서 24 시간의 배양 후, 성장 배지에서 5  $\mu$ L의 20X, 계열 희석된 TNF-알파가 각 웰에 2중으로 첨가되었다 (10 pt 용량 반응, 최고 농도 20 ng/mL). 추가적으로, 성장 배지에서 5  $\mu$ L의 20X, 희석된 스타우로스포린이 각 웰에 2중으로 첨가되었다 (농도 1 nM).

[0554] 시험 작용제의 존재에서 24 시간의 배양 후, U937 세포주에서 TNF-알파 활성의 계측가능한 조정을 증명하는데 필요한 화합물의 농도는 존재하는 ATP의 정량에 의해 평가되었다. 퍼센트 세포 성장은 처리되지 않은 대조 웰에 상대적으로 계산되었다. 모든 검사는 각 농도 수준에서 2중으로 수행되었다.

[0555] 시험 작용제에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 다음의 4 파라미터-로지스틱 방정식을 이용하여 데이터를 곡선-적합함으로써, Prism 6.05를 이용하여 추정되었다:

$$Y = \frac{\text{맨 위} - \text{맨 아래}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^n} + \text{맨 아래}$$

[0556]

[0557] 여기서 맨 위는 대조 흡광도의 최대 %이고, 맨 아래는 최고 작용제 농도에서 대조 흡광도의 최소 %이고, Y는 대조 흡광도의 %이고, X는 작용제 농도이고, IC<sub>50</sub>은 대조 세포와 비교하여 세포 성장을 50% 저해하는 작용제의 농

도이고, 그리고 n은 곡선의 기울기이다.

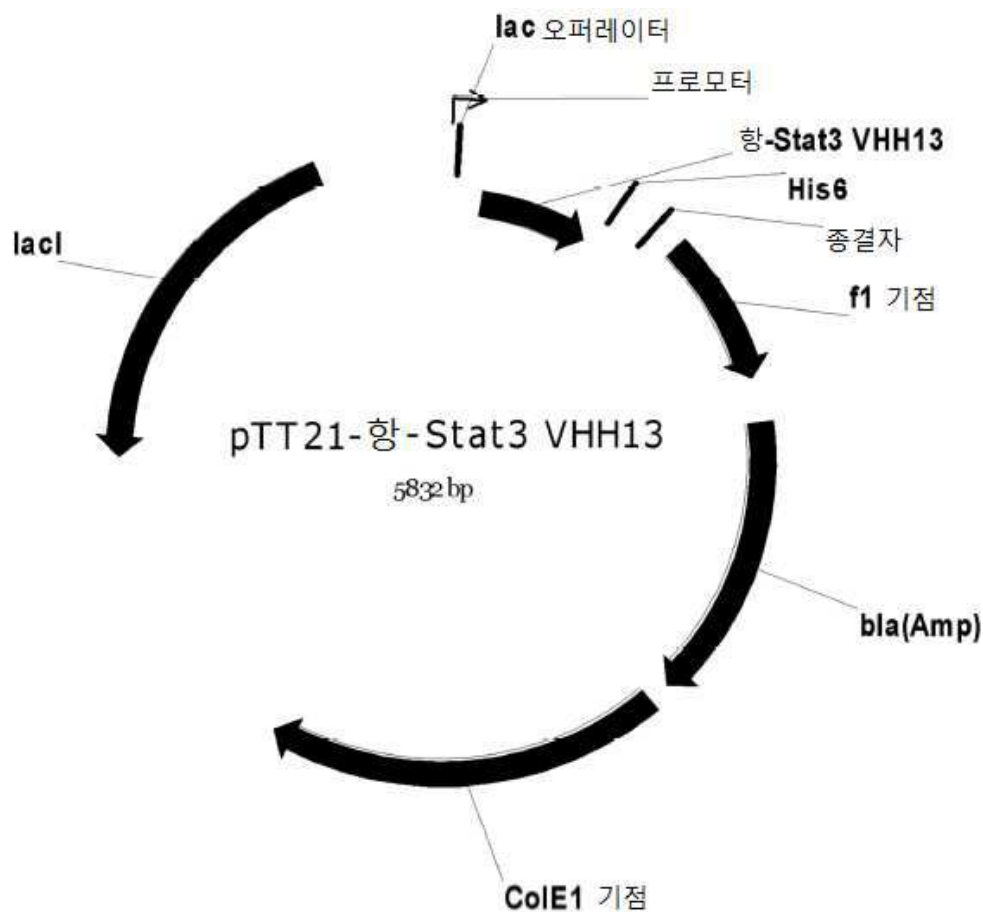
[0558] 도면 12 및 13은 TNF-알파가 U937 세포에 세포독성이라는 것을 증명한다. U937에 대항하여 TNF-알파에 대한  $IC_{50}$ 은 95.10 pg/ml이다. TNF-알파 곡선은 용량 적정 사멸 효과를 보여준다.

[0559] 도면 14는 U937에 대항하여 TNF-알파 세포독성이 3가지 상이한 항-TNF-알파 VHH에 의해 저해된다는 것을 증명한다. 항-TNF-알파 VHH62 (서열 번호:47) sdAb, 항-TNF-알파 VHH 66 (서열 번호:45) sdAb, 그리고 항-TNF-알파 VHH69 (서열 번호:46) sdAb가  $EC_{50}$ 에서 일정한 용량의 TNF-알파와 함께 배양될 때, 3가지 항-TNF-알파 VHH 모두 TNF-알파에 의한 U937의 사멸을 저해한다. 항-TNF-알파 VHH62 (서열 번호:47) sdAb의  $IC_{50}$ 은 대략 713.6 ug/ml 이었다. 항-TNF-알파 VHH69 (서열 번호:46) sdAb의  $IC_{50}$ 은 208.055 ug/ml보다 컸다. 항-TNF-알파 VHH66 (서열 번호:45) sdAb의  $IC_{50}$ 은 결정될 수 없었는데, 그 이유는 이것이 약  $1 \times 10^2$  ug/ml 내지  $1 \times 10^2$  ug/ml의 항-TNF-알파 VHH66 (서열 번호:45) sdAb의 농도로부터 TNF-알파의 세포독성을 완전하게 저해했기 때문이다. 항-TNF-알파 VHH66 (서열 번호:45) sdAb의 이러한 농도 범위에서, U937 세포 성장에서 증가, 그리고 따라서, TNF-알파 활성의 완전한 저해가 나타난다.

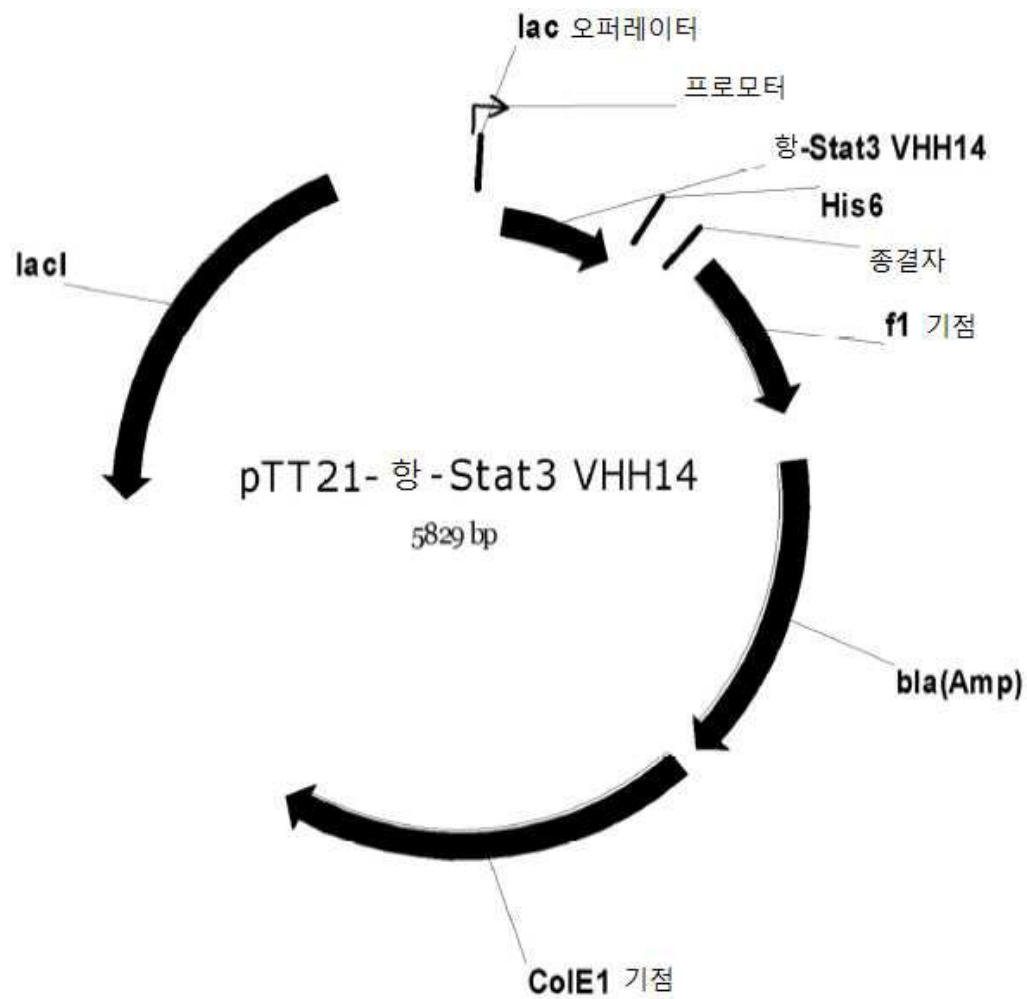
[0560] 비록 본 발명이 일정한 바람직한 구체예에 관하여 상당히 상세하게 설명되긴 했지만, 다른 구체예가 가능하다. 본 발명 방법을 위해 개시된 단계는 예로서, 제한하는 것으로 의도되지 않을 뿐만 아니라 이들은 각 단계가 상기 방법에 반드시 필요하다는 것을 지시하는 것으로 의도되지 않고, 단지 예시적인 단계에 불과하다. 이런 이유로, 첨부된 청구항의 범위는 본 발명에서 내포된 바람직한 구체예의 설명으로 제한되지 않아야 한다. 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 전체적으로 참조로서 편입된다.

## 도면

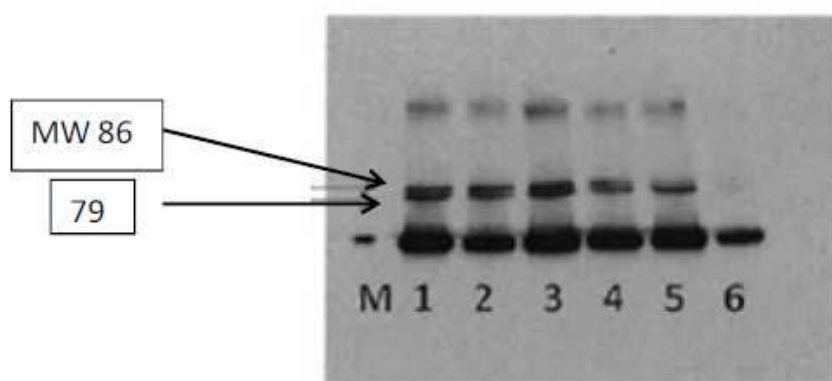
### 도면1



도면2



도면3



레안:

M- 마커

1- STAT3 VHH13 (포유류)

2- STAT3 VHH14 (포유류)

3- STAT3 VHH13 (세균)

4- STAT3- VHH14 (세균)

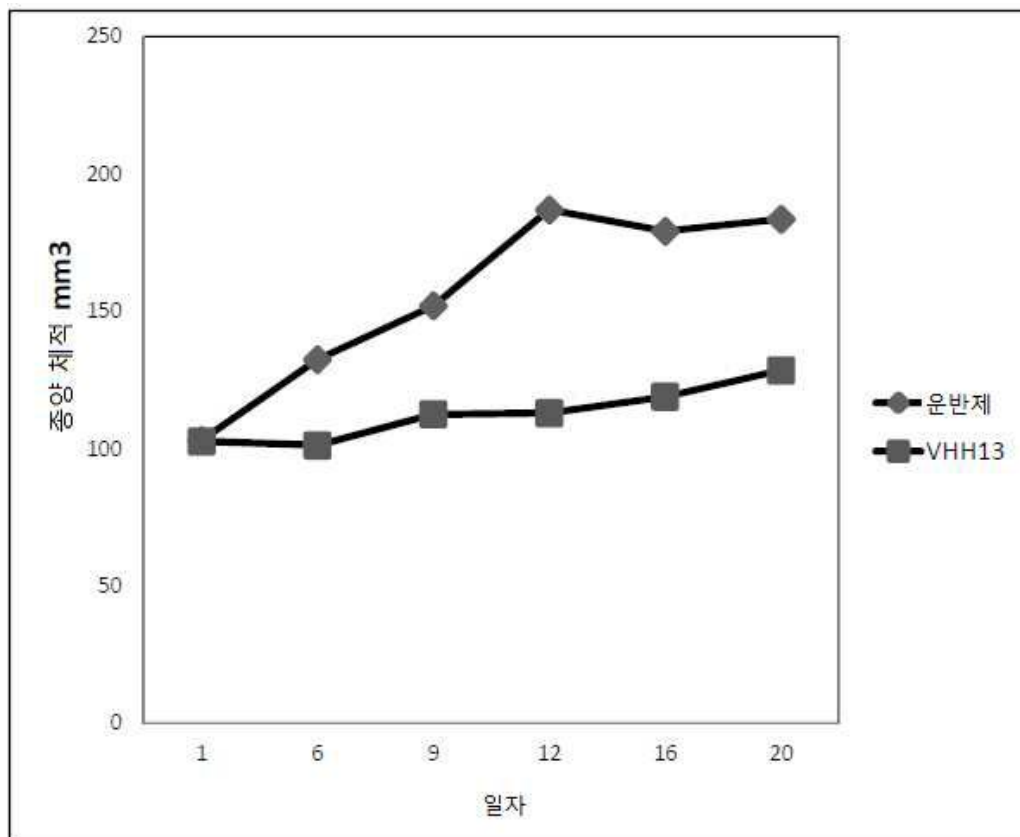
5- 양성 대조 (STAT-3)

6- 음성 대조 (STAT-1)

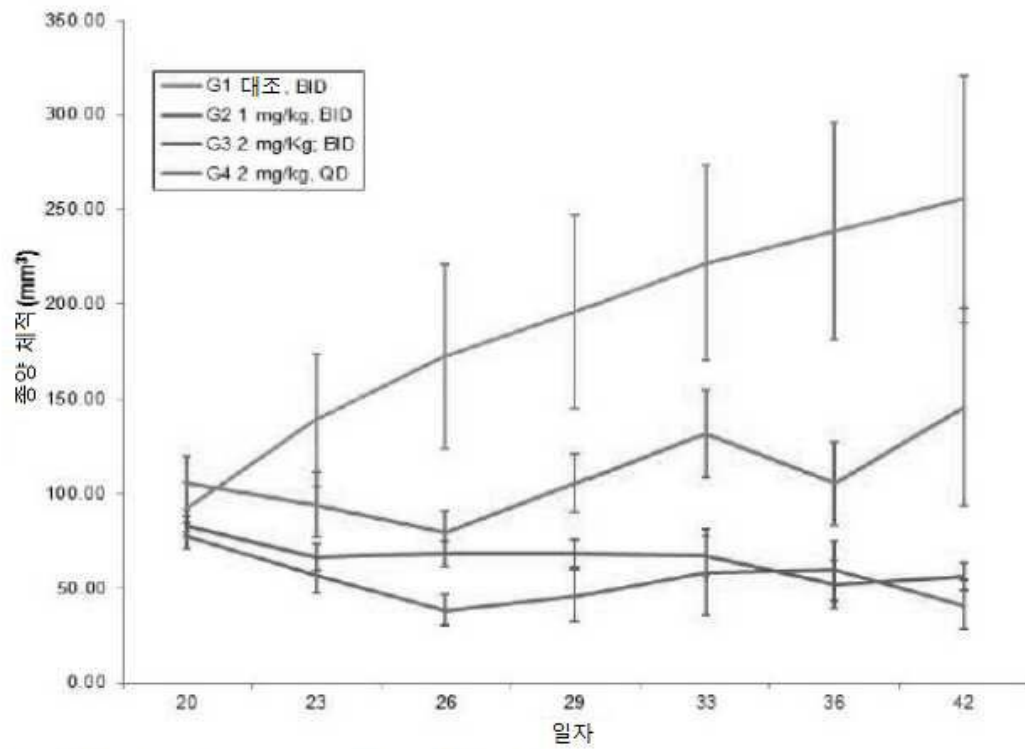
도면4



도면5



도면6



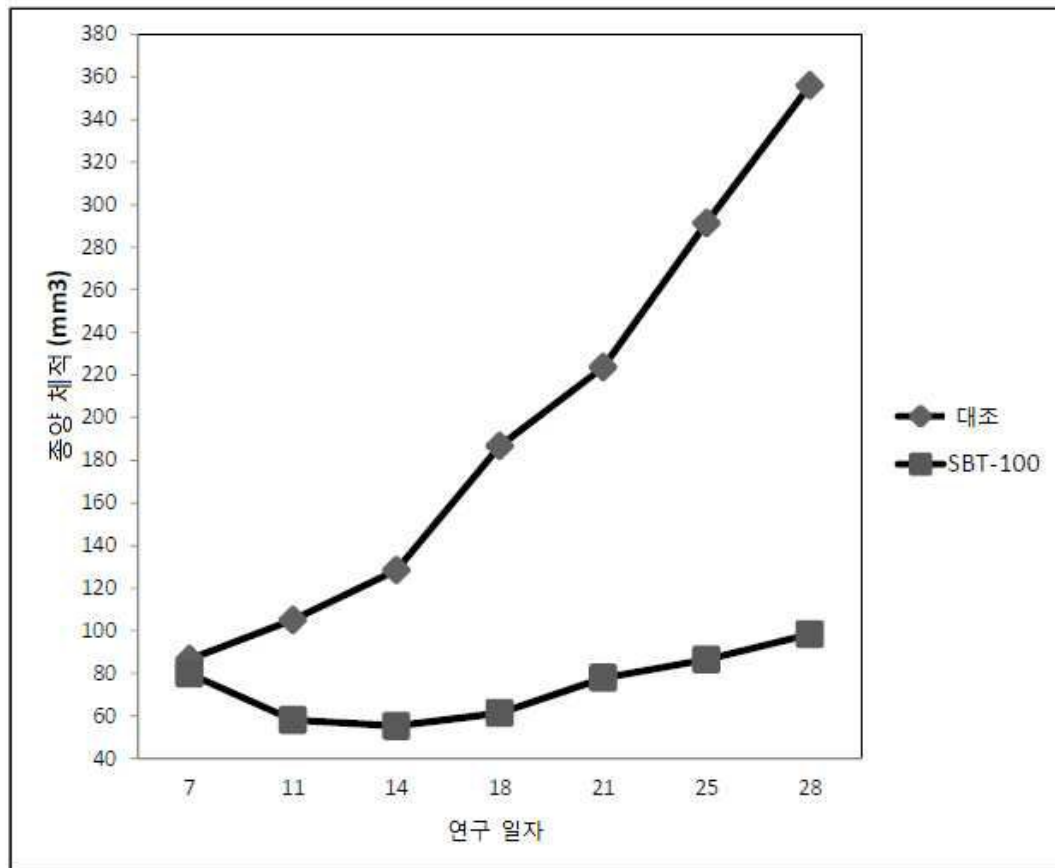
맨 위 곡선: G1은 운반제 단독이 하루 2회 IP 제공된 대조군이다

두 번째 곡선: G2는 항-STAT3 B VHH13가 하루 2회 1 mg/kg으로 IP 제공된다

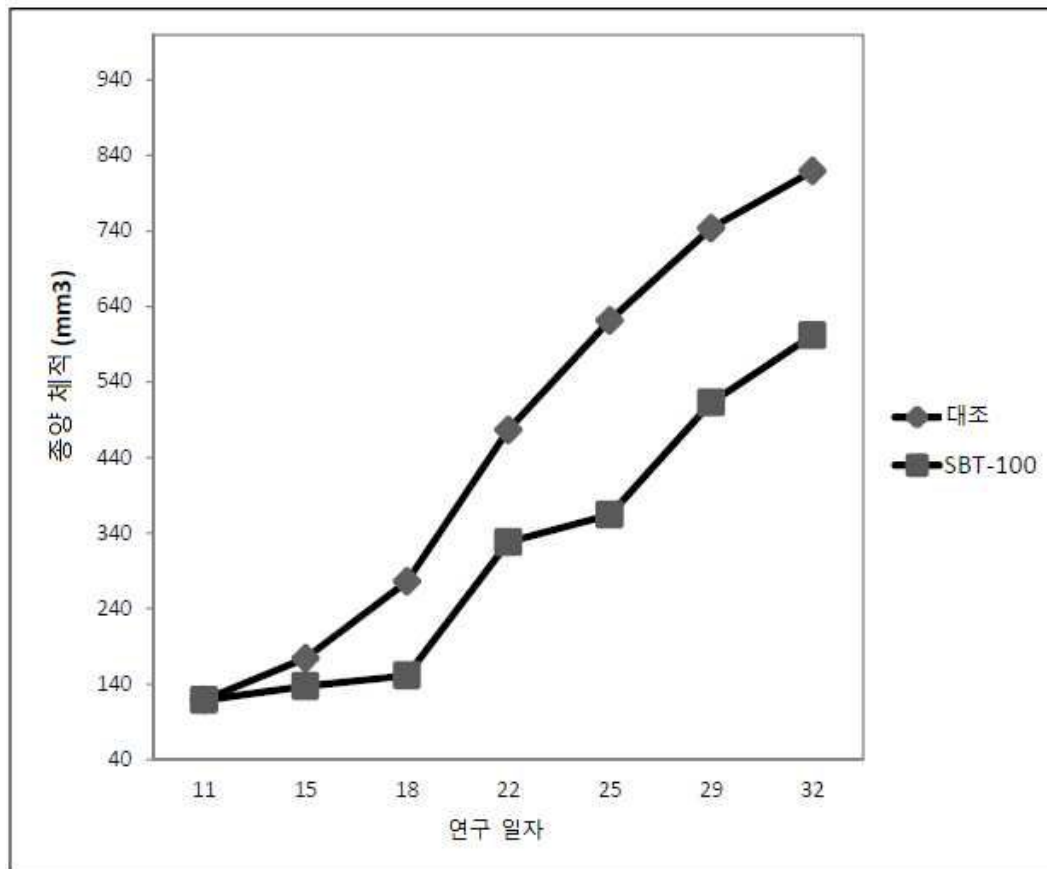
시작 지점에서 세 번째 곡선: G3은 항-STAT3 B VHH13가 하루 2회 2 mg/kg으로 IP 제공된다

시작 지점에서 맨 아래 곡선: G4는 항-STAT3 B VHH13가 하루 1회 2 mg/kg으로 IP 제공된다

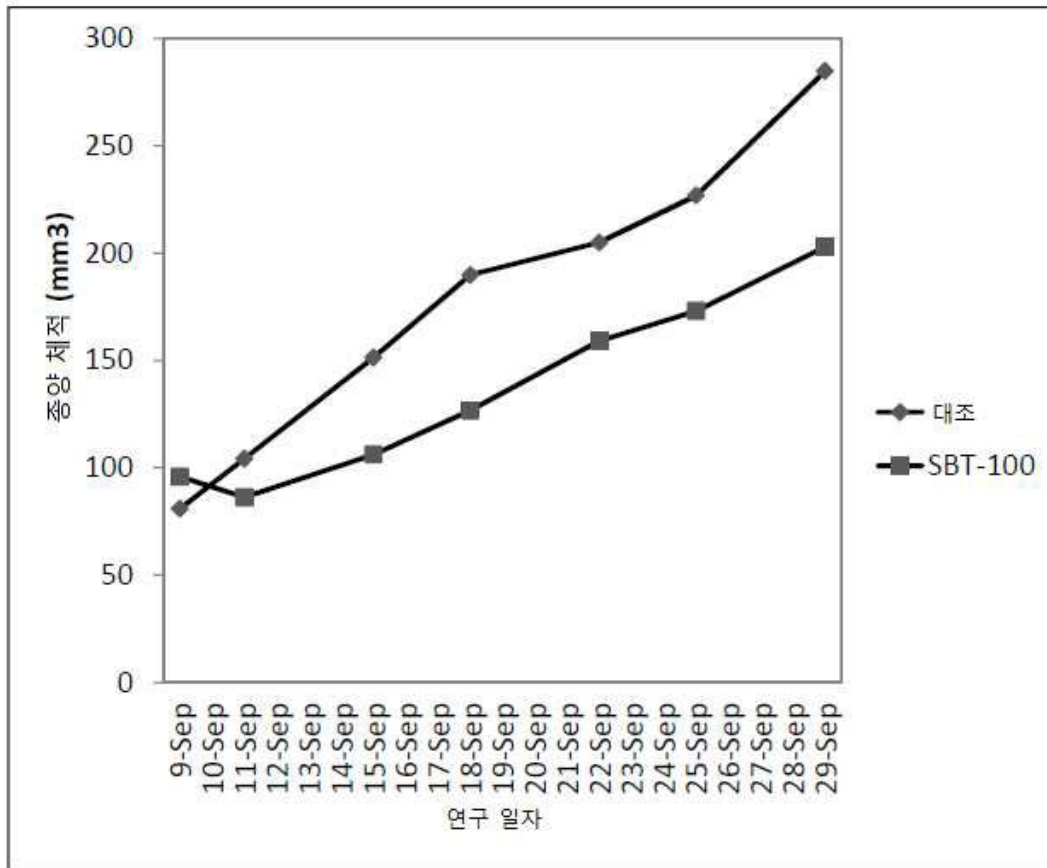
도면7



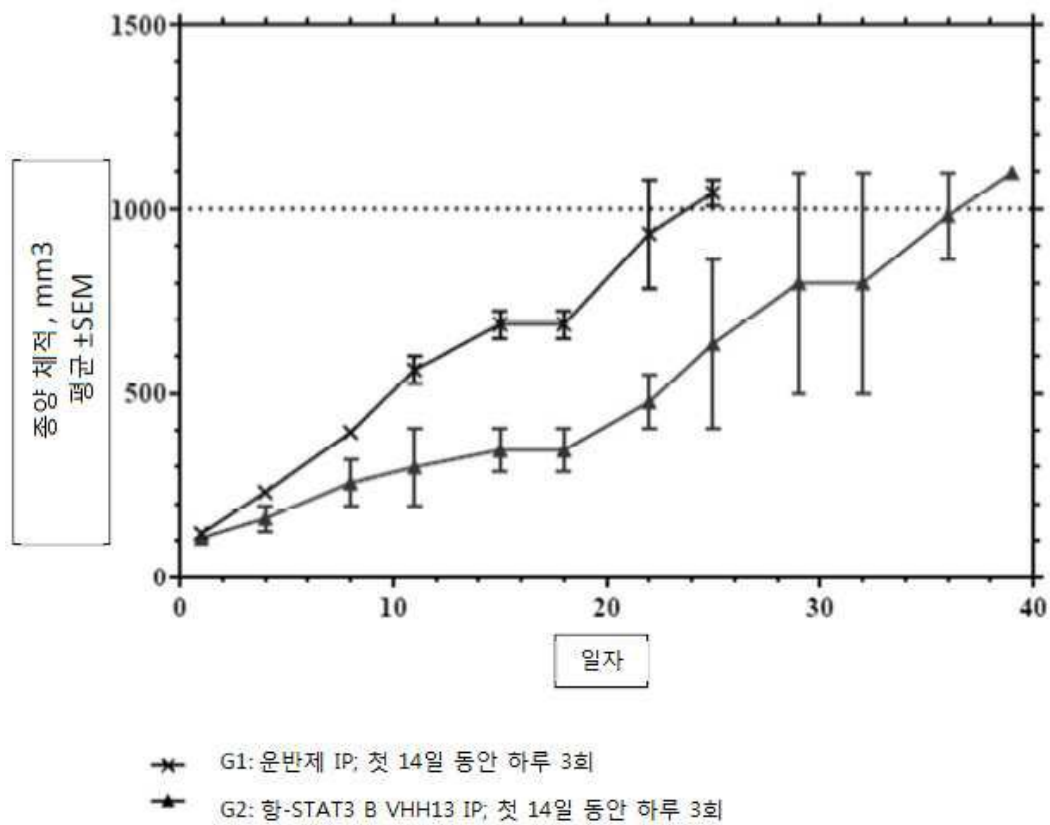
도면8



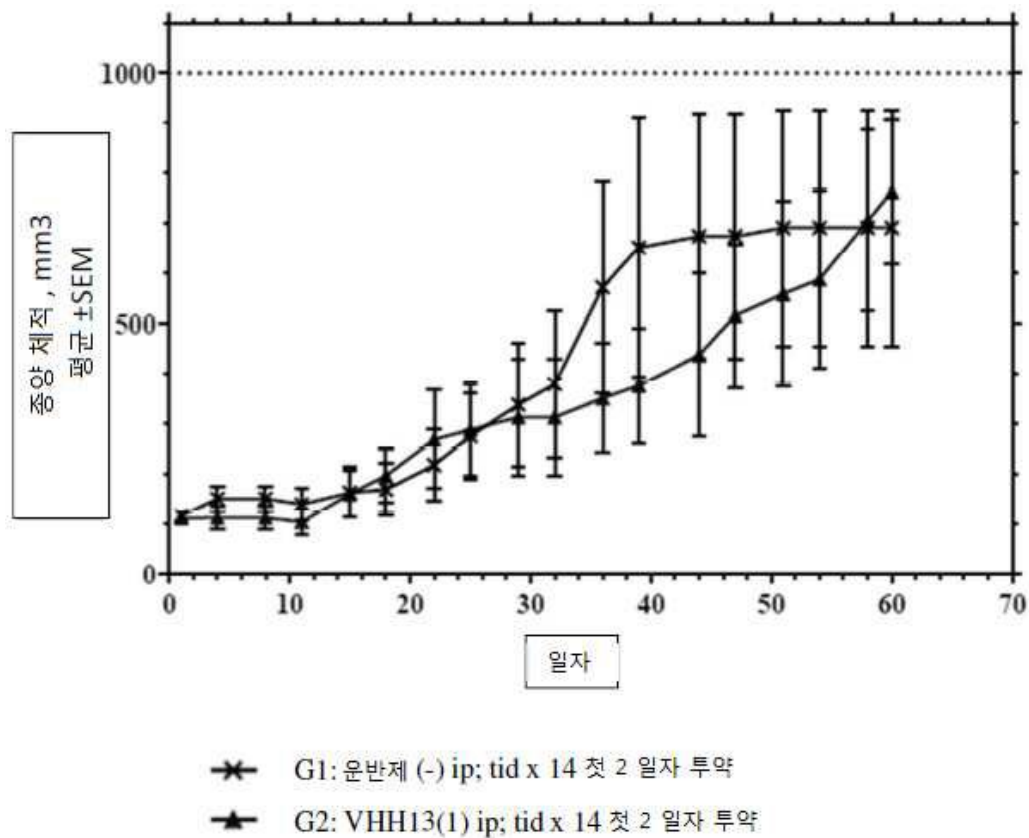
도면9



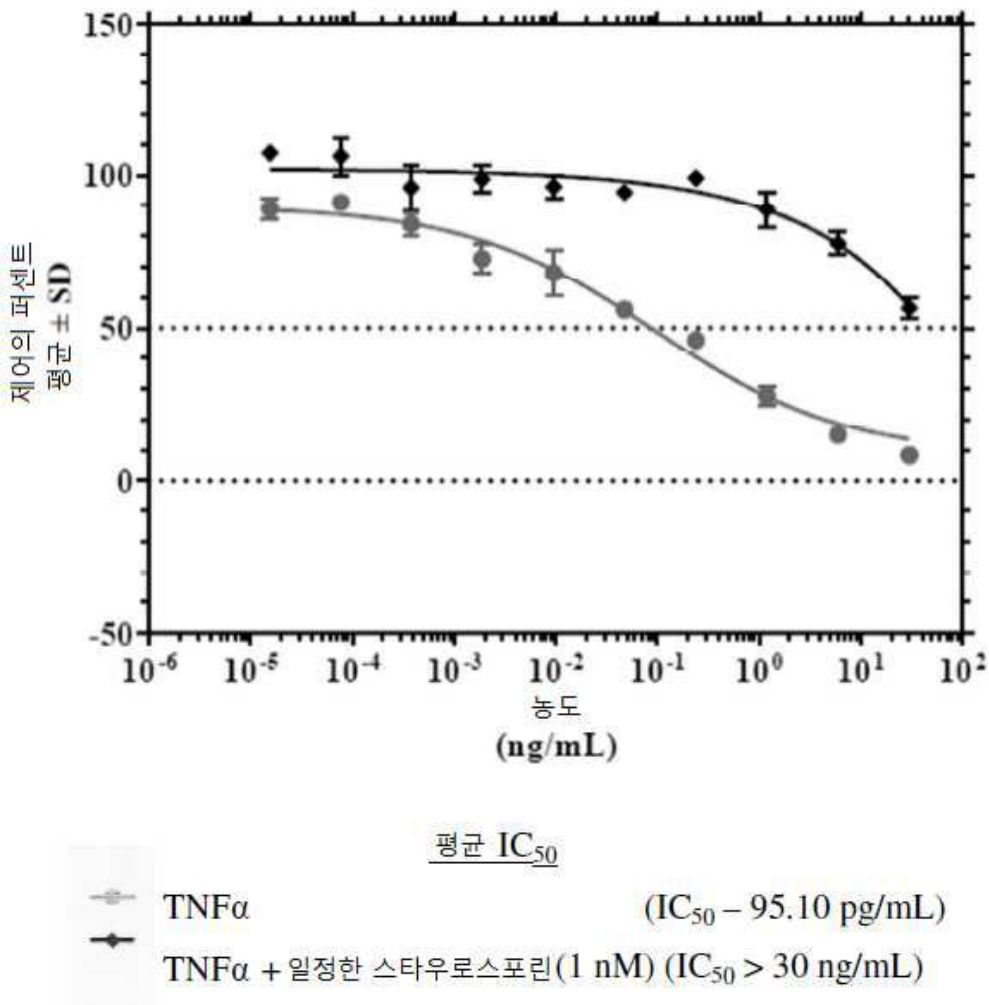
도면10



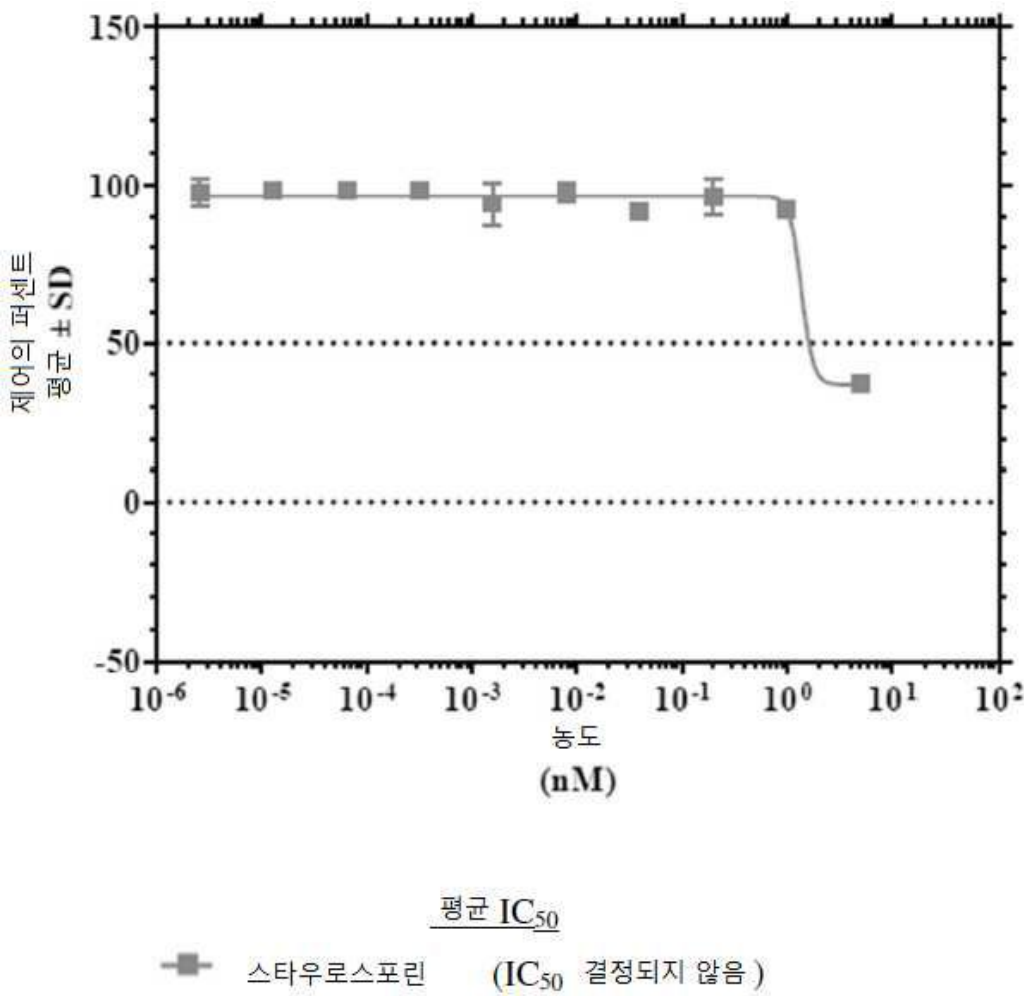
도면11



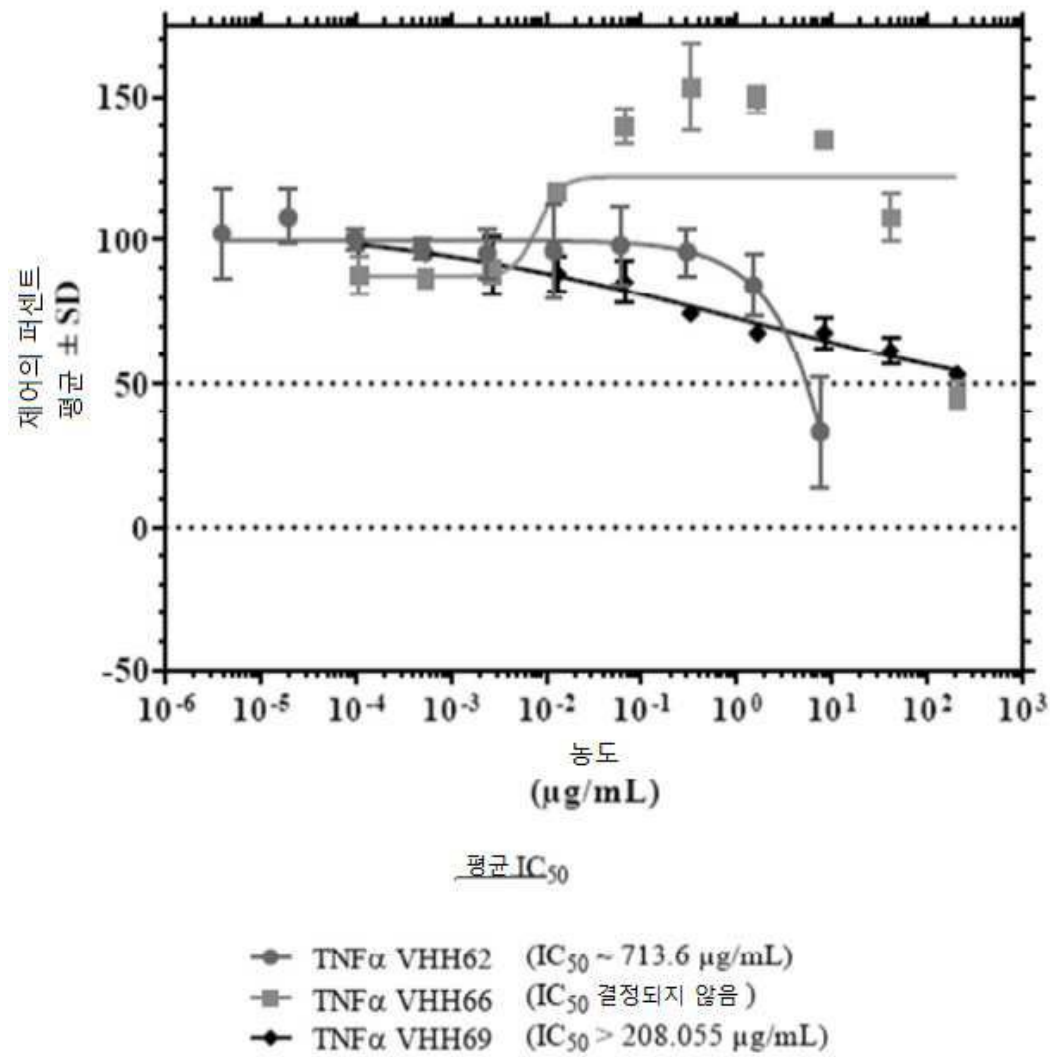
도면12



도면13



도면14



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Singh, Sunanda

<120> Single Domain Antibodies Against Intracellular Antigens

<130> 7304-51293-4PCT

<150> US 62/067908

<151> 2014-10-23

<150> US 62/148656

<151> 2015-04-16

<150> US 62/188353

<151> 2015-07-02

<150> US 62/210795

<151> 2015-08-27

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcaga ctggagggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag tttctggaaa tatcggcagc agctactgca tgggctggtt cgcgcaggt 120

ccagggaaga agcgcgaggc ggtcgcacgt attgtacgtg atggtgccac tggctacgca 180

gactacgtga agggccgatt caccatctcc cgagacagcg ccaagaacac tctgtatctg 240

caaatgaaca ggctgatacc tgaggacact gccatctact actgtgcggc agacctgccc 300

ccaggttggt tgactcaggc gatttgaat ttgtgtatc ggggccaggg aaccctggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asp Leu Pro Pro Gly Cys Leu Thr Gln Ala Ile Trp Asn Phe Gly

100 105 110

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

115 120

<210> 3

<211

> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 5

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met  
65 70 75 80

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

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110  
His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 6

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 6

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

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

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg  
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met  
65 70 75 80

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

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly  
100 105 110

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

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg  
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met  
65 70 75 80

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

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly  
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 9

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

1 5 10 15

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

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg  
50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

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

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly  
100 105 110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 10

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 12

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

<210> 13

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met

65 70 75 80

Asn Thr Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg

85 90 95

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 14

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

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

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

Ser Ser Arg Gly Phe Ala Gly His Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg  
                   50                    55                    60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Tyr Val Lys Asn Ala Val Tyr Leu Gln Met  
 65                    70                    75                    80

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

Glu Gly Trp Glu Cys Gly Glu Thr Trp Leu Asp Arg Thr Ala Gly Gly  
                   100                    105                    110

His Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120                    125

<210> 15

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 15

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

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

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

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

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

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

<210> 16

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 16

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

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

<210> 17

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 17

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

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

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

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 18

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

50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr  
                     100                      105                      110  
 Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120                      125

<210> 19

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 19

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

50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr  
                     100                      105                      110  
 Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120                      125

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 22

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110  
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125  
<210> 23  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Camelid  
<400> 23  
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

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

85 90 95  
Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr  
100 105 110  
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125  
<210> 24  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Camelid  
<400> 24  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly

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

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

<210> 25

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 25

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Thr Ser Arg Phe Asp Cys Tyr Arg Gly Ser Trp Phe Asn Arg Tyr  
100 105 110  
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125  
<210> 26  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 26

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

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

<210> 27

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 29

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Asn Gly Gly Arg Ser  
20 25 30  
Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

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

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

100 105 110  
Met Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 30

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 30

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60  
tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tcttgaaag 120  
gagcgcgagg gattcgcagc tcttagtagc cgtggttttg ccgggcacta taccgactcc 180

gtgaagggcc gatttccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg 240  
aacactgtga aacctgagga cgctccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag 300  
tgcggtgaga cctggttga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc 360  
caggtcaccg tctcctca 378

<210> 31

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 31

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60  
tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tcttgaaag 120

gagcgcgagg gattcgcagc tcttagtagc cgtggttttg ccgggcacta taccgactcc 180  
gtgaagggcc gatttccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg 240  
aacactgtga aacctgagga cgctccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag 300  
tgcggtgaga cctggttga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc 360  
ctggtcaccg tctcctca 378

<210> 32

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 32

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggagc caatggtggt cggagctgca tgggctggtt ccgccaggtt 120

ccagggaagg agcgcgaggg ggtttcttgt atttcaaccg gtggctttat tacatactat 180  
gccgactccg tgaaggccg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg 300  
tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg 360  
acctgggtca ccgtctctc a 381

<210> 33

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 33

catgtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggagc caacggtgtt cggagctgca tgggctggtt ccgccaggtt 120  
ccagggaagg agcgcgaggg ggtttcttgt atttcaaccg gtggctttat tacatactat 180  
gccgactccg tgaaggccg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg 300  
tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg 360  
accaggtca ctgtctctc a 381

<210> 34

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 34

gatgtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggagc caatggtgtt cggagctgca tgggctggtt ccgccaggtt 120  
ccagggaagg agcgcgaggg ggtttcttgt atttcaaccg gtggctttat tacatactat 180  
gccgactccg tgaaggccg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg 300  
tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg 360  
acctgggtca ccgtctctc a 381

<210> 35

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 35

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc | 60  |
| tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tcctggaaag  | 120 |
| gagcgcgagg gattcgcagc tcttagcagc cgtggttttg ccgggcacta taccgactcc  | 180 |
| gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg   | 240 |
| aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag  | 300 |

|                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| tgcggtgaga cctggttga cggaccgcc gggagccata cctactggg ccaggggacc | 360 |
| ctggtcaccg tctcctca                                            | 378 |

<210> 36

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 36

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc | 60  |
| tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctggt tccgccaggc tcctggaaag  | 120 |
| gagcgcgagg gattcgcagc tcttagtagc cgtggttttg ccgggcacta taccgactcc  | 180 |
| gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg   | 240 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag | 300 |
| tgcggtgaga cctggttga ccgaaccgcc gggggccata cctactggg ccaggggacc   | 360 |
| ctggtcaccg tctcctca                                               | 378 |

<210> 37

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 37

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctggagc caatggtggt cggagctgca tgggctggtt ccgccaggtt  | 120 |

ccagggaagg agcgcgaggg ggtttcttgtt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat 180

gccgactccg tgaagggtcg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgtgtat 240

ctgcaaatga gcagcctgaa acctgaggac actgcatgt actactgtgc gacgagtcgg 300

tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg 360

accaggtca ccgtctctc a 381

<210> 38

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 38

catgtgcagc tgggtggagtc tggggggggc tcggtgcagg ctggaggctc tctgagactc 60

tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggcttgt tccgccaggc tcctggaaag 120

gagcgcgagg gactgcagc tcttagtagc cgtggttttg ccgggcaacta taccgactcc 180

gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg 240

aacactgtga aacctgagga cgctccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag 300

tgcggtgaga cctggttga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc 360

caggtcaccg tctctca 378

<210> 39

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 39

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggagc caatggtgtt cggagctgca tgggctggtt ccgccaggtt 120

ccagggaagg agcgcgaggg ggtttcttgtt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat 180

gccgactccg tgaagggtcg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgtgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgcatgt actactgtgc gacgagtcgg 300

tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg 360

accaggtca ccgtctctc a 381

<210> 40

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 40

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctggagc caatgggtgtt cggagctgca tgggctgttt cggccaggtt | 120 |
| ccagggaagg agcgcgaggg ggtttctgtt atttcaaccg gtggtcttat tacatactat  | 180 |
| gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tccaagaca acaccaagaa cacgctgtat   | 240 |
| ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc gacgagtcgg  | 300 |
| tttgactgct atagaggctc ttggttcaac cgatatatgt ataacagttg gggccagggg  | 360 |
| accaggtca ccgtctctc a                                              | 381 |

<210> 41

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 41

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagactc tctgagactc | 60  |
| tcctgtgtag cctctacata caccggctgc atgggctgtt tccgccaggc tcctggaaag  | 120 |
| gagcgcgagg gactgcagc tcttagtagc cgtgggtttg cggggcacta taccgactcc   | 180 |
| gtgaagggcc gattctccat ctcccagac tacgtcaaga atgcggtgta tctgcaaatg   | 240 |
| aacactgtga aacctgagga cgctgccatg tactactgtg cagcacggga gggatgggag  | 300 |
| tgcggtgaga cctgggttga ccggaccgcc gggggccata cctactgggg ccaggggacc  | 360 |
| ctggtcactg tctctca                                                 | 378 |

<210> 42

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 42

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| gtgcagctgg tggagtcagg gggaggctcg gtgcaggctg gaggtctctt gagactctcc | 60 |
|-------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| tgtgcagcct ctggagccaa tggtaggtcgg agctgcatgg gctggttccg ccaggttcca    | 120 |
| gggaaggagc gtgagggggt ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc     | 180 |
| gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaagaacac gctgtatctg     | 240 |
| caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcgac gagtcggttt     | 300 |
| <br>gactgctata gaggtctctg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc | 360 |
| ctggtcactg tctcctca                                                   | 378 |
| <210> 43                                                              |     |
| <211> 378                                                             |     |
| <212> DNA                                                             |     |
| <213> Artificial Sequence                                             |     |
| <220><223> Camelid                                                    |     |
| <400> 43                                                              |     |
| <br>gtgcagctgg tggagtctga gggaggctcg gtgcaggctg gaggtctct gagactctcc  | 60  |
| tgtgcagcct ctggagccaa tggtaggtcgg agctgcatgg gctggttccg ccaggttcca    | 120 |
| gggaaggagc gcgagggggt ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc     | 180 |
| gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaagaacac gctgtatctg     | 240 |
| <br>caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcgac gagtcggttt | 300 |
| gactgctata gaggtctctg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc     | 360 |
| ctggtcaccg tctcctca                                                   | 378 |
| <210> 44                                                              |     |
| <211> 378                                                             |     |
| <212> DNA                                                             |     |
| <213> Artificial Sequence                                             |     |
| <220><223> Camelid                                                    |     |
| <400> 44                                                              |     |
| <br>gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctcg gtgcaggctg gaggtctct gagactctcc  | 60  |
| tgtgcagcct ctggagccaa tggtaggtcgg agctgcatgg gctggttccg ccaggttcca    | 120 |
| gggaaggagc gcgagggggt ttctggtatt tcaaccggtg gtcttattac atactatgcc     | 180 |
| <br>gactccgtga agggccgatt caccatctcc caagacaaca ccaataacac gctgtatctg | 240 |
| caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacact gccatgtact actgtgcgac gagtcggttt     | 300 |
| gactgctata gaggtctctg gttcaaccga tatatgtata acagttgggg ccaggggacc     | 360 |
| ctggtcactg tctcctca                                                   | 378 |

<210> 45

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Asp Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Gly Thr Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Tyr Gly Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Thr Ile Ser Leu Thr Pro Ser Asp Tyr Arg  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 47  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Camelid  
 <400> 47  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Pro Val Gln Ala Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Glu Ala  
 20 25 30  
 Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
 50 55 60  
 Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
 85 90 95  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp  
 100 105 110

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

Ser

<210> 48

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 48

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

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

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

<210> 49

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 49

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

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

<210> 50

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 50

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr  
100 105 110

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

<210> 51

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 51

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

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

20 25 30

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr  
100 105 110

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

<210> 52

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 52

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

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

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

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr  
100 105 110

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

<210> 53

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 53

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

1 5 10 15

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

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

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

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 54

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Asp Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 55

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 55

```

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

          50          55          60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser Leu
65          70          75          80
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr
          100         105         110
Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115         120

```

<210> 56

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 56

```

His Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Glu Ala Gly Gly
1           5           10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Tyr Ala Ala Tyr
          20          25          30
Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Asp Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

```

35 40 45  
Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Leu Ala Thr His Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser Leu  
65 70 75 80  
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
Ala Asp Arg Asp Arg Cys Gly Ser Ile Trp Thr Tyr Ala Tyr Lys Tyr  
100 105 110  
Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 57

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 57

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

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

115

120

<210> 58

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Asp Gly Lys Val Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ala Thr Ile Asp Ile Asp Gly Gln Thr Thr His Ala Asp Ser Val Lys

50

55

60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Asp Ser Phe Gly

20 25 30  
Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45  
Ala Ala Val Tyr Arg Arg Ala Gly Asp 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 Ser Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Ser Val Ser Ser Trp Thr Gly Tyr Lys Tyr  
100 105 110  
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 60

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 60

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Asp Ser Phe Gly  
20 25 30  
Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45  
Ala Ala Val Tyr Arg Arg Ala Gly Asp 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 Ser Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Ser Val Ser Ser Trp Thr Gly Tyr Lys Tyr

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser                     |     |     |     |
| 115                                                             | 120 |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| <210> 61                                                        |     |     |     |
| <211> 123                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |     |
| <220><223> Camelid                                              |     |     |     |
| <400> 61                                                        |     |     |     |
| Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Val Gly Gly |     |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |     |
| Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Thr Asp Ser Tyr Gly |     |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |     |
| Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val |     |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |     |
| Ala Ser Ile Tyr Arg Asn Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |     |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Leu |     |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |     |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys |     |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |     |
| Ala Val Arg Ser Phe Gly Ser Val Ser Thr Trp Ala Gly Tyr Val Tyr |     |     |     |
| 100 105 110                                                     |     |     |     |
| Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser                     |     |     |     |
| 115 120                                                         |     |     |     |

|                                                                 |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------|--|--|--|
| <210> 62                                                        |  |  |  |
| <211> 123                                                       |  |  |  |
| <212> PRT                                                       |  |  |  |
| <213> Artificial Sequence                                       |  |  |  |
| <220><223> Camelid                                              |  |  |  |
| <400> 62                                                        |  |  |  |
| Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly |  |  |  |

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Asp Ser Phe Gly  
                   20                    25                    30  
 Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Ala Val Tyr Arg Arg Ala Gly Asp 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 Ser Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Ala Arg Thr Tyr Gly Ser Val Ser Ser Trp Thr Gly Tyr Lys Tyr  
                   100                    105                    110  
 Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 63

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 63

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

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

115 120 125

<210> 64

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120

<210> 65

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 65

Gln Val Gln Val Val Glu Tyr Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Trp Glu Leu Val

35 40 45

Ser Asn Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 66

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val

35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr

50 55 60

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

65                      70                      75                      80  
Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
85                      90                      95

[illegible]

&lt;210&gt; 67

<211> 129

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

67

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

1 5 10 15

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val  
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
50 55 60

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

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

85 90 95

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Pro | Asp | Pro | Tyr | Ala | Tyr | Ser | Thr | Tyr | Ser | Asp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

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

115 120 125

Ser

<210> 68

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val

35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 69

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 69

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

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

Tyr Cys Ser Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
                   115                    120                    125  
 Ser

<210> 70

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 70

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

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

65                      70                      75                      80  
Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
85                      90                      95

[illegible]

<210> 71

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 71

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

1 5 10 15

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val  
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp

100 105 110

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

Ser

<210> 72

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val

35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 73

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 73

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

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

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

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

<210> 74

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 74

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
                   50                    55                    60

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

65                      70                      75                      80  
Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
85                      90                      95

[illegible]

<210> 75

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 75

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

1 5 10 15

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

[illegible]

<210> 76

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val

35 40 45

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp

100 105 110

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

115 120 125

Ser

<210> 77

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 77

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

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

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

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

<210> 78

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 78

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

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Val Cys Glu Leu Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
                   50                    55                    60

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

65                      70                      75                      80  
Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala  
85                      90                      95

[illegible]

<210> 79

<211> 128

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 79

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

1 5 10 15

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

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

Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Ala  
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Glu Tyr

100 105 110

Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 80

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 80

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

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

20 25 30  
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Cys Glu Leu Val

35 40 45  
Ser Thr Ile Thr Thr Glu Gly Ile Thr Ser Glu Ala Ser Ser Tyr Tyr

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

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

85 90 95  
Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Asp Pro Tyr Ala Tyr Ser Thr Tyr Ser Asp

100 105 110  
Tyr Cys Thr Trp Ala Gln Gly Thr Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 81

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Camelid

<400> 81

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

1 5 10 15

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

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