



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월14일  
(11) 등록번호 10-1686247  
(24) 등록일자 2016년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C40B 40/10 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01) C12P 21/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-7011856  
(22) 출원일자(국제) 2008년10월31일  
심사청구일자 2013년10월30일  
(85) 번역문제출일자 2010년05월28일  
(65) 공개번호 10-2010-0113481  
(43) 공개일자 2010년10월21일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/012398  
(87) 국제공개번호 WO 2009/058379  
국제공개일자 2009년05월07일  
(30) 우선권주장  
60/984,209 2007년10월31일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2004502451 A\*  
BIOPHYSICAL JOURNAL, Vol. 93(7), pp.  
2447-2456 (2007.10.01.).\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
메디문 엘엘씨  
미국 20878 메릴랜드주 게이트르스부르크 원 메디  
문 웨이  
(72) 발명자  
우 헤렌  
미국 20841 메릴랜드주 보이즈 하비스트 문 로드  
14405  
바카 마누엘  
미국 20878 메릴랜드주 게이트르스버그 마켓 스트리  
트 이스트 720  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 28 항

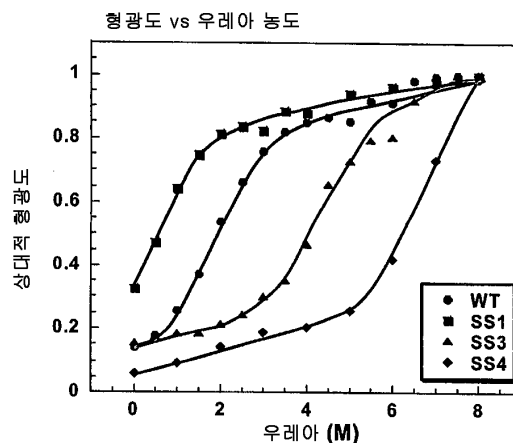
심사관 : 김중호

(54) 발명의 명칭 단백질 스캐폴드

(57) 요약

본 발명은 단백질 스캐폴드, 및 이러한 단백질 스캐폴드의 제조, 스크리닝, 조작 및 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도10e



(72) 발명자

스위스 제프리

미국 20852 메릴랜드주 락빌 아파트 303 체이스 크  
로싱 씨클 12034

차코 베노이

미국 20878 메릴랜드주 게이터스버그 아파트 164  
마켓 스트리트 이 324

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

a. A, B, C, D, E, F 및 G로 명명된 7개의 베타 스트랜드 도메인으로,

(i) A 베타 스트랜드는 서열 번호 239, B 베타 스트랜드는 서열 번호 229, C 베타 스트랜드는 서열 번호 230, D 베타 스트랜드는 서열 번호 236, E 베타 스트랜드는 서열 번호 232, F 베타 스트랜드는 서열 번호 245, G 베타 스트랜드는 서열 번호 246; 또는

(ii) A 베타 스트랜드는 서열 번호 239, B 베타 스트랜드는 서열 번호 229, C 베타 스트랜드는 서열 번호 247, D 베타 스트랜드는 서열 번호 236, E 베타 스트랜드는 서열 번호 232, F 베타 스트랜드는 서열 번호 248, G 베타 스트랜드는 서열 번호 234

에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것인 7개의 베타 스트랜드 도메인을 포함하는, 재조합 폴리펩티드 스캐폴드로서,

b. 상기 베타 스트랜드 도메인은 6개의 루프 영역에 연결되고, 여기서 루프 영역은 각각의 베타 스트랜드와 연결되고, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프로 명명되며, 서열 번호 1의 동족(cognate) 루프 영역에 상응하고;

c. BC, DE 또는 FG 루프 영역 중 1 이상은 서열 번호 1의 루프 영역과 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가로 서로 다르며;

d. 상기 스캐폴드는 F 베타 스트랜드와 G 베타 스트랜드 사이, 및/또는 C 베타 스트랜드와 F 베타 스트랜드 사이에 결합을 형성하는 1 이상의 이황화 결합을 포함하고, 상기 스캐폴드는 표적에 결합하는 것인 스캐폴드.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

a. 상기 BC 루프는 S-X-a-X-b-X-X-G의 서열을 갖는 9개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 프롤린 또는 알라닌을 나타내고, (b)는 알라닌 또는 글리신을 나타내거나; 또는

b. 상기 BC 루프는 S-P-c-X-X-X-X-T-G의 서열(서열번호 258)을 갖는 11개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (c)는 프롤린, 세린 또는 글리신을 나타내거나; 또는

c. 상기 BC 루프는 A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G의 서열(서열번호 257)을 갖는 12개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (d)는 프롤린, 글루타메이트 또는 리신을 나타내고, (e)는 아스파라긴 또는 글리신을 나타내고, (f)는 세린 또는 글리신을 나타내는 것인 스캐폴드.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

a. 상기 FG 루프는 X-a-X-X-G-X-X-S의 서열을 갖는 9개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고 (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내거나; 또는

- b. 상기 FG 루프는 X-a-X-X-X-b-N-P-A의 서열을 갖는 10개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내고, (b)는 세린 또는 글리신을 나타내거나; 또는
- c. 상기 FG 루프는 X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A의 서열을 갖는 11개 아미노산으로 이루어지며, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내는 것인 스캐폴드.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표적은 세포-표면 항원, 가용성 항원, 고정화 항원, 면역침묵 항원, 세포내 항원, 핵내 항원, 자가 항원, 비자가 항원, 암 항원, 박테리아 항원 또는 바이러스 항원인 스캐폴드.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 스캐폴드는 시차 주사 열량측정법(DSC)으로 측정시 열 용융점( $T_m$ )이 40℃ 이상으로 나타나는 것인 스캐폴드.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 스캐폴드는 시차 주사 열량측정법(DSC)으로 측정시 열 용융점( $T_m$ )이 40℃ 이상으로 나타나는 것인 스캐폴드.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 스캐폴드는 이중성 제제에 접합되고, 여기서 상기 제제는 다른 스캐폴드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민(HSA), 항체의 Fc 영역, IgG 분자, 결합 펩티드, 세포독성 약물, 방사성표지, 조영제, His-태그, 비오틴, Flag-태그, 핵산 또는 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택된 것인 스캐폴드.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 상기 스캐폴드는 이중성 제제에 접합되고, 여기서 상기 제제는 다른 스캐폴드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민(HSA), 항체의 Fc 영역, IgG 분자, 결합 펩티드, 세포독성 약물, 방사성표지, 조영제, His-태그, 비오틴, Flag-태그, 핵산 또는 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택된 것인 스캐폴드.

#### 청구항 12

제8항에 있어서, 상기 스캐폴드는 이중성 제제에 접합되고, 여기서 상기 제제는 다른 스캐폴드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민(HSA), 항체의 Fc 영역, IgG 분자, 결합 펩티드, 세포독성 약물, 방사성표지, 조영제, His-태그, 비오틴, Flag-태그, 핵산 또는 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택된 것인 스캐폴드.

#### 청구항 13

제1항에 따른 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드로서, 상기 스캐폴드는 다른 스캐폴드, IgG 분자 또는 이의 단편, Fc 영역, 이량체화 도메인, 화학적 가교결합, 이황화 결합, 또는 아미노산 링커에 의해 연결된 것인 다량체 스캐폴드.

#### 청구항 14

제7항에 따른 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드로서, 상기 스캐폴드는 다른 스캐폴드, IgG 분자 또는 이의 단편, Fc 영역, 이량체화 도메인, 화학적 가교결합, 이황화 결합, 또는 아미노산 링커에 의해 연결된 것인 다량체 스캐폴드.

#### 청구항 15

제8항에 따른 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드로서, 상기 스캐폴드는 다른 스캐폴드, IgG 분자 또는 이의 단편, Fc 영역, 이량체화 도메인, 화학적 가교결합, 이황화 결합, 또는 아미노산 링커에 의해 연결된 것인 다량체 스캐폴드.

#### 청구항 16

제1항에 따른 스캐폴드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 17

제16항에 따른 핵산 분자에 작동적으로 연결된 발현 벡터.

#### 청구항 18

제17항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 19

제1항에 따른 스캐폴드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리로서, 1 이상의 루프 영역이 길이 및/또는 다양성에 대해 무작위화되는 것인 라이브러리.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 1의 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이된 2 이상의 루프 영역 서열을 포함하는 것인 라이브러리.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 2 루프 영역 서열은 BC/DE, BC/FG, 및 DE/FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 것인 라이브러리.

#### 청구항 22

제20항에 있어서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 1의 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이된 3 이상의 루프 영역 서열을 포함하는 것인 라이브러리.

#### 청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 스캐폴드는 리보솜, 박테리오파지, 바이러스, 박테리아 또는 효모의 표면 상에 디스플레이되는 것인 라이브러리.

#### 청구항 24

표적에 결합하는 폴리펩티드 스캐폴드를 획득하는 방법으로서,

(a) 스캐폴드: 표적 리간드 복합체가 형성되는 조건 하에서 제19항 내지 제22항 중 어느 하나의 항에 따른 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, 및

(b) 표적 리간드에 결합하는 스캐폴드를 상기 복합체로부터 획득하는 단계

를 포함하는 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, (b) 단계에서 획득한 상기 단백질 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하는 방법.

#### 청구항 26

제24항의 방법에 의해 획득한 폴리펩티드 스캐폴드.

#### 청구항 27

제25항의 방법에 의해 획득한 폴리펩티드 스캐폴드.

#### 청구항 28

제1항의 스캐폴드를 포함하는, 멸균된, 발열원 무함유 조성물.

**청구항 29**

제13항의 스캐폴드를 포함하는, 멸균된, 발열원 무함유 조성물.

**청구항 30**

제14항의 스캐폴드를 포함하는, 멸균된, 발열원 무함유 조성물.

**청구항 31**

제15항의 스캐폴드를 포함하는, 멸균된, 발열원 무함유 조성물.

**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

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제



청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

## 청구항 93

삭제

## 청구항 94

삭제

## 청구항 95

삭제

## 청구항 96

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] -관련 출원에 대한 교차 참조-

[0002] 본 출원은 2007년 10월 31일자에 출원된, 미국 가출원 제60/984,209호를 우선권으로 주장하며, 이를 전체로 참조하여 포함시킨다.

[0003] -기술 분야-

[0004] 본 발명은 예를 들어, 신규한 결합 특징을 갖는 생성물을 생성하는데 유용한 단백질 스캐폴드에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 통상 단백질 스캐폴드라 불리는, 비교적 명확한 3차원 구조를 갖는 단백질은 조작된 생성물의 디자인을 위한 시약으로 사용될 수 있다. 이러한 스캐폴드는 일반적으로 특이적 또는 무작위적 서열 변이가 일어날 수 있는 1 이상의 영역을 함유하며, 이러한 서열 무작위화는 종종 목적 생성물을 선별할 수 있는 단백질 라이브러리를 제조하기 위해 수행된다. 이러한 스캐폴드가 유용한 구체적인 영역 중 하나는 항체 모방체 디자인 영역이다.

[0006] 시장에서 성공한 일부 치료 항체(HERCEPTIN<sup>®</sup>, AVASTIN<sup>®</sup>, SYNAGIS<sup>®</sup>)가 존재하지만, 치료 단백질로서 항체 단편을 생성하고자 하는 관심이 증대되고 있다. 이의 장점은 목적하는 결합 특성을 얻기 위해 분자 생물학적 기법으로 조작이 용이하다는 점, 미생물 시스템에서 이러한 단편을 발현할 수 있는 능력, 및 항체 단편이 전체 길이 항체보다 조직 투과성이 양호할 것이라는 기대감 등을 들 수 있다. 이러한 예로는 REOPRO<sup>®</sup>가 있다.

[0007] 또한, 표적에 대한 높은 친화성 및 낮은 면역원성과 독성 등과 같은 항체 및 항체 단편의 장점을 이용하면서, 한편으로는 적절한 리폴딩을 요하는 도메인내 이황화 결합 요구성, 및 항체 단편에 대한 응집 경향과 전장 IgG에 비해 낮은 안정성 등의 단점 일부를 피하기 위해, 소형의, 비항체 치료제, 즉 항체 모방체를 개발하고자 하는 노력을 기울이고 있다. 일례로 "미니바디" 스캐폴드가 있으며, 이는 면역글로불린 폴드와 관련된 것으로서, 단일클론 항체의 중쇄 가변 도메인에서 3개의 베타 스트랜드를 결실시켜 설계되었다(Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). 이 단백질은 61 잔기를 포함하고, 항체 내 상보성 결정 부위(CDR)와 상당히 유사한, 2개의 과가변성 루프를 나타내는데 사용할 수 있다. 이들 2개의 루프를 무작위화시키고 생성물을 항원 결합성에 대해 선별하였지만, 지금까지 골격부는 가용성 문제로 인해 활용도가 어느 정도 제한적인 것으로 나타났다. 루프를 디스플레이하기 위해 사용된 다른 골격은  $\alpha$ -아밀라제의 소형 단백질 억제제인 텐다미스타트로서, 이는 2개의 이황화 결합에 의해 함께 결합된, 74 잔기의 6-스트랜드 베타 시트 샌드위치를 함유하고 3개의 CDR-유사 루프를 형성한다(McConnell and Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995).

[0008] 다른 단백질을 골격으로 시험하여 알파 헬릭스 표면 상의 무작위화된 잔기(Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995), 알파 나선 다발 내 알파 나선 사이의 루프(Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6552, 1995), 및 이황화 브릿지로 제한된 루프, 예컨대 소형 프로테아제 억제제(Markland et al., Biochemistry 35:8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen and Collins, Gene 164:243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270:12250, 1995)를 디스플레이하는

데 사용하였다.

[0009] 따라서, 다양한 치료 및 진단 용도를 위한 소형의, 안전한 인공 항체-유사 분자를 개발할 필요가 있다.

[0010] 본 명세서에서 참조 문헌의 인용이나 설명은 본 발명의 종래 분야로서 승인된 사실로 해석해서는 안된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 목적하는 임의의 화합물에 결합할 수 있는 재조합된, 비-천연 발생 단백질 스캐폴드 패밀리를 제공한 다. 구체적으로, 본 명세서에서 기술하는 단백질은 항체 가변 영역의 상보성 결정 영역("CDR")과 유사한 명확한 루프를 디스플레이하는데 사용될 수 있다. 이들 루프에 대해 무작위화 또는 제한 진화법을 수행하여 다수의 표적 화합물에 결합하기 위해 요구되는 다양성을 유발시킨다. 이 단백질들을 상이한 표적에 결합할 수 있는 다중 특이적 스캐폴드로 어셈블링시킬 수 있다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 천연 발생 단백질 서열에서 유래된 다수의 루프 영역 서열과 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하는 재조합, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드(이하에서는 "본 발명의 스캐폴드"라 함)를 제공하고, 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되며, 상기 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과 상동성이 50% 이상이다. 일부 구체예에서, 천연 발생 서열은 인간 테나신 C에 상응하는 단백질 서열이다. 구체적으로, 이들 스캐폴드는 테나신 C의 제3 FnIII 도메인("Tn3" 도메인으로도 알려짐)을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 1, 5-32, 64-67 및 210로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 33-59로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[0013] 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 예측된 Tn3 구조 모티프, 예컨대 호열성 유기체 유래의 것, 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고 아케오글로버스 필기더스(*Archaeoglobus fulgidus*), 스타필로써머스 마리너스(*Staphylothermus marinus*), 실폴로버스 액시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*), 실폴로버스 솔파타리커스(*Sulfolobus solfataricus*) 및 실폴로버스 토크다이(*sulfolobus tokodaii*) 유래의 것에 상응한다.

[0014] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 2-4, 68-88 및 210으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 89-98로 이루어진 군에서 선택된 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명의 스캐폴드는 또한 이황화 결합-안정화된 스캐폴드를 포함한다. 이황화 결합-안정화된 스캐폴드는 카오토로픽 변성 및 프로테아제 처리에 대한 내성, 내열성으로 측정시 증강된 안정성을 나타낸다.

[0016] 본 발명의 스캐폴드는 본 명세서에서 기술하는 바와 같이, 목적하는 표적에 결합하도록 조작된다. 이러한 결합은 예를 들어, 친화성이 100  $\mu$ M 이상으로 나타날 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한 본 발명의 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드(이하에서는 "본 발명의 다량체 스캐폴드"라 함)를 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 다량체 스캐폴드는 예를 들어, 이량체화 도메인, 아미노산 링커, 이황화 결합, 화학적 가교결합 및 IgG 분자 또는 이의 단편, 또는 Fc 영역에 연결된 2 이상의 스캐폴드를 포함한다.

[0018] 본 발명은 또한, 본 발명의 다수의 스캐폴드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리(이하에서는 "본 발명의 라이브러리"라 함)를 제공한다. 본 발명의 라이브러리는 다량체 스캐폴드를 제작하기 위한 표적 결합 스캐폴드를 포획 및 동정하는데 유용하다.

[0019] 본 발명의 다른 측면에서는 또한 본 발명의 스캐폴드 및 라이브러리를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 본 발명의 스캐폴드 및 라이브러리를 제조, 사용, 스크리닝, 최적화 및 조작하는 방법을 제공한다.

[0021] 또다른 측면에서, 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드 및/또는 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물의 치료 유효량을 투여하여 환자에서, 본 명세서에 기술한 바와 같이, 질환 또는 이의 증상을 치료, 예방, 완화, 검출, 진단 또는 모니터링하는 방법을 제공한다.

[0023] 특정 구체예에서, 본 발명은 질환, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니나 암을 예방, 완화, 검출, 진단 또는 모니터링하는데 유용한 TRAIL-R2 특이적 결합인자를 제공한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 특이적 결합 스캐폴드는 암세포가 TRAIL-R2를 발현하는 암의 치료에 유용하다. 일부 구체예에서, 암은 이에 제한되는 것은 아니고, 폐암, 비호지킨 림프종, 위장암, 신장부 암, 난소암, 간암, 위암, 방광암, 유방암, 결장암, 직결장암, 췌장암, 간암, 전립선암 및 흑색종을 포함할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0024] 본 발명을 설명하기 위해서, 본 발명에 대한 일정 구체예를 도면으로 도시하였다. 그러나, 본 발명을 도면에 도시한 구체예들의 설명 및 상세한 배열에 제한하는 것은 아니다.

도 1. 스캐폴드의 제조합 전체 세포 발현. 도 1에서는 단백질 스캐폴드를 발현하는 이.콜라이(*E.coli*) 배양물에서 유래하는 다양한 제조합 용해물의 쿠마시 염색된 PAGE 겔을 도시하였다. 높은 수준으로 발현된 스캐폴드에 별(\*) 표시하였다.

도 2. Tn3 기반 스캐폴드의 발현 및 정제. 이 도면에서는 제조합 발현 및 정제이후 Tn3 기반 스캐폴드를 증명하는 쿠마시 염색된 PAGE 겔을 도시하였다. Tn3 스캐폴드는 용이하게 균질물로 정제되었다.

도 3a. Tn3 기반 스캐폴드에 대한 용융점 측정. 도 3a의 그래프는 시차 주사 열량측정법으로 측정시 Tn3 기반 스캐폴드의 열 용융 곡선 측정 결과를 도시한 것이다.  $T_m$ 은 pH 7.0에서 약 45°C로 측정되었다.

도 3b. Tn3 기반 스캐폴드의 우레아 변성 프로파일. 도 3b의 그래프는 pH 7.5에 다양한 우레아 농도에서 Tn3 기반 스캐폴드의 변성 프로파일을 나타낸 것이다. 분자의 고유한 형광발광성 변화를 사용하여 분자의 언폴딩을 측정하였다. Tn3 스캐폴드에 대한, 언폴딩 결과 형광발광 강도가 증가하였고 보다 높은 파장쪽으로 이동하였다. 도면에서 증명한 바와 같이, 이 분자는 저농도의 우레아(1 M 이하)에서 폴딩되고 보다 고농도 우레아에서 변성되었다. 분자의 50%가 언폴딩되는 몰농도는 약 2 M로 계산되었다.

도 3c. Tn3 스캐폴드는 단량체 상태로 존재한다. 도 3c의 그래프는 오염 단편 및/또는 보다 고도의 구조체에 대한 상대적 비율을 측정하기 위한 정제된 Tn3 스캐폴드의 크기 배제 크로마토그래피 분석 결과를 나타낸다. 그래프 상에 백분율로 나타낸 바와 같이, 97% 이상의 스캐폴드가 단량체 형태로 용리되었고(온라인 광산란 분석기에 의해 대략 11 kDa으로 측정됨), 단지 소량의 분획(대략 3%)만이 약 21 kDa의 피크에서 용리되었는데, 이는 아마도 이량체인 듯하다.

도 4. 스캐폴드의 BC 루프가 루프 길이 다양성을 증명하다. 도 4의 그래프는 다양한 Tn3 관련 단백질 스캐폴드의 BC 루프의 길이 다양성을 나타낸다. (A)는 PDB 데이터베이스로부터 Tn3 관련 스캐폴드의 서브셋에서 유래된 서열(51 서열)에 의해 나타나는 루프 길이 다양성을 보여주는 것이다. (B)는 Swiss-prot 데이터베이스에서 유래된 서열(397 서열)에 의해 나타나는 루프 길이 다양성을 보여주는 것이다. 도시한 바와 같이, 다양한 Tn3 관련 스캐폴드의 BC 루프는 길이가 7-26 아미노산 잔기로 나타났다. 본 명세서에서 사용된 계획안에 따르면, Tn3에서 BC 루프의 길이는 9 잔기이다.

도 5. 스캐폴드의 FG 루프가 루프 길이 다양성을 증명하다. 도 5의 그래프는 다양한 Tn3 관련 단백질 스캐폴드의 FG 루프의 길이 다양성을 나타낸 것이다. 도 5는 PDB 데이터베이스로부터 Tn3 관련 스캐폴드 서브셋에서 유래된 서열에 의해 나타나는 FG 루프 길이 다양성을 보여준다. 도시한 바와 같이, Tn3 스캐폴드의 FG 루프는 6-18 아미노산 잔기 길이를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 설계안에 따라, Tn3에서 FG 루프의 길이는 10 잔기이다.

도 6. 스캐폴드의 DE 루프가 루프 길이 다양성을 증명하다. 도 6의 그래프는 다양한 Tn3 단백질 스캐폴드의 DE 루프의 길이 다양성을 나타낸 것이다. 도 6은 PDB 데이터베이스로부터 Tn3 관련 스캐폴드 서브셋에서 유래한 서열에 의해 나타나는 DE 루프 길이 다양성을 도시한 것이다. 도시한 바와 같이, Tn3 관련 스캐폴드의 DE 루프는 길이가 약 4 내지 약 17 아미노산 잔기로 나타난다. 본 명세서에서 사용된 계획안에 따라, Tn3 내 DE 루프의 길이는 6 잔기이다.

도 7a. 스캐폴드의 9 아미노산 잔기 BC 루프가 서열 다양성을 보여준다. 도 7a의 그래프는 Swiss-Prot 데이터베이스

이스(73 서열)로부터 9 아미노산 잔기 루프에 의해 나타나는 서열 다양성을 보여준다. 정렬 도구, Weblogo를 사용하여, 9 아미노산 길이 BC 루프 내 특정 위치에서 일어나는 아미노산의 상대적 발생률을 특정 위치 상에 단일 문자 코드의 크기로 나타내었다. 예를 들어, 분석한 9 아미노산 잔기의 BC 루프의 위치 3에서, 가장 우세한 아미노산은 프롤린(P), 다음으로는 알라닌(A), 그 다음으로는 발린(V)이다.

도 7b. 스캐폴드의 12 아미노산 잔기 BC 루프가 서열 다양성을 보여준다. 도 7b의 그래프는 Swiss-Prot 데이터 세트(99 서열)로부터의 12 아미노산 잔기 BC 루프에 의해 나타나는 서열 다양성을 도시한 것이다. 정렬 도구, Weblogo를 사용하여, 12 아미노산 길이 BC 루프 내 특정 위치에서 일어나는 아미노산의 상대적 발생률을 특정 위치 상에 단일 문자 코드의 크기로 나타내었다. 예를 들어, 분석한 12 아미노산 잔기의 BC 루프의 위치 3에서, 가장 우세한 아미노산은 프롤린(P), 그 다음으로는 글리신(G), 다음으로는 글루타민(Q)이다.

도 8. 스캐폴드의 FG 루프가 서열 다양성을 보여준다. 도 8의 그래프는 Swiss-Prot 데이터 세트(393 서열)에서 유래하는 모든 길이로부터 FG 루프에 의해 나타나는 서열 다양성을 도시한 것이다. 정렬 도구, Weblogo를 사용하여, FG 루프 내 특정 위치에서 일어나는 아미노산의 상대적인 발생률을 특정 위치 상에 단일 문자 코드의 크기로 나타내었다. 예컨대, 분석한 FG 루프의 위치 2에서, 가장 우세한 아미노산은 아스파라긴(N), 다음으로 트레오닌(T), 그 다음으로는 리신(K)이다.

도 9a. SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 Tn3 스캐폴드의 발현 및 정제. 재조합 발현 및 정제 이후에 SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 Tn3 스캐폴드(SynBP01)를 증명하는 쿠마시 염색된 PAGE 겔을 도시한 것이다. SynBP01 스캐폴드는 용이하게 균질물로 정제되었다.

도 9b. SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드의 K<sub>D</sub> 측정. 기록 결과는 BIACORE<sup>®</sup> 분석법에 의해서 SYNAGIS<sup>®</sup>에 대한 SynBP01 스캐폴드의 특이적 결합 친화성을 규명하는 실험을 나타낸 것이다. 고정화된 SYNAGIS<sup>®</sup> 및 다양한 농도의 이동상 SynBP01를 사용하여, 결합 친화성(K<sub>D</sub>)이 약 16  $\mu$ M인 것으로 측정되었다.

도 9c. SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드는 베이스 스캐폴드와 유사한 안정성을 나타낸다. SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드를 실시예 3에서 제조한 스캐폴드 라이브러리에서 동정하였다. 도 9c에는 단백질의 언폴딩을 고유 형광 발광으로 측정하는 우레아 변성 실험의 결과를 도시한 것이다. 이 실험에서, Tn3 스캐폴드(WT) 및 SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드 SynBP01(A1)는 우레아 농도 증가에 따라 매우 유사한 변성 프로파일을 나타냈다.

도 9d. 결합 스캐폴드는 표적 항체 SYNAGIS<sup>®</sup>를, 2가적으로 차지한다. 기록 결과는 BIAcore 분석 포맷에서 고정된 분자에 대해 2 스캐폴드의 결합성(engagement)을 특정규명하는 실험 결과를 나타낸다. 이 실험에서, 고정된 SYNAGIS<sup>®</sup>를 1  $\mu$ M SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 단백질 스캐폴드(파란색 기록선)의 용액 또는 1  $\mu$ M SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 단백질 스캐폴드 + 0.19  $\mu$ M 가교결합 mAb(적색 기록선)으로 중첩시켰다. 이 그래프는 단량체 스캐폴드 또는 가교결합된 스캐폴드가 나타내는 상이한 결합 특성을 도시한 것이다.

도 10a. 천연 발생 이황화 결합 함유 Tn3 구조 모티프의 서열 정렬. 도시한 서열 정렬은 안정화 조작을 위한 후보 위치를 결정하기 위해서 21개의 천연 발생 이황화 결합 함유 Tn3 관련 구조 모티프 내 시스테인 잔기의 위치를 개략적으로 나타낸 것이다. 개별 Tn3 서열 내 유사 색상 Cys 잔기는 이황화 결합으로 연결된다. 이황화 결합 함유 스캐폴드 내 시스테인 잔기에 상응하는 Tn3 내 위치 및 잔기의 동정을 촉진하기 위해 Tn3의 서열 (Iten.pro)을 정렬 내에 포함시켰다.

도 10b. 스캐폴드 안정성 증가를 위한 표적화 이황화 결합 조작법. 도 10b의 그래프는 스캐폴드 서열 내에 조작할 수 있는 가능한 이황화 결합 위치를 도시한 것이다. 안정성을 증가시키기 위해서, 4개의 도시한 이황화 결합 이치를 개별적으로 스캐폴드에 조작하였다. 최종 재조합 스캐폴드를 각각 Tn3<sup>SS1</sup>, Tn3<sup>SS2</sup>, Tn3<sup>SS3</sup> 및 Tn3<sup>SS4</sup>라 명명하였다.

도 10c. 선택 정제된 이황화 결합 조작된 스캐폴드의 RP-HPLC 기록 결과. 도 10c에 도시된 그래프는 정제 후, 환원, 및 이황화 결합 형성을 위한 리폴딩 후 (i) Tn3<sup>SS3</sup> 및 (ii) Tn3<sup>SS4</sup>의 역상 HPLC 크로마토그램이다. 이 크로마토그램은 스캐폴드 내 함유된 시스테인이 단백질 정제 후 부분적으로만 산화(맨위 기록선)되고 DTT 처리에 의해 완전 환원(중간 기록선)되고, 리폴딩 후 이황화 결합으로 완전하게 산화(아래 기록선)된 것을 보여준다.

도 10d. 이황화 조작된 스캐폴드의 발현 및 특징규명. 도 10d는 도 10b에 도시한 4 이황화 조작된 스캐폴드의

폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 결과를 도시한 것이다. 정제 및 리폴딩된 구성체 Tn3(WT), Tn3<sup>SS1</sup>(1), Tn3<sup>SS2</sup>(2), Tn3<sup>SS3</sup>(3), Tn3<sup>SS4</sup>(4)의 샘플을 환원 및 비환원 조건 하에서 분석하여 예상되는 이황화 결합 형성을 평가하였다. 도시한 바와 같이, Tn3<sup>SS2</sup>가 이황화 연결된 이량체를 형성하였다. 다른 구성체(Tn3, Tn3<sup>SS1</sup>, Tn3<sup>SS3</sup> 및 Tn3<sup>SS4</sup>)는 정제되고 리폴딩된 이황화 함유 스캐폴드가 환원 및 비환원 조건 하에서 유사하게 이동되었기 때문에 도입된 시스테인 잔기 의해 이량체를 형성하지 않았다.

도 10e. 단일 이황화 조작된 스캐폴드의 우레아 변성 프로파일. 도 10e의 그래프는 패널 A에 Tn3<sup>SS1</sup>(SS1), Tn3<sup>SS3</sup>(SS3) 및 Tn3<sup>SS4</sup>(SS4)와 Tn3 (WT) 스캐폴드를 개략적으로 나타낸 선택된 이황화 함유 스캐폴드의 우레아 변성 실험의 결과를 도시한 것이다. 이 실험에서는 다양한 정제 및 리폴딩된 스캐폴드를 고농도의 우레아에 노출시켰다. 언폴딩의 측정에 따라, 상대적인 형광발광을 모니터링하였다. 단백질이 언폴딩되거나 또는 덜 안정해짐에 따라서, 상대적 형광발광이 증가하였다. 이 패널에 도시한 바와 같이, Tn3<sup>SS1</sup> 함유 스캐폴드는 Tn3 스캐폴드에 비하여 우레아 감응도가 높게 나타났으며 그에 따라 덜 안정하였다. 또한, 스캐폴드 Tn3<sup>SS3</sup> 및 Tn3<sup>SS4</sup>는 Tn3에 비하여 우레아 매개 변성에 대해 보다 높은 내성을 나타냈고, 따라서 보다 안정하였다. 스캐폴드 Tn3<sup>SS4</sup>는 이 실험에서 시험한 스캐폴드 중 우레아 매개 변성에 대해 최고의 내성을 나타내었다.

도 10f. Tn3<sup>SS4</sup> 이황화 조작된 스캐폴드는 Tn3 스캐폴드에 비하여 증가된 안정성을 나타낸다. 도 10f의 그래프는 Tn3 스캐폴드(원)의 안정성을 이황화 함유 스캐폴드, Tn3<sup>SS4</sup>(네모)와 비교한 구아니딘 히드로클로라이드 변성 분석 결과를 도시한 것이다. 그래프에 도시한 바와 같이, Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드는 Tn3 스캐폴드에 비하여 구아니딘 매개 변성에 대해 높은 내성을 나타냈으며, 따라서, 보다 안정하였다.

도 10g. Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드는 Tn3 스캐폴드에 비하여 높은 수준의 프로테아제 내성을 나타낸다. 이 패널은 Tn3 스캐폴드의 안정성을 Tn3<sup>SS4</sup> 함유 스캐폴드와 비교한 프로테아제 감응도 분석 결과를 도시한 것이다. 이 실험에서, 상대적인 프로테아제 내성은 단백질 안정성과 상관된다. Tn3 스캐폴드에 대해서, 썬몰리신과 10분 정도 항온반응시킨 결과 분해되었다. 썬몰리신과 항온반응 1시간 후, Tn3 스캐폴드는 완전하게 분해되었다. Tn3<sup>SS4</sup> 함유 스캐폴드는 총 16시간 동안 썬몰리신 내성을 나타냈으며, Tn3 스캐폴드보다 안정성이 높다는 것을 시사한다.

도 10h. Tn3<sup>SS4</sup> 이황화 조작된 스캐폴드는 높은 용점(Tm)을 나타낸다. 도 10h의 그래프는 Tn3 스캐폴드(점선)을 이황화 함유 Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드(실선)와 비교한 열안정성 실험 결과를 도시한 것이다. 용융 곡선으로 나타낸 바와 같이, Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드는 Tn 스캐폴드(약 45°C, 도 3a 참고) 보다 높은 용융점(약 71°C)을 나타냈다.

도 10i. Tn3<sup>SS4</sup> 이황화 조작된 스캐폴드는 단량체 상태로 존재한다. 도 10i는 Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드의 크기 배제 크로마토그래피/다중각 광 산란(SEC-MALS) 분석 결과를 나타낸 것이다. 이 데이터는 정제된 Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드가 단량체 상태로 존재하며, 온라인 광 산란 검출기를 통해 약 11 kDa으로 측정되었다.

도 10j. 정제된 Tn3<sup>SS3+4</sup> 이황화 조작된 스캐폴드의 RP-HPLC 크로마토그램. 도 10j 그래프는 정제 후, 환원, 및 리폴딩하여 이황화 결합 생성 후 Tn3<sup>SS3+4</sup>의 역상 HPLC 크로마토그래피를 도시한 것이다. 이 기록결과는 스캐폴드 내 함유된 시스테인이 단백질 정제 후 부분적으로만 산화(윗쪽 기록선)되고 DTT 처리 후 완전 환원(중간 기록선)되었으며 리폴딩 후 2 이황화 결합으로 완전 산화(아랫쪽 기록선)된 것을 보여준다.

도 10k. 이중 이황화 함유 스캐폴드 Tn3<sup>SS3+4</sup>는 높은 수준의 안정성을 나타낸다. 도 10k는 Tn3(WT) 스캐폴드(원)의 안정성을 단일 이황화 함유 스캐폴드, Tn3<sup>SS4</sup>(네모), 및 이중 이황화 함유 스캐폴드, Tn3<sup>SS3+4</sup>(세모)와 비교한 구아니딘 히드로클로라이드 변성 분석 결과를 도시한 것이다. 그래프에 도시한 바와 같이, 리폴딩된 이중 이황화 스캐폴드, Tn3<sup>SS3+4</sup>는 단일 리폴딩된 이황화 함유 스캐폴드, Tn3<sup>SS4</sup>와 Tn3 스캐폴드와 비교하여 구아니딘 매개 변성에 높은 내성을 나타내었고, 따라서 보다 안정하였다.

도 11a. 초호열성 유기체로부터 스캐폴드의 발현 및 정제. 도 11a에는 다양한 초호열성 박테리아로부터 예측되는 스캐폴드(Tn3 구조 모티프)의 발현과 정제를 보여주는 쿠마시 염색된 PAGE 겔을 도시하였다. 모든 예상 스캐

폴드를 발현시키고 균질물로 정제하였다. 이 도면에서, T는 전체 세포 용해물을 나타내고, S는 가용성 용해물 분획을 나타내며, P는 정제된 단백질을 나타낸다.

도 11b. 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드는 높은 수준의 열 안정성을 나타낸다. 도 11b는 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드의 열안정성을 도시한 그래프이다. 추정 스캐폴드를 재조합 발현, 정제시키고, 열 안정성 시험을 수행하였다. 그래프에 도시한 바와 같이, 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드는 높은 용점(대략 pH 7.0에서 83℃)을 나타냈다.

도 11c. 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드는 높은 수준의 안정성을 나타낸다. 도 11c는 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드의 열안정성을 도시한 것이다. 추정 스캐폴드를 재조합 발현, 정제하고 시차 주사 열량분석계에서 열 안정성 시험을 수행하였다. 그래프로 도시한 바와 같이, 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드는 pH 3.0에서 높은 용점(대략 98℃)을 나타냈다. 이 스캐폴드는 또한, pH 7.0에서 높은 수준의 안정성을 나타내었지만, 75℃ 보다 높은 온도에서 응집되어 용액에서 분리되었다.

도 11d. 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드는 높은 수준의 안정성을 나타낸다. 도 11d는 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드의 높은 단백질 안정성을 증명한 구아니딘 히드로클로라이드 변성 분석 결과를 도시한 그래프이다. 그래프에 도시한 바와 같이, 이 스캐폴드를 언폴딩하기 위해서 높은 농도의 구아니딘 히드로클로라이드가 필요하였으며(분자의 50%가 5.0 M의 구아니딘 농도에서 언폴딩됨), 이러한 결과는 안정성이 높다는 것을 설명한다.

도 11e. 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드는 높은 수준의 안정성을 나타낸다. 도 11e는 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드의 높은 단백질 안정성을 증명하는 구아니딘 히드로클로라이드 변성 분석 결과를 도시한 그래프이다. 단백질 언폴딩은 분자의 상대적 형광발광 증가와 상관된다. 그래프에 도시한 바와 같이, pH 7.0(원) 또는 pH 3.0(네모)에서 스캐폴드를 언폴딩하기 위해 높은 농도의 구아니딘-HCl이 요구되며, 이는 안정성이 높다는 것을 예증한다.

도 11f. 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드는 높은 수준의 프로테아제 내성을 나타낸다. 도 11f는 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드의 안정성을 측정하는 프로테아제 감응도 분석 결과를 도시한 그래프이다. 이 실험에서, 상대적 프로테아제 내성은 단백질 안정성과 상관있다. 이 스캐폴드를 10분간 써몰리신과 항온반응시킨 결과, 분해 정도가 낮아 시간 경과에 따라 안정하게 유지되었다. 스태필로써머스 마리너스 스캐폴드는 총 16시간 경과 동안 써몰리신 내성을 나타내었다.

도 11g. 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드는 높은 수준의 프로테아제 내성을 나타낸다. 도 11g는 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드의 안정성을 측정하는 프로테아제 감응도 분석 결과를 도시한 그래프이다. 이 실험에서, 상대적인 프로테아제 내성은 단백질 안정성과 상관있다. 설폴로버스 토코다이 스캐폴드는 총 16 시간 경과 동안 써몰리신 내성을 나타냈다.

도 11h. 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드를 숙주 세포로부터 정제하였다. 도 11h는 스태필로써머스 마리너스 스캐폴드의 1 단계 정제를 도시한 도면이다. 이 스캐폴드에 의해 나타내는 높은 수준의 안정성 덕분에, 스캐폴드는 유지하면서 다량의 숙주 세포 단백질을 제거하기 위해 재조합 스캐폴드를 함유하는 미정제 이.콜라이(*E.coli*) 용해물을 가열하는 것이 가능하다. 레인 1은 열처리 전 미정제 용해물을 나타낸 것이다. 미정제 용해물 함유 PAGE 겔의 쿠마시 염색은 후보 스캐폴드가 존재하는 것을 보여준다. 70℃에서 15 분간 미정제 용해물의 열처리 결과 대부분의 숙주 세포 단백질이 손실된 반면 스캐폴드는 손상되지 않은 채로 남아 있었다(레인 2).

도 11i. 스태필로써머스 마리너스 유래 스캐폴드를 숙주 세포에서 정제하였다. 도 11i는 스태필로써머스 마리너스 스캐폴드의 1 단계 정제 과정을 도시한 것이다. 이 스캐폴드가 나타내는 높은 수준의 안정성 덕분에, 스캐폴드는 유지하면서 다량의 숙주 세포 단백질을 분해하기 위해 재조합 스캐폴드를 함유하는 미정제 이.콜라이 용해물을 써몰리신으로 처리하는 것이 가능하다. 레인 1은 프로테아제 처리된 미정제 용해물을 나타낸 것이다. 미정제 용해물을 함유하는 PAGE 겔의 쿠마시 염색은 스캐폴드가 존재함을 보여준다. 55℃에서 45분간 미정제 용해물을 프로테아제 처리한 결과 대부분의 숙주 세포 단백질은 손실된 반면 스캐폴드는 손상되지 않은 채로 남아 있었다(레인 2).

도 11j. 설폴로버스 토코다이 유래 스캐폴드를 숙주 세포로부터 정제하였다. 도 11j는 설폴로버스 토코다이 스캐폴드의 정제를 도시한 도면이다. 이 스캐폴드가 나타내는 높은 수준의 안정성 덕분에, 대부분의 숙주 세포 단백질을 제거하는 한편, 가용성 스캐폴드는 유지시키기 위해 재조합 스캐폴드를 함유하는 미정제 용해물을 pH 3.0에서 항온반응시키고 온도를 70℃로 15분간 승온시키는 것이 가능하다. 레인 1은 산 또는 열처리 전 미정제

이.콜라이 용해물을 나타낸다. 라인 2는 미정제 용해물의 pH를 3.0으로 낮춘 후 남아있는 가용성 단백질을 나타낸다. 라인 3은 pH를 3.0으로 낮추고 70℃에서 15분간 항온반응시킨 후 가용성 단백질을 나타낸다. 이 스캐폴드는 이러한 처리 동안 용액 중에서 내성을 가지고 유지되었다.

도 12. SynBP01와 SYNAGIS®의 결합에 2 루프가 필요하다. 도 12는 플레이트 결합된 SYNAGIS®에 대한 SynBP01 및 이의 변이체의 결합을 도시한 도면이다. 이 실험에서, SynBP01의 BC 및 FG 루프를 야생형 스캐폴드에 전달하여 SynBP01의 단일 루프 변이체를 생성시켰다. 이들 변이체(BC 단독 및 FG 단독이라 명명함)에 대해 ELISA 기반 결합 분석을 수행하였고 여기서 이들 변이체는 평판 결합된 SYNAGIS®에 대해 결합하지 않는 것으로 나타났다. 대조군으로서, ELISA 분석 포맷에서 SynBP01 결합이 존재하였다. 또한, SS4 이황화 돌연변이를 SynBP01에 중첩시켰다. SynBP01 SS4라 명명한, 이 변이체는 ELISA 포맷에서 플레이트 결합된 SYNAGIS®에 대해 어떠한 결합도 나타내지 않았다.

도 13. BIAcore로 측정한 TRAIL-R2 특이적 클론 5E5의 결합 친화성 측정결과. 도 13은 칩 결합된 TRAIL-R2에 대한 클론 5E5의 친화성 측정결과를 나타내는 도면이다.  $K_d$ 는 대략 700 nM로 개선되었다.

도 14. 다중 TRAIL-R2 특이적 클론이 경쟁적 결합을 나타내었다. 도 14는 다양한 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드의 경쟁적 결합 실험 결과를 나타낸 도면이다. 2종의 TRAIL-R2 특이적 클론, 5E5 및 7G11에 대해 파지 상에 디스플레이된 다른 TRAIL-R2 특이적 클론에 대한 경쟁적 결합을 시험하였다. 5E5는 그 자체, 및 2H6과 7G11을 제외한 다른 모든 클론과 경쟁하였다. 이러한 결과는 TRAIL-R2 상의 2개의 상이한 에피토프를 인식하는 2 그룹의 클론이 존재한다는 것을 의미한다.

도 15. 다양한 TRAIL-R2 특이적 클론의 경쟁. 도 15는 다양한 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드의 경쟁적 결합 실험 결과를 도시한 도면이다. 5종의 TRAIL-R2 특이적 클론, 1E3, 1G11, 2B4, 1C12 및 2D3에 대해 파지 상에 디스플레이된 다른 TRAIL-R2 특이적 클론에 대한 경쟁적 결합을 시험하였다. 1E3, 1C12 및 2D3은 8B3 및 7G11을 제외한 대부분의 파지 디스플레이된 클론과 경쟁하였다. 가용성 1G11은 파지 디스플레이된 클론 중 어떠한 클론과도 경쟁하지 않았고, 2B4는 대부분의 경우에서 낮은 정도에서 중간 정도의 억제성을 보였다. 이러한 데이터는 1E3, 1C12 및 2D3가 TRAIL-R2 상의 동일 에피토프를 인식한다는 것을 시사한다.

도 16. TRAIL-R2 결합인자는 세포 생존능을 억제한다. 도 16은 2:1:0.5의 물 비율로 항-HIS 태그 항체 및 항-마우스 IgG와 복합체 형성시 5E5, 7G11, 1C12, 2D3 및 1E3 처리에 대한 Colo-205 세포주의 감응도를 도시한 도면이다. 생존 세포 백분율은 TRAIL-R2에 결합하지 않는 대조군 Tn3으로 처리한 세포에서 얻은 신호의 백분율에 따른 TRAIL-R2 결합 클론 처리에 대한 분석 신호로 나타내어 얻었다.

도 17a. 다가 Tn3-융합 단백질의 실시예들을 나타낸 다이어그램. 2가 구성체는 항체 Fc 영역에 융합된 Tn3를 나타내며 반면 4가 구성체는 Tn3를 중쇄 불변 영역 및/또는 경쇄 C카파 영역에 융합시킨 것이다.

도 17b. 다가 Tn3-융합 단백질 내 단백질 모듈의 연결부를 도시한 다이어그램. i) Fc 융합 구성체에서, N-말단 Tn3 모듈은 IgG1의 힌지 영역 및 펩티드 링커를 통해 IgG1의 Fc 영역에 연결된다. 상기 링커 서열은 길이 및 조성이 다양할 수 있지만, 실시예 16에서는 -GA- 모티프였다. ii) C카파 융합 구성체에서, N-말단 Tn3 모듈은 펩티드 링커를 통해 항체 카파 경쇄의 불변 영역에 연결된다. 상기 링커 서열은 길이와 조성이 다양할 수 있지만, 실시예 16에서는 -GGGTPT- 모티프였다. iii) IGHG1 융합 구성체에서, N-말단 Tn3 모듈은 펩티드 링커를 통해 IgG1 중쇄의 불변 영역에 연결된다. 상기 링커 서열은 길이와 조성이 다양할 수 있지만, 실시예 16에서 -GGGTPT- 모티프였다.

도 18. 다가 Tn3 구성체의 발현. 도 18은 단백질 A 정제 후 2가 Tn 구성체(샘플 1-3), 및 4가 Tn3 구성체(샘플 4-7)의 상대적 크기를 보여주는 환원성 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다. 샘플 번호는 표 10에 열거한 것과 대응된다. 발현된 모든 구성체는 이 분석으로 예상되는 크기를 나타내었다.

도 19. Tn3 단량체 및 다량체의 결합 친화성. 도 19는 1가, 2가 및 4가 1C12 및 D1 Tn3 구성체를 사용한 바이오센서 결합 실험이 센서그램이다. TRAIL-R2-Fc 융합 단백질을 센서 칩 상에 고정시키고 샘플 단백질을 이 칩 상에 주입하였다. "tetra"는 4가 C $\kappa$ /IGHG1 융합 구성체를 의미한다. 1C12 구성체는 수가(valency)에 따라서 TRAIL-R2에 대한 결합이 향상된 반면, 대조군 D1 구성체는 결합하지 않는 것으로 나타났다.

도 20. TRAIL-R2를 표적화하는 2가 Tn3 구성체의 효과. 도 20은 가교결합 항체(항-인간 Fc)를 부가하거나 부가하지 않은, (A) 2가 형태인 TRAIL-R2 특이적 Tn3 결합인자 1C12, 또는 (B) 2가 형태인 비특이적 Tn3 결합인자로



처리한 H2122 세포의 성장 억제 그래프이다. 대조군 비-결합인자와 비교하여, TRAIL-R2 특이적 결합인자는 이 분석에서 온화한 활성을 나타내었는데, 2차 항체 존재시 감소되었다.

도 21. TRAIL-R2를 표적화하는 4가 Tn3 구성체의 효과. 도 21은 가교결합 항체(항-인간 Fc)를 부가하거나 부가하지 않고, (A) 단일특이적 4가 형태의 TRAIL-R2 특이적 Tn3 결합인자 1C12, 또는 (B) 단일특이적 4가 형태의 비-특이적 Tn3 결합인자를 처리한 H2122 세포의 성장 억제 그래프를 도시한 것이다. 대조군 비결합인자와 비교하여, TRAIL-R2 특이적 결합인자는 이 분석에서 활성을 나타내었는데, 2차 항체 존재시에는 약하게 감소하였다.

도 22. TRAIL-R2를 표적화하는 다중특이적 4가 Tn3 구성체의 효과. 도 22는 가교결합 항체(항-인간 Fc)를 부가하거나 또는 부가하지 않고, (A) 이중특이적 4가 형태의 TRAIL-R2 특이적 Tn3 결합인자 1C12 및 2D3(1C12는 IgG1 중쇄의 불변 영역에 융합되었고, 2D3은 C카파 도메인에 융합됨), 또는 (B) 이중특이적 4가 형태인 TRAIL-R2 특이적 결합인자 2D3 및 1C12(2D3은 IgG1 중쇄의 불변 영역에 융합되었고, 1C12는 C카파 도메인에 융합됨)를 처리한 H2122 세포의 성장 억제 그래프를 도시한 것이다. 대조군 비결합인자(도 21에 도시함)에 비하여, TRAIL-R2 특이적 결합인자는 이러한 분석에서 활성을 나타내었으며, 2차 항체 존재시 증가하였다.

도 23. pSec 구성체의 디자인. (A)는 pSec-oppA-Tn3 내 오픈 리딩 프레임의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. oppA 신호 펩티드(밑줄) 서열 번호 227는 주변세포질 공간으로 분비된 후 절단된다. oppA 신호 내 끝에서 두번째 잔기(이태릭체)는 pSec-oppA(L25M)-Tn3 유도체에서 메티오닌으로 돌연변이되어 *Nco* I 클로닝 부위가 도입되었다. (B)는 구성체 내 프로모터, 신호 펩티드, Tn3 및 His 태그 모듈의 배치를 도시한 pSec-oppA(L25M)-Tn3 구성체를 나타낸 것이다.

도 24. 분비 Tn3 구성체의 제조. (A)는 미정제 배지 및 Tn3를 분비하는 이.콜라이의 주변세포질 분획에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다. (B)는 이.콜라이 배지에서 정제된 Tn3 스캐폴드의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다. (C)는 이.콜라이 배지에서 정제된 Tn3의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다. DTT 환원 이후 체류 시간의 이동은 이황화 결합의 존재와 일치하는 것이다.

도 25. SYNAGIS® Fc 2가 결합인자의 SDS-PAGE. 도 25는 Fc 영역에 융합된 SynBP01 스캐폴드의 환원(레인 1) 및 비환원(레인 2) SDS-PAGE 분석 결과를 도시한 것이다. 이 결과는 융합물이 정확한 크기라는 것을 보여주며 이량체화된 것을 의미할 수도 있다.

도 26. SynBP01과 SYNAGIS® Fc 2가 결합인자의 경쟁적 결합 분석결과. SynBP01 vs. SynBP01-Fc의 경쟁적 BIAcore 분석. 간략하게, SYNAGIS®를 아민 커플링을 통해 CM5 센서 칩 표면 상에 고정시켰다. 1  $\mu$ M 농도의 SynBP01 또는 SynBP01-Fc를 75  $\mu$ l/분의 유속으로 주입하였다. 2가 SynBP01-Fc 구성체가 단일 도메인 결합인자보다 친화성이 높게 나타났다.

도 27. Tn3 스캐폴드는 PEG에 접합시킬 수 있다. (A) STn3(CTC)의 고정화 금속-친화성 컬럼 정제(레인 1-4), 및 말레이미드-유도화된 PEG 처리 후(양이온-교환 크로마토그래피 전) 정제된 STn3(CTC)에 대한 SDS-PAGE 분석 결과(레인 5). 레인 1: STn3(CTC)-발현 세포 유래의 전체 세포 용해물; 레인 2: IMAC 컬럼의 유통액(flow-through); 레인 3: IMAC 컬럼의 세정 분획; 레인 4: STn3(CTC), 미PEG화; 레인 5: PEG화 STn3(CTC). (B) SP XL 양이온-교환 컬럼에서 정제된, PEG화 STn3(CTC)의 SDS-PAGE. 피크 농도구배 분획은 레인 1-5에 도시하였다.

도 28. AB, CD 및 EF 루프는 루프-길이 다양성을 증명하였다. AB, CD 및 EF 루프의 길이를 각각의 103 Fn3 서열에 대해 추출하고 이 데이터를 사용하여 도시한 루프 길이 빈도 분포도를 제작하였다. 임의의 소정 루프에 대해, 모든 길이에 대한 빈도의 합은 103이었고, 서열 수를 분석하였다.

도 29. 상이한 pH 및 이온 강도에서 Tn3에 대한 용융점 측정. 도 29의 그래프는 Tn3 스캐폴드에 대하여, pH 7.0(20 mM 인산나트륨 완충액 중)에서(A), pH 5.0에서(20 mM 아세트산나트륨 완충액 중)(B), 그리고 pH 7.0에 고염 완충액에서(1.0 M의 염을 함유하는 20 mM 인산나트륨 완충액)(C)에서, 시차 주사 열량측정법으로 측정된 열 용융 곡선 측정결과를 나타낸 것이다. Tn3에 대한  $T_m$ 은 pH 7.0에서 약 45°C, pH 5.0에서 52°C, 높은 이온 강도 존재하의 pH 7.0에서 55°C로 측정되었다. pH 7.0 샘플에 대한 반복 주사(노란색) 결과 열적 언폴딩은 이러한 조건 하에서 가역적인 것으로 나타났다. Tn3의 열적 언폴딩은 pH 5.0에서는 비가역적이었다.

도 30a. Tn3의 전하 돌연변이체의 디자인. Tn3의 3차원 구조의 일례를 나타낸 도면이다(pdb 코드: 1ten). 서열 번호 1의 잔기 8-90를 도시하였는데, 모든 Asp 및 Glu 잔기의 측쇄는 노란색과 흰색으로 나타내었다. 8 돌연변이체의 패널을 디자인하였는데, 여기서 노란색으로 나타낸 Asp 및 Glu 잔기는 Asn 또는 Gln로 치환되었다. 잔기

번호화는 서열 번호 1에 따랐다.

도 30b. Tn3의 정제된 재조합 전하 돌연변이체의 SDS-PAGE 분석 결과. 각 정제된 단백질의 분취액을 SDS-PAGE 겔에서 분석하였다. 비교를 위해, 야생형 단백질은 동일 겔의 개별 레인에서 러닝시켰는데, 다양한 전하 돌연변이체와 유사한 이동 속도를 나타내었다.

도 31a. 안정화 Tn3 돌연변이체의 가산성. 일련의 Tn3 점돌연변이체를 생성하였는데, 이때 개별 Asp 또는 Glu 잔기를 Asn 또는 Gln로 치환시켰다. 도 31a는 고유한 형광발광으로 단백질의 언폴딩을 측정하는 우레아 변성 실험 결과를 도시한 것이다. 이 실험에서, Tn 스캐폴드의 8 전하 돌연변이체 중 5개(E33Q, D49N, E52Q, D53N, E86Q)는 야생형 Tn3 스캐폴드에 비하여 언폴딩을 위해 보다 높은 농도의 우레아가 필요하였다.

도 31b. 전하 돌연변이의 조합으로 Tn3 안정성이 부가적으로 개선되었다. 야생형 Tn3의 안정성을 향상시킨 Asp 또는 Glu 잔기의 점 돌연변이를 Tn3의 이중 또는 삼중 돌연변이로 조합시켰다. 조합된 Tn3 돌연변이체 각각(E33Q/D49N, D49N/E86Q 및 E33Q/D49N/E86Q)은 임의의 상응하는 점돌연변이체 또는 야생형 Tn3보다 높은 안정성을 나타내었다.

도 32 야생형 및 전하 조작된 Tn3 스캐폴드에 대한 용융점 측정결과. 도32의 그래프는 시차 주사 열량측정법으로 측정한 pH 7.0에서 Tn3 스캐폴드 변이체의 열 용융 곡선 측정 결과를 나타낸 그래프이다.  $T_m$ 은 야생형 Tn3에 대해서 약 45°C(A), E33Q/D49N Tn3에 대해 50°C(B), D49N/E86Q Tn3에 대해 52°C(C), E33Q/D49N/E86Q Tn3에 대해 52°C(D)였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 명세서에서 기술하는 단백질 스캐폴드는 항체-유도된 단편 및 비항체 골격 둘 모두보다 우수하도록 디자인되었다. 항체 단편에 비해 본 발명의 스캐폴드의 주요 장점은 구조적인 것이다. 이들 스캐폴드는 인간 체액 단백질에서 발견되는 전체의 안정한 가용성 구조 모듈 및 자연계 내 다른 공급원(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 호열성 박테리아)에서 유도된다. 결과적으로, 이들은 항체 단편보다 양호한 폴딩 특성 및 열안정성을 나타내고, 이들의 생성에는 항체 천연 폴딩 부의 제거, 종종 가변 도메인과 불변 도메인 사이의 계면 등과 같은, 온전한 항체 내에서, 소수성 환경하에 숨겨지는, 종종 아미노산 잔기들의 노출 등이 포함된다. 용매에 이러한 소수성 잔기를 노출시키는 것은 응집 가능성을 증가시킨다.

[0026] 또한, 본 발명의 스캐폴드는 항체 분자의 기능적 장점을 제공한다. 구체적으로, 스캐폴드가 면역글로불린이 아님에도, 전체적인 폴드가 IgG 중쇄의 가변 영역폴드와 유사하여, 상대 표정(relative orientation)으로 항체 CDR과 유사한 방식으로 이의 3 루프를 디스플레이하는 것이 가능하게 된다. 이러한 구조 때문에, 본 발명의 스캐폴드는 자연계에서 유사한 항원 결합 특성 및 그들 항체에 대한 친화성을 보유한다. 그 결과, 생체 내에서 항체의 친화성 성숙화 과정과 유사한, 루프 무작위화 및 서플링 전략을 시험관 내에서 채택할 수 있다.

### [0027] 1. FnIII 구조 모티프

[0028] 본 발명의 스캐폴드는 포유동물 혈액 및 구조 단백질에서 발견되는 도메인인 III형 피브로넥틴 모듈 구조를 기초로 한다. 이 도메인은, 피브로넥틴, 테나신, 세포내 세포골격 단백질, 사이토카인 수용체 및 원핵세포 효소를 비롯하여, 현재까지 서열분석된 단백질들에 종종 존재한다(Bork and Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8990, 1992; Bork et al., Nature Biotech. 15:553, 1997; Meinke et al., J. Bacteriol. 175:1910, 1993; Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265:15659, 1990). 이 도메인이 자연계에서 무수하게 출현하지만, 아미노산 서열은 상당히 다양하다. 구체적으로, 이들 스캐폴드는 테나신 C의 제3 FnIII 도메인("Tn3" 도메인이라고도 알려짐)을 포함한다. 이 도메인의 전체 폴드는 낙타 및 라마 IgG에 전체 항원 인식 단위를 포함하는, 중쇄의 가변 영역인, 최소 기능성 항체 단편의 폴드와 밀접하게 관련된다.

[0029] 또한, Tn3 도메인은 높은 친화성으로 특이적 표적에 결합할 수 있는 다양한 단백질 스캐폴드 폴의 생성을 촉진하는, 무작위화에 내성이 있는 노출된 루프 서열을 보유한다.

[0030] 이들 단백질 스캐폴드는 목적하는 거의 모든 화합물(예를 들어, 임의의 단백질)에 결합할 수 있는 단백질을 디자인하기 위해 활용될 수 있다. 구체적으로, 본 명세서에서 기술하는 Tn3 구조 모티프를 기초로 하는 분자는 항체 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)과 유사한 1 이상의 루프를 무작위화하기 위해 디자인된 방향적 진화법이 수행되는 스캐폴드로서 사용될 수 있다. 이러한 방향적 진화법에 의해서 대상 항원에 대한 친화성이 높은 항체 유사 분자가 제조된다. 또한, 본 명세서에서 기술된 스캐폴드는 이렇게 도입되는 루프에 결합되는 분자의 방향적 진화를 위해서, 정해진 노출 루프(예를 들어, 항원 결합을 기초로 이전에 무작위화되어 선택된 루프)를 디스

플레이하는데 사용될 수 있다. 이러한 유형의 선택은 임의의 개별 CDR-유사 루프에 대한 인식 분자를 동정하기 위해, 또는 대안적으로는, 비선형 에피토프 결합 부분과 조합된 2 또는 모든 3개의 CDR 유사 루프의 인식을 위한 인식 분자의 동정을 위해 수행될 수 있다.

- [0031] IgG 중쇄의 항원 결합 루프에 상응하는 한 세트의 Tn3의 3 루프는 아미노산 잔기 23-31(BC), 50-56(DE) 및 75-84(FG)에 걸쳐 존재한다. BC, DE 및 FG 루프의 길이는 각각, 9, 6 및 10 잔기이고, 각각 7-10, 4-8 및 4-28 잔기 길이인, 항체 중쇄에서 발견되는 상응하는 항원-인식 루프의 협소 범위 내에 존재한다. 대안적으로, 다른 구체예에서, BC, DE 및 FG 루프의 길이는 각각, 아미노산 잔기 23-31, 51-56, 및 75-84에 걸쳐 존재한다. 따라서, 높은 항원 친화성에 대해 무작위화되어 선택되면, 이들 루프는 항체 내 상응하는 루프와 접촉하는 동등한 항원과 접촉할 수 있다. Tn3 도메인의 AB, CD 및 EF 루프는 또한 이러한 특성을 공유하고, 따라서 또한 항원에 대한 높은 친화성에 대해 무작위화하여 선택할 수 있다. 이러한 과정은 BC, DE 및 FG 루프의 무작위화와 평행하게 또는 연속적으로 수행될 수 있다.
- [0032] 특정 구체예에서, 인간 테나신 C의 Tn3 도메인을 기초로 하는 스캐폴드의 1 이상의 루프 영역은 하기 I-VI의 아미노산 잔기를 포함한다:
- [0033] I. AB 루프에 포함된 12~17 아미노산 잔기;
- [0034] II. BC 루프에 포함된 23~31 아미노산 잔기;
- [0035] III. CD 루프에 포함된 39~45 아미노산 잔기;
- [0036] IV. DE 루프에 포함된 50~56 아미노산 잔기;
- [0037] V. EF 루프에 포함된 60~66 아미노산 잔기; 및
- [0038] VI. FG 루프에 포함된 75~84 아미노산 잔기.
- [0039] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6 루프를 포함하며, 여기서 루프는 서열 번호 201, 202, 203, 204, 205 또는 206의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 201의 아미노산 서열을 갖는 AB 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 202의 아미노산 서열을 갖는 BC 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 203의 아미노산 서열을 갖는 CD 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 204의 아미노산 서열을 갖는 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 205의 아미노산 서열을 갖는 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 206의 아미노산 서열을 갖는 FG 루프를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 201의 아미노산 서열을 갖는 AB 루프, 서열 번호 202의 아미노산 서열을 갖는 BC 루프, 서열 번호 203의 아미노산 서열을 갖는 CD 루프, 서열 번호 204의 아미노산 서열을 갖는 DE 루프, 서열 번호 205의 아미노산 서열을 갖는 EF 루프, 및 서열 번호 206의 아미노산 서열을 갖는 FG 루프를 포함한다.
- [0040] 다른 특정 구체예에서, 인간 테나신 C의 Tn3 도메인을 기초로 하는 스캐폴드의 1 이상의 루프 영역은 하기 I-VI의 아미노산 잔기를 포함한다:
- [0041] I. AB 루프에 포함된 11~17 아미노산 잔기;
- [0042] II. BC 루프에 포함된 23~31 아미노산 잔기;
- [0043] III. CD 루프에 포함된 39~45 아미노산 잔기;
- [0044] IV. DE 루프에 포함된 51~56 아미노산 잔기;
- [0045] V. EF 루프에 포함된 60~67 아미노산 잔기; 및
- [0046] VI. FG 루프에 포함된 75~84 아미노산 잔기.
- [0047] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6 루프를 포함하고, 여기서 루프는 서열 번호 207, 202, 203, 208, 209 또는 206의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 207의 아미노산 서열을 갖는 AB 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 202의 아미노산 서열을 갖는 BC 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 203의 아미노산 서열을 갖는 CD 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 208의 아미노산 서열을 갖는 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는

서열 번호 209의 아미노산 서열을 갖는 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 206의 아미노산 서열을 갖는 FG 루프를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 207의 아미노산 서열을 갖는 AB 루프, 서열 번호 202의 아미노산 서열을 갖는 BC 루프, 서열 번호 203의 아미노산 서열을 갖는 CD 루프, 서열 번호 208의 아미노산 서열을 갖는 DE 루프, 서열 번호 209의 아미노산 서열을 갖는 EF 루프, 및 서열 번호 206의 아미노산 서열을 갖는 FG 루프를 포함한다.

[0048] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 1-32 또는 68-88 중 임의 서열의 동족 루프 영역의 변이체인 루프 영역을 포함한다.

[0049] 본 발명은 천연 발생 단백질 서열에서 유래된 다수의 루프 영역 서열에 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하는 제조합, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드를 제공하며, 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열에서 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고, 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과 상동성이 50% 이상이다. 예를 들어, 이러한 아미노산 서열은 이에 제한되는 것은 아니고, 서열 번호 1-32, 60-88 및 210 중 임의의 서열일 수 있다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 인간 테나신 C의 Tn3 도메인의 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 인간 테나신 C의 Tn3 도메인과 상동성이 50% 이상인 서열을 포함한다. 추가 구체예에서, 상기 Tn3 도메인에 대한 상동성은 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 그 이상이다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 인간 테나신 C에서 유래하는 추가적인 Tn3 구조 모티프에 상응하는 단백질 서열이다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 다른 테나신 단백질에서 유래하거나, 다른 유기체(이에 제한되는 것은 아니고, 쥐와 동물, 돼지, 소 또는 말 테나신) 유래의 테나신 단백질에서 유래하는 Tn3 구조 모티프에 상응하는 단백질 서열이다.

[0050] Tn3이 항체 모방체 생성을 위한 스캐폴드를 대표하지만, 다른 분자가 본 명세서에 기술한 분자에서 Tn3을 대체할 수 있다. 이러한 분자에는 이에 제한되는 것은 아니고, 동물 및 원핵생물에서 유래하는 관련 Tn3 구조 모티프가 포함된다. 또한, 다른 단백질 유래의 Tn3 구조 모티프도 사용될 수 있다. 상이한 유기체 및 모단백질 유래 모듈이 다양한 응용분야, 예를 들어 낮은 pH에서 안정한 스캐폴드의 디자인을 위해 가장 적합할 수 있으며, 이는 낮은 pH에서 최적으로 성장하는 유기체(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 설포로버스 토코다이) 유래 단백질을 생성하는데 가장 바람직할 수 있다. 다른 구체예에서, 관련 Tn3 구조 모티프를 초호열성 박테리아, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 각각 70°C 보다 높은 온도에서 최적 성장을 보이는, 아케오글로버스 펠기더스 및 스타필로써머스 마리너스 등에서 동정하여 활용할 수 있다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 초호열성 유기체, 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고 아케오글로버스 펠기더스, 스타필로써머스 마리너스, 설포로버스 액시도칼다리우스, 설포로버스 솔파타리커스 및 설포로버스 토코다이 유래의 예상 Tn3 구조 모티프에 상응한다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 상기 기술한 Tn3 구조 모티프 또는 호열성 유기체 유래의 예상 Tn3 구조 모티프에 상응하는 서열 유래의 임의 서열과 상동성이 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상인 단백질 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 호열성 유기체 유래 Tn3 구조 모티프는 서열 번호 2-4 및 68-88의 아미노산 서열에서 선택될 수 있다.

[0051] 본 발명은 또한 7개 보다 많은 다수의 베타 스트랜드를 갖는 본 발명의 스캐폴드를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 다수, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11 또는 그 이상의 베타 스트랜드를 포함한다.

[0052] 본 발명은 또한, 6개가 넘는 다수의 루프 영역을 갖는 본 발명의 스캐폴드를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 다수, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11 또는 그 이상의 루프 영역을 포함한다.

[0053] 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 7개 이상의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 베타 스트랜드는 N-말단에서 C-말단으로 A, B, C, D, E, F 및 G 스트랜드라 명명된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 7개 이상의 베타 스트랜드를 포함하고, 각 스트랜드는 루프 영역에 의해 분리되며, 여기서 루프 영역은 N-말단에서 C-말단으로, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프로 명명된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 7개 보다 적은 베타 스트랜드를 포함하고, 각 스트랜드는 루프 영역에 의해 분리된다. 대안적인 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 7개 보다 적은 베타 스트랜드를 포함하고, 각 스트랜드는 루프 영역에 의해 분리된다.

[0054] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6 또는



는 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 베타 스트랜드는 서열 번호 228-234에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 A 스트랜드는 서열 번호 228의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 B 스트랜드는 서열 번호 229의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 C 스트랜드는 서열 번호 230의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 D 스트랜드는 서열 번호 231의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 E 스트랜드는 서열 번호 232의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 F 스트랜드는 서열 번호 233의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로, A-G로 명명된 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 G 스트랜드는 서열 번호 234의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 228의 서열을 갖는 A 스트랜드, 서열 번호 229의 서열을 갖는 B 스트랜드, 서열 번호 230의 서열을 갖는 C 스트랜드, 서열 번호 231의 서열을 갖는 D 스트랜드, 서열 번호 232의 서열을 갖는 E 스트랜드, 서열 번호 233의 서열을 갖는 F 스트랜드 및 서열 번호 234의 서열을 갖는 G 스트랜드를 포함한다.

[0055] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하고, 여기서 상기 베타 스트랜드는 서열 번호 235, 229, 230, 236, 232, 237 및 234에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 A 스트랜드는 서열 번호 235의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 B 스트랜드는 서열 번호 229의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 C 스트랜드는 서열 번호 230의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 D 스트랜드는 서열 번호 236의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 E 스트랜드는 서열 번호 232의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 F 스트랜드는 서열 번호 237의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단에서 C-말단으로 A-G로 명명된, 적어도 7개의 베타 스트랜드를 포함하며, 여기서 상기 G 스트랜드는 서열 번호 234의 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 235의 서열을 갖는 A 스트랜드, 서열 번호 229의 서열을 갖는 B 스트랜드, 서열 번호 230의 서열을 갖는 C 스트랜드, 서열 번호 236의 서열을 갖는 D 스트랜드, 서열 번호 232의 서열을 갖는 E 스트랜드, 서열 번호 237의 서열을 갖는 F 스트랜드 및 서열 번호 234의 서열을 갖는 G 스트랜드를 포함한다.

[0056] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 1-32 또는 68-99 중 임의 서열의 동족 베타 스트랜드와의 상동성이 50% 이상인 베타 스트랜드 서열을 포함한다. 추가 구체예에서, 상기 상동성은 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 그 이상이다.

[0057] 단백질 스캐폴드의 다양한 스트랜드를 연결하는 루프는 길이 및/또는 서열 다양성에 대해 무작위화될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 불변인 1 이상의 루프와, 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화시킨 1 이상의 추가 루프를 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 루프 AB, CD 및 EF 중 1 이상은 불변이고, 루프 BC, DE 및 FG 중 1 이상은 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 스캐폴드를 갖는다.

[0058] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기의 공통 서열로 무작위화된 BC 루프를 포함한다: S-X-a-X-b-X-X-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 프롤린 또는 알라닌을 나타내고, (b)는 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

[0059] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된 BC 루프를 포함한다: A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (d)는 프롤린, 글루타메이트 또는 리신을 나타내고,

(e)는 아스파라긴 또는 글리신을 나타내며, (f)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.

[0060] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기의 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함하는 BC 루프를 갖는다: S-P-c-X-X-X-X-X-T-G, 여기서 X는 임의의 아미노산이고, (c)는 프롤린, 세린 또는 글리신을 나타낸다.

[0061] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.

[0062] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 포함한다: X-a-X-X-X-b-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내며, (b)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.

[0063] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 포함한다: X-a-X-X-G-X-S-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.

[0064] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화된, 6 잔기를 포함하는 DE 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: X-X-X-X-X, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다.

[0065] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된, 7 잔기를 포함하는, AB 루프를 포함한다: K-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

[0066] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된, 9 잔기를 포함하는, AB 루프를 포함한다: K-X-X-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

[0067] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 7, 8 또는 9 잔기를 포함하는, CD 루프를 포함하며, 여기서 CD 루프 내 각 잔기는 무작위화되고, 이때 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타낸다.

[0068] 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된, 8 잔기를 포함하는 EF 루프를 포함한다: X-b-L-X-P-X-c-X, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, 여기서 (b)는 아스파라긴, 리신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산 또는 글리신을 나타내며, (c)는 이소류신, 트레오닌, 세린, 발린, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

[0069] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 약 75~약 500, 약 75~약 200, 약 75~약 100, 약 75~약 250 또는 약 75~약 150 아미노산을 포함할 수 있다.

## [0070] 2. 이황화-조작된 스캐폴드-기반 단백질

[0071] 본 발명의 스캐폴드의 안정성을 증가시키기 위한 노력으로, 생물정보학을 활용하여 이황화 결합의 조작에 적합한 후보 위치를 동정하였다. 그러나, 매우 근접한 후보 잔기 쌍을 동정하기 위한 단백질 구조의 매뉴얼 검사를 통한 이황화 디자인은 이러한 유형의 결합이 요구하는 엄격한 기하학적 제약으로 인해 대개는 비생산적이다 (Dombkowski, Bioinformatics Vol.19 No.14, 2003 1852-1853). 따라서, 본 발명은 열적 내성, 카오토로픽 변성 및 프로테아제 처리에 대한 내성으로 측정시 안정성의 향상된 것으로 나타나는 위치에 조작된 이황화 결합을 갖는 스캐폴드를 제공한다.

[0072] 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4 또는 적어도 5개의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함하고, 여기서 상기 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합은 스캐폴드를 안정화시킨다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 2개의 베타 스트랜드 사이에 위치하는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 예를 들어, 상기 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합은 A 스트랜드와 B 스트랜드 사이, 또는 D 스트랜드와 E 스트랜드 사이, 또는 F 스트랜드와 G 스트랜드 사이, 또는 C 스트랜드와 F 스트랜드 사이에 연결부를 형성할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합은 F 스트랜드와 G 스트랜드 사이에 제1 결합, 및 C 스트랜드와 F 스트랜드 사이에 제2 결합을 형성한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 2개의 루프 영역 사

이에 위치하는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 루프 영역과 베타 스트랜드 사이에 위치하는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 동일한 베타 스트랜드 내에 위치하는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 동일한 루프 영역 내에 위치하는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 1 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함하고, 여기서 상기 결합은 2개의 다른 스캐폴드 사이에 위치한다.

[0073] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4개 또는 그 이상의 스캐폴드의 다량체 스캐폴드(용어 "다량체"는 회합된 적어도 2 또는 그 이상의 스캐폴드로 정의됨)를 형성하는 이황화 결합을 포함한다.

[0074] 이황화 결합의 조작으로 부여되는 안정성 증가는 당분야에 공지된 방법, 예컨대 열( $T_m$ ) 및 카오프로틱 변성(예컨대 우레아, 또는 구아니딘), 프로테아제 처리(예컨대 썬몰리신) 또는 다른 당분야에서 허용되는 안정성 파라미터로 용이하게 측정할 수 있다. 단백질 안정성을 측정하는데 사용되는 방법의 총괄적인 리뷰는 예를 들어, 문헌 ["Current Protocols in Molecular Biology" and "Current Protocols in Protein Science" by John Wiley and Sons. 2007]을 참조한다.

[0075] 일 구체예에서, 이황화 결합을 함유하는 본 발명의 스캐폴드는 열 내성, 카오프로틱 변성, 프로테아제 처리에 대한 내성 또는 다른 당분야에 공지된 안정성 파라미터로 측정시, 이황화 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여, 안정성이 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상 증가된 것으로 나타난다.

[0076] 단백질의 안정성은 다양한 조건 하에서 단백질이 나타내는 형광발광 수준을 통해 측정할 수 있다. 스트레스 하에서 단백질이 나타내는 내부 형광발광 변화와 단백질의 상대적인 언폴딩성 간에 긍정적인 상호관련성이 있다. 열적 특징을 측정하기 위해 적절한 단백질 안정성 분석법은 시차 주사 열량측정법(DSC) 및 원형 편광이색성 측정법(CD)을 포함한다. 단백질이 DSC 또는 CD로 측정된 파라미터에서 상당한 크기로 이동을 보일 때, 언폴딩된 구조와 상호관련되며, 이러한 이동이 있는 온도를 용점 또는 ( $T_m$ )이라고 한다. 일 구체예에서, 이황화 조작된 본 발명의 스캐폴드는 동일한 실험 조건 하에서 조작되기 전의 동일 스캐폴드가 나타내는 용점( $T_m$ ) 보다, 적어도 45 °C 보다 높은, 적어도 50°C 보다 높은, 적어도 55°C 보다 높은, 적어도 60°C 보다 높은, 적어도 65°C 보다 높은, 적어도 70°C 보다 높은, 적어도 71°C 보다 높은, 적어도 72°C 보다 높은, 적어도 73°C 보다 높은, 적어도 74°C 보다 높은, 적어도 75°C 보다 높은, 적어도 76°C 보다 높은, 적어도 77°C 보다 높은, 적어도 78°C 보다 높은, 적어도 79°C 보다 높은, 적어도 80°C 보다 높은, 적어도 81°C 보다 높은, 적어도 82°C 보다 높은, 적어도 83°C 보다 높은, 적어도 84°C 보다 높은, 적어도 85°C 보다 높은, 적어도 85°C 보다 높은, 적어도 86°C 보다 높은, 적어도 87°C 보다 높은, 적어도 88°C 보다 높은, 적어도 89°C 보다 높은, 적어도 90°C 보다 높은, 적어도 91°C 보다 높은, 적어도 92°C 보다 높은, 적어도 93°C 보다 높은, 적어도 94°C 보다 높은, 적어도 94°C 보다 높은, 적어도 95°C 보다 높은, 적어도 96°C 보다 높은, 적어도 97°C 보다 높거나 또는 적어도 98°C 높거나, 또는 적어도 100°C 보다 높거나, 또는 적어도 105°C 보다 높거나, 또는 적어도 110°C 보다 높거나, 또는 적어도 120 °C 보다 높은 용점( $T_m$ )을 나타낸다.

[0077] 다른 구체예에서, 이황화 조작된 본 발명의 스캐폴드는 동일한 실험 조건 하에서 이황화 조작 전의 동일 스캐폴드와 비교하여, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상의 증가된 용점( $T_m$ )을 나타낸다.

[0078] 단백질 안정성의 또 다른 분석법은 단백질을 단백질 내 상호작용을 불안정화시키는 작용을 하는, 카오프로틱제, 예컨대 우레아 또는 구아니딘(예를 들어, 구아니딘-HCl 또는 구아니딘 이소티오시아네이트)에 노출시키는 것을 포함한다. 고농도의 우레아 또는 구아니딘에 단백질을 노출시, 상대적 내부 형광발광도를 측정하여 단백질 분자의 50%가 언폴딩되는 값을 측정하였다. 이 값을  $C_m$  값이라고 하며, 이 값은 단백질 안정성에 대한 벤치마크 값을 의미한다.  $C_m$  값이 높을수록, 단백질이 보다 안정하다. 일 구체예에서, 이황화 조작된 본 발명의 스캐폴드는 유사한 조건 하에 우레아 변성 실험에서 측정시 이황화 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여,  $C_m$  값이 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도

50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상 증가된 것으로 나타난다.

[0079] 다른 구체예에서, 이황화 조작된 본 발명의 스캐폴드는  $C_m$  값이 유사한 조건 하에 구아니딘 변성 실험에서 측정시 이황화 조작 전의 동일 스캐폴드와 비교하여 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상 증가된 것으로 나타난다.

[0080] 단백질 안정성을 분석하는데 사용되는 다른 분석법은 프로테아제 내성 분석이다. 이 분석에서, 상대적인 단백질 안정성 수준은 시간 경과에 따른 프로테아제 분해에 대한 내성과 상호 관련된다. 프로테아제 처리에 보다 내성이 있을수록 단백질은 보다 안정적이다. 일 구체예에서, 이황화 조작된 본 발명의 스캐폴드는, 안정성이 유사 조건하에 프로테아제 내성 실험에서 측정시 이황화 조작전의 동일 스캐폴드에 비하여, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상 증가된 것으로 나타난다.

[0081] 일부 예에서, 안정성이 감소된 본 발명의 스캐폴드, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니고, 세포독소 또는 방사성 핵종에 접합된 스캐폴드를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 스캐폴드는 비특이적 독성에 대해 보다 빠른 제거율을 요구할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 조작 전 스캐폴드에 비하여 스캐폴드를 탈 안정화시키는 이황화 결합을 포함한다. 일 구체예에서, 이황화 결합을 함유하는 본 발명의 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서 열적 내성, 카오트로픽 변성, 프로테아제 처리에 대한 내성 또는 당분야에 공지된 다른 안정성 파라미터로 측정시, 이황화 조작전의 동일 스캐폴드와 비교하여 안정성이 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 그 이상 감소된 것으로 나타난다.

### [0082] 3. 스캐폴드 동역학

[0083] 본 발명은 표적(예를 들어, 단백질)에 특이적으로 결합하는 스캐폴드를 제공한다. 일부 구체예에서, 표적은 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고 세포-표면 항원, 가용성 항원, 고정화 항원, 면역침묵 항원, 세포내 항원, 핵내 항원, 자가 항원, 비자가 항원, 암 항원, 박테리아 항원 또는 바이러스 항원일 수 있다.

[0084] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 특정 동역학으로 표적에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 BIAcore® 또는 당분야에 공지된 다른 방법으로 측정시, 회합 속도 상수 또는  $k_{on}$  속도(스캐폴드(Sc)+항원(Ag)( $k_{on} \rightarrow Sc-Ag$ )가 적어도  $10^5 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $1.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $2.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ , 또는 적어도  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ 이거나 또는 약  $10^5 \sim$  약  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ 의  $k_{on}$  속도, 약  $1.5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1} \sim$  약  $1 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 의  $k_{on}$  속도, 약  $2 \times 10^5 \sim$  약  $1 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 의  $k_{on}$  속도, 또는 약  $4.5 \times 10^5 \sim$  약  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 의  $k_{on}$  속도를 가질 수 있다.

[0085] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 BIAcore® 분석법 또는 당분야에 공지된 다른 분석법으로 측정시  $k_{off}$  속도(스캐폴드(Sc)+항원(Ag) ( $k_{off} \rightarrow Sc-Ag$ )가  $10^{-3} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-3} s^{-1}$  미만,  $10^{-4} s^{-1}$  미만,  $2 \times 10^{-4} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-4} s^{-1}$  미만,  $10^{-5} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-5} s^{-1}$  미만,  $10^{-6} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-6} s^{-1}$  미만,  $10^{-7} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-7} s^{-1}$  미만,  $10^{-8} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-8} s^{-1}$  미만,  $10^{-9} s^{-1}$  미만,  $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  미만이거나, 또는  $10^{-10} s^{-1}$  미만이거나, 또는  $10^{-3} \sim 10^{-10} s^{-1}$ ,  $10^{-4} \sim 10^{-8} s^{-1}$ , 또는  $10^{-5} \sim 10^{-8} s^{-1}$ 이다.

[0086] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 친화성 상수 또는  $K_a(k_{on}/k_{off})$ 가 적어도  $10^2 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^2 M^{-1}$ , 적어도  $10^3 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^3 M^{-1}$ , 적어도  $10^4 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^4 M^{-1}$ , 적어도  $10^5 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^5 M^{-1}$ , 적어도  $10^6 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^6 M^{-1}$ , 적어도  $10^7 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^7 M^{-1}$ , 적어도  $10^8 M^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^8 M^{-1}$ , 적어도  $10^9 M^{-1}$ , 적



어도  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , 적어도  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , 또는 적어도  $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ , 또는  $10^2$ - $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^4$ - $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , 또는  $10^5$ - $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이다. 본 발명의 스캐폴드는 BIAcore® 분석 또는 당분야에 공지된 다른 분석법으로 측정시  $K_a$ 가  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  이하,  $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  이하,  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  이하,  $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$  이하,  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  이하,  $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$  이하,  $10^{14} \text{ M}^{-1}$  이하, 또는  $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$  이하이다.

[0087] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 BIAcore® 분석 또는 당분야에 공지된 다른 분석법으로 측정시, 해리 상수 또는  $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ )가  $10^{-5} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  미만,  $10^{-6} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$  미만,  $10^{-7} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$  미만,  $10^{-8} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$  미만,  $10^{-9} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$  미만,  $10^{-10} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$  미만,  $10^{-11} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$  미만,  $10^{-12} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$  미만,  $10^{-13} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$  미만,  $10^{-14} \text{ M}$  미만,  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$  미만,  $10^{-15} \text{ M}$  미만 또는  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$  미만이다.

#### [0088] 4. 스캐폴드-기반 결합 단백질의 방향적 진화

[0089] 본 명세서에 기술한 스캐폴드는 신규하거나 또는 개서된 표적 결합 단백질을 진화시키기 위한 임의의 방법에서 사용될 수 있다. 일 특정예에서, 표적을 고형 지지체, 예컨대 컬럼 수지 또는 마이크로타이터 평판웰 등에 고정시키고, 이 표적을 후보 스캐폴드-기반 결합 단백질의 라이브러리와 접촉시킨다. 이러한 라이브러리는 CDR-유사 루프의 서열 및/또는 길이의 무작위화를 통해서 Tn3 모티프 기반 스캐폴드로부터 제작된 클론으로 이루어질 수 있다. 일 구체예에서, 라이브러리는 파지, 파지미드, 바이러스, 박테리아 또는 효모 디스플레이 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리일 수 있다. 필요하다면, 이 라이브러리는 예를 들어, 하기 문헌들에 기술된 방법으로 생성된 RNA-단백질 융합 라이브러리일 수 있다; Szostak et al., U.S. 특허 6,258,558 B1, U.S. 특허 6,261,804 B1; U.S. 특허 5,643,768 및 U.S. 특허 5,658,754. 대안적으로, 라이브러리는 DNA-단백질 라이브러리일 수 있다(예를 들어, 문헌 [Lohse, DNA-Protein Fusions and Uses Thereof, U.S. 출원 60/110,549(1998년 12월 2일 출원되었으나, 현재는 포기됨), 및 U.S. 출원 09/453,190(1999년 12월 2일 출원 참조).

[0090] 이와 관련되어, 박테리오파지(파지) 디스플레이는 거대한 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 이들 라이브러리의 구성원(들)을 동정가능하게 하는 잘 알려진 방법 중 하나이다. 파지 디스플레이는 변이체 폴리펩티드를 박테리오파지 입자의 표면 상에 코트 단백질과 융합 단백질로 디스플레이시키는 방법이다(Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). 파지 디스플레이의 유용성은 선별적으로 무작위화된 단백질 변이체(또는 무작위적으로 클로닝된 cDNA)의 거대 라이브러리를 높은 친화성을 갖는 표적 분자에 결합하는 서열들에 대해 신속하고 효율적으로 분류할 수 있다는 점에 있다. 펩티드(Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) 또는 단백질(Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; ClaCkson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) 라이브러리의 파지 디스플레이는 특이적 결합성을 갖는 것에 대해 수백만 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 스크리닝하기 위해 사용되어 왔다(Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). 무작위 돌연변이체의 파지 라이브러리를 분류하는 것은 다수의 변이체를 제작하고 증식시키기 위한 전략, 표적 수용체를 사용한 친화성 정제 과정, 및 결합 농축 결과를 평가하기 위한 수단이 필요하다(예를 들어, U.S. 특허 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 및 5,663,143 참조).

[0091] 대부분의 파지 디스플레이 방법이 섬유상 파지를 사용하지만, 람다형 파지 디스플레이(WO 95/34683; U.S. 특허 5,627,024), T4 파지 디스플레이 시스템(Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) 및 T7 파지 디스플레이 시스템(Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 특허 5,766,905)도 알려져 있다.

[0092] 기본 파지 디스플레이 개념에 대해 수많은 다른 개선법과 변형법이 개발되었다. 이들 개선법은 선택된 표적 분자와의 결합에 대해 펩티드 라이브러리를 스크리닝하고 목적하는 특성을 위해 이들 단백질을 스크리닝하는 능력을 갖는 기능성 단백질을 디스플레이하기 위한 디스플레이 시스템의 능력을 향상시켰다. 파지 디스플레이 반응

을 위한 조합 반응 장치가 개발되었고(WO 98/14277), 파지 디스플레이 라이브러리를 이중분자 상호작용(WO 98/20169; WO 98/20159) 및 제한된 헬릭스 펩티드 특성(WO 98/20036)을 분석하고 제어하는데 사용하였다. WO 97/35196는 친화성 리간드를 단리하는 방법을 기술하고 있는데, 여기서 파지 디스플레이 라이브러리를, 리간드가 표적 분자에 결합하게 되는 제1 용액, 및 친화성 리간드가 표적 분자에 결합하지 않는 제2 용액과 접촉시켜, 결합 리간드를 선택적으로 단리한다. WO 97/46251은 친화성 정제된 항체를 사용하여 무작위 파지 디스플레이 라이브러리를 바이오패닝한 후, 결합 파지를 단리하고, 이후 미세평판 웰을 사용한 마이크로패닝 과정을 수행하여 고친화성 결합 파지를 단리하는 방법을 기술하고 있다. 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 단백질 A를 친화성 태그로 사용하는 것도 보고되었다(Li et al. (1998) Mol Biotech., 9:187). WO 97/47314는 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있는 조합 라이브러리를 사용하여 효소 특이성을 구별하기 위한 기질 삭감 라이브러리의 용도를 기술하고 있다. 파지 디스플레이를 사용하여 세제로 사용하기 적합한 효소를 선별하는 방법이 WO 97/09446에 기술되어 있다. 특이적 결합 단백질을 선별하는 추가적인 방법은 U.S. 특허 5,498,538, 5,432,018 및 WO 98/15833에 기술되어 있다.

[0093] 펩티드 라이브러리를 생성하고 이들 라이브러리를 스크리닝하는 방법이 또한 U.S. 특허 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192 및 5,723,323에 개시되어 있다.

[0094] 본 발명의 라이브러리를 위해서, 천연 발생 Tn3 구조 모티프의 루프 길이 및 다양성 선호도를 결정하기 위해 생물 정보학적 방법을 채택하였다(실시예 2 참조). 이 분석 동안, 루프 길이 및 서열 다양성에 대한 선호도를 적용하여 "제한적 무작위화" 방법을 개발하였다. 이러한 제한적 무작위화에서는, 상대적인 루프 길이 및 서열 선호도를 라이브러리 전략 개발에 도입시켰다. 예를 들어, BC 루프에 대한 루프 길이 선호도 중 하나는 9잔기라는 것을 확인하였다. 9잔기를 함유하는 BC 루프를 추가로 분석시, 그 위치에서 특정 아미노산, 또는 아미노산 군에 대한 선호도가 존재하는지 또는 위치가 완전하게 무작위적인지 확인하였다. 루프 길이 및 서열 다양성 분석을 라이브러리 개발과 통합시킨 결과가 제한적 무작위화이다(즉, 무작위화된 루프 내 일정 위치를 제한하는 것으로서 아미노산이 그 위치에 존재할 수 있음). 제한적 무작위화법의 일례를 실시예(실시예 2 참조)에 기술하였다.

[0095] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술한 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 라이브러리(이하 "본 발명의 라이브러리")를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 천연 발생 단백질 서열에서 유래한 다수의 루프 영역 서열에 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하는 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드를 포함하며, 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고, 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 서열 상동성이 50% 이상이다. 일부 구체예에서, 천연 발생 서열은 인간 테나신 Tn3에 상응하는 단백질 서열이다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 인간 테나신 C 유래의 추가적인 Tn3 구조 모티프에 상응하는 단백질 서열이다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 다른 테나신 단백질 유래, 또는 다른 유기체의 테나신 단백질(예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 쥐와 동물, 돼지, 소 또는 말 테나신 등) 유래의 Tn3 구조 모티프에 상응하는 단백질 서열이다. 또다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 임의의 유기체 유래의 Tn3 구조 모티프에 상응하는 단백질 서열이다. 다른 구체예에서, 천연 발생 서열은 호열성 유기체, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니고 아케오글로버스 펠기더스, 스태필로써머스 마리너스, 셀폴로버스 엑시도칼다리우스, 셀폴로버스 솔파타리커스 및 셀폴로버스 토코다이 유래의 예측 Tn3 구조 모티프에 상응한다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 상기 기술한 바와 같은 Tn3 구조 모티프 또는 예측 Tn3 구조 모티프에 상응하는 임의의 서열과 서열 상동성이 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상인 단백질 서열을 갖는다.

[0096] 라이브러리를 고정화된 표적과 항온반응시키고, 지지체를 세척하여 비특이적 결합인자를 제거하고, 가장 단단히 결합된 결합인자를 매우 엄격한 조건 하에서 용리한 후 PCR을 수행하여 서열 정보를 회수하거나, 또는 서열에 대한 추가의 돌연변이 유발법과 함께 또는 없이, 선별 과정을 반복하는데 사용할 수 있는 새로운 결합인자의 라이브러리를 생성시킬 수 있다. 항원에 대해 충분히 친화성이 있는 결합인자를 얻을 때까지 다수회의 선별 라운드를 수행하였다.

[0097] 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 본 명세서에 기술된 스캐폴드를 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 7개 이상의 베타 스트랜드를 더 포함하는 스캐폴드를 포함하며, 여기서 상기 베타 스트랜드는 N-말단에서 C-말단으로 A, B, C, D, E, F 및 G 스트랜드라 명명된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 각각의 스트랜드가 루프 영역에 의해 분리된, 7개 이상의 베타 스트랜드를 더 포함하는 스캐폴드를 포함하고, 여기서 루프 영역은 N-말단에서 C-말단으로, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프라 명명된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 N-말단에서 C-말단으로, A, B, C, D, E, F 및 G 스트랜드라 명명된 적어도 7개의 베타 스

트랜드를 더 포함하는 스캐폴드를 포함하고, 여기서 각각의 스트랜드는 루프 영역에 의해 연결되며, 이때 루프 영역은 N-말단에서 C-말단으로, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG라 명명된다.

[0098] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 I 내지 VI의 아미노산 잔기를 포함하는 인간 테나신 C의 Tn3 도메인을 기반으로 하는 스캐폴드의 1 이상의 루프 영역을 추가로 포함한다:

[0099] I. AB 루프에 포함된 12~17 아미노산 잔기;

[0100] II. BC 루프에 포함된 23~31 아미노산 잔기;

[0101] III. CD 루프에 포함된 39~45 아미노산 잔기;

[0102] IV. DE 루프에 포함된 50~56 아미노산 잔기;

[0103] V. EF 루프에 포함된 60~66 아미노산 잔기; 및

[0104] VI. FG 루프에 포함된 75~84 아미노산 잔기.

[0105] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 I 내지 VI의 아미노산 잔기를 포함하는 인간 테나신 C의 Tn3 도메인을 기반으로 하는 스캐폴드의 1 이상의 루프 영역을 추가로 포함하는 스캐폴드를 포함한다:

[0106] I. AB 루프에 포함된 11~17 아미노산 잔기;

[0107] II. BC 루프에 포함된 23~31 아미노산 잔기;

[0108] III. CD 루프에 포함된 39~45 아미노산 잔기;

[0109] IV. DE 루프에 포함된 51~56 아미노산 잔기;

[0110] V. EF 루프에 포함된 60~67 아미노산 잔기; 및

[0111] VI. FG 루프에 포함된 75~84 아미노산 잔기.

[0112] 본 발명은 또한 루프 서열 다양성을 포함하는 스캐폴드를 포함하는 라이브러리도 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 1 이상의 위치를 함유하는 1 이상의 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 1 이상의 위치를 함유하는 한편 일정하게 유지되는 1 이상의 위치를 추가로 포함하는 1 이상의 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 제한적 무작위화를 수행한 1 이상의 위치를 포함하는 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 제한적 무작위화를 수행한 1 이상의 위치와, 불변인 1 이상의 위치를 추가로 포함하는 1 이상의 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 제한적 무작위화를 수행한 1 이상의 위치를 포함하고, 무작위화된 1 이상의 위치 및 불변인 1 이상의 위치를 추가로 포함하는 1 이상의 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다.

[0113] 단백질 스캐폴드의 다양한 스트랜드를 연결하는 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 1 이상의 루프를 갖는 스캐폴드를 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 1 이상의 루프는 불변으로 유지되는 한편 1 이상의 추가 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 스캐폴드를 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 AB, CD 및 EF 루프 중 1 이상, 2 이상, 또는 3개 모두가 불변으로 유지되는 한편, BC, DE 및 FG 루프 중 1 이상, 2 이상 또는 3 모두가 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 스캐폴드를 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 AB, CD 및 EF 루프 중 1 이상, 2 이상 또는 적어도 3 모두가 무작위되는 한편, BC, DE 및 FG 루프 중 1 이상, 2 이상 또는 3 모두가 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 스캐폴드를 갖는다.

[0114] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화되는 BC 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: S-X-a-X-b-X-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 프롤린 또는 알라닌을 나타내며, (b)는 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

[0115] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 하기 공통 서열로 무작위화된 BC 루프를 포함한다: A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (d)는 프롤린, 글루타메이트 또는 리신을 나타내고, (e)는 아스파라긴 또는 글리신을 나타내며, (f)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.

[0116] 다른 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함하는 BC 루프를 포함한다:

S-P-c-X-X-X-X-X-T-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (c)는 프롤린, 세린 또는 글리신을 나타낸다.

- [0117] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0118] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: X-a-X-X-X-b-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내며 (b)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.
- [0119] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화된 FG 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0120] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화되고, 7 잔기를 포함하는, AB 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: K-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.
- [0121] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화되고, 9 잔기를 포함하는, AB 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: K-X-X-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.
- [0122] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 7, 8 또는 9 잔기를 포함하는 CD 루프를 갖는 스캐폴드를 포함하고, 여기서 CD 루프 내 각 잔기는 무작위화되며, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타낸다.
- [0123] 특정 구체예에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 공통 서열로 무작위화되고, 8 잔기를 포함하는 EF 루프를 갖는 스캐폴드를 포함한다: X-b-L-X-P-X-c-X, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린 또는 세린을 나타내고, (b)는 아스파라긴, 리신, 세린, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산 또는 글리신을 나타내며, (c)는 이소류신, 트레오닌, 세린, 발린, 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.
- [0124] 본 발명의 추가 구체예는 상기 기술한 바와 같은 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 라이브러리를 코딩하는 단리된 핵산 분자의 컬렉션이다.
- [0125] 이들 Tn3 라이브러리의 디자인에서 추가적인 실제 고려사항은 임의의 아미노산을 코딩하기 위한 축퇴성 올리고 뉴클레오타이드에서 대체로 사용되는 "NNK"(N = A, G, T, C; K = G, T) 혼합 코돈 설계안에 대한 대체안을 찾는 것이다. "NNK" 혼합체가 모든 20개 아미노산을 코딩하는 32개의 상이한 코돈을 제공하지만, 이들이 동등하게 코딩되는 것은 아니다(표 11). 예를 들어, "NNK" 설계안의 3/32 코돈이 Leu(CTG, CTT, TTG)를 코딩하지만, 단지 1/32 코돈만이 Asp(GAT)를 코딩한다. 또한, "NNK" 혼합체는 하나의 중지 코돈(TAG) 및 Cys 코돈(TGT)을 코딩하지만, 이들 중 어떠한 것도 참신한(naive) 라이브러리를 생성하려는 경우에는 바람직하지 않다. 대체 설계안을 고려할 때, 본 발명자들은 적은 아미노산 서브셋으로 구성된 CDR 서열을 코딩하는 합성 항체 라이브러리가 보고되었던 점에 주목하였다. 단지 4개 아미노산(Tyr, Ala, Asp, Ser), 또는 2성분 쌍(Tyr, Ser)으로 구성된 CDR을 갖는 항체 라이브러리가 단백질 항원에 대한 특이적이고 높은 친화성 mAb를 생성시키는 것으로 보고되었다(Fellouse et al, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101:12467-72, Fellouse et al. J. Mol. Biol., 2005, 348:1153-62). 유사하게, 단지 Tyr 및 Ser을 포함하는 무작위화된 루프 서열을 갖는 10 Fn3 스캐폴드 단백질의 라이브러리도 단백질 표적에 대한 특이적 결합인자를 산출하였다(Koide et al. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104:66-32-7). 고도로 제한된 아미노산 세트를 함유하는 라이브러리가 특이적 결합 단백질을 생성할 수 있지만, 라이브러리로부터 획득되는 결합인자의 다양성은 제한적이게 된다. 따라서, 본 발명자들은 Tn3 라이브러리에 다양성을 도입시키기 위해 대안적인 "NHT" 혼합 코돈 설계안을 디자인하였다(H = A, T, C). "NHT" 혼합체는 20개 아미노산의 타당한 서브셋을 코딩하지만, "NNK" 혼합 코돈에 대해 기술한 단점은 제거하였다(표 12). 이러한 설계안은 12/20 아미노산을 코딩하는 12 코돈을 생성시키는데, 즉 각 코돈이 고유한 아미노산을 코딩한다. 또한, 중지 코돈이나 Cys 코돈이 없다. 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 NHT 코돈 설계안으로 코딩된 코돈을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 NNK 혼합 코돈 설계안으로 코딩된 코돈을 포함한다.



- [0126] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 친화성 돌연변이가 수행될 수 있다. 이러한 당분야에서 허용되는 방법에서, 특이적 결합 단백질에 대해 특이적인 표적에 대한 친화성을 증가시키기 위해 선택된 전략을 수행한다(Wu et al. Proc Natl Aca Sci USA. May 1998 26;95(11):6037-42). 최종적인 본 발명의 스캐폴드는 친화성 돌연변이 이전의 스캐폴드에 비해서 적어도 높아진 결합 특징을 나타낼 수 있다.
- [0127] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 항체에 대한 CDR 그래프팅(grafting)과 유사한 "루프 그래프팅"이 수행될 수 있다. 당분야에서 허용되는 이러한 방법에서, 항체 유래의 1 이상의 CDR을 엑셉터 항체(또는, 이 예에서, 본 발명의 스캐폴드) 상에 "그래프팅"시킨다(Ewert et al. Methods:2004 Oct;34(2):184-99). 다른 구체예에서, 다른 스캐폴드 유래의 1 이상의 루프를 본 발명의 스캐폴드 상에 그래프팅시킬 수 있다.
- [0128] 본 발명은 또한 스캐폴드:표적 복합체를 형성하도록 표적에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드의 아미노산 서열을 동정하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 a) 본 발명의 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 제공하는 단계; b) (a) 단계의 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 고정화 또는 분리가능 표적과 접촉시키는 단계; c) 자유 스캐폴드로부터 스캐폴드:표적 복합체를 분리하는 단계; d) 표적에 결합할 수 있는 디스플레이된 스캐폴드를 농축시키고 다양성을 낮추어서 (a)의 라이브러리와는 구별되는 새로운 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리가 생성되도록 (c)의 분리된 스캐폴드를 복제시키는 단계; e) 경우에 따라 (d) 단계의 새로운 라이브러리를 사용하여 (b), (c) 및 (d) 단계를 반복하는 단계; 및 f) (d) 단계에서 얻은 디스플레이된 스캐폴드 중을 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 추론하는 단계를 포함한다.
- [0129] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 라이브러리 스크리닝으로부터 동정한 후 추가로 무작위화될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 명세서에서 기술한 방법을 사용하여 라이브러리로부터 동정된 스캐폴드의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 또는 적어도 6개 루프를 추가로 무작위화하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 추가 무작위화된 스캐폴드에 대해 후속하여 표적에 결합할 수 있는 스캐폴드 동정 방법을 수행하며, 상기 방법은 (a) 고정화 또는 분리가능한 표적과 상기 추가 무작위화된 스캐폴드를 접촉시키는 단계, (b) 자유 스캐폴드로부터 추가 무작위화된 스캐폴드:표적 복합체를 분리하는 단계, (c) (b) 단계의 분리된 스캐폴드를 복제하고, 경우에 따라 (a)-(c) 단계를 반복하는 단계, 및 (d) 추가 무작위화된 스캐폴드를 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여, 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 추론하는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서, 추가무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 이전에 무작위화된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다. 다른 추가 구체예에서, 추가 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 앞서 무작위화되지 않은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다.
- [0130] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 라이브러리 스크리닝으로 동정된 후 추가로 무작위화될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 명세서에서 기술한 방법을 사용하여 라이브러리에서 동정된 스캐폴드의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6 또는 적어도 7개 스트랜드를 추가로 무작위화시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 추가로 무작위화된 스캐폴드에 대해 표적에 결합할 수 있는 스캐폴드를 동정하는 후속 방법을 수행하며, 상기 방법은 (a) 고정화 또는 분리가능한 표적과 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 접촉시키는 단계, (b) 자유 스캐폴드로부터 추가로 무작위화된 스캐폴드:표적 복합체를 분리하는 단계, (c) (b) 단계의 분리된 스캐폴드를 복제하고, 경우에 따라 (a)-(c) 단계를 반복하는 단계, 및 (d) 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여, 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 추론하는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서, 추가로 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 먼저 무작위화시킨 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 무작위화된 스트랜드를 포함한다. 다른 추가 구체예에서, 추가로 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 먼저 무작위화시키지 않은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 무작위화된 스트랜드를 포함한다.
- [0131] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 라이브러리 스크리닝으로 동정된 후 추가로 무작위화될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 명세서에서 기술한 방법을 사용하여 라이브러리로부터 동정된 스캐폴드의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개, 및 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 스트랜드를 추가로 무작위화하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 추가로 무작위화된 스캐폴드에 대해 표적에 결합할 수 있는 스캐폴드를 동정하는 후속 방법을 수행하며, 상기 방법은 (a) 고정화 또는 분리가능 표적과 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 접촉시키는 단계, (b) 자유 스캐폴드로부터 추가로 무작위화된 스캐폴드:표적 복합체를 분리하는 단계, (c) (b) 단계의 분리된 스캐폴드를 복제시키고, 경우에 따라 (a)-(c) 단계를 반복하는 단계, 및 (d) 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여, 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 추론하는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서,

추가로 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 이전에 무작위화시킨 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 스트랜드, 및 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다. 다른 추가 구체예에서, 추가로 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 앞서 무작위화시키지 않은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7개의 스트랜드, 및 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다.

[0132] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 얻는 방법 중 하나는 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화 루프, 및 AB, CD 및 EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 얻는 다른 방법은 AB, CD, EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화 루프, 및 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다.

[0133] 본 발명은 또한 적어도 1 또는 그 이상의 표적에 결합하는 2 이상의 스캐폴드를 얻는 방법을 제공한다. 이 방법은 특정 반응을 유도하기 위해 협력적으로 작용하는 제제의 스크리닝을 가능하게 한다. 이러한 스크리닝을 사용하는 것은 1보다 많은 스캐폴드의 협력을 요하는 작동제 활성이 필요할 때 이롭다(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니나 수용체 티로신 키나제의 작동). 이 방법은 다량체 복합체를 형성하기 위해 라이브러리를 리포맷하지 않고 협력 체제를 스크리닝할 수 있게 한다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 스캐폴드:표적 리간드 복합체가 형성되는 조건 하에서 본 발명의 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, 상기 스캐폴드를 가교제(2개의 동일하거나 상이한 스캐폴드가 함께 근접하여 결합하게 하는 제제로 정의됨)를 사용하여 결합시키는 단계로서, 여기서 스캐폴드의 가교결합은 검출가능한 반응을 유도하는 것인 단계 및 복합체로부터 표적에 결합하는 스캐폴드를 얻는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서, 가교제는 스캐폴드 특이적 항체 또는 이의 단편, 에피토프 태그 특이적 항체 또는 이의 단편, 이량체화 도메인, 예컨대 Fc 영역, 류신 지퍼 모티프, 화학적 가교결합제, 또는 당분야에 공지된 다른 이량체화 도메인 등이다.

[0134] 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 화합물을 검출하는 방법을 제공한다. 라이브러리 스크리닝을 통해 얻은 스캐폴드의 결합 특이성을 기초로, 예컨대 진단 방법 등을 위해서, 샘플 내 특이적 표적을 검출하기 위한 분석에서 이러한 스캐폴드를 사용하는 것이 가능하다. 일 구체예에서, 화합물을 검출하는 방법은 화합물:스캐폴드 복합체가 형성되는 조건 하에서 샘플 내 상기 화합물을 본 발명의 스캐폴드와 접촉시키는 단계 및 상기 스캐폴드를 검출하여 샘플 내 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서, 스캐폴드를 표지화(예를 들어, 방사성 동위원소, 형광발광성, 효소-연결 또는 비색성 표지)하여 상기 화합물의 검출을 촉진할 수 있다.

[0135] 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 화합물을 포획하는 방법을 제공한다. 라이브러리 스크리닝을 통해 얻은 스캐폴드의 결합 특이성을 기초로, 예를 들어 정제 방법 등을 위해서, 샘플 내 특이적 표적을 포획하기 위한 분석에서 이러한 스캐폴드를 사용하는 것이 가능하다. 일 구체예에서, 샘플에서 화합물을 포획하는 방법은 화합물:스캐폴드 복합체가 형성되는 조건 하에서 본 발명의 스캐폴드와 샘플 내 상기 화합물을 접촉시키는 단계 및 샘플에서 상기 복합체를 분리하여 상기 샘플 내 상기 화합물을 포획하는 단계를 포함한다. 추가 구체예에서, 스캐폴드를 고정화시켜 화합물:스캐폴드 복합체의 분리를 용이하게 할 수 있다.

[0136] 일부 구체예에서, 본 발명의 라이브러리에서 단리된 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 그 이상의 무작위화된 루프 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 단리된 스캐폴드 루프 서열은 도너 스캐폴드로부터 리시버(receiver) 스캐폴드의 임의 루프로 스와핑될 수 있다(예를 들어, 도너 스캐폴드로부터의 AB 루프 서열을 리시버 스캐폴드 내 임의 루프 영역으로 전달할 수 있음). 특이적인 구체예에서, 단리된 루프 서열을 리시버 스캐폴드 내 동족 루프로 전달할 수 있다(예를 들어, 도너 스캐폴드의 AB 루프 서열을 리시버 스캐폴드의 AB 루프 위치로 전달할 수 있음). 일부 구체예에서, 단리된 루프 서열은 다양한 리시버 스캐폴드를 사용하여 무작위적으로 "혼합 및 매칭"될 수 있다.

[0137] 다른 구체예에서, 단리된 스캐폴드 서열은 루프 서열을 통해 확인할 수 있다. 예를 들어, 라이브러리를 사용하여 특정 표적에 대해 패닝하고 특이적 결합인자의 컬렉션을 단리한다. 무작위화된 루프 서열은 스캐폴드 백그라운드(즉 표적 X에 결합하는 스캐폴드로서, 여기서 상기 스캐폴드는 서열 번호 x의 AB 루프 서열을 포함함). 다른 구체예에서, 스캐폴드가 표적 X에 결합하는 2 루프 서열을 나타내는 경우, 이 루프 서열은 스캐폴드 서열 부재시에 결합 표적 X로서 특징될 수 있다. 다시 말해서, 특정 표적에 결합하는 라이브러리로부터 단리된 스캐폴드는 스캐폴드 골격과 무관하게 그 표적에 결합하는 가변 루프 서열로서 발현될 수 있다고 생각된다. 이 과정은

항체의 가변 영역 내 CDR의 개념과 유사할 수 있다.

[0138] 일부 구체예에서, 본 발명은 SYNAGIS<sup>®</sup>에 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 스캐폴드를 제공한다. 이러한 구체예에서, SYNAGIS<sup>®</sup>에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 100, 102, 105, 107 및 109에서 선택된 BC 루프를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, SYNAGIS<sup>®</sup>에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 101, 103, 104, 106, 108 또는 110에서 선택된 FG 루프를 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, SYNAGIS<sup>®</sup>에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 100, 102, 105, 107 및 109에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열을 포함할 수 있고; 서열 번호 101, 103, 104, 106, 108 또는 110에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 SYNAGIS<sup>®</sup>에 특이적으로 결합하는 스캐폴드와 결합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수 있고, 상기 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합인자는 서열 번호 100, 102, 105, 107 및 109에서 선택된 하나의 BC 루프 서열을 포함하고; 서열 번호 101, 103, 104, 106, 108 또는 110에서 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 경쟁 분석은 실시예 11 및/또는 14에 기술한 대로 수행하거나 또는 당분야에 공지된 다른 분석법으로 수행할 수 있다.

[0139] 일부 구체예에서, 본 발명은 리소자임에 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 스캐폴드를 제공한다. 이러한 구체예에서, 리소자임에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 111, 114, 102, 120 및 124에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 리소자임에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 또는 125에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 리소자임에 특이적으로 결합하는 본 발명의 스캐폴드는 서열 번호 111, 114, 102, 120 및 124에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열을 포함할 수 있고; 서열 번호 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 또는 125에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 리소자임에 결합하는 스캐폴드와 결합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수 있으며, 상기 리소자임 결합인자는 서열 번호 111, 114, 102, 120 또는 124에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열; 및 서열 번호 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 또는 125에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함한다. 경쟁 분석은 실시예 11 및/또는 14에 기술된 바와 같이 수행하거나, 또는 당분야에 공지된 다른 분석법으로 수행할 수 있다.

## [0140] 5. 다량체 스캐폴드

[0141] 스캐폴드 단량체이외에도, 본 명세서에 기술한 임의의 스캐폴드 구성체는 수가를 증가시켜 항원 결합에 대한 화합력을 증가시키기 위한 수단으로서 스캐폴드의 이량체 또는 다량체로서 생성될 수 있다. 또한, 본 명세서에 기술한 임의의 스캐폴드 구성체는 항원 결합에 대한 특이성을 증가시키기 위한 수단으로서 스캐폴드의 이량체 또는 다량체로서 생성될 수 있다(예를 들어, 다른 항원에 결합하는 스캐폴드를 생성할 수 있음). 이러한 다량체(다량체 스캐폴드 또는 다가 스캐폴드라고도 함)는 개별 스캐폴드 분자 간에 공유 결합을 통해서, 예를 들어 아미노산 링커를 도입하여 생성시킬 수 있다. 다른 방법에서, 다량체 스캐폴드는 당분야에 공지된 이량체화 도메인을 사용하여 어셈블리될 수 있다. 구체적인 예에서, 공유 결합된 스캐폴드는 다량체 스캐폴드를 코딩하는 융합 유전자를 제작하여 생성시키거나, 또는 시스템인 잔기용 코돈을 단량체 서열에 유전자 조작해서 발현 생성물 간에 이황화 결합이 형성되도록 하여 생성시킬 수 있다.

[0142] 비공유 결합된 다량체 스캐폴드도 다양한 방법으로 생성시킬 수 있다. 이러한 방법에는 양으로 및/또는 음으로 하전된 잔기에 상응하는 코돈을 단량체 서열에 도입하여 발현 생성물(및 따라서 단량체 간) 내 이들 잔기 간에 상호작용이 일어나도록 하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 단량체 서브유닛에 천연적으로 존재하는 하전된 잔기를 이용하여 간략화시킬 수 있다. 비공유 결합된 스캐폴드를 생성시키는 다른 방법은 단량체 스캐폴드 유전자(예를 들어, 아미노 또는 카르복시 말단에)에, 상호작용하는 것으로 알려진 단백질 또는 단백질 도메인의 코딩 서열을 도입하는 것이다. 이러한 단백질 또는 단백질 도메인은 코일-코일 모티프, 류신 지퍼 모티프, 이량체 또는 고도의 다량체를 직접 형성하는 것으로 알려진 임의의 수많은 단백질 서브유닛(또는 이의 단편)을 포함한다.

[0143] 일부 구체예에서, 본 발명의 다량체 스캐폴드는 항체의 임의 도메인(또는 단편)에 융합된 1 이상의 스캐폴드를 포함한다. 일부 구체예에서, 1 이상의 스캐폴드는 항체 가변 도메인, CH1 도메인, C카파 도메인, C람다 도메인, CH2 또는 CH3 도메인에 융합된다. 다른 구체예에서, 1 이상의 스캐폴드는 항체 Fc의 CH2 도메인에 융합된다. 이러한 구체예에서, 최종 단백질은, 발현시, 항체 Fc 단편의 CH2 및 CH3 영역의 이량체화를 통해서 특정 표적에 대해 2가가 될 수 있다. 추가 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 Fc 단편에 연결된 항체 가변 영역을 대신한다.

대안적인 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 CH1-Fc 단편, C카파 또는 C람다 도메인에 연결된 항체 가변 영역을 대신하지 않는다.

[0144] 추가 구체예에서, 다량체 스캐폴드는 스캐폴드를 항체의 C카파 또는 C람다 영역 및 CH1 영역에 융합시켜 제작된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 항체의 CH1 및 C카파 또는 C람다 영역에 융합된 항체 가변 영역을 대신한다. 추가 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 항체의 경쇄 또는 중쇄 C-말단에 융합될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 항체의 경쇄 또는 중쇄의 N-말단에 융합될 수 있다.

[0145] 일부 구체예에서, 다량체 본 발명의 스캐폴드는 동일한 에피토프에 특이적인 스캐폴드를 포함한다. 다른 구체예에서, 다량체 본 발명의 스캐폴드는 다르게는 에피토프 결합 도메인으로 알려진 상이한 에피토프에 대해 특이적인 스캐폴드를 포함한다. 본 발명의 다량체 스캐폴드는 본 명세서에 모든 목적을 위해 전체로 참조하여 포함되는, 2008년 7월 30일 출원된 "다중특이적 에피토프 결합 단백질 및 이의 용도"라는 명칭의 미국 특허 출원 제 12/182,975호에 기술된 바와 같이 어셈블리되어 사용될 수 있다. 이러한 에피토프 결합 도메인은 항체, 항체 단편, 디아바디, scFv, Fab, Fv 또는 결합 펩티드에서 선택될 수 있다.

[0146] 다른 구체예에서, 에피토프 결합 도메인은 본 발명의 스캐폴드와 동일한 표적에 특이적일 수 있다.

[0147] 다른 구체예에서, 에피토프 결합 도메인은 본 발명의 스캐폴드와는 상이한 표적에 특이적일 수 있다.

[0148] 2 이상의 스캐폴드를 연결시키고자 하는 특정 경우에 적합한 링커를 선택하는 것은 예를 들어, 단량체 도메인의 성질, 및/또는 단백질가수분해와 산화반응에 대한 펩티드 링커의 안정성 등을 포함하여 다양한 변수에 따라 좌우될 수 있다.

[0149] 링커 폴리펩티드는 우선적으로 Gly, Ser, Ala 및 Thr로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 잔기를 포함한다. 예를 들어, 펩티드 링커는 Gly, Ser, Ala 및 Thr로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 잔기를 75% 이상(펩티드 링커에 존재하는 전체 잔기 수를 기초로 계산함), 예컨대 80% 이상, 예를 들어 85% 이상 또는 90% 이상 함유할 수 있다. 펩티드 링커는 또한 Gly, Ser, Ala 및/또는 Thr 잔기만으로 이루어질 수 있다. 링커 폴리펩티드는 목적하는 활성을 유지하도록 상호간에 올바른 구조형태를 취하도록 본 발명의 2 이상의 단량체 또는 본 발명의 2 이상의 다량체 스캐폴드를 연결하는데 적절한 길이여야 한다.

[0150] 이러한 목적에 적절한 길이는 1 이상의 길이, 대체로 약 50 아미노산 잔기보다 적은 길이, 예컨대 2-25 아미노산 잔기, 5-20 아미노산 잔기, 5-15 아미노산 잔기, 8-12 아미노산 잔기 또는 11 잔기의 길이이다. 유사하게, 링커를 코딩하는 폴리펩티드는 크기가 예를 들어, 약 2~약 15 아미노산, 약 3~약 15, 약 4~약 12, 약 10, 약 8, 또는 약 6 아미노산 범위이다. 핵산, 예컨대 DNA, RNA 또는 이 둘의 조합을 포함하는 방법 및 조성물에서, 링커 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 약 6 뉴클레오티드~약 45 뉴클레오티드, 약 9 뉴클레오티드~약 45 뉴클레오티드, 약 12 뉴클레오티드~약 36 뉴클레오티드, 약 30 뉴클레오티드, 약 24 뉴클레오티드, 또는 약 18 뉴클레오티드일 수 있다. 유사하게, 링커 폴리펩티드에 포함시키기 위해 선택되는 아미노산 잔기는 폴리펩티드 다량체의 활성이나 기능을 유의하게 방해하지 않는 특성을 가져야 한다. 따라서, 펩티드 링커는 전체적으로, 폴리펩티드 다량체의 활성 또는 기능과 연관되지 않거나, 또는 내부 폴딩을 방해하거나, 또는 특정 표적과 폴리펩티드 다량체의 결합을 심각하게 방해하는 1 이상의 단량체 도메인 내 아미노산 잔기와의 결합이나 다른 상호작용을 형성하는 전하를 띄지 않아야 한다.

[0151] 펩티드 링커는 또한 폴리펩티드 링커 내 아미노산 잔기가 특정 폴리펩티드 다량체 내 단량체 도메인의 특정 세트에 대해 무작위화된 라이브러리로부터 선별될 수도 있다. 탄성 링커도 단량체 도메인의 적절한 조합을 찾기 위해 사용할 수 있는데, 이후 가변 링커의 무작위 라이브러리를 사용하여 최적화시켜서 최적 길이 및 기하형태를 갖는 링커를 얻는다. 최적 링커는 표적과의 결합에 참여하고, 특이적 표적에 결합하지 않을 경우에 폴리펩티드 다량체 내에서 서로에 대해 단량체 도메인의 이동성을 제한하는 최소 개수의 바른 유형의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다.

[0152] 신규한 연결된 융합 폴리펩티드에 폴리펩티드를 연결하기 위해 인공 펩티드 링커를 비롯하여 천연 발생 펩티드 링커를 사용하는 것은 문헌들에 공지되어 있다(Hallewell et al. (1989), J. Biol. Chem. 264, 5260-5268; Alftan et al. (1995), 단백질 Eng. 8, 725-731; Robinson & Sauer (1996), Biochemistry 35, 109-116; Khandekar et al. (1997), J. Biol. Chem. 272, 32190-32197; Fares et al. (1998), Endocrinology 139, 2459-2464; Smallshaw et al. (1999), Protein Eng. 12, 623-630; U.S. Pat. No. 5,856,456).

[0153] 상기 언급한 바와 같이, 펩티드 링커가 적어도 일부 탄성을 보유한 것이 대체로 선호된다. 따라서, 일부 구체예에서, 펩티드 링커는 1-25 글리신 잔기, 5-20 글리신 잔기, 5-15 글리신 잔기 또는 8-12 글리신 잔기를 함유한



다. 펩티드 링커는 대체로 50% 이상의 글리신 잔기, 예컨대 75% 이상의 글리신 잔기를 함유한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 펩티드 링커는 글리신 잔기만을 포함한다. 특정 구체예에서, 링커 서열은 (G-G-G-S)<sub>x</sub>의 서열을 포함할 수 있고, 여기서 x는 양의 정수이다. 다른 특정 구체예에서, 링커 서열은 (G-A)<sub>x</sub>의 서열을 포함할 수 있고, 여기서 x는 양의 정수이다. 다른 특정 구체예에서, 링커 서열은 (G-G-G-T-P-T)<sub>x</sub>의 서열을 포함할 수 있고, 여기서 x는 양의 정수이다.

[0154] 일부 경우에서, 펩티드 링커에 일부 강성을 제공하는 것이 바람직하거나 또는 필요할 수 있다. 이는 펩티드 링커의 아미노산 서열에 프롤린 잔기를 포함시켜 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 구체예에서, 펩티드 링커는 펩티드 링커의 아미노산 서열에 1 이상의 프롤린 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 펩티드 링커는 아미노산 서열을 가지며, 여기서 아미노산 잔기의 25% 이상, 예컨대 50% 이상, 예를 들어, 75% 이상이 프롤린 잔기이다. 본 발명의 일 특정 구체예에서, 펩티드 링커는 프롤린 잔기만을 포함한다.

[0155] 본 발명의 일부 구체예에서, 펩티드 링커는 비폴리펩티드 부분을 위한 부착 기를 포함하는 아미노산 잔기가 도입되도록 변형된다. 이러한 아미노산 잔기의 예는 시스테인 잔기(이 잔기에 비-폴리펩티드 부분이 후속하여 부착됨)일 수 있거나 또는 아미노산 서열은 생체 내에서 N-글리코실화 부위(이를 통해 펩티드 링커에 당 부분이 부착됨(생체 내에서))를 포함할 수 있다. 추가적인 선택 방법은 진화된 tRNA 및 tRNA 합성효소를 사용하여 비천연 아미노산을 다량체 도메인 또는 링커에 유전자적으로 도입시키는 것이다(예를 들어, U.S. 공개 특허 출원 제 2003/0082575호 참조). 예를 들어, 케토-티로신의 삽입은 발현된 단백질 도메인 또는 다량체와 부위 특이적 커플링을 가능하게 한다.

[0156] 때때로, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 펩티드 링커의 아미노산 서열은 동일하다. 다르게, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 펩티드 링커의 아미노산 서열은 다를 수 있다.

## [0157] 6. 융합체

[0158] 본 명세서에 기술된 스캐폴드는 다른 단백질 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 이들 스캐폴드는 N-말단 또는 C-말단을 통해서, IgG의 불변 영역(Fc)과 스캐폴드를 융합시켜 인간 면역 반응에 통합시킬 수 있다. Fc 융합 분자는 면역 반응의 보체 성분을 활성화시키고 단백질 스캐폴드의 치료 가치를 상승시킨다. 유사하게, 스캐폴드와 보체 단백질, 예컨대 C1q 간 융합체를 사용하여 세포를 표적화할 수 있고, 스캐폴드와 독소간 융합체를 사용하여 특정 항원을 보유하는 세포를 특이적으로 파괴할 수 있다.

[0159] 추가적으로, 다양한 공개물은 분자에 FcRn-결합 폴리펩티드를 도입하거나(WO 97/43316; U.S. 특허 5,869,046; U.S. 특허 5,747,035; WO 96/32478; WO 91/14438) 또는 FnRn-결합 친화성은 보존되지만 다른 Fc 수용체에 대한 친화성은 상당히 감소된 항체와 분자를 융합시키거나(WO 99/43713) 또는 항체의 FcRn 결합 도메인과 융합시켜서(WO 00/09560; U.S. 특허 4,703,039) 반감기를 개질시킨 생리적 활성 분자를 얻는 방법을 하고 있다. 생리적 활성 분자의 반감기를 증가시키는 특정 기술 및 방법은 또한 "반감기가 증가된 항체"의 명칭으로 2006년 8월 1일 등록된 U.S. 특허 7,083,784에서 확인할 수 있으며, 이를 모든 목적을 위해 전체로 포함시킨다. 구체적으로, 본 발명의 스캐폴드를 IgG의 Fc 영역에 융합시키는 것을 고려할 수 있으며, 여기서 상기 Fc 영역은 아미노산 잔기 돌연변이(카바의 EU 인덱스로 번호화): M252Y/S254T/T256E 또는 H433K/N434F/Y436H를 포함한다.

[0160] 또한, 본 발명의 스캐폴드는 생체 내 또는 혈청 반감기가 증가되거나 연장된 분자와 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 혈류 내 반감기 및/또는 조직 침투성을 증가시키기 위해 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민(HSA), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 다당류, 면역글로불린 분자(IgG), 보체, 헤모글로빈, 결합 펩티드, 지단백질 및 다른 인자와 회합된다. 임의의 이들 융합체는 표준 기술, 예를 들어 공개된 유전자 서열을 사용하여 제작된 재조합 융합 유전자의 발현을 통해 생성될 수 있다.

[0161] 또한, 본 발명의 스캐폴드는 생체 내 또는 혈청 반감기를 증가시키거나 연장시키는 분자와 결합하거나 회합될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 혈청 반감기를 증가시키기 위해서, 알부민, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 다당류, 면역글로불린 분자 또는 혈청 반감기를 증가시킨 Fc 돌연변이를 갖는 면역글로불린 분자, 보체, 헤모글로빈, 지단백질 및 다른 인자와 회합된다. 임의의 이들 융합체는 표준 기술, 예를 들어 공개된 유전자 서열을 사용하여 제작된 재조합 융합 유전자로부터 융합 단백질을 발현시켜 생성시킬 수 있다.

[0162] 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 커플링제, 커플링 또는 활성화 부분(예를 들어, 티올, 트리플레이트, 트레실레이트, 아지드, 옥시란, N-히드록시숙신이미드 또는 말레이미드 부분)이 있거나 없는, 폴리에틸렌 글리콜 화합물 또는 이의 유도체를 의미한다. 용어 "PEG"는 그 유사체를 포함하여, 분자량이 500 내지 150,000 Da인

폴리에틸렌 글리콜을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 여기서 말단 OH-기는 메톡시 기로 치환될 수 있다(mPEG라고 함).

[0163] 일 구체예에서, 스캐폴드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 유도체화될 수 있다. PEG는 2개의 말단 히드록실 기를 갖는 산화에틸렌 반복 단위의 선형, 수용성 중합체이다. PEG는 대체로 약 500 달톤 내지 약 40,000 달톤 범위인 그들의 분자량에 따라 분류된다. 여기서 바람직한 구체예에서, 사용되는 PEG는 분자량이 5,000 달톤 내지 약 20,000 달톤이다. 본 발명의 스캐폴드에 커플링된 PEG는 분지형이거나 비분지형일 수 있다(Monfardini, C. et al. 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69). PEG는 Nektar Inc., Sigma Chemical Co. 및 다른 회사에서 판매된다. 이러한 PEG에는, 이에 제한되는 것은 아니고, 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜(MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙시네이트(MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜 숙시네이트(MePEG-S--NHS), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아민(MePEG-NH<sub>2</sub>), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트(MePEG-TRES), 및 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-이미다졸릴-카르보닐(MePEG-IM) 등이 포함된다.

[0164] 간략하게, 일 구체예에서, 사용되는 친수성 중합체, 예를 들어 PEG는 한쪽 말단에서 비반응성기 예컨대 메톡시 또는 에톡시 기로 캡핑된다. 이후에, 이 중합체는 적절한 활성화제, 예컨대 시아누릭 할라이드(예를 들어, 시아누릭 클로라이드, 브로마이드 또는 플루오라이드), 디아마도졸, 무수화물 시약(예를 들어, 디할로숙시닉 무수물, 예컨대 히브로모숙시닉 무수물), 아실 아마이드, p-디아조이옴벤질 에테르, 3-(p-디아조늄페녹시)-2-히드록시프로필에테르) 등과의 반응을 통해 다른 말단에서 활성화된다. 다르게, 본 발명의 스캐폴드 내 작용기는 중합체와의 반응을 위해 활성화되거나, 또는 2 개가 공지의 커플링 방법을 사용한 협동 커플링 반응에서 연결될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 당분야의 당업자에게 공지되고 이들이 사용하는 무수히 많은 다른 반응 전략을 사용하여 PEG로 유도체화될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0165] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 조작하여 접합을 위한 반응성 기를 제공한다. 이러한 스캐폴드에서, N-말단 및/또는 C-말단은 또한 접합을 위한 반응성 기를 제공하는데 적합할 수 있다. 다른 구체예에서, N-말단이 하나의 부분(예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, PEG)에 접합되는 한편 C-말단은 다른 부분(예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 비오틴)에 접합될 수 있으며, 이의 반대도 가능하다.

[0166] 용어 "생체 내 반감기"는 통상의 의미로 사용되는데, 즉 폴리펩티드의 생물학적 활성의 50%가 여전히 신체/표적 장기에 존재하는 기간, 또는 폴리펩티드의 활성이 이의 초기값의 50%인 시간을 의미하는데 사용된다. 기능적인 생체 내 반감기를 측정하기 위한 대체안으로서, "혈청 반감기"를 측정할 수 있는데, 즉 제거되기 전에 혈장 또는 혈류에서 폴리펩티드 분자의 50%가 순환하는 시간을 측정할 수 있다. 혈청 반감기 측정은 대체로 기능성 반감기를 측정하는 것보다 단순하며 혈청 반감기의 크기는 일반적으로 기능성 생체 내 반감기의 크기에 대한 좋은 지표이다. 혈청 반감기에 대한 다른 용어로는 혈장 반감기, 순환 반감기, 순환상 반감기, 혈청 제거율, 혈장 제거율 및 제거 반감기 등이 포함된다. 유지되는 기능성은 보통 전용고, 단백질가수분해, 보조인자 결합, 수용체 결합 활성, 또는 특정 단백질과 연관된 다른 유형의 생물학적 활성에서 선택된다.

[0167] 기능성 생체 내 반감기 또는 혈장 반감기에 대해 사용되는 용어 "증가된"은 폴리펩티드의 상대적 반감기가 동등한 조건 하에서 측정시 기준 분자(예를 들어, 비변형 폴리펩티드)에 비하여 통계적으로 유의하게 증가된 것을 의미하기 위해 사용된다. 예를 들어, 상대적 반감기는 비변형 기준 분자와 비교하여 약 25% 이상, 예컨대 약 50% 이상, 예를 들어, 약 100% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상, 약 250% 이상 또는 약 500% 이상 증가될 수 있다. 다른 구체예에서, 반감기는 비변형된 기준 분자와 비교하여 약 1배 이상, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상 또는 50배 이상 증가할 수 있다.

## [0168] 7. 무작위화 구체예

[0169] 일 측면에서, 본 발명은 무작위화된 스캐폴드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 다량체 무작위화된 스캐폴드를 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 이황화 조작된 무작위화된 스캐폴드를 제공한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 스캐폴드를 포함하는 라이브러리를 제공한다. 이 섹션에서 집합적으로 "본 발명"이라고 언급하는, 본 발명의 스캐폴드 및 상기 스캐폴드를 포함하는 디스플레이 라이브러리의 무작위화 전략을 이하에 제공한다.

[0170] 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 적어도 1개의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, 또는 적어도 BC, 또는 적어도 CD, 또는 적어도 DE, 또는 적어도 EF, 또는 적어도 FG 루프가 무작위화된다.





AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프가 모두 무작위화된다.

[0178] 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 1 이상, 또는 2 이상, 또는 3 이상, 또는 4 이상, 또는 5 이상, 또는 6 이상의 루프는 무작위화되지 않는다.

[0179] 일 구체예에서, 본 발명은 1개 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 하나의 루프는 무작위화되지 않는다. 일 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 AB 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 BC 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 CD 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 DE 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 EF 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 FG 루프가 무작위화되지 않는다.

[0180] 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 2개 루프가 무작위화되지 않는다. 일 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB 및 BC 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB 및 CD 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB 및 DE 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB 및 EF 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB 및 FG 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 BC 및 CD 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 BC 및 DE 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 BC 및 EF 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 BC 및 FG 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 CD 및 DE 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 CD 및 EF 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 CD 및 FG 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 DE 및 EF 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 DE 및 FG 루프가 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 EF 및 FG 루프가 무작위화되지 않는다.

[illegible]

기서 적어도 CD, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다.

[0182] 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 4개 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD 및 DE 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD 및 EF 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, CD, DE 및 EF 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, CD, DE 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, CD, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 이때 적어도 BC, CD, DE 및 EF 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 이때 적어도 BC, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 이때 적어도 CD, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다.

[0183] 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 5개 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD, DE 및 EF 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD, DE 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, CD, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 BC, CD, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다.

[0184] 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 6개 루프는 무작위화되지 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 1 이상의 무작위화된 루프를 포함하고, 여기서 적어도 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프는 무작위화되지 않는다.

[0185] 본 발명은 또한 베타 스트랜드 영역이 무작위화된 스캐폴드를 제공하고, 여기서 상기 베타 스트랜드 무작위화 스캐폴드는 유사한 조건 하에서 측정시 베타 스트랜드 무작위화 이전의 동일 스캐폴드만큼 적어도 높은 안정성 및 특이적 표적 친화성을 나타낸다. 일 구체예에서, 본 발명은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개의 베타 스트랜드가 무작위화된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 적어도 A 스트랜드, 또는 적어도 B 스트랜드, 또는 적어도 C 스트랜드, 또는 적어도 D 스트랜드, 또는 적어도 E 스트랜드, 또는 적어도 F 스트랜드가 무작위화되어 포함된다.

[0186] 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 2개의 베타 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 B 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 C 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 D 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 E 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A 스트랜드 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B 스트랜드 및 C 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B 스트랜드 및 D 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B 스트랜드 및 E 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B 스트랜드 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B 스트랜드 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 C 스트랜드 및 D 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 C 스트랜드 및 E 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 C 스트랜드 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 C 스트랜드 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 D 스트랜드 및 E 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 D 스트랜드 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 D 스트랜드 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 E 스트랜드 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 E 스트랜드 및 G 스트랜드



A, B, C, D, E 및 F 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, C, D, E 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, C, D, E, F 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, D, E, F 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, C, E, F 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, C, D, F 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, C, D, E 및 G 스트랜드를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 B, C, D, E, F 및 G 스트랜드를 포함한다.

[0191] 일 구체예에서, 본 발명은 6개의 무작위화된 베타 스트랜드를 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 A, B, C, D, E, F 및 G 스트랜드를 포함한다.

[0192] 본 발명은 또한 루프 길이 다양성을 갖는 단백질 스캐폴드를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 적어도 27, 적어도 28, 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산 잔기를 포함하는 1개 이상의 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 본 발명은 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 아미노산 잔기를 포함하는 1 이상의 루프를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 길이가 동일한 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 또는 적어도 6개 루프를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명은 길이가 다른 적어도 2 루프, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5 또는 적어도 6개 루프를 포함할 수 있다.

[0193] 다른 구체예에서, 본 발명은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 천연 발생 단백질 서열로부터 변이될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명은 상응하는 천연 발생 단백질 서열로부터 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6개 루프 서열 중에 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명은 상응하는 천연 발생 단백질 서열로부터 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6개의 루프 서열 중에 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6, 또는 적어도 7, 또는 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 14, 또는 적어도 15, 또는 적어도 16, 또는 적어도 17, 또는 적어도 18, 또는 적어도 19, 또는 적어도 20, 또는 적어도 21, 또는 적어도 22, 또는 적어도 23, 또는 적어도 24, 또는 적어도 25, 또는 적어도 26, 또는 적어도 27, 또는 적어도 28, 또는 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다.

[0194] 다른 구체예에서, 본 발명은 상응하는 천연 발생 단백질 서열로부터 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6개의 루프 서열 중에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4~적어도 약 8, 적어도, 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 14, 또는 적어도 15, 또는 적어도 16, 또는 적어도 17, 또는 적어도 18, 또는 적어도 19, 또는 적어도 20, 또는 적어도 21, 또는 적어도 22, 또는 적어도 23, 또는 적어도 24, 또는 적어도 25, 또는 적어도 26, 또는 적어도 27, 또는 적어도 28, 또는 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다.

[0195] 일 구체예에서, 본 발명은 루프 AB에 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다. 다른 구체예에서 본 발명은 루프 AB에 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6, 또는 적어도 7, 또는 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 14, 또는 적어도 15, 또는 적어도 16, 또는 적어도 17, 또는 적어도 18, 또는 적어도 19, 또는 적어도 20, 또는 적어도 21, 또는 적어도 22, 또는 적어도 23, 또는 적어도 24, 또는 적어도 25, 또는 적어도 26, 또는 적어도 27, 또는 적어도 28, 또는 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다. 다른 구체예에서 본 발명은 루프 AB에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4~적어도 약 8, 적어도, 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 14, 또는 적어도 15, 또는 적어도 16, 또는 적어도 17, 또는 적어도 18, 또는 적어도 19, 또는 적어도 20, 또는 적어도 21, 또는 적어도 22, 또는 적어도 23, 또는 적어도 24, 또는 적어도 25, 또는 적어도 26, 또는 적어도 27, 또는 적어도 28, 또는 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다.

[0196] 일 구체예에서, 본 발명은 루프 BC에 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 루프 BC에 적어도 1, 또는 적어도 2, 또는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6, 또는 적어도 7, 또는 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도







적어도 15, 또는 적어도 16, 또는 적어도 17, 또는 적어도 18, 또는 적어도 19, 또는 적어도 20, 또는 적어도 21, 또는 적어도 22, 또는 적어도 23, 또는 적어도 24, 또는 적어도 25, 또는 적어도 26, 또는 적어도 27, 또는 적어도 28, 또는 적어도 29, 또는 적어도 30개 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함한다.

[0201]

[illegible]

[0202]

본 발명은 또한 루프 서열 다양성을 포함하는 스캐폴드를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 1 이상의 위치를 함유하는 1 이상의 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 무작위화된 1 이상의 위치를 포함하는 한편 일정하게 유지되는 1 이상의 위치를 더 포함하는 1 이상의 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 제한적 무작위화가 수행된 1 이상의 위치를 포함하는 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 제한적 무작위화를 수행한 1 이상의 위치를 포함하고, 일정하게 유지되는 1 이상의 위치를 더 포함하는 1 이상의

루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 제한적 무작위화를 수행한 1 이상의 위치를 포함하고, 무작위화된 1 이상의 위치를 더 포함하며, 일정하게 유지되는 1 이상의 위치를 포함하는 1 이상의 루프를 포함한다.

[0203] 일 구체예에서, 본 발명은 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개 루프를 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC 루프를 포함한다. 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 CD 루프를 포함한다. 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 DE 루프를 포함한다. 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 EF 루프를 포함한다. 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 FG 루프를 포함한다.

[0204] 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 및 BC 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 및 CD 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 및 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC 및 CD 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC 및 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 CD 및 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 CD 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 CD 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 DE 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 DE 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 EF 및 FG 루프를 포함한다.

[illegible]

[0206] 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, 및 DE 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, CD, DE, 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, CD, DE, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, CD, EF, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, DE, EF, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, DE, EF, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열

길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC, CD, DE 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC, CD, EF 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC, DE, EF 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 CD, DE, EF, 및 FG 루프를 포함한다.

[0207] 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, DE, 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, DE, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, CD, DE, EF 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, DE, EF 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, EF 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, EF, 및 FG 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 AB, BC, CD, DE, 및 EF 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 길이 및 다양성을 위해 무작위화된 BC, CD, DE, EF 및 FG 루프를 포함한다.

## [0208] 8. 스캐폴드 집합체

[0209] 본 발명은 이에 제한되는 것은 아니고, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 융합 단백질, 핵산 분자, 소형 분자, 모방 체제, 합성 약물, 무기 분자 및 유기 분자를 포함하는, 1 이상의 부분에 접합되거나 융합된 스캐폴드의 용도를 포함한다. 본 발명은 융합 단백질 생성을 위해 이중성 단백질 또는 폴리펩티드(또는 이의 단편, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100 아미노산의 폴리펩티드)에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합(공유 및 비공유 접합 둘 모두 포함)된 스캐폴드의 용도를 포함한다. 융합을 반드시 직접적으로 할 필요는 없으며, 본 명세서에서 기술한 링커 서열을 통해 수행할 수 있다. 예를 들어, 특정 세포 표면 수용체에 특이적인 항체에 스캐폴드를 융합 또는 접합시켜, 시험관 내 또는 생체 내에서, 이중성 폴리펩티드가 특정 세포 유형을 표적화하는데 스캐폴드를 사용할 수 있다. 이중성 폴리펩티드에 융합되거나 접합된 스캐폴드를 또한 시험관 내 면역분석법 및 당분야에 공지된 방법을 사용하는 정제 방법에 사용할 수 있다. 국제 공개 특허 WO 93/21232; 유럽 특허 EP 439,095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; U.S. Pat. No. 5,474,981; Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432; 및 Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452 등을 참조하며, 이들을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다.

[0210] 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 추가적인 융합 단백질은 유전자 서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링, 및또는 코돈 서플링(충칭하여 "DNA 서플링"이라 함) 등의 기법을 사용하여 생성될 수 있다. DNA 서플링을 적용하여 본 발명의 스캐폴드의 활성을 변경시킬 수 있다(예를 들어, 친화성은 높아지고 해리 속도는 낮아진 스캐폴드). 예를 들어, U.S. 특허 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; 및 5,837,458, 및 Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; and Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313 등을 참조한다. 이들 각 특허 및 공개물을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다. 스캐폴드, 또는 이의 코딩된 스캐폴드에 대해 재조합 전에 에러-프론 PCR, 무작위 뉴클레오타이드 삽입 또는 다른 방법에 의한 무작위 돌연변이 유발법을 수행하여 변경될 수 있다. 특정 표적에 결합하는 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 중 1 이상의 부분은 1 이상의 이중성 분자의 1 이상의 성분, 모티프 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 함께 재조합될 수 있다.

[0211] 또한, 본 발명의 스캐폴드는 마커 서열, 예컨대 정제를 용이하게 하는 펩티드에 융합될 수 있다. 일부 구체예에서, 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드(his-태그), 예컨대 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)에서 제공하는 태그이고, 이들 대부분은 시판된다. 문헌 [Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824]에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 정제에 용이함을 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는 이에 제한되는 것은 아니고, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유래된 에피토프에 해당되는 헤마글루티닌 "HA" 태그(Wilson et al., 1984, Cell 37:767) 및 "flag" 태그 등이 포함된다.

[0212] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드, 이의 유사체 또는 유도체는 진단 또는 검출 체제에 접합될 수 있다. 이러한 스캐폴드는 임상 실험 과정의 일부, 예컨대 특정 요법의 효율을 결정하는 것의 일부로서 질환의 발병 또는 진행을 모니터링하거나 또는 예측하는데 유용할 수 있다. 이러한 진단 및 검출은 이에 제한되는 것은 아니나, 다양한 효소 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 홀스래디시 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시드 또는 아세틸콜린에스터라제; 보결 분자단, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴; 형광발광 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 엠펠리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오

시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 파이코에리트린; 발광 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니로, 루미놀; 생물발광 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 루시페라제, 루시페린 및 아쿠오린; 방사성 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 요오드(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), 탄소(<sup>14</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 트리튬(<sup>3</sup>H), 인듐(<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), 및 테크네튬(<sup>99</sup>Tc), 티튬(<sup>201</sup>Ti), 갈륨(<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 팔라듐(<sup>103</sup>Pd), 몰리브덴(<sup>99</sup>Mo), 크세논(<sup>133</sup>Xe), 불소(<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn, and <sup>117</sup>Tn; 다양한 양전자 방출 X선 단층 촬영을 사용하는 양전자 방출 금속, 비방사성 상자성체 금속 이온, 및 특정 방사성동위원소에 접합되거나 방사성표지된 분자를 포함하는 검출가능한 물질에 스캐폴드를 커플링시켜 수행할 수 있다.

[0213]

본 발명은 또한 치료적 부분에 접합된 스캐폴드의 용도를 포함한다. 스캐폴드는 치료적 부분, 예컨대 세포독소, 예를 들어, 세포증식 억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출인자에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 유해한 임의의 제제를 포함한다. 치료적 부분은 이에 제한되는 것은 아니고, 항대사물질(예를 들어, 메토트렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BCNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신C 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 도노루비신(이전에 도노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전에 악티노마이신)), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 아우리스타틴 분자(예를 들어, 아우리스타틴 PHE, 브리오스타틴 1, 및 솔라스타틴 10; 예를 들어, 하기 문헌을 참조하며, 이들을 모두 전체로 참조하여 포함시킨다: Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8 (2002), Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., *Anticancer Drugs* 12:735-40 (2001), Wall et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80 (1999), Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999)), 호르몬(예를 들어, 글루코코르티코이드, 프로게스테론, 안드로겐 및 에스트로겐), DNA-복구 효소 억제제(예를 들어, 에토포시드 또는 토포테칸), 키나제 억제제(예를 들어, 화합물 ST1571, 이마티닙 메실레이트(Kantarjian et al., *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002))), 세포독성 제제(예를 들어, 파클리탁셀, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티덤브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 마이토잔트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체) 및 하기 U.S. 특허들에 기술된 화합물(U.S. 특허 6,245,759, 6,399,633, 6,383,790, 6,335,156, 6,271,242, 6,242,196, 6,218,410, 6,218,372, 6,057,300, 6,034,053, 5,985,877, 5,958,769, 5,925,376, 5,922,844, 5,911,995, 5,872,223, 5,863,904, 5,840,745, 5,728,868, 5,648,239, 5,587,459), 파르네실 트랜스퍼라제 억제제(예를 들어, R115777, BMS-214662, 및 예를 들어, 하기 U.S. 특허에 기술된 것들: U.S. 특허 6,458,935, 6,451,812, 6,440,974, 6,436,960, 6,432,959, 6,420,387, 6,414,145, 6,410,541, 6,410,539, 6,403,581, 6,399,615, 6,387,905, 6,372,747, 6,369,034, 6,362,188, 6,342,765, 6,342,487, 6,300,501, 6,268,363, 6,265,422, 6,248,756, 6,239,140, 6,232,338, 6,228,865, 6,228,856, 6,225,322, 6,218,406, 6,211,193, 6,187,786, 6,169,096, 6,159,984, 6,143,766, 6,133,303, 6,127,366, 6,124,465, 6,124,295, 6,103,723, 6,093,737, 6,090,948, 6,080,870, 6,077,853, 6,071,935, 6,066,738, 6,063,930, 6,054,466, 6,051,582, 6,051,574, 및 6,040,305), 토포이소머라제 억제제(예를 들어, 캄프토테신; 이리노테칸; SN-38; 토포테칸; 9-아미노캄프토테신; GG-211(GI 147211); DX-8951f; IST-622; 루비테칸; 피라졸아크리딘; XR-5000; 사인토펜; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN-1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; 및 레베카마이신); 불가레인; DNA 부흥 결합인자 예컨대 Hoescht 염료 33342 및 Hoechst 염료 33258; 니티딘; 파카로닌; 에피베르베린; 코탈라인; 베타-라파론; BC-4-1; 비스포스포네이트(예를 들어, 알렌드로네이트, 시마드로네이트, 클로드로네이트, 티루드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트, 네리드로네이트, 올판드로네이트, 리세드로네이트, 피리드로네이트, 파미드로네이트, 졸렌드로네이트) HMG-CoA 리덕타제 억제제(예를 들어, 로바스타틴, 심바스타틴, 아토르바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 스타틴, 세리바스타틴, 레스콜, 루피터, 로수바스타틴 및 아토르바스타틴) 및 이의 약학적으로 허용되는 염, 이의 용매화물, 포접화합물 및 프로드러그, 예를 들어, 문헌[Rothenberg, M. L., *Annals of Oncology* 8:837-855(1997); 및 Moreau, P., et al., *J. Med. Chem.* 41:1631-1640(1998)] 참조, 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, 하기 U.S. 특허들에 개시된 것들: U.S. 특허 6,277,832, 5,998,596, 5,885,834, 5,734,033 및 5,618,709), 면역조절제(예를 들어, 항체 및 사이토카인), 항체, 및 아데노신 디아미나제 억제제(예를 들어, 플



루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신)를 포함한다. 예에는, 파클리탁셀, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티도브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시안트라신 디온, 미토잔트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료제는 이에 제한되는 것은 아니고, 항대사산물(예를 들어, 메토티렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오우라실 테카르바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BCNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP), 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 아우리스타틴 분자(예를 들어, 아우리스타틴 PHE, 브리오스타틴 1, 솔라스타틴 10, 예를 들어, 문헌 [Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8 (2002), Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., *Anti Cancer Drugs* 12:735-40 (2001), Wall et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80 (1999), Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999)]를 참조하며, 이들 모두를 참조하여 본 발명에 포함시킴), 항유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 호르몬(예를 들어, 글루코코르티코이드, 프로게스타틴, 안드로겐 및 에스트로겐), DNA-복구 효소 억제제(예를 들어, 에토포시드 또는 토포테칸), 키나제 억제제(예를 들어, 화합물 ST1571, 이마티닙 메실레이트(Kantarjian et al., *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002)), 및 하기 U.S. 특허에 개시된 화합물: U.S. 특허 6,245,759, 6,399,633, 6,383,790, 6,335,156, 6,271,242, 6,242,196, 6,218,410, 6,218,372, 6,057,300, 6,034,053, 5,985,877, 5,958,769, 5,925,376, 5,922,844, 5,911,995, 5,872,223, 5,863,904, 5,840,745, 5,728,868, 5,648,239, 5,587,459), 파르네실 트랜스퍼라제 억제제(예를 들어, R115777, BMS-214662, 및 예를 들어, 하기 U.S. 특허에 기술된 것들: U.S. 특허 6,458,935, 6,451,812, 6,440,974, 6,436,960, 6,432,959, 6,420,387, 6,414,145, 6,410,541, 6,410,539, 6,403,581, 6,399,615, 6,387,905, 6,372,747, 6,369,034, 6,362,188, 6,342,765, 6,342,487, 6,300,501, 6,268,363, 6,265,422, 6,248,756, 6,239,140, 6,232,338, 6,228,865, 6,228,856, 6,225,322, 6,218,406, 6,211,193, 6,187,786, 6,169,096, 6,159,984, 6,143,766, 6,133,303, 6,127,366, 6,124,465, 6,124,295, 6,103,723, 6,093,737, 6,090,948, 6,080,870, 6,077,853, 6,071,935, 6,066,738, 6,063,930, 6,054,466, 6,051,582, 6,051,574 및 6,040,305), 토포이소머라제 억제제(예를 들어, 캄프토테신; 이리노테칸; SN-38; 토포테칸; 9-아미노캄프토테신; GG-211(GI 147211); DX-8951f; IST-622; 루비테칸; 피라졸로아크리딘; XR-5000; 사이토포핀; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN-1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; 및 레베카마이신; 불가레인; DNA 부흥 결함인자 예컨대 Hoescht 염료 33342 및 Hoechst 염료 33258; 니티딘; 파가로닌; 에피베르베린; 코랄린; 베타-라파콘; BC-4-1; 및 이의 약학적으로 허용되는 염, 이의 용매화물, 포접화합물 및 프로드러그, 예를 들어, 문헌 [Rothenberg, M. L., *Annals of Oncology* 8:837-855(1997); and Moreau, P., et al., *J. Med. Chem.* 41:1631-1640(1998) 참조), 안티센스(예를 들어, U.S. 특허 6,277,832, 5,998,596, 5,885,834, 5,734,033 및 5,618,709에 개시된 것들), 면역조절제(예를 들어, 항체 및 사이토카인), 항체(예를 들어, 리툭시맵(Rituxan<sup>®</sup>), 칼리케아마이신(Myloarg<sup>®</sup>), 이브리투모맵 티우제탄(Zevalin<sup>®</sup>), 및 토시투모맵(Bexxar<sup>®</sup>), 및 아데노신 디아미나제 억제제(예를 들어, 플루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신) 등을 포함한다.

[0214] 또한, 스캐폴드는 주어진 생물학적 반응을 변형시키는 치료적 부분 또는 약물 부분에 접합될 수 있다. 치료적 부분 또는 약물 부분은 고전적인 화학 치료 제제에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 약물 부분은 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은 예를 들어, 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소; 단백질 예컨대 종양 괴사 인자,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래된 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화인자, 아포토시스 제제, 예를 들어, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I(국제 공개 출원 WO 97/33899 참조), AIM II(국제 공개 출원 WO 97/34911 참조), Fas 리간드(Takahashi et al., 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574) 및 VEGI(국제 공개 출원 WO 99/23105), 혈전 제 또는 항혈관생성제, 예를 들어 안지오테라틴, 엔도스타틴 또는 응고 경로의 성분(예를 들어, 조직 인자); 또는 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인(예를 들어, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자("GM-CSF") 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF")), 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬 ("GH")), 또는 응고제(예를 들어, 칼슘, 비타민 K, 조직 인자, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, Hageman 인자(인자 XII), 고분자량 키니노젠(HMWK), 프리칼리크레인(PK), 응고 단백질 인자 II(프로트롬빈), 인자 V, XIIa, VIII, XIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, 인지질, 피브리노겐의  $\alpha$  및  $\beta$  쇄에서 유래한 피브리노펩티드 A 및 B, 피브린 단량체)를 포함한다.

- [0215] 또한, 스캐폴드는 치료적 부분, 예컨대 방사성 금속 이온, 예컨대 알파-방출인자, 예컨대  $^{213}\text{Bi}$  또는 이에 제한되는 것은 아니고,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{131}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{Ho}$ ,  $^{131}\text{Sm}$ 를 포함하는 방사성금속 이온을 폴리펩티드에 접합하는데 유용한 거대한 킬레이터에 접합될 수 있다. 일정 구체예에서, 거대한 킬레이터는 링커 분자를 통해 스캐폴드에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 이러한 링커 분자는 당분야에 통상적으로 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; and Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50]에 기술되어 있으며, 이들 각 문헌을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다.
- [0216] 항체에 치료적 부분을 접합시키는 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58]를 참조한다. 유사한 접근법을 본 발명의 스캐폴드와 사용하는데 적용할 수 있다.
- [0217] 본 발명의 스캐폴드에 접합된 치료적 부분 또는 약물은 피험체에서 특정 질환에 대해 목적하는 예방 또는 치료 효과(들)를 얻도록 선택되어야 한다. 임상의 또는 다른 의학 종사자는 어떠한 치료적 부분 또는 약물을 스캐폴드에 접합시킬지 결정할 때 다음 사항을 고려해야 한다: 질환의 성질, 질환의 중증도 및 피험체의 상태.
- [0218] 본 발명의 스캐폴드는 또한 표적 항원의 면역분석 또는 정제에 특히 유용한, 고상 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고상 지지체는 이에 제한되는 것은 아니고, 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리염화비닐 또는 폴리프로필렌 등을 포함한다.
- [0219] **9. 제조**
- [0220] 본 발명의 스캐폴드의 제조법 발현은 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터의 제작을 요구한다. 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 획득되면, 스캐폴드 제조를 위한 벡터는 당분야에 공지된 방법을 사용하는 제조법 DNA 기법으로 제조할 수 있다. 따라서, 스캐폴드 코딩 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 단백질을 제조하는 방법을 본 명세서에 기술한다. 당분야의 숙련가에게 공지된 방법을 사용하여 스캐폴드 폴리펩티드 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 제작할 수 있다. 이러한 방법들에는 예를 들어, 시험관 내 제조법 DNA 기법, 합성 기법 및 생체 내 유전자 제조법 포함된다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동적으로 연결된, 본 발명의 스캐폴드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다.
- [0221] 발현 벡터는 통상의 방법으로 숙주세포에 전달되고, 이어서 형질감염된 세포를 통상의 방법으로 배양하여 본 발명의 스캐폴드를 생성시킨다. 따라서, 본 발명은 이중성 프로모터에 작동적으로 연결된, 본 발명의 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 적절한 숙주 세포는 이에 제한되는 것은 아니고, 미생물 예컨대 박테리아(예를 들어, 이.콜라이 및 비.서브틸리스)를 포함한다.
- [0222] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 활용하여 본 발명의 스캐폴드를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 목적하는 코딩 서열을 생성시키고 이후 정제할 수 있는 비히클과, 또한 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질 전환 또는 형질감염시, 본 발명의 스캐폴드를 발생 부위에서(in situ) 발현시킬 수 있는 세포를 의미한다. 이러한 시스템에는 이에 제한되는 것은 아니고, 미생물, 예컨대 스캐폴드 코딩 서열을 함유하는 제조법 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 이.콜라이 및 비.서브틸리스); 스캐폴드 코딩 서열을 함유하는 제조법 효모 발현 벡터로 감염된 효모(예를 들어, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pichia*)); 스캐폴드 코딩 서열을 함유하는 제조법 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 배클로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 스캐폴드 코딩 서열을 함유하는 제조법 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환되거나 또는 제조법 발현 벡터(예를 들어, 칼리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈에서 유래한 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스에서 유래한 프로모터(예를 들어, 아데노바



이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구성체를 보유하는 포유동물 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NS0 및 3T3 세포)을 포함한다.

[0223] 본 발명의 스캐폴드를 코딩하는 유전자의 삽입부를 함유하는 발현 벡터는 하기 3종의 일반적인 접근법을 통해 동정될 수 있다: (a) 핵산 혼성화, (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재, 및 (c) 삽입된 서열의 발현. 제1 접근법에서, 발현 벡터 내에 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 융합 단백질을 코딩하는 유전자의 존재는 각각 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 융합 단백질을 코딩하는 삽입된 유전자와 상동성을 갖는 서열을 포함하는 프로브를 사용하는 핵산 혼성화를 통해 검출할 수 있다. 2번째 접근법에서, 재조합 벡터/숙주 시스템은 벡터 내에 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 삽입으로 인해 야기되는, 일정한 "마커" 유전자 기능(예를 들어, 티미딘 키나제 활성화, 항생제 내성, 형질전환 표현형, 배클로바이러스 내 내포체(occlusion body) 형성 등)의 존재 또는 부재를 기초로 동정 및 선별될 수 있다. 예를 들어, 스캐폴드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 벡터의 마커 유전자 서열 내에 삽입시키면, 스캐폴드 삽입부를 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재를 통해 동정할 수 있다. 3번째 접근법에서, 재조합 발현 벡터는 재조합체가 발현하는 유전자 생성물(예를 들어, 스캐폴드 또는 이의 다량체)를 분석하여 동정할 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어, 시험관 내 분석 시스템 내 단백질의 물리적 또는 기능적 특성, 예를 들어, 스캐폴드의 결합, 작동성 또는 길항성 등을 기반으로 할 수 있다.

[0224] 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 적어도 부분적으로 화학적으로 합성될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 반합성적으로 제조된다.

## [0225] 10. 스캐폴드 정제

[0226] 본 발명의 스캐폴드를 재조합 발현으로 제조하면, 단백질 정제를 위해 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 금속-킬레이트 크로마토그래피, 이온 교환, 친화성 및 크기 컬럼 크로마토그래피 등), 원심분리, 차등 가용성 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 방법으로 정제할 수 있다.

[0227] 본 발명의 고도로 안정한 성질의 스캐폴드는 정제 전략을 변화시키는 것이 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 스캐폴드가 나타내는 열안정성은 변성을 통해 다량의 숙주 세포 단백질을 제거하도록 스캐폴드를 포함하는 미정제 용해물을 가열시키는 것을 가능하게 한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드가 나타내는 높은 내프로테아제 성질은 임의의 정제 단계 전에 미정제 용해물 내 숙주 세포 단백질의 신속한 분해를 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 스캐폴드가 나타내는 pH 내성은 임의의 정제 단계 전에 pH를 높이거나 낮추어서 미정제 용해물 내 숙주 세포 단백질의 선별적인 침전을 가능하게 한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드의 정제는 미정제 용해물로부터 다량의 숙주 세포 단백질을 제거하기 위해서 고온 이동, 프로테아제 처리, pH 상승 또는 저하 또는 이들 중 임의의 조합을 통해 촉진될 수 있다. 일부 구체예에서, 열 변성, 프로테아제 처리, pH 이동 이후에 남은 단백질은 특정 스캐폴드 단백질이 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이다.

[0228] 일부 구체예에서, 스캐폴드를 정제하는 방법은 숙주 세포 단백질을 침전시키기 위해서, 상기 스캐폴드를 함유하는 미정제 용해물의 pH를 약 6.5, 또는 약 6.0, 또는 약 5.5, 또는 약 5.0, 또는 약 4.5 또는 약 4.0, 또는 약 3.5, 또는 약 3.0 또는 약 2.5, 또는 약 2.0으로 낮추는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 정제 방법은 숙주 세포 단백질을 침전시키기 위해서, 상기 스캐폴드를 함유하는 미정제 용해물의 pH를 약 8.0, 또는 약 8.5, 또는 약 9.0, 또는 약 9.5, 또는 약 10.0, 또는 약 10.5, 또는 약 11.0, 또는 약 11.5, 또는 약 12.0, 또는 약 12.5로 상승시키는 것을 포함한다.

## [0229] 11. 스캐폴드의 규모가변적 제조

[0230] 대량 획득을 위해, 본 발명의 스캐폴드를 규모가변적 방법(이하, "본 발명의 규모가변적 방법")을 통해 제조하였다. 일부 구체예에서, 스캐폴드는 분석 규모 생물반응기(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 5L, 10L, 15L, 30L, 또는 50L 생물반응기). 다른 구체예에서, 스캐폴드는 제조 규모 생물반응기(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 75L, 100L, 150L, 300L, 또는 500L)에서 본 발명의 스캐폴드를 제조하기 위해 규모를 증가시킬 수 있는 연구 실험실에서 본 발명의 규모가변적 방법으로 제조할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 연구 실험실에서 수행되는 제조 방법에 비하여 생산 효율이 거의 또는 전혀 감소되지 않는다.

[0231] 일부 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 스캐폴드를 약 1 g/L, 약 2 g/L, 약 3 g/L, 약 5 g/L, 약 7.5 g/L, 약 10 g/L, 약 12.5 g/L, 약 15.0 g/L, 약 17.5 g/L, 약 20 g/L, 약 25 g/L, 약 30 g/L, 또는 그 이상의 생산 효율로 생성시킨다.

- [0232] 다른 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 스캐폴드를 적어도 약 1 g/L, 적어도 약 2 g/L, 적어도 약 3 g/L, 적어도 약 5 g/L, 적어도 약 7.5 g/L, 적어도 약 10 g/L, 적어도 약 12.5 g/L, 적어도 약 15 g/L, 적어도 약 17.5 g/L, 적어도 약 20 g/L, 적어도 약 25 g/L, 적어도 약 30 g/L, 또는 그 이상의 생산 효율로 생성시킨다.
- [0233] 다른 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 스캐폴드를 약 10 g/L~약 300 g/L, 약 10 g/L~약 250 g/L, 약 10 g/L~약 200 g/L, 약 10 g/L~약 175 g/L, 약 10 g/L~약 150 g/L, 약 10 g/L~약 100 g/L, 약 20 g/L~약 300 g/L, 약 20 g/L~약 250 g/L, 약 20 g/L~약 200 g/L, 약 20 g/L~약 175 g/L, 약 20 g/L~약 150 g/L, 약 20 g/L~약 125 g/L, 약 20 g/L~약 100 g/L, 약 30 g/L~약 300 g/L, 약 30 g/L~약 250 g/L, 약 30 g/L~약 200 g/L, 약 30 g/L~약 175 g/L, 약 30 g/L~약 150 g/L, 약 30 g/L~약 125 g/L, 약 30 g/L~약 100 g/L, 약 50 g/L~약 300 g/L, 약 50 g/L~약 250 g/L, 약 50 g/L~약 200 g/L, 약 50 g/L~약 175 g/L, 약 50 g/L~약 150 g/L, 약 50 g/L~약 125 g/L, 또는 약 50 g/L~약 100 g/L의 생산 효율로 생성시킨다.
- [0234] 일부 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 다량체 스캐폴드를 약 10 mg/L, 약 20 mg/L, 약 30 mg/L, 약 50 mg/L, 약 75 mg/L, 약 100 mg/L, 약 125 mg/L, 약 150 mg/L, 약 175 mg/L, 약 200 mg/L, 약 250 mg/L, 약 300 mg/L 또는 그 이상의 생산 효율로 생성시킨다.
- [0235] 다른 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 다량체 스캐폴드를 적어도 약 10 mg/L, 적어도 약 20 mg/L, 적어도 약 30 mg/L, 적어도 약 50 mg/L, 적어도 약 75 mg/L, 적어도 약 100 mg/L, 적어도 약 125 mg/L, 적어도 약 150 mg/L, 적어도 약 175 mg/L, 적어도 약 200 mg/L, 적어도 약 250 mg/L, 적어도 약 300 mg/L 또는 그 이상의 생산 효율로 생성시킨다.
- [0236] 다른 구체예에서, 본 발명의 규모가변적 방법은 다량체 스캐폴드를 약 10 mg/L~약 300 mg/L, 약 10 mg/L~약 250 mg/L, 약 10 mg/L~약 200 mg/L, 약 10 mg/L~약 175 mg/L, 약 10 mg/L~약 150 mg/L, 약 10 mg/L~약 100 mg/L, 약 20 mg/L~약 300 mg/L, 약 20 mg/L~약 250 mg/L, 약 20 mg/L~약 200 mg/L, 약 20 mg/L~약 175 mg/L, 약 20 mg/L~약 150 mg/L, 약 20 mg/L~약 125 mg/L, 약 20 mg/L~약 100 mg/L, 약 30 mg/L~약 300 mg/L, 약 30 mg/L~약 250 mg/L, 약 30 mg/L~약 200 mg/L, 약 30 mg/L~약 175 mg/L, 약 30 mg/L~약 150 mg/L, 약 30 mg/L~약 125 mg/L, 약 30 mg/L~약 100 mg/L, 약 50 mg/L~약 300 mg/L, 약 50 mg/L~약 250 mg/L, 약 50 mg/L~약 200 mg/L, 약 50 mg/L~약 175 mg/L, 약 50 mg/L~약 150 mg/L, 약 50 mg/L~약 125 mg/L, 또는 약 50 mg/L~약 100 mg/L의 생산 효율로 생성시킨다.
- [0237] **12. 분비형 스캐폴드의 제조**
- [0238] 본 발명은 또한 분비형으로서 또는 세포 내 형태로서 스캐폴드를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 분비형 스캐폴드를 본 명세서에 기술한 수준으로 제조한다. 다른 구체예에서, 분비형 스캐폴드는 적절하게 폴딩되고 완전하게 기능성이다. 다른 구체예에서, 분비형 스캐폴드의 제조는 Ptac 프로모터의 사용을 포함한다. 다른 구체예에서, 분비형 스캐폴드의 제조는 oppA 신호의 사용을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 분비형 스캐폴드는 원핵생물 숙주 세포에서 발현된다. 추가 구체예에서, 스캐폴드는 원핵생물 숙주 세포의 주변세포질 공간으로 분비된다. 또 다른 구체예에서, 스캐폴드는 배지로 직접 분비된다. 또 다른 구체예에서, 스캐폴드는 미정제 세포 배양 배지 또는 주변세포질 추출물로부터 스크리닝될 수 있다.
- [0239] 본 발명은 또한 단백질 스캐폴드를 사용하여 탠덤 단백질 또는 융합체를 분비하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 원핵생물 세포의 주변세포질 공간 또는 세포 배양 배지로 펩티드 및/또는 단백질을 분비하기 위한 운반체 분자로서 작용할 수 있다.
- [0240] 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 정제하는 방법은 15분간 70℃로 상기 스캐폴드를 포함하는 미정제 용해물을 가열하는 단계 및 이후 원심분리를 통해 응집된 화합물을 제거하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 정제하는 방법은 상기 스캐폴드를 포함하는 미정제 용해물을 약 50℃, 약 55℃, 약 60℃, 약 65℃, 약 70℃, 약 75℃, 약 80℃, 약 85℃, 또는 약 90℃로 가열하는 단계 및 이후 원심분리를 통해 응집된 화합물을 제거하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 정제하는 방법은 미정제 용해물을 적어도 약 1분, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 6분, 약 7분, 약 8분, 약 9분, 약 10분, 약 11분, 약 12분, 약 13분, 약 14분, 약 15분, 약 20분, 또는 약 30분 동안 가열시키는 단계 및 이후 원심분리를 통해 응집된 화합물을 제거하는 단계를 포함한다.
- [0241] 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 정제하는 방법은 미정제 용해물의 pH를 3.0으로 바꾸고, 상기 스캐폴드를 포함하는 미정제 용해물을 70℃로 15분간 가열하는 단계 및 이후에 원심분리를 통해 응집된 화합물을

제거하는 단계를 포함한다.

### [0242] 13. 스캐폴드 분석

[0243] 본 발명의 스캐폴드에 대해 당분야에 공지된 임의의 방법을 통해 표적에 대한 결합성을 분석할 수 있다. 사용할 수 있는 대표적인 분석법은 이에 제한되는 것은 아니고, 몇몇 예를 들면, 웨스턴 블랏, 방사성면역분석법, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), "샌드위치" 면역분석법, 면역침강 분석법, 침전 반응, 겔 확산 프리시피틴 반응법, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체-고정 분석법, 면역방사분석법, 형광발광 면역분석법 등을 포함한다. 이러한 분석법은 당분야에 통상적이고 공지된 것들이다(Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

[0244] ELISA는 항원(예를 들어, 스캐폴드)을 준비하고, 이 항원으로 96웰 마이크로타이터 평판의 웰을 코팅한 후, 검출가능한 화합물 예컨대 효소 기질(예를 들어, 홀스래디쉬 퍼옥시다제 또는 알칼리 포스파타제)과 접합된 목적하는 에피토프 결합 단백질(예를 들어, 스캐폴드 특이적 항체)을 웰에 부가한 후 일정 기간 동안 반응시키고, 항원 존재를 검출하는 것을 포함한다. ELISA에서, 목적하는 에피토프 결합 단백질을 검출가능한 화합물에 접합시킬 필요는 없으며, 대신 검출가능한 화합물에 접합된 2차 항체(목적 단백질을 인식함)를 웰에 부가할 수 있다. 또한, 웰을 항원으로 코팅하는 대신, 목적 단백질을 웰에 코팅할 수 있다. 이 경우, 검출가능한 화합물에 접합된 2차 항체를 부가한 후, 코팅된 웰에 목적 항원을 부가한다. 당분야의 당업자는 당분야에 공지된 ELISA의 다른 변형뿐만 아니라, 검출된 신호를 증가시키기 위해 변형시킬 수 있는 변수들에 대해서 잘 알고 있다. 예를 들어, ELISA에 대해서는, 문헌 [Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1]을 참조한다.

[0245] 항원에 대한 스캐폴드의 결합 친화성 및 다른 결합 특성은 예를 들어, 평형 방법(예를 들어, 효소-연결 면역흡착 분석법(ELISA; 또는 방사면역분석법(RIA)), 또는 동역학적 분석법(예를 들어, BIACORE<sup>®</sup> 분석), 및 기타 방법 예컨대 간접 결합 분석법, 경쟁적 결합 분석법, 형광 공명 에너지 전이(FRET), 겔 전기영동 및 크로마토그래피(예를 들어, 겔 여과법)을 포함하는 당분야에 공지된 다양한 시험관 내 분석법으로 측정할 수 있다. 이러한 방법과 다른 방법들은 하나 이상의 성분을 검토할 때 표지를 활용하고/하거나 이에 제한되는 것은 아니고, 발색단, 형광발광, 발강 또는 동위원소 표지를 포함하여 다양한 검출 방법을 채택할 수 있다. 결합 친화성 및 동역학에 대한 상세한 설명은 문헌 [Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)]에서 확인할 수 있다.

[0246] 본 발명의 스캐폴드의 안정성은 다양한 여러 접근법을 통해 증가될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 본 명세서에 기술한 바와 같이, 비천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 N-말단 영역 및/또는 C-말단 영역의 연장부를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 스캐폴드의 표면 전하를 조정하기 위해 1 이상의 아미노산 잔기의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 본 명세서에서 기술한 바와 같이, 혈청 반감기 증가를 위한 변경을 포함한다. 또 다른 구체예, 본 발명의 스캐폴드는 스캐폴드의 소수성 코어를 안정시키기 위해 1 이상의 아미노산 잔기의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다.

[0247] 본 발명의 스캐폴드의 안정성은 다양한 여러 기법으로 측정할 수 있다. 당분야에 공지된 기법에서 선택된 것으로 시차 주사 열량측정법(DSC), 원형 편광이색성(CD), 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE), 프로테아제 내성, 등온 열량측정법(ITC), 핵 자기 공명법(NMR), 내부 형광발광 및 생물학적 활성 측정법 등이 포함된다. 일 구체예에서, 조작된 본 발명의 스캐폴드는 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 안정성이 증가된 것으로 나타난다.

### [0248] 14. 약학 조성물

[0249] 다른 측면에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아니고, 약학적으로 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본 발명의 표적 결합 단백질 또는 스캐폴드 또는 그 조합을 함유하는, 약학 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 본 발명의 스캐폴드 또는 본 발명의 2 이상의 상이한 스캐폴드의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 보체 활성을 갖거나 또는 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 스캐폴드의 조합을 포함할 수 있다.

[0250] 본 발명의 약학 조성물은 또한, 병용 요법, 예컨대 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 병용 요법은 1 이상의 다른 요법과 조합된 본 발명의 스캐폴드를 포함할 수 있고, 여기서 상기 요법은 면역요법, 화학요법, 방사선 치료 또는 약물 요법일 수 있다.

- [0251] 본 발명의 약학 조성물은 1 이상의 약학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 이러한 염의 예는 산부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산부가 염은 비독성 무기산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산에서 유래된 염을 비롯하여, 비독성 유기산 예컨대 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐 치환된 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설폰산 등을 포함한다. 염기 부가 염은 알칼리토 금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘 등에서 유래한 염을 비롯하여, 비독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등에서 유래한 것을 포함한다.
- [0252] 본 발명의 약학 조성물은 또한 약학적으로 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 항산화제의 예는 (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 이황산나트륨, 메타이아황산나트륨, 아황산 나트륨 등; (2) 유용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; (3) 금속 킬레이팅 제제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 솔비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.
- [0253] 본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물, 식물성유, 예컨대 올리브유, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대 레시틴을 사용하여 유지할 수 있고, 분산물의 경우에는 필수 입자 크기를 유지하여 유지하며, 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다.
- [0254] 이러한 조성물은 또한 보조제 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제 등을 함유할 수도 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 멸균 과정과 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 솔브산 등을 포함시키는 것으로 확보된다. 등장성 제제, 예컨대 당류, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사가능한 약학 제형의 장기 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴 등의 흡수 지연 제제를 포함시켜 가능할 수 있다.
- [0255] 대체로 약학 조성물은 제조 및 보관 상태에서 멸균된 상태이고 안정해야만 한다. 조성물은 용액제, 미세에멀션, 리포솜 또는 고농도 약물에 적절한 다른 정돈된 구조물로 제제화할 수 있다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유하는 분산물 매질 또는 용매, 및 이의 적절한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴 등의 코팅을 사용하여, 분산물의 경우에는 필수 입자 크기를 유지하여, 그리고 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다. 여러 경우에서, 등장성 제제, 예를 들어, 당, 폴리알콜 예컨대 만니톨, 솔비톨 또는 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 절절하다. 주사가능 조성물의 장기 흡수는 조성물에, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴 등 흡수를 지연시키는 제제를 포함시켜 이를 수 있다.
- [0256] 멸균된 주사가능 용액은 필요에 따라, 상기 열거한 성분 중 하나 또는 조합물과 함께 적절한 용매 중에 필요량으로 활성 화합물을 유입시킨 후, 멸균 미세여과하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산물은 활성 성분을, 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 다른 필요한 성분들을 함유하는 멸균 비히클에 도입시켜 제조할 수 있다. 멸균된 주사가능한 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분의 분말과 이전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가적인 목적 성분을 얻는 진공 건조법 및 냉동건조법(동결건조법)이다.
- [0257] 일 구체예에서, 본 발명의 조성물(예를 들어, 액상 제형)은 내독소 및/또는 관련 발열원성 물질이 실질적으로 없는 무발열원성 제형이다. 내독소는 미생물 내에 한정되어 미생물이 파괴되거나 사멸할 경우에 방출되는 독소를 포함한다. 발열원성 물질은 또한 박테리아 및 다른 미생물의 외막에서 유래하는 발열을 유도하는, 열안정성 물질(당단백질)을 포함한다. 이들 물질 둘 모두는 인간에게 투여시, 발열, 저혈압 및 쇼크를 유발시킬 수 있다. 가능한 유해 영향으로 인해, 정맥 내 투여되는 약학 약물 용액에서 소량의 내독소라도 제거하는 것이 이롭다. FDA(Food & Drug Administration)는 정맥 내 약물 적용을 위해 단일한 1시간 기간에 체중 1 kg 당 용량 당 5 내독소 단위(EU)를 최대치로 정하였다(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). 치료 단백질 체중 1 kg 당 수백 또는 수천 mg의 양으로 투여시, 소량의 내독소라도 제거하는 것이 이롭다. 일 구체예에서, 조성물 내 내독소 및 발열원의 농도는 10 EU/mg 적거나, 5 EU/mg 보다 적거나, 또는 1 EU/mg 보다 적거나, 또는 0.1 EU/mg 보다 적거나, 또는 0.01 EU/mg 보다 적거나, 또는 0.001 EU/mg 보다 적다. 다른 구체예에서, 조성물 내 내독소 및 발열원 농도는 약 10 EU/mg 보다 적거나, 또는 약 5 EU/mg 보다 적거나, 또는 약 1 EU/mg 보다 적거나, 또는 약 0.1 EU/mg 보다 적거나, 또는 약 0.01 EU/mg 보다 적거나, 또는 약 0.001 EU/mg 보다 적다.



## 15. 용량/투여

본 발명의 스캐폴드를 포함하는 약학 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, 스캐폴드를 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합한다. 치료제 및 진단제의 제형은 생리적으로 허용되는 담체, 부형제 안정화제와 혼합하여, 예를 들어, 동결건조 분말, 슬러리, 수용액, 로션 또는 현탁제 등의 형태로 제조될 수 있다(Hardman, et al.(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse 시스템s, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.).

치료를 위한 투여 계획의 선택은 실제물의 혈청 또는 조직 턴오버 속도, 증상 정도, 실제물의 면역원성 및 생물학적 매트릭스 내 표적 세포의 접근성을 포함하는 몇몇 인자에 따라 좌우된다. 일정 구체에서, 투여 계획은 허용되는 부작용 수준과 일관되게 환자에 전달되는 치료제 양을 최대화시킨다. 따라서, 전달되는 생물학적 제제의 양은 부분적으로 특정 실제물 및 치료되는 병태의 중증도에 의존적이다. 항체, 사이토카인 및 소형 분자의 적절한 용량을 선택하는 안내서를 이용할 수 있다(Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert, et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom, et al. (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon, et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz, et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh, et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky, et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

적절한 용량은 예를 들어, 치료에 영향을 주거나 또는 치료에 영향을 줄 것으로 예상되는 당분야에서 공지되거나 의심되는 변수 또는 인자를 사용하여, 임상가가 결정한다. 대체로, 용량은 최적 용량보다는 어느 정도 적은 양에서 시작하여, 이후에 부정적인 부작용에 비하여 목적하거나 또는 최적의 효과를 얻을 때까지 소량씩 증가시킨다. 중요한 진단 척도는 예를 들어, 생성되는 염증 사이토카인의 수준 또는 염증의 증상 등을 포함한다.

본 발명의 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 용량 수준은 환자에 대한 독성없이, 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 얻는데 유효한 활성 성분의 양을 얻도록 다양할 수 있다. 선택된 용량 수준은 적용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 처리 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료하려는 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 건강 상태 및 이전 약력 및 의학 분야에 공지된 기타 인자 등을 포함하는 다양한 약동역학적 인자에 따라 좌우된다.

본 발명의 스캐폴드는 예를 들어, 1일, 1주, 또는 주당 1-7회 간격의 용량으로, 또는 연속 주입에 의해 제공될 수 있다. 용량은 정맥내, 피하내, 국소적, 경구, 비강내, 직장, 근육내, 대뇌 내, 또는 흡입을 통해 제공될 수 있다. 특정 용량 프로토콜은 상당히 바람직하지 않은 부작용을 피하는 최대 용량 또는 용량 빈도를 포함하는 것이다. 총 주간 용량은 적어도 0.05  $\mu\text{g/kg}$ -체중, 적어도 0.2  $\mu\text{g/kg}$ , 적어도 0.5  $\mu\text{g/kg}$ , 적어도 1  $\mu\text{g/kg}$ , 적어도 10  $\mu\text{g/kg}$ , 적어도 100  $\mu\text{g/kg}$ , 적어도 0.2 mg/kg, 적어도 1.0 mg/kg, 적어도 2.0 mg/kg, 적어도 10 mg/kg, 적어도 25 mg/kg, 또는 적어도 50 mg/kg(예를 들어, 하기 문헌 참조: Yang, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold, et al. (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu, et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji, et al. (20003) 암 Immunol. Immunother. 52:133-144)일 수 있다. 소형 분자 치료제, 예를 들어, 펩티드 모방체, 단백질 스캐폴드, 천연 생성물, 또는 유기 화합물의 바람직한 용량은  $\mu\text{g/kg}$ -체중을 기초로 항체 또는 폴리펩티드에 대한 것과 대략 동일하다. 소형 분자 또는 스캐폴드 치료제의 바람직한 혈장 농도는  $\mu\text{g/kg}$ -체중을 기준으로, 항체에 대한 것과 대략 동일하다. 용량은 적어도 15  $\mu\text{g}$ , 적어도 20  $\mu\text{g}$ , 적어도 25  $\mu\text{g}$ , 적어도 30  $\mu\text{g}$ , 적어도 35  $\mu\text{g}$ , 적어도 40  $\mu\text{g}$ , 적어도 45  $\mu\text{g}$ , 적어도 50  $\mu\text{g}$ , 적어도 55  $\mu\text{g}$ , 적어도 60  $\mu\text{g}$ , 적어도 65  $\mu\text{g}$ , 적어도 70  $\mu\text{g}$ , 적어도 75  $\mu\text{g}$ , 적어도 80  $\mu\text{g}$ , 적어도 85  $\mu\text{g}$ , 적어도 90  $\mu\text{g}$ , 적어도 95  $\mu\text{g}$ , 또는 적어도 100  $\mu\text{g}$ 일 수 있다. 피험체에 투여되는 용량은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12회, 또는 그 이상에 달할 수 있다.

본 발명의 스캐폴드에 대해, 환자에 투여되는 용량은 환자의 체중에 대해, 0.0001 mg/kg~100 mg/kg일 수 있다. 용량은 환자 체중에 대해 0.0001 mg/kg~20 mg/kg, 0.0001 mg/kg~10 mg/kg, 0.0001 mg/kg~5 mg/kg, 0.0001~

2 mg/kg, 0.0001~1 mg/kg, 0.0001 mg/kg~0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg~0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg~ 0.25 mg/kg, 0.0001~0.15 mg/kg, 0.0001~0.10 mg/kg, 0.001~0.5 mg/kg, 0.01~ 0.25 mg/kg, 또는 0.01~0.10 mg/kg일 수 있다.

[0265] 본 발명의 스캐폴드의 용량은 투여되는 용량(mg/kg)을 환자의 체중(kg)에 곱해서 계산할 수 있다. 본 발명의 스캐폴드의 용량은 환자 체중에 대해서, 150  $\mu\text{g/kg}$  이하, 125  $\mu\text{g/kg}$  이하, 100  $\mu\text{g/kg}$  이하, 95  $\mu\text{g/kg}$  이하, 90  $\mu\text{g/kg}$  이하, 85  $\mu\text{g/kg}$  이하, 80  $\mu\text{g/kg}$  이하, 75  $\mu\text{g/kg}$  이하, 70  $\mu\text{g/kg}$  이하, 65  $\mu\text{g/kg}$  이하, 60  $\mu\text{g/kg}$  이하, 55  $\mu\text{g/kg}$  이하, 50  $\mu\text{g/kg}$  이하, 45  $\mu\text{g/kg}$  이하, 40  $\mu\text{g/kg}$  이하, 35  $\mu\text{g/kg}$  이하, 30  $\mu\text{g/kg}$  이하, 25  $\mu\text{g/kg}$  이하, 20  $\mu\text{g/kg}$  이하, 15  $\mu\text{g/kg}$  이하, 10  $\mu\text{g/kg}$  이하, 5  $\mu\text{g/kg}$  이하, 2.5  $\mu\text{g/kg}$  이하, 2  $\mu\text{g/kg}$  이하, 1.5  $\mu\text{g/kg}$  이하, 1  $\mu\text{g/kg}$  이하, 0.5  $\mu\text{g/kg}$  이하, 또는 0.5  $\mu\text{g/kg}$  이하일 수 있다.

[0266] 본 발명의 스캐폴드의 단위 용량은 0.1 mg~20 mg, 0.1 mg~15 mg, 0.1 mg~12 mg, 0.1 mg~10 mg, 0.1 mg~8 mg, 0.1 mg~7 mg, 0.1 mg~5 mg, 0.1~2.5 mg, 0.25 mg~20 mg, 0.25~15 mg, 0.25~12 mg, 0.25~10 mg, 0.25~8 mg, 0.25 mg~ 7 mg, 0.25 mg~5 mg, 0.5 mg~2.5 mg, 1 mg~20 mg, 1 mg~15 mg, 1 mg~12 mg, 1 mg~10 mg, 1 mg~8 mg, 1 mg~7 mg, 1 mg~5 mg, 또는 1 mg~2.5 mg일 수 있다.

[0267] 본 발명의 스캐폴드의 용량은 피험체에서 혈청 역가가 적어도 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 1  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 2  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 5  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 6  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 10  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 15  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 20  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 25  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 50  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 100  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 125  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 150  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 175  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 200  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 225  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 250  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 275  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 300  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 325  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 350  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 375  $\mu\text{g/ml}$ , 또는 적어도 400  $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있다. 다르게, 본 발명의 스캐폴드의 용량은 피험체에서 혈청 역가가 적어도 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 1  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 2  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 5  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 6  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 10  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 15  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 20  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 25  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 50  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 100  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 125  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 150  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 175  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 200  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 225  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 250  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 275  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 300  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 325  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 350  $\mu\text{g/ml}$ , 적어도 375  $\mu\text{g/ml}$ , 또는 적어도 400  $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.

[0268] 본 발명의 스캐폴드의 용량은 반복될 수 있고, 투여는 적어도 1일, 2일, 3일, 5일, 10일, 15일, 30일, 45일, 2개월, 75일, 3개월, 또는 적어도 6개월 간격으로 나누어 수행될 수 있다.

[0269] 특정 환자에 대한 유효량은 인자들 예컨대 치료하려는 병태, 환자의 전반적인 건강 상태, 투여 방법 경로 및 용량 및 부작용의 중증도 등에 따라 다양할 수 있다(Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK).

[0270] 투여 경로는 예를 들어, 국소적으로 또는 피부 도포, 정맥, 복강내, 대뇌 내, 근육내, 안내, 동맥내, 뇌척수내, 병변내, 주사 또는 주입, 또는 지연 방출 시스템 또는 이식물에 의한 것일 수 있다(Sidman et al. (1983) Biopolymers 22:547-556; Langer, et al. (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epstein, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang, et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; U.S. 특허 6,350,466 및 6,316,024). 필요한 경우에, 조성물은 또한 주사 부위에 동통을 완화시키기 위한 리도카인 등과 같은 국소 마취제 및 가용화제를 포함할 수도 있다. 또한, 예를 들어, 흡입기 또는 연무기, 에어로졸화 제제와의 제형을 사용하여 폐 투여할 수도 있다. 예를 들어, U.S. 특허 6,019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, 및 4,880,078; PCT 공개 출원 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, 및 WO 99/66903를 참조하며, 이들 각각을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다. 일 구체예에서, 항체, 병용 요법, 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR<sup>TM</sup> 폐 약물 전달법(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass)을 사용하여 투여된다.

[0271] 본 발명의 조성물은 또한, 당분야에 공지된 1 이상의 다양한 방법을 사용하여 1 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수도 있다. 당분야의 숙련가가 이해하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 다양해진다. 본 발명의 스캐폴드에 대해 선택된 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입을 포함한다. 비경구 투여는 일반적으로 주사에 의해서, 장 및 국소 투여 이외의 투여 경로를 의미하는 것이고, 제한없이, 정맥 내, 근육내, 동맥내, 포막내(intrathecal), 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복막내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 다르게, 본 발명의 조성물은 비경구 외 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비내, 경구, 질, 직장, 질하 또는 국소적으로 투여될 수 있다.



- [0272] 본 발명의 스캐폴드를 제어 방출 또는 지연 방출 시스템으로 투여하는 경우, 펌프를 사용하여 지연 또는 제어 방출을 실시할 수 있다(Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). 중합체 물질을 사용하여 본 발명의 치료제의 제어 또는 지연 방출을 수행할 수 있다(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); U.S. 특허 5,679,377; U.S. 특허 5,916,597; U.S. 특허 5,912,015; U.S. 특허 5,989,463; U.S. 특허 5,128,326; PCT 공개 특허출원 WO 99/15154; 및 PCT 공개 특허 출원 WO 99/20253). 지연 방출 제형에 사용되는 중합체의 예는 이에 제한되는 것은 아니고, 폴리(2-히드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리언하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA) 및 폴리오르쏘에스테르를 포함한다. 일 구체예에서, 지연 방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 침출성(leachable) 불순물이 없으며, 보관시 안정하고, 멸균되며 생분해성이다. 제어 또는 지연 방출 시스템은 예방 또는 치료 표적에 근접 위치시켜서, 전신 용량의 일부분만을 요한다(Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).
- [0273] 제어 방출 시스템은 문헌 [Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533]을 참조한다. 당분야의 숙련가에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 1 이상의 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 지연 방출성 제형을 제조할 수 있다. 예를 들어, 이하 문헌을 참조할 수 있으며, 이들 각각을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다: U.S. 특허 4,526,938, PCT 공개 특허 출원 WO 91/05548, PCT 공개 특허 출원 WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, and Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.
- [0274] 본 발명의 스캐폴드를 국소 투여하는 경우에는, 연고, 크림, 경피 패치, 로션, 젤, 샴푸, 스프레이, 에어로졸, 용액, 에멀션, 또는 당업자에게 잘 알려진 다른 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]을 참조한다. 비스프레이성 국소 제형인 경우, 담체 또는 국소 도포에 적합하고, 일부 경우에서, 물보다 동적 점도가 큰 1 이상의 부형제를 포함하는 점성 내지 반고체 또는 고체 형태가 대체로 사용된다. 적절한 제형은, 제한없이, 용액제, 현탁제, 에멀션, 크림, 고약, 분말, 도포제, 연고 등을 포함하고, 이들은 필요하다면 멸균시키거나, 예컨대 삼투압과 같은 다양한 특성에 영향을 주기 위한 보조제(예컨대, 보존제, 안정화제, 습윤제, 완충액, 또는 염)와 혼합될 수 있다. 기타 적절한 국소 제형으로서는, 분무형 에어로졸 제제를 포함하며, 여기서, 일부 경우에서, 고체 또는 액체 불활성 담체와 조합한 활성 성분은 가압 휘발물(예컨대, 기체 추진제, 예컨대 프레온)과 혼합하여 또는 스쿠즈병에 포장된다. 필요한 경우 보습제 또는 습윤제를 약학 조성물 및 약학 제형에 첨가할 수 있다. 이러한 추가적인 성분들의 예들은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0275] 본 발명의 스캐폴드를 비내 투여하는 경우, 에어로졸 형태, 스프레이, 운무또는 액적 형태로 제제화될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따라 사용되는 예방제 또는 치료제는 적절한 추진제(예컨대, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적절한 기체)를 사용하여 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 용량 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 캡슐 및 카트리지(예컨대, 젤라틴으로 구성됨)는 화합물 및 적절한 분말 기체, 예컨대 락토스 또는 녹말의 분말 믹스를 함유하도록 제형화될 수 있다.
- [0276] 제2 치료제, 예컨대, 사이토카인, 스테로이드, 화학요법제, 항생제 또는 방사선과 함께 공동-투여 또는 치료하는 방법이 당분야에 공지되어 있다(예컨대, 문헌 [Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson

(eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.을 참조한다). 치료제의 유효량은 증상을 10% 이상; 20% 이상; 약 30% 이상; 40% 이상 또는 50% 이상 감소시킬 수 있다.

[0277] 본 발명의 스캐폴드와 조합하여 투여할 수 있는 추가 치료제(예컨대, 예방제 또는 치료제)는, 본 발명의 스캐폴드와 투여 시차가 5분보다 짧은 간격, 30분보다 짧은 간격, 1시간 간격, 약 1시간 간격, 약 1시간 내지 약 2시간 간격, 약 2시간 내지 약 3시간 간격, 약 3시간 내지 약 4시간 간격, 약 4시간 내지 약 5시간 간격, 약 5시간 내지 약 6시간 간격, 약 6시간 내지 약 7시간 간격, 약 7시간 내지 약 8시간 간격, 약 8시간 내지 약 9시간 간격, 약 9시간 내지 약 10시간 간격, 약 10시간 내지 약 11시간 간격, 약 11시간 내지 약 12시간 간격, 약 12시간 내지 18시간 간격, 18시간 내지 24시간 간격, 24시간 내지 36시간 간격, 36시간 내지 48시간 간격, 48시간 내지 52시간 간격, 52시간 내지 60시간 간격, 60시간 내지 72시간 간격, 72시간 내지 84시간 간격, 84시간 내지 96시간 간격, 또는 96시간 내지 120시간 간격으로 하여 투여될 수 있다. 2 이상의 요법을 동일한 한 환자 방문 시에 투여할 수 있다.

[0278] 본 발명의 스캐폴드 및 다른 요법을 순환적으로 투여할 수 있다. 순환 요법은 일정 시간 동안 제1 요법(예컨대, 제1 예방제 또는 치료제)의 투여, 이후 일정 시간 동안의 제2 요법(예컨대, 제2 예방제 또는 치료제)의 투여 후, 선택적으로, 일정 시간 동안의 제3 요법(예컨대, 예방제 또는 치료제)의 투여 등을 포함하며, 이러한 순차적 투여의 반복, 즉 요법들 중 한 요법에 대한 내성이 진행되는 것을 감소시키기 위한 주기를 반복하여, 요법들 중 한 요법의 부작용을 피하거나 또는 이를 감소시키고/시키거나 요법들의 효능을 향상시킨다.

[0279] 일정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 생체 내에서 적절한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈액 뇌 장벽(BBB)은 다수의 고친수성 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 통과하도록 하기 위해서(필요하다면), 이들을 예를 들어, 리포솜으로 제형화시킬 수 있다. 리포솜 제조 방법에 대해서는, 예컨대, 미국 특허 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 장기에 선택적으로 전달되어 표적화 약물 전달을 개선시키기 위한 1 이상의 부분을 포함한다(예컨대, 문헌 [V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685] 참조). 예시적인 표적화 부분은 엽산 또는 비오틴(예컨대, 미국특허 제 5,416,016호(Low et al.)); 만노사이드(문헌 [Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038]); 항체(문헌 [P.G. Bloeman et al., (1995) *FEBS Lett.* 357:140]; [M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]); 계면활성 단백질 A 수용체(문헌 [Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]); p120(문헌 [Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090])을 포함하며; 또한 문헌 [K. Keinänen; ML. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123]; [J.J. Killian; IJ. Fidler (1994); *Immunomethods* 4:273]도 참조한다.

[0280] 본 발명은 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물 단독 또는 다른 요법과 조합하여 이를 필요로 하는 피험체에게 투여하기 위한 프로토콜을 제공한다. 본 발명의 병용 요법의 요법제(예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 피험체에게 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 병용 요법의 요법제(예컨대, 예방제 또는 치료제)는 순환적으로 투여될 수 있다. 순환 요법은 일정 시간 동안의 제1 요법(예컨대, 제1 예방제 또는 치료제)의 투여, 이후 일정 시간 동안의 제2 요법(예컨대, 제2 예방제 또는 치료제)의 투여 후, 선택적으로, 일정 시간 동안의 제3 요법(예컨대, 예방제 또는 치료제)의 투여 등을 포함하며, 이러한 순차적 투여, 즉 순환은 요법들 중 한 요법(예컨대, 제제)에 대한 내성 진행을 감소시켜, 요법들 중 한 요법(예컨대, 제제)의 부작용을 피하거나 혹은 이를 감소시키고/시키거나 요법들의 효능을 향상시키기 위해 반복된다.

[0281] 본 발명의 병용 요법의 요법제(예컨대, 예방제 또는 치료제)는 대상에 동시에 투여될 수 있다. "동시에"라는 용어는 정확하게 같은 시각에 요법제(예컨대, 예방제 또는 치료제)를 투여하는 것에 제한되는 것이 아니라, 본 발명의 스캐폴드와 다른 요법(들)을 달리 투여하는 것보다 증가된 혜택을 제공하기 위해 본 발명의 스캐폴드가 다른 요법(들)과 함께 작용할 수 있도록 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물을 순서대로 일정 시간 간격으로 피험체에게 투여하는 것을 의미한다. 예를 들어, 각 요법은 피험체에게 동일 시점에 또는 다른 시점에서 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있지만, 동시에 투여되지 않으면, 이들이 목적하는 치료 또는 예방 효과를 제공하도록 충분히 근접한 시간 내에 투여되어야 한다. 각 요법은 임의의 적절한 제형으로, 그리고 임의의 적절한 경로를 통해 피험체에게 개별적으로 투여될 수 있다. 다양한 구체예에서, 요법제들(예컨대, 예방제 또는 치료제)은 15분 보다 짧게, 30분보다 짧게, 1시간 보다 짧은 간격, 약 1시간 간격, 약 1시간 내지 약 2시간간격, 약 2시간 내지 약 3시간 간격, 약 3시간 내지 약 4시간 간격, 약 4시간 내지 약 5시간 간격, 약 5시간 내지 약 6시간 간격, 약 6시간 내지 약 7시간 간격, 약 7시간 내지 약 8시간 간격, 약 8시간 내지 약 9시간

간격, 약 9시간 내지 약 10시간 간격, 약 10시간 내지 약 11시간 간격, 약 11시간 내지 약 12시간 간격, 24시간 간격, 48시간 간격, 72시간 간격 또는 1주 간격으로 피험체에게 투여된다. 다른 구체예에서, 2 이상의 요법제 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 동일한 환자 방문 내에 투여된다.

[0282] 병용 요법의 예방제 또는 치료제는 동일한 약학 조성물로 피험체에게 투여될 수 있다. 다르게는, 병용 요법의 예방제 또는 치료제는 개별 약학 조성물로 피험체에게 동시에 투여될 수 있다. 예방제 또는 치료제는 피험체에게 동일 투여 경로 또는 다른 투여 경로로 투여될 수 있다.

## [0283] 16. 스캐폴드를 사용하는 방법

[0284] 본 발명의 스캐폴드는 시험관 내 및 생체 내 진단 및 치료적 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이들 분자는 다양한 병증을 치료, 예방 또는 진단하기 위해, 예를 들어, 시험관 내 또는 생체 외, 배양 세포, 또는 피험체, 예를 들어 생체 내에서 투여될 수 있다.

[0285] 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드를 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 이에 제한되는 것은 아니고, 암, 염증성 및 자가면역 질환, 감염성 질환을 포함하는 질환 또는 질병과 관련된 1 이상의 증상의 예방, 진단, 관리, 치료 또는 완화를 위해서, 본 발명의 스캐폴드를, 단독으로 또는 다른 요법과 조합하여 사용하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 제한없이 암, 염증성 및 자가면역 질환, 감염성 질환을 포함하는, 질환, 질병 또는 감염증과 관련된 1 이상의 증상을 예방, 관리, 치료 또는 완화시키기 위해, 부분(예를 들어, 치료제 또는 약물)에 융합되거나 접합된 본 발명의 스캐폴드를 단독으로 또는 다른 요법과 조합하여 사용하는 것을 포함한다.

[0286] 또한, 수많은 세포 표면 수용체들은 서브유닛의 가교결합 결과로서 활성화되거나 불활성화된다. 본 발명의 단백질은 세포 표면 수용체의 가교결합을 통해 표적 세포에서 반응을 자극하거나 또는 억제하는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 다수 세포 표면 수용체와 항원의 상호작용을 차단하는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 다수 세포 표면 수용체와 항원의 상호작용을 강화시키는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 동일 항원에 대한 특이성을 공유하거나, 또는 2종의 상이한 항원에 결합하는 결합 도메인을 함유하는 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 세포 표면 수용체의 동종이량체 또는 이종이량체를 가교시키는 것도 가능할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질을 사용하여 특정 세포 표면 수용체에 리간드, 또는 리간드 유사체를 전달할 수 있다.

[0287] 본 발명은 또한, 전통적인 항체를 사용하여 용이하게 이뤄지지 않았던 에피토프를 표적화하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 인접한 항원을 우선 표적화하고 결합한 상태에서, 다른 결합 도메인이 숨은 항원을 끌어들이 수 있다.

[0288] 본 발명은 또한, 상이한 세포 유형을 함께 회합시키기 위해 스캐폴드를 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 단백질은 하나의 결합 도메인을 갖는 표적 세포에 결합하고 다른 결합 도메인을 통해 다른 세포를 모집할 수 있다. 다른 구체예에서, 제1 세포는 암세포이고 제2 세포는 면역 이펙터 세포, 예컨대 NK 세포일 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 상이한 2 세포, 예컨대 항원 제시 세포 및 T 세포 간의 상호작용을 강화시켜 면역 반응을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0289] 본 발명은 또한, 암 또는 이의 증상을 완화, 치료 또는 예방하기 위해 스캐폴드 단백질을 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 머리, 목, 눈, 입, 목구멍, 식도, 가슴, 피부, 뼈, 폐, 결장, 직장, 직결장, 위, 비장, 신장, 골격근, 피하 조직의 암, 전이성 흑색종, 자궁내막, 전립선, 유방, 난소, 고환, 갑상선, 혈액, 림프절, 신장, 간, 췌장, 뇌 또는 중추 신경계의 암을 치료하는데 유용하다.

[0290] 본 발명은 또한, 세포 개체군을 격감시키기 위해 스캐폴드를 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 다음의 세포 유형; 호산구, 호염구, 호중구, T 세포, B 세포, 비만 세포, 단핵구 및 종양 세포를 격감시키는데 유용하다.

## [0291] 17. TRAIL-R2 특이적 스캐폴드

[0292] TRAIL-R2 단백질은 TNF-수용체 수퍼패밀리 유전자의 구성원에 의해 코딩되고, 세포내 사멸 도메인을 포함한다. 일례에서, 이는 또한, TNFRSF10B; CD262, DR5, KILLER< KILLER/DR5, TRAILR2, TRICK2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB 또는 ZTNFR9로도 알려져 있다. 이 수용체는 종양 괴사 인자-관련 아포토시스 유도 리간드 (TNFSF10/TRAIL/APO-2L)에 의해 활성화되어, 아포토시스 신호를 전달한다. 또한, TRAIL-R2 유도된 아포토시스는 케스파제 및 세포내 어댑터 분자 FADD/MORT1를 포함한다(Walczak et al. EMBOJ, (1997), 16, 5386-97).

[0293] 일부 구체예에서, 본 발명은 TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 스캐폴드를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명

의 스캐폴드는 인간 TRAIL-R2에 특이적으로 결합한다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 마우스, 닭, 레서스 원숭이, 사이노몰거스 원숭이, 래트 또는 토끼에서 유래한 TRAIL-R2 상동체에 결합한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL-R2의 노출된 에피토프에 결합한다. 이러한 구체예는 수용체를 정규 장소 밖에서 발현하도록 형질감염된 세포 및/또는 세포에서 내생성으로 발현되는 TRAIL-R2를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 단량체 TRAIL-R2 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL-R2의 동종이량체 형태 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 단량체 TRAIL-R2에 결합하여 2 이상의 TRAIL-R2 분자의 이량체화 또는 올리고머화를 촉진한다(예를 들어, 다량체 스캐폴드에 제한되지 않음). 또 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL-R2와 TRAIL 리간드의 상호작용을 억제하거나 감소시킨다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL 리간드와 TRAIL-R2의 상호작용을 모방한다. 추가 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL-R2에 의한 세포 신호를 작동시킨다.

[0294] 본 발명은 또한 본 명세서에서 기술된 스캐폴드를 사용하여 TRAIL-R2를 조정하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 TRAIL-R2를 발현하는 세포를 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드와 접촉시키는 단계 및 TRAIL 리간드와의 상호작용을 차단하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 TRAIL-R2를 발현하는 세포와 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드를 접촉시키는 단계, 및 TRAIL 리간드와 TRAIL-R2의 상호작용을 모방하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드와의 접촉을 통해 TRAIL-R2를 작동시키는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 세포 상에 발현된 TRAIL-R2의 단량체를 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드와 접촉시키고 이량체화 또는 올리고머화를 촉진시켜서 TRAIL-R2를 이량체화 또는 올리고머화하는 것을 포함한다. 추가 구체예에서, TRAIL-R2의 이량체화는 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다량체 스캐폴드, TRAIL-R2 이량체를 모방하는 스캐폴드, TRAIL-R2 이량체 형성물을 안정화시키는 스캐폴드, TRAIL-R2 단량체를 탈안정화시키는 스캐폴드 또는 세포 상에 디스플레이된 TRAIL-R2 이량체만을 인식하는 스캐폴드의 사용을 통해 이루어질 수 있다.

[0295] 다른 구체예에서, TRAIL-R2의 이량체화 또는 올리고머화는 스캐폴드 이량체화 또는 올리고머화 제제와 커플링된 단량체 스캐폴드를 사용하여 이루어질 수 있다. 이러한 스캐폴드 이량체화 또는 올리고머화 제제는 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 항-스캐폴드 항체, 에피토프 태그에 항체와 커플링된 에피토프 태그를 갖는 스캐폴드의 사용, 또는 본 명세서에 기술되고 당분야에 공지된 다양한 단백질 이량체화 또는 올리고머화 모티프의 도입을 포함한다. 추가 구체예에서, TRAIL-R2 이량체 또는 올리고머는 단량체 스캐폴드를 투여한 후, 스캐폴드 이량체화 또는 올리고머화 제제의 투여를 통해 유도될 수 있다.

[0296] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 당분야에 공지된 통상의 분석법으로 측정시 세포 생존능이 감소되는 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드의 투여를 포함한다. 추가 구체예에서, 세포 생존능 감소는 당분야에 공지된 분석법으로 측정시 아포토시스의 활성화이다. 다른 구체예에서, 세포 생존능 감소는 당분야에서 허용되는 방법으로 측정시 세포 분열의 억제이다. 일부 구체예에서, 세포 생존능은 치료 부재시 세포 생존능과 비교시 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 그 이상 감소된다. 일부 구체예에서, 세포 생존능은 실시예 15 및/또는 17에 요약된 방법 또는 당분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 측정된다.

[0297] 일부 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 TRAIL(Apo-2 리간드)로 알려진 TRAIL-R2에 대한 리간드와 유사한 활성으로 TRAIL-R2를 작동시킨다. 다른 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 TRAIL-R2를 충분히 활성화시켜, 케스파제 3, 케스파제 8, 케스파제 10 또는 FADD의 활성화를 포함하여, 1 이상의 세포내 신호 경로를 활성화시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 1 이상의 암 세포 유형에서 아포토시스를 활성화시킨다. 추가 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 TRAIL과 비교시 1 이상의 세포 유형에서 아포토시스의 활성화를 증가시키는 것으로 확인되었다. 다른 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 TRAIL(리간드)와 TRAIL-R2 상의 동일 에피토프에 결합하거나 또는 그 결합에 대해 경쟁한다. 이러한 구체예에서, TRAIL-R2 결합 스캐폴드는 가용성 TRAIL 리간드(예컨대 TRAIL 리간드의 114-281 단편)를 사용하는 시험관 내 경쟁 분석, 결정학적 연구, 또는 다른 공지된 시험관 또는 생체 내 연구로 측정할 수 있는, 적어도 50% 이상, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 그 이상으로, TRAIL과 TRAIL-R2의 상호작용 억제를 차단할 수 있다.

[0298] **17.1. 요법에서 TRAIL-R2 결합인자를 사용하는 방법**

[0299] TRAIL-R2는 아포토시스 신호전달을 매개하는 것으로 알려져 있다. 몇몇 유형의 정상 세포가 TRAIL-R2를 발현하



지만, 이 수용체를 통한 아폽토시스 신호전달은 발암유전자 예컨대 Myc 또는 Ras에 의한 형질전환과 관련되어 사멸 수용체-매개 아폽토시스에 보다 민감성이 되는, 종양 세포에 주로 한정되어 나타난다(Wang et al., Cancer Cell 5:501-12 (2004); Nesterov et al., Cancer Res. 64:3922-7 (2004)). TRAIL-R2는 인간 암세포주와 원발성 종양에서 주로 발현된다.

[0300] 본 발명의 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 암의 예방, 치료, 유지 또는 완화하는데 유용하다. 일부 구체예에서, 암은 TRAIL-R2를 발현하는 암 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 암 세포는 비암성 세포에 비하여 TRAIL-R2를 과 발현한다. 일부 구체예에서, 암은 예를 들어, 암종, 림프종, 아세포종, 육종 또는 백혈병이다. 다른 구체예에서, 암은 편평세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암(NSCLC), 비호지킨 림프종, 아세포종, 위장암, 신장 부 암, 난소암, 간암, 위암, 방광암, hepatoma, 유방암, 결장암, 직결장암, 췌장암, 자궁내막 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 두경부암, 폐암, 선암종, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 또는 본 명세서에 기술한 다른 암을 포함한다.

[0301] 일부 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드를 치료가 필요한 피험체(즉, 암환자)에게 투여한다. 이러한 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드를 포함하는 멸균된 발열원 무함유 조성물을 이를 필요로 하는 피험체에게 투여한다. 치료 효율은 당분야에 공지된 다양한 시험관 내 및 생체 내 분석법, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 종양 존재량 또는 부피 감소를 비롯하여, 아텍신 V 결합의 케스파제 활성화를 이용하는, 아폽토시스 활성 등을 사용하여 측정된다.

[0302] 다른 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 암 또는 다른 암 또는 TRAIL-R2 관련 질환을 진단하고 검출하는데 유용하다. 이러한 구체예에서, 본 발명의 TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 검출 제제, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 방사성동위원소, 형광발광 또는 화학발광 표지에 연결된다. 이러한 연결된 결합인자는 피험체에서, 또는 상기 피험체에서 채취된 샘플에서 암 또는 TRAIL-R2 관련 질환을 검출하거나 진단하는 방법에서 유용하다. 또한, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 다른 TRAIL-R2 관련 병태, 예컨대 인간을 비롯한, 포유동물에서 면역 관련 질환을 진단 및 치료하는데 유용하다.

## [0303] 17.2. 특이적 TRAIL-R2 결합 서열

[0304] TRAIL-R2 특이적 스캐폴드를 동정하고자 하는 노력으로, 2-루프 라이브러리 및 3 루프 라이브러리가 스크리닝되었다. TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 다수의 클론을 동정하였다.

[0305] 일부 구체예에서 TRAIL-R2 특이적 본 발명의 스캐폴드는 TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개 루프 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 2F4, 5B10, 10D9, 6F11, 8B3, 5E5, 2H6, 7G11 또는 6C7에서 선택된 TRAIL-R2 결합 스캐폴드 클론의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 126-143에서 선택된 1 이상의 1 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 또는 142에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 또는 143에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드 서열 번호 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 또는 142에서 선택된 BC 루프 서열; 및 서열 번호 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 또는 143에서 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 126의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 127의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 128의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 129의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 130의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 131의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 132의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 133의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 134의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 135의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 136의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 137의 FG 루프 서열을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 140의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 141의 FC 루프 서열을 포함한다. 또 다른 특이적 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 138의 BC 루프 서열, 및 서열 번호 139의 FC 루프 서열을 포함한다.

[0306] 다른 구체예에서, 본 발명은 또한, TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 스캐폴드와 결합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수도 있으며, 상기 TRAIL-R2 결합인자는 2F4, 5B10, 10D9, 6F11, 8B3, 5E5, 2Hb, 7G11 또는 6C7로 이루어진 군에서 선택된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한, TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 스캐폴드와 결



합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수도 있고, 상기 TRAIL-R2 결합 인자는 서열 번호 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 또는 142에서 선택된 하나의 BC 루프 서열; 및 서열 번호 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 또는 143에서 선택된 하나의 FG 루프 서열을 포함한다. 경쟁 분석은 실시예 11 및/또는 14에 기술된 바와 같이 또는 당분야에 공지된 다른 분석법을 통해 수행할 수 있다.

[0307] 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 1E03, 2B04, 1C12, 1A03, 1C10, 1B12, 2G03, 2D3, 1C06, 2F08, 1B04, 3B11, 1D8, 2A12, 1E05, 2F02, 1H05, 2A11, 또는 1G11에서 선택된 TRAIL-R2 결합 스캐폴드 클론의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6개 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 144-200로부터의 1 이상의 루프를 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 또는 198에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196, 또는 199에서 선택된 1 이상의 DE 루프 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 또는 200에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함한다. 추가 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 또는 198에서 선택된 1 이상의 BC 루프 서열; 서열 번호 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196, 또는 199에서 선택된 1 이상의 DE 루프 서열; 및 서열 번호 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197 또는 200에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함한다.

[0308] 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 144의 BC 루프 서열, 서열 번호 145의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 146의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 147의 BC 루프 서열, 서열 번호 148의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 149의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 150의 BC 루프 서열, 서열 번호 151의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 152의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 153의 BC 루프 서열, 서열 번호 154의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 155의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 165의 BC 루프 서열, 서열 번호 166의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 167의 FG 루프 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, TRAIL-R2 특이적 스캐폴드는 서열 번호 198의 BC 루프 서열, 서열 번호 199의 DE 루프 서열, 및 서열 번호 200의 FG 루프 서열을 포함한다.

[0309] 다른 구체예에서, 본 발명은 또한, TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 스캐폴드와 결합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수 있고, 상기 TRAIL-R2 결합인자는 1E03, 2B04, 1C12, 1A03, 1C10, 1B12, 2G03, 2D3, 1C06, 2F08, 1B04, 3B11, 1D8, 2A12, 1E05, 2F02, 1H05, 2A11, 또는 1G11로 이루어진 군에서 선택된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 또한, TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는 스캐폴드와 결합에 대해 경쟁하는 스캐폴드를 포함할 수 있고, 상기 TRAIL-R2 결합인자는 서열 번호 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 또는 198에서 선택된 하나 이상의 BC 루프 서열; 서열 번호 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196, 또는 199에서 선택된 1 이상의 DE 루프 서열; 및 서열 번호 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197 또는 200에서 선택된 1 이상의 FG 루프 서열을 포함한다. 경쟁 분석은 실시예 11 및/또는 14에서 기술한 바와 같이, 또는 당분야에 공지된 다른 분석법을 통해 수행할 수 있다.

## [0310] 18. 스캐폴드를 사용하는 방법.

[0311] 본 발명은 또한, 사이토카인을 불활성화, 억제, 또는 격감시키기 위해 스캐폴드를 사용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명은 하기 사이토카인 중 1 이상을 불활성화, 억제 또는 격감시키는데 유용하다: TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fMLP, 인터페론 알파(서브타입 1, 2a, 2b, 4, 4b, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17 및 21 포함), 인터페론 베타, 인터페론 오메가, 인터페론 감, 인터루킨 IL-1-33, CCL1-28, CXCL 1-17 및 CX3CL1.

[0312] 본 발명은 또한, 다양한 감염성 제제 예컨대 바이러스, 진균, 진핵성 미생물, 및 박테리아를 불활성화시키는데 스캐폴드를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 RSV, hMPV, PIV, 또는 인플루엔자 바이러스를 불활성화시키는데 사용된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 진균성 병원체, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 내글리아(*Naegleria*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 히스토플라스마(*Histoplasma*), 칸디다(*Candida*) 또는 티니아(*Tinea*) 속의 구성원 등을 불활성화시키는데 사용될

수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 진핵성 미생물, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 지아르디아(*Giardia*), 톡소플라스마(*Toxoplasma*), 플라즈모디움(*Plasmodium*), 트리파노소마(*Trypanosoma*) 및 엔타모에바(*Entamoeba*) 속의 구성원을 불활성화시키는데 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 박테리아 병원체, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니고, 스탕필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 클로스트리디움(*Clostridium*), 보렐리아(*Borrelia*), 비브리오(*Vibrio*) 및 자이세리아(*Neisseria*) 속의 구성원을 불활성화시키는데 사용될 수 있다.

[0313] 본 발명은 또한, 진단 시약으로서 스캐폴드 단백질을 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 단백질은 상이한 항원을 효과적으로 동시에 포획할 필요가 있는 시약이나 키트에 유용하다.

[0314] 본 발명의 단백질 및 이를 포함하는 조성물은 많은 목적, 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, 암을 포함하는 광범위한 반성 및 급성 질환 및 질병에 대한 치료제로 유용하다. 본 발명의 방법에 따라 예방, 관리, 치료 또는 완화될 수 있는 암의 예는 이에 제한되는 것은 아니고, 머리, 목, 눈, 입, 목구멍, 식도, 가슴, 뼈, 폐, 결장, 직장, 위, 전립선, 유방, 난소, 신장, 간, 췌장 및 뇌의 암을 포함한다. 추가적인 암으로서, 이에 제한되지는 않지만, 하기의 예를 들 수 있다: 백혈병, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 예컨대 골수모세포성 백혈병, 전골수성 백혈병, 골수단세포성 백혈병, 단핵세포성 백혈병, 적백혈병 및 골수이형성 증후군, 만성 백혈병, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 만성 골수성(과립세포성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모양 세포성 백혈병; 진성 적혈구증가증; 림프종, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 호지킨병, 비호지킨병; 다발성 골수종, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 아급성 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질세포성 백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수외성 형질세포종; 발덴스트롬 마크로 글로불린혈증; 특별한 증상이 없는 단일클론성 감마병증; 양성 단일클론성 감마병증; 중쇄병; 골수암 및 골체조직 육종, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 골육종, 골수종 골질환, 다발성 골수종, 진주종-유발성 골육종, 뼈의 파제트병, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대 세포 종양, 뼈의 섬유육종, 척색종, 골막성 육종, 연조직 육종, 혈관육종(hemangiosarcoma), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 신경초종, 횡문근육종 및 활막 육종; 뇌종양, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 신경교종, 성상세포종, 뇌간교종, 상의 세포종, 편지교종, 비신경교성 종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체종, 송과체모세포종 및 원발성 뇌 림프종; 유방암 이에 제한되지는 않지만, 선암종, 소엽성(소세포) 암종, 선관내 암종, 수질성 유방암, 점액성 유방암, 관상 유방암, 유두상 유방암, 파제트병(소아성 파제트병 포함) 및 염증성 유방암; 부신암종, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 갈색세포종 및 부신피질암; 갑상선암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 유두상 또는 여포상 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 미분화 갑상선암; 췌장암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, VIP종, 소마토스타틴-분비 종양 및 암양종 또는 도세포 종양; 뇌하수체 암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 쿠싱 증후군, 프로락틴-분비 종양, 말단비대증 및 요붕증; 안암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 안구 흑색종, 예컨대 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종과 모양체 흑색종 및 망막모세포종; 질암, 예컨대 편평세포암종, 선암종 및 흑색종; 음문암, 예컨대 편평세포암종, 흑색종, 선암종, 기저 세포암, 육종 및 파제트병; 자궁경부암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 편평세포암종 및 선암종; 자궁내막암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 자궁내막 암종 및 자궁내막 육종; 난소암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 난소 상피 암종, 경계성 종양, 생식세포 종양 및 간질 종양; 식도암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 편평세포 암, 선암종, 선양낭성 암종, 점액표피양 암종, 선편평세포 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 우체상 암종 및 연맥세포(소세포) 암종; 위암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 선암종, 종괴형(용종형), 궤양성, 표재 확장성, 분산 확장성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종; 결장암; 직장암; 간암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 간세포성 암종 및 간모세포종, 담낭암, 예컨대 선암종; 담관암종, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 유두상, 결절성 및 확산성 담관암종; 폐암, 예컨대 비소세포 폐암, 편평세포암종(표피양 암종), 선암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암; 고환암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 배세포 종양, 고환종, 미분화, 원형(전형), 정모세포성, 비고환종, 태생 암종, 기형 암종, 융모상피암종(난황낭 종양), 전립선암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 선암종, 평활근육종 및 횡문근육종; 말기암; 구강암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 편평세포암종; 기저암; 침샘암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 선암종, 점액표피양 암종 및 선양낭성 암종; 인두암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 편평세포암 및 우체상; 피부암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 기저 세포암, 편평세포암종 및 흑색종, 표재 확장성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 선단 흑자성 흑색종; 신장암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 신세포암, 선암종, 부신종, 섬유육종, 이행세포암(신우 및/또는 수뇨관); 빌름스 종양; 방광암, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 이행세포암종, 편평세포암, 선암종, 암육종. 또한, 암은 점액육종, 골육종, 내피육종, 림프관내피육종, 중피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭선암종, 기관지원성 암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두상 암종 및 유두상 선암종을 포함한다(이러한 질환들의 검토를 위해서는, 문헌 [Fishman et al.,

1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia] 및 [Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., United States of America]를 참조). 아포토시스의 변형에 의해 발생한 암도 역시 본 발명의 방법 및 조성물로 치료할 수 있다. 이러한 암은 이에 제한되지는 않지만, 여포상 림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양과, 전암성 병변 예컨대 가족적 선종성 용종증 및 골수 이형성증후군을 포함할 수 있다.

[0315] 본 발명의 단백질 및 이를 포함하는 조성물은 다양한 목적, 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, 자가면역 및/또는 염증성 질환을 비롯한 광범위한 만성 및 급성 질환 및 질병에 대한 치료제로서 유용하다. 본 명세서에 기술한 본 발명의 조성물 및 방법은 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하다. 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환의 예는 이에 제한되는 것은 아니지만, 원형탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 쇼그렌 증후군, 건선, 죽상동맥경화증, 당뇨병 망막변증 및 다른 망막변증, 수정체후부 섬유증식증, 노인성 황반변성, 신생혈관성 녹내장, 혈관종, 갑상선 증식증(그레이브스병 포함), 각막 이식과 다른 조직 이식 및 만성 염증, 폐혈증, 류마티스 관절염, 복막염, 크론병, 재관류 손상, 폐혈증, 내독소성 쇼크, 낭포성 섬유증, 심장내막염, 건선, 관절염(예컨대, 건선성 관절염), 과민성 쇼크, 장기 허혈, 재관류 손상, 척추 손상 및 동종이식 거부반응, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근증, 복강 부전증-피부염, 만성 피로 면역이상증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 처그-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 한랭 응집 질환, 크론병, 원관상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통증후군-섬유근염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소증 자반병(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 매니에르병, 혼합 결체조직 질환, 다발성 경화증, 1형 당뇨병 또는 면역 매개성 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발성 연골염, 다분비선 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 근강직 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 타가야스 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 켈양성 대장염, 포도막염, 맥관염, 예컨대 포진성 피부염, 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함한다. 염증성 장애의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 알레르기 질환, 폐혈성 쇼크, 폐섬유증, 비분류성 척추관절병증, 비분류성 관절증, 관절염, 염증성 골용해 및 만성 바이러스 또는 박테리아성 감염으로 인한 만성 염증을 포함한다. 본 발명의 조성물과 방법은 상기 질병들을 예방, 관리 또는 치료하는데 사용되는 하나 이상의 통상적인 요법과 함께 사용될 수 있다.

[0316] 본 발명의 단백질 및 이를 포함하는 조성물은 여러 목적, 예를 들어, 광범위한 만성 및 급성 질환과 장애 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 바이러스성, 박테리아성 및 진균성 질환을 포함하는 감염성 질병에 대한 치료제로서 유용하다. 바이러스성 병원체의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만: 아데노바이러스(예컨대, 포유류아데노바이러스 및 조류아데노바이러스), 헤르페스바이러스(예컨대, 단순 포진(헤르페스) 바이러스 1, 단순 포진 바이러스 2, 단순 포진 바이러스 5 및 단순 포진 바이러스 6), 레비바이러스(예컨대, 레비바이러스, 엔테로박테리아 파지 MS2, 알로레바이러스), 폭스바이러스(예컨대, 초도폭스바이러스, 파라폭스바이러스, 아비폭스바이러스, 카프리폭스 바이러스, 레포리폭스바이러스, 수이폭스바이러스, 몰루스시폭스바이러스 및 엔토모폭스바이러스), 파포바이러스(예컨대, 폴리오마바이러스 및 파필로마바이러스), 파라믹소바이러스(예컨대, 파라믹소바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 1, 모빌리바이러스(예컨대, 홍역 바이러스), 루볼라바이러스(예컨대, 볼거리 바이러스), 뉴모노비리네(예컨대, 뉴모바이러스, 인간 호흡기 합포체 바이러스) 및 메타뉴모바이러스(예컨대, 조류 뉴모바이러스 및 인간 메타뉴모바이러스)), 피코르나바이러스(예컨대, 엔테로바이러스, 라이노 바이러스, 헤파토 바이러스(예컨대, 인간 간염 A 바이러스), 카디오바이러스 및 엡토바이러스), 레오바이러스(예컨대, 오르쏘레오 바이러스, 오르비바이러스, 로타바이러스, 사이포바이러스, 피지바이러스, 파이트레오바이러스 및 오리자바이러스), 레트로바이러스(예컨대, 포유동물 B형 레트로바이러스, 포유동물 C형 레트로바이러스, 조류 C형 레트로바이러스, D형 레트로바이러스 군, BLV-HTLV 레트로바이러스, 렌티바이러스(예컨대 인간 면역결핍 바이러스 1 및 인간 면역결핍 바이러스 2), 스푸마바이러스), 플라비바이러스(예컨대, C형 간염 바이러스), 헤파드나바이러스(예컨대, B형 간염 바이러스), 토가바이러스(예컨대, 알파바이러스(예컨대, 신드비스 바이러스), 루비바이러스(예컨대, 루벨라 바이러스)), 람도바이러스(예컨대, 베시쿨로바이러스, 리싸바이러스, 에페메로바이러스, 사이토람도 바이러스 및 네클레오람도 바이러스), 아레나바이러스(예컨대, 아레나바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 입피 바이러스 및 라싸 바이러스) 및 코로나바이러스(예컨대, 코로나바이러스 및 토로바이러스)를 포함한다. 박테리아성 병원체의 예로서는,



이에 제한되지는 않지만: 이에 제한되지는 않지만, 아쿠아스피릴룸(*Aquaspirillum*)과, 아조스피릴룸(*Azospirillum*)과, 아조박테라시아(*Azotobacteraceae*)과, 박테로이다시아(*Bacteroidaceae*)과, 바르토넬라(*Bartonella*)종, 브델로비브리오(*Bdellovibrio*)과, 캄필로박터(*Campylobacter*)종, 클라미디아(*Chlamydia*)종(예컨대, 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)), 클로스트리디움(*Clostridium*), 엔테로박테리아시아(*Enterobacteriaceae*)과(예컨대, 시트로박터(*Citrobacter*)종, 에드워드시엘라(*Edwardsiella*), 엔테로박터 에어 제네스(*Enterobacter aerogenes*), 어위니아(*Erwinia*)종, 대장균(*Escherichia coli*), 하프니아(*Hafnia*)종, 클렙시엘라(*Klebsiella*)종, 모르가넬라(*Morganella*)종, 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아(*Providencia*), 살모넬라(*Salmonella*)종, 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 가르디넬라(*Gardinerella*)과, 해모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 할로박테리아시아(*Halobacteriaceae*)과, 헬리코박터(*Helicobacter*)과, 레지오날라시아(*Legionellaceae*)과, 리스테리아(*Listeria*)종, 메틸로코카시아(*Methylococcaceae*)과, 미코박테리아(*Mycobacteria*)(예컨대, 미코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)), 네이세리아시아(*Neisseriaceae*)과, 오세아노스피릴룸(*Oceanospirillum*)과, 파스퇴렐라시아(*Pasteurellaceae*)과, 뉴모코커스(*Pneumococcus*)종, 슈도모나스(*Pseudomonas*)종, 리조비아시아(*Rhizobiaceae*)과, 스피릴룸(*Spirillum*)과, 스피로소마시아(*Spirosomaceae*)과, 스태필로코커스(*Staphylococcus*)(예컨대, 메티실린 저항성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 스태필로코커스 파이로진(*Staphylococcus pyrogenes*)), 스트렙토코커스(*Streptococcus*)(예컨대, 스트렙토코커스 엔테리티디스(*Streptococcus enteritidis*), 스트렙토코커스 파스시아(*Streptococcus fascia*) 및 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)), 뱀피로비브르 헬리코박터(*Vampirovibr Helicobacter*)과 및 뱀피로비브리오(*Vampirovibrio*)과를 포함한다.진균성 병원체의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만: 암시디아(*Absidia*)종(예컨대, 암시디아 코림비페라(*Absidia corymbifera*) 및 암시디아 라모사(*Absidia ramosa*)), 아스퍼질러스(*Aspergillus*)종(예컨대, 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*) 및 아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*)), 바시디오볼루스 라나룸(*Basidiobolus ranarum*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 칸디다(*Candida*)종(예컨대, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 케르(*Candida kerr*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파랍실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 슈도트로피칼리스(*Candida pseudotropicalis*), 칸디다 킬러몬디(*Candida quilliermondii*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 칸디다 스텔라토이디어(*Candida stellatoide*) 및 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)), 코지디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 코니디오볼루스(*Conidiobolus*)종, 크립토코커스 네오포름스(*Cryptococcus neoforms*), 커닝햄렐라(*Cunninghamella*)종, 더마토파이테스(*dermatophytes*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 마이크로스포룸 집세움(*Microsporum gypseum*), 무코 푸실러스(*Mucor pusillus*), 파라코지디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 슈달레쉬리아 보이디(*Pseudallescheria boydii*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 뉴모사이스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*), 리조푸스(*Rhizopus*)종(예컨대, 리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*) 및 리조푸스 마이크로스포루스(*Rhizopus microsporus*)), 사카로마이세스(*Saccharomyces*)종, 스포로쓰릭스 쉐키(*Sporothrix schenckii*), 자이코마이세테스(*zygomycetes*) 및 자이코마이세테스(*Zygomycetes*), 아스코마이세테스(*Ascomycetes*), 바시디오마이세테스(*Basidiomycetes*), 듀테로마이세테스(*Deuteromycetes*) 및 우마이세테스(*Oomycetes*)와 같은 강을 포함한다.

[0317] 다른 구체예에서, 본 발명은 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질환, 또는 이의 1 이상의 증상을 예방, 관리, 치료 또는 완화하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 본 발명의 1 이상의 스케폴드의 치료 유효량을 수술과 병용하여, 단독으로 또는 표적 또는 실험적 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법/면역요법 및/또는 방사선 요법의 투여를 추가로 병용하여 투여하는 것을 포함한다. 이러한 구체예에 따라서, 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질환 또는 이의 1 이상의 증상을 예방, 관리, 치료 또는 완화하는데 활용되는 본 발명의 스케폴드는 일정한 부분(예를 들어, 치료제 또는 약물)에 융합되거나 접합될 수도 있고 아닐 수도 있다.

[0318] 본 발명은 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질환, 또는 이의 1 이상의 증상을 예방, 관리, 치료 또는 완화하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 피험체에게 본 발명의 1 이상의 스케폴드를 암 치료제(a.k.a. 비암 치료제)가 아닌 1 이상의 치료제와 병용하여 투여하는 것을 포함한다. 이러한 제제의 예로서는, 이에 제한되지는 않지만, 항구토제, 항진균제, 항박테리아제, 예컨대 항생제, 항염증제 및 항바이러스제를 포함한다. 항구토제의 비제한적인 예로서는, 메토포마진과 메토클로프라미드를 포함한다. 항진균제의 비제한적인 예로서는, 아졸 약물, 이미다졸, 트리아졸, 폴리엔, 암포테리신 및 피리미딘을 포함한다. 항박테리아제의 비제한

적인 예로서는, 다티노마이신, 블레오마이신, 에리스로마이신, 페니실린, 미트라마이신, 세팔로스포린, 이미페넴, 악스트레오남, 반코마이신, 시클로세린, 바시트라신, 클로람페니콜, 클린다마이신, 테트라사이클린, 스트렙토마이신, 토브라마이신, 젠타마이신, 아미카신, 카나마이신, 네오마이신, 스펙티노마이신, 트리메토프림, 노르플록사신, 레팜핀, 폴리마익신, 암포테리신 B, 니스타틴, 케토카나졸, 이소니아지드, 메트로니다졸 및 펜타미딘을 포함한다. 항바이러스제의 비제한적인 예로서는, 뉴클레오시드 유사체(에킨대, 지도부딘, 아시클리버, 강시클리버, 비다빈, 이독수리딘, 트리플루리딘 및 리바비린), 포스카넷, 아만타딘, 리만타딘, 사퀴나버, 인디나버, 리토나버, 인터페론("IFN")- $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\gamma$  및 AZT를 포함한다. 항염증제의 비제한적인 예로서는, 비스테로이드성 항염증성 약물("NSAID"), 스테로이드성 항염증성 약물,  $\beta$ -작용제, 항-콜린제 및 메틸잔틴을 포함한다.

[0319] 다른 구체예에서, 본 발명은 암세포 표현형을 억제할 수 있는 조성물을 포함한다. 일 구체예에서, 암세포 표현형은 세포 성장, 세포 부착, 세포 부착능 손실, 수용체 발현 감소(이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어, Eph 수용체), 수용체 발현 증가(이에 제한되지 않지만, 에킨대 Eph 수용체), 전이 가능성, 세포 주기 억제, 수용체 티로신 키나제 활성화/억제 등이다.

[0320] 일 구체예에서, 본 발명은 만성 염증을 치료할 수 있는 조성물을 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 파괴 또는 불활성화를 위해 면역 세포를 표적화하는데 유용하다. 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 활성화된 T 세포, 휴지기 T 세포, B 세포, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포 또는 수지상 세포를 표적화하는데 유용하다. 다른 구체예에서, 본 발명은 면역 세포 기능을 감소시킬 수 있는 조성물을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 면역 세포 기능을 제거할 수 있다.

[0321] 다른 구체예에서, 본 발명은 혈관생성을 억제하거나 감소시킬 수 있는 조성물을 포함한다. 다른 구체예에서, 혈관 생성은 종양 성장, 류마티스 관절염, SLE, 쇼그렌 증후군 등과 관련된다.

[0322] 다른 구체예에서, 본 발명의 위장관 질환을 치료하는데 유용한 조성물을 포함한다. 본 발명의 스캐폴드는 낮은 pH 조건 하에서 높은 수준의 안정성을 나타낸다. 낮은 pH에서의 안정성은 본 발명의 조성물이 다양한 위장 질환, 에킨대 과민성 장 증후군, 위식도 역류증, 가성 장폐색, 덩핑 증후군, 난치성 구역증, 소화성 궤양, 충수염, 허혈성 대장염, 궤양성 대장염, 위염, 헬리코 파이로리(*Helico pylori*) 질환, 크론병, 위궤양, 복부 스프루, 게실염, 게실증, 연하 곤란증, 열공 탈장, 감염성 식도 질환, 딸꾹질, 반추 등에 대한 경구 투여용으로 적합하다.

[0323] 본 발명은 또한, 조합 조성물 및 질환 또는 이의 증상을 예방, 치료, 경감 또는 완화하는데서 이러한 조성물의 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 스캐폴드는 질환 또는 이의 증상을 예방, 치료, 경감 또는 완화하는데 적합한 통상의 요법과 병용할 수 있다. 예시적인 통상의 요법은 문헌 [Physician's Desk Reference (56th ed., 2002 and 57th ed., 2003)]을 참조한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 화학요법, 방사선요법, 수술, 생물질(항체 또는 펩티드)를 사용한 면역요법, 소형 분자, 당분야에 공지된 다른 요법과 병용할 수 있다. 일부 구체예에서, 병용 요법은 함께 투여된다. 다른 구체예에서, 병용 요법은 개별적으로 투여된다.

[0324] 본 발명은 또한, 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 질환과 관련된 특정 표적에 결합하는 본 발명의 스캐폴드를 상기 질환을 진단하는데 사용되는 방법에 제공할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드는 피험체에서 질환을 진단하는 방법에서 사용되며, 상기 방법은 피험체에서 샘플을 얻는 단계, 표적:스캐폴드 상호작용이 일어나는 조건 하에서 상기 샘플 내 스캐폴드와 표적을 접촉시키는 단계, 표적:스캐폴드 복합체를 동정하여 샘플 내에서 표적을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 표적은 질환과 관련된 항원이다. 다른 구체예에서, 표적은 사이토카인, 염증성 매개인자, 세포내 항원, 자가 항원, 비자가 항원, 핵내 항원, 세포 표면 항원, 박테리아 항원, 바이러스 항원 또는 진균 항원이다. 다른 구체예에서, 진단하려는 질환은 본 명세서에 기술되어 있다.

[0325] 본 발명은 또한, 특정 표적을 영상화하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 조영제, 에킨대 녹색-형광발광 단백질, 다른 형광발광 태그(Cy3, Cy5, 로다민 등), 비오틴, 또는 방사성 핵종에 접합된 본 발명의 스캐폴드를 특정 표적의 존재, 위치 또는 진행을 영상화하는 방법에서 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 표적을 영상화하는 방법은 시험관 내에서 수행된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 표적을 영상화하는 방법은 생체 내에서 수행된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 표적을 영상화하는 방법은 MRI, PET 스캔, X-선, 형광발광 검출 또는 당분야에 공지된 다른 검출 방법을 통해 수행된다.

[0326] 본 발명은 또한 본 발명의 스캐폴드를 사용하여 질환 진행, 재발, 치료 또는 완화를 모니터링하는 방법을 제공한다. 질환 진행, 재발, 치료 또는 완화를 모니터링하는 방법은 본 명세서에 기술한 바와 같이 본 발명의 스캐



폴드를 영상화, 진단 또는 화합물/표적과 접촉시키는 방법을 통해 수행된다.

## 19. 키트

본 발명의 범주에는 또한, 본 발명의 조성물(예를 들어, 스캐폴드) 및 사용 지침서를 포함하는 키트가 포함된다. 키트는 1 이상의 추가 시약, 또는 본 발명의 1 이상의 추가적인 스캐폴드가 더 포함될 수 있다. 대체로, 키트는 키트 내용물의 용도를 명시한 라벨을 포함한다. 용어, 라벨은 키트 상에 또는 키트에 부착되어, 또는 키트와 함께 제공되는 임의의 기록부, 또는 기록 물질을 포함한다.

## 20. 균등물

당분야의 당업자는 단지 통상의 실험을 사용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 구체예에 대한 수많은 균등물을 확인하거나, 또는 인지하게 될 것이다. 이러한 균등물을 하기 청구항에 포함시키고자 한다.

본 명세서에 언급된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공개물, 특허 또는 특허 출원을 본 명세서에 참조하여 포함시킨다고 특별하게 그리고 개별적으로 나타낸 것과 동일하 정도로 본 명세서에서 참조하여 포함시킨다. 추가적으로, 2007년 10월 31일 가출원된 U.S. 가출원 60/984,209를 모든 목적을 위해 전체로 참조하여 포함시킨다.

### 예시적인 구체예:

1. 제조함, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드로서,

I. 천연 발생 단백질 서열에서 유래한 다수의 루프 영역 서열에 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하고,

II. 여기서, 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고,

III. 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 1의 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이다.

2. 구체예 1의 스캐폴드에서, 상기 다수의 베타 스트랜드는 7개 이상의 스트랜드이다.

3. 구체예 1의 스캐폴드에서, 상기 다수의 루프 영역은 6개 이상의 영역이다.

4. 구체예 1의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 A, B, C, D, E 및 F라 명명된 7개의 베타 스트랜드, 및 6개 루프 영역을 포함하고, 이때 루프 영역은 각각의 베타 스트랜드와 연결되고, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프라 명명된다.

5. 구체예 4의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 201의 AB 루프 서열, 서열 번호 202의 BC 루프 서열, 서열 번호 203의 CD 루프 서열, 서열 번호 204의 DE 루프 서열, 서열 번호 205의 EF 루프 서열, 및 서열 번호 206의 FG 루프 서열을 포함한다.

6. 구체예 4의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 207의 AB 루프 서열, 서열 번호 202의 BC 루프 서열, 서열 번호 203의 CD 루프 서열, 서열 번호 208의 DE 루프 서열, 서열 번호 209의 EF 루프 서열 및 서열 번호 206의 FG 루프 서열을 포함한다.

7. 구체예 1의 스캐폴드에서, 상기 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 1에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

8. 구체예 5 또는 6의 스캐폴드에서, 상기 루프 영역 서열은 BC 및 FG 루프를 포함한다.

9. 구체예 8의 스캐폴드에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 아미노산을 포함한다: S-X-a-X-b-X-X-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 프롤린 또는 알라닌을 나타내며, (b)는 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.

10. 구체예 8의 스캐폴드에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함한다: S-P-c-X-X-X-X-X-T-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (c)는 프롤린, 세린 또는 글리신을 나타낸다.

11. 구체예 8의 스캐폴드에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 12 아미노산을 포함한다: A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (d)는 프롤린, 글루타메이트 또는 리신을 나타내며, (e)는

아스파라긴 또는 글리신을 나타내고, (f)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.

- [0347] 12. 구체예 8의 스캐폴드에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-X-S, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0348] 13. 구체예 9의 스캐폴드에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 10 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-X-X-b-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내며, (b)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.
- [0349] 14. 구체예 8의 스캐폴드에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0350] 15. 구체예 4-14 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 루프 영역 서열은 DE 루프를 추가로 포함한다.
- [0351] 16. 구체예 15의 스캐폴드에서, 상기 DE 루프는 하기 공통 서열을 갖는 6 아미노산을 포함한다: X-X-X-X-X-X, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다.
- [0352] 17. 구체예 4-14 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 루프 영역 서열은 AB 루프를 추가로 포함한다.
- [0353] 18. 구체예 7의 스캐폴드에서, 상기 AB 루프는 하기 공통 서열을 갖는 7 잔기를 포함한다: K-X-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0354] 19. 구체예 18의 스캐폴드에서, 상기 AB 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 잔기를 포함한다: K-X-X-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0355] 20. 구체예 4-14 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 루프 영역 서열은 CD 루프를 추가로 포함한다.
- [0356] 21. 구체예 20의 스캐폴드에서, 상기 CD 루프는 7, 8, 또는 9 잔기를 포함하고, 여기서 CD 루프 내 각 잔기는 무작위화되며, 각 잔기는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린일 수 있다.
- [0357] 22. 구체예 4-14 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 루프 영역 서열은 EF 루프를 추가로 포함한다.
- [0358] 23. 구체예 22의 스캐폴드에서, 상기 EF 루프는 하기 공통 서열을 갖는 8을 포함한다: X-b-L-X-P-X-c-X, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (b)는 아스파라긴, 리신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 글리신을 나타내며, (c)는 이소류신, 트레오닌, 세린, 발린, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0359] 24. 구체예 1-14 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 1 이상의 이황화 결합을 추가로 포함한다.
- [0360] 25. 구체예 24의 스캐폴드에서, 상기 이황화 결합은 A 스트랜드와 B 스트랜드 간의 연결부를 형성한다.
- [0361] 26. 구체예 24의 스캐폴드에서, 상기 이황화 결합은 D 스트랜드와 E 스트랜드 간의 연결부를 형성한다.
- [0362] 27. 구체예 24의 스캐폴드에서, 상기 이황화 결합은 F 스트랜드와 G 스트랜드 간의 연결부를 형성한다.
- [0363] 28. 구체예 24의 스캐폴드에서, 상기 이황화 결합은 C 스트랜드와 F 스트랜드 간의 연결부를 형성한다.
- [0364] 29. 구체예 1-28 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 2 이상의 이황화 결합을 추가로 포함한다.
- [0365] 30. 구체예 29의 스캐폴드에서, 상기 이황화 결합은 F 스트랜드와 G 스트랜드 간의 제1 연결부, 및 C 스트랜드와 F 스트랜드 간의 제2 연결부를 형성한다.
- [0366] 31. 구체예 24 또는 29의 스캐폴드에서, 상기 1 이상의 이황화 결합은 베타 스트랜드 도메인에 존재한다.
- [0367] 32. 구체예 24 또는 29의 스캐폴드에서, 상기 1 이상의 이황화 결합은 루프 영역에 존재한다.
- [0368] 33. 구체예 15의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는  $Tn3^{SS1}$  (서열 번호 64),  $Tn3^{SS2}$  (서열 번호 210),  $Tn3^{SS3}$  (서열 번호 65), 또는  $Tn3^{SS4}$  (서열 번호 66)에 상응하는 서열을 포함한다.
- [0369] 34. 구체예 17의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드  $Tn3^{SS3+4}$  (서열 번호 67)에 상응하는 서열을 포함한다.

- [0370] 35. 구체에 1-34 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 표적에 결합한다.
- [0371] 36. 구체에 35의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 100  $\mu\text{M}$  이상의 친화성( $K_D$ )으로 상기 표적에 결합한다.
- [0372] 37. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 표적은 세포-표면 항원, 가용성 항원, 고정화 항원, 면역침묵 항원, 세포 내 항원, 핵내 항원, 자가 항원, 비자가 항원, 암 항원, 박테리아 항원, 또는 바이러스 항원이다.
- [0373] 38. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 20 mM 인산나트륨(pH 7.0)에서 시차 주사 열량측정법(DSC)로 측정시 열 용융점( $T_m$ )이 40°C 이상으로 나타난다.
- [0374] 39. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 우레아 변성 실험에서 측정시  $C_m$ 이 10% 이상 증가된 것으로 나타난다.
- [0375] 40. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 구아닌 변성 실험에서 측정시  $C_m$ 이 10% 이상 증가한 것으로 나타난다.
- [0376] 41. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 프로테아제 분해 내성이 10% 이상 증가한 것으로 나타난다.
- [0377] 42. 구체에 36의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 이중성 제제에 접합되고, 상기 제제는 다른 스캐폴드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민(HSA), 항체의 Fc 영역, IgG 분자, 결합 펩티드, 세포독성 약물, 방사성 동위원소, 조영제, His-태그, 비오틴, Flag-태그, 핵산, 또는 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0378] 43. 구체에 36에 따른 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드.
- [0379] 44. 구체에 43의 다량체 스캐폴드에서, 상기 다량체 스캐폴드는 에피토프 결합 도메인을 더 포함하고, 상기 에피토프 결합 도메인은 항체, 항체 단편, 디아바디, scFv, Fab, Fv, 결합 펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0380] 45. 구체에 43의 다량체 스캐폴드에서, 상기 에피토프 결합 도메인은 상기 스캐폴드와는 다른 표적에 특이적이다.
- [0381] 46. 구체에 43의 다량체 스캐폴드에서, 상기 에피토프 결합 도메인은 상기 스캐폴드와 동일하나 표적에 대해 특이적이다.
- [0382] 47. 구체에 43-46의 다량체 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 다른 스캐폴드, IgG 분자 또는 이의 단편, Fc 영역, 이량체화 도메인, 화학적 가교결합, 이황화 결합, 또는 아미노산 링커에 의해 연결된다.
- [0383] 48. 구체에 1-47 중 어느 하나의 다량체 스캐폴드를 코딩하는 핵산 분산.
- [0384] 49. 구체에 48의 핵산에 작동적으로 연결된 발현 벡터.
- [0385] 50. 구체에 49의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0386] 51. 구체에 36의 스캐폴드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리로서, 각각의 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열에서 유래하는 다수의 루프 영역 서열에 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하고, 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되며, 여기서 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 1의 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상이다.
- [0387] 52. 구체에 51의 라이브러리에서, 상기 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가에 의해 변이된 2 이상의 루프 영역 서열을 포함한다.
- [0388] 53. 구체에 52의 라이브러리에서, 상기 2 루프 영역 서열은 BC/DE, BC/FG, DE/FG, AB/CD, AB/EF 및 CD/ ED 루프로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0389] 54. 구체에 53의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 BC 및 FG 루프를 포함한다.
- [0390] 55. 구체에 53의 라이브러리에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 아미노산을 포함한다: S-X-a-X-b-X-X-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 프롤린 또는 알라닌을 나타내며, (b)는 알라닌 또는 글리신을 나타낸다.
- [0391] 56. 구체에 53의 라이브러리에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함한다: S-P-c-X-X-

X-X-X-X-T-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (c)는 프롤린, 세린 또는 글리신을 나타낸다.

- [0392] 57. 구체예 53의 라이브러리에서, 상기 BC 루프는 하기 공통 서열을 갖는 12 아미노산을 포함한다: A-d-P -X-X-X-e-f-X-I-X-G, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (d)는 프롤린, 글루타메이트 또는 리신을 나타내며, (e)는 아스파라긴 또는 글리신을 나타내고, (f)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.
- [0393] 58. 구체예 53의 라이브러리에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0394] 59. 구체예 53의 라이브러리에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 10 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-X-X-b-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타내며, (b)는 세린 또는 글리신을 나타낸다.
- [0395] 60. 구체예 53의 라이브러리에서, 상기 FG 루프는 하기 공통 서열을 갖는 11 아미노산을 포함한다: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타내고, (a)는 아스파라긴, 트레오닌 또는 리신을 나타낸다.
- [0396] 61. 구체예 52의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 DE 루프를 추가로 포함한다.
- [0397] 62. 구체예 61의 라이브러리에서, 상기 DE 루프는 하기 공통 서열을 갖는 6 아미노산을 포함한다: X-X-X-X-X-X, 여기서 X는 임의의 아미노산을 나타낸다.
- [0398] 63. 구체예 52의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 AB 루프를 추가로 포함한다.
- [0399] 64. 구체예 63의 라이브러리에서, 상기 AB 루프는 하기 공통 서열을 갖는 7 잔기를 포함한다: K-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0400] 65. 구체예 63의 라이브러리에서, 상기 AB 루프는 하기 공통 서열을 갖는 9 잔기를 포함한다: K-X-X-X-X-X-X-a, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (a)는 세린, 트레오닌, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0401] 66. 구체예 52의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 CD 루프를 추가로 포함한다.
- [0402] 67. 구체예 66의 라이브러리에서, 상기 CD 루프는 7, 8, 또는 9 잔기를 포함하고, 여기서 CD 루프 중 각 잔기는 무작위화되고, 이때 각 잔기는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린일 수 있다.
- [0403] 68. 구체예 52의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 EF 루프를 추가로 포함한다.
- [0404] 69. 구체예 68의 라이브러리에서, 상기 EF 루프는 하기 공통 서열을 갖는 8을 포함한다: X-b-L-X-P-X-c-X, 여기서 X는 아스파라긴, 아스파르트산, 히스티딘, 티로신, 이소류신, 발린, 류신, 페닐알라닌, 트레오닌, 알라닌, 프롤린, 또는 세린을 나타내고, (b)는 아스파라긴, 리신, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 글리신을 나타내며, (c)는 이소류신, 트레오닌, 세린, 발린, 알라닌, 또는 글리신을 나타낸다.
- [0405] 70. 구체예 51의 라이브러리에서, 상기 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이된 3 이상의 루프 영역 서열을 포함한다.
- [0406] 71. 구체예 70의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 BC, DE 및 FG 루프를 포함한다.
- [0407] 72. 구체예 70의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 AB, CD 및 EF 루프를 포함한다.
- [0408] 73. 구체예 70의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 임의의 3 루프를 포함한다.
- [0409] 74. 구체예 38의 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리에서, 상기 폴리펩티드는 리보솜, 박테리오파지, 바이러스, 박테리아, 또는 효모의 표면 상에 디스플레이된다.
- [0410] 75. 구체예 51-74 중 어느 하나의 라이브러리를 코딩하는 단리된 핵산 분자의 컬렉션.
- [0411] 76. 구체예 75의 핵산 분자에 작동적으로 연결된 발현 벡터.
- [0412] 77. 표적에 결합하는 폴리펩티드 스캐폴드를 획득하는 방법으로서, 상기 방법은 (a) 스캐폴드:표적 리간드 복합체가 형성되는 조건 하에서 구체예 38의 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, 및 (b) 상기 복합체로부

터, 표적 리간드에 결합하는 스캐폴드를 획득하는 단계를 포함한다.

- [0413] 78. 구체에 77의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득된 상기 단백질의 스캐폴드 중 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더욱 포함한다.
- [0414] 79. 구체에 78의 방법에서, 상기 방법은 2 이상의 루프를 포함한다.
- [0415] 80. 구체에 78의 방법에서, 상기 방법은 3 이상의 루프를 포함한다.
- [0416] 81. 구체에 78의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득된 상기 단백질 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 포함하고, 여기서 상기 (a) 및 (b) 단계의 반복은 (a) 및 (b) 단계의 제1 작업시 표적과는 다른 표적을 접촉시키는 것을 더 포함한다.
- [0417] 82. 구체에 78의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 상기 단백질 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하고, 여기서 상기 루프는 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않았던 것이다.
- [0418] 83. 구체에 78의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 얻은 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하며, 여기서 상기 루프는 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않았던 것이고, 상기 (a) 및 (b) 단계의 반복은 상기 (a) 및 (b) 단계의 제1 작업시 표적과는 다른 표적을 접촉시키는 것을 더 포함한다.
- [0419] 84. 구체에 77-83 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화 루프, 및 AB, CD 및 EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다.
- [0420] 85. 구체에 77-83 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 AB, CD, EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화 루프, 및 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다.
- [0421] 86. 구체에 77-83 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 베타 스트랜드를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함한다.
- [0422] 87. 구체에 86의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 단백질의 상기 스캐폴드의 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 베타 스트랜드를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함한다.
- [0423] 88. 표적에 결합하는 2 이상의 스캐폴드를 획득하는 방법으로서, 상기 방법은 스캐폴드:표적 리간드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체에 38의 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, (b) 상기 스캐폴드를 가교제를 사용하여 결합시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 스캐폴드의 가교결합은 검출가능한 반응을 유도하는 것인 단계, 및 (c) 복합체로부터, 표적에 결합하는 상기 스캐폴드를 획득하는 단계를 포함한다.
- [0424] 89. 구체에 88의 방법에서, 상기 스캐폴드는 동일한 에피토프를 인식한다.
- [0425] 90. 구체에 88의 방법에서, 상기 스캐폴드는 상이한 에피토프를 인식한다.
- [0426] 91. 구체에 88의 방법에서, 상기 가교제는 항체, 항체 단편, 이량체화 모티프, 화학적 가교결합제, 결합 펩티드, 또는 에피토프 태그로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0427] 92. 샘플에서 화합물을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 화합물:스캐폴드 복합체가 형성되는 조건 하에서, 구체에 1-47 중 어느 하나의 스캐폴드와 상기 샘플을 접촉시키는 단계 및 상기 복합체를 검출하여 상기 샘플 내 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0428] 93. 샘플에서 화합물을 포획하는 방법으로서, 상기 방법은 화합물:스캐폴드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체에 1-47 중 어느 하나의 고정화 스캐폴드와 상기 샘플을 접촉시키는 단계 및 상기 고정화 스캐폴드를 제거하여, 상기 샘플에서 상기 화합물을 포획하는 단계를 포함한다.



- [0429] 94. 구체예 1-47 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하는 발열원 무함유, 멸균 조성물.
- [0430] 95. 구체예 1-47 중 어느 하나의 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물.
- [0431] 96. 구체예 95의 조성물을 사용하여 환자에서 질환을 예방, 치료, 관리 또는 완화하는 방법.
- [0432] 97. 구체예 95 또는 96의 조성물을 사용하여 환자에서 질환을 진단하거나 영상화하는 방법.
- [0433] 98. 구체예 96의 방법에서, 상기 방법은 추가 요법을 더 포함하며, 여기서 상기 요법은 면역요법, 생물학적 요법, 화학요법, 방사선요법, 또는 소형 분자 약물 요법이다.
- [0434] 99. 구체예 96-98의 방법에서, 상기 질환은 자가면역 질환, 염증성 질환, 증식성 질환, 감염성 질환, 호흡기 질환, 위장 질환, 당뇨병, 루푸스, 또는 비만증이다.
- [0435] 100. 재조합, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드로서,
- [0436] I. 천연 발생 단백질 서열에서 유래한 다수의 예측 루프 서열에 연결된 다수의 예측 베타 스트랜드 도메인을 포함하고,
- [0437] II. 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고,
- [0438] III. 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 2의 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이다.
- [0439] 101. 구체예 100의 스캐폴드에서, 상기 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 2에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0440] 102. 재조합, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드로서,
- [0441] I. 천연 발생 단백질 서열에서 유래된 다수의 예측 루프 영역 서열에 연결된 다수의 예측 베타 스트랜드 도메인을 포함하고,
- [0442] II. 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 중 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고,
- [0443] III. 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 3 또는 4의 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상이다.
- [0444] 103. 구체예 102의 스캐폴드에서, 상기 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 3 또는 4의 단백질 서열을 포함한다.
- [0445] 104. 재조합, 비천연 발생 폴리펩티드 스캐폴드로서,
- [0446] I. 천연 발생 단백질 서열에서 유래된 다수의 예측 루프 영역 서열에 연결된 다수의 예측 베타 스트랜드 도메인을 포함하고,
- [0447] II. 여기서 천연 발생 단백질 서열 중 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고,
- [0448] III. 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상이고, 여기서 상기 천연 발생 단백질 서열은 서열 번호 5-32, 68-88로부터 선택된다.
- [0449] 105. 구체예 100-104 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 다수의 베타 스트랜드는 7개 이상의 스트랜드이다.
- [0450] 106. 구체예 100-104 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 다수의 루프 영역은 6개 이상의 영역이다.
- [0451] 107. 구체예 100-104의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 각각 A, B, C, D, E 및 F로 명명된 7개 베타 스트랜드, 및 6개 루프 영역을 포함하고, 여기서 루프 영역은 각각의 베타 스트랜드를 연결하고, AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프로 명명된다.
- [0452] 108. 구체예 100-107 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 1 이상의 이황화 결합을 더 포함한다.
- [0453] 109. 구체예 100-107 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 적어도 2, 3, 4, 또는 그 이상의 이황화 결합을 더 포함한다.

- [0454] 110. 구체에 108 또는 109의 스캐폴드에서, 상기 1 이상의 이황화 결합은 베타 스트랜드 도메인에 존재한다.
- [0455] 111. 구체에 108 또는 109의 스캐폴드에서, 상기 1 이상의 이황화 결합은 루프 영역에 존재한다.
- [0456] 112. T구체에 100-111 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 표적에 결합한다.
- [0457] 113. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 표적은 세포-표면 항원, 가용성 항원, 고정화 항원, 면역침묵 항원, 세포내 항원, 핵내 항원, 자가 항원, 비자가 항원, 암 항원, 박테리아 항원 또는 바이러스 항원이다.
- [0458] 114. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 적어도 100  $\mu$ M의 Kd 친화성으로 결합한다.
- [0459] 115. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 20 mM 인산나트륨(pH 7.0) 중 시차 주사 열량측정법(DSC)으로 측정시 용점(Tm)이 40℃ 이상으로 나타난다.
- [0460] 116. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 우레아 변성 실험으로 측정시 Cm이 10% 이상 증가된 것으로 나타난다.
- [0461] 117. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 구아니딘 변성 실험에서 측정시 Cm이 10% 이상 증가된 것으로 나타난다.
- [0462] 118. 구체에 112의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 유사한 실험 조건 하에서, 조작 전의 동일 스캐폴드에 비하여 프로테아제 분해에 대해 10% 이상 증가된 내성을 나타낸다.
- [0463] 119. 구체에 112의 스캐폴드에서 상기 스캐폴드는 이중성 체제에 접합되고, 여기서 상기 체제는 다른 스캐폴드, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 인간 혈청 알부민(HSA), 항체의 Fc 영역, IgG 분자, 이량체화 도메인, 결합 펩티드, 세포독성 약물, 방사성 동위원소, 조영제, His-태그, 비오틴, Flag-태그, 핵산, 또는 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0464] 120. 구체에 100-119 중 어느 하나의 2 이상의 스캐폴드를 포함하는 다량체 스캐폴드.
- [0465] 121. 구체에 120의 다량체 스캐폴드에서, 상기 다량체 스캐폴드는 에피토프 결합 도메인을 포함하고, 상기 에피토프 결합 도메인은 항체, 항체 단편, 디아바디, scFv, Fab, Fv, 또는 결합 펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0466] 122. 구체에 121의 다량체 스캐폴드에서, 상기 에피토프 결합 도메인은 상기 스캐폴드와는 다른 표적에 특이적이다.
- [0467] 123. 구체에 121의 다량체 스캐폴드에서, 상기 에피토프 결합 도메인은 상기 스캐폴드와 동일한 표적에 특이적이다.
- [0468] 124. 구체에 120-123 중 어느 하나의 다량체 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 다른 스캐폴드, IgG 분자 또는 그의 단편, Fc 영역, 이량체화 도메인, 화학적 가교결합, 이황화 결합, 또는 아미노산 링커에 의해 연결된다.
- [0469] 125. 구체에 100-124 중 어느 하나의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.
- [0470] 126. 구체에 125의 핵산에 작동적으로 연결된 발현 벡터.
- [0471] 127. 구체에 126의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0472] 128. 구체에 100-119 중 어느 하나의 스캐폴드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리로서, 각각의 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열에서 유래한 다수의 루프 영역 서열에 연결된 다수의 베타 스트랜드 도메인을 포함하고, 여기서 상기 루프 영역 서열 중 1 이상은 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되고, 폴리펩티드 스캐폴드의 베타 스트랜드 도메인은 천연 발생 단백질 서열의 상응하는 도메인 서열과의 상동성이 50% 이상이다.
- [0473] 129. 구체에 128의 라이브러리에서, 상기 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되는 2 이상의 루프 영역 서열을 포함한다.
- [0474] 130. 구체에 128의 라이브러리에서, 상기 2루프 영역 서열은 BC/DE, BC/FG, DE/FG, AB/CD, AB/EF, 및 CD/ ED 루프로 이루어진 군에서 선택된 루프 서열을 포함한다.
- [0475] 131. 구체에 128의 라이브러리에서, 상기 스캐폴드는 천연 발생 단백질 서열 내 상응하는 루프 서열로부터 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가되어 변이되는 3 이상의 루프 영역 서열을 포함한다.

- [0476] 132. 구체예 131의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 BC, DE 및 FG 루프를 포함한다.
- [0477] 133. 구체예 131의 라이브러리에서, 상기 루프 영역 서열은 AB, CD 및 EF 루프를 포함한다.
- [0478] 134. 구체예 128의 라이브러리에서, 상기 폴리펩티드는 리보솜, 박테리오파지, 바이러스, 박테리아 또는 효모의 표면 상에 디스플레이된다.
- [0479] 135. 구체예 134의 라이브러리에서, 상기 라이브러리는  $10^6$  이상의 서열 다양성을 갖는다.
- [0480] 136. 표적에 결합하는 스캐폴드를 획득하는 방법으로서, 상기 방법은 (a) 스캐폴드:표적 리간드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체예 128의 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, 및 (b) 복합체로부터, 리간드에 결합하는 스캐폴드를 획득하는 단계를 포함한다.
- [0481] 137. 구체예 136의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 상기 단백질 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성하고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함한다.
- [0482] 138. 구체예 137의 방법에서, 상기 방법은 2 이상의 루프를 무작위화하는 것을 포함한다.
- [0483] 139. 구체예 137의 방법에서, 상기 방법은 3 이상의 루프를 무작위화하는 것을 포함한다.
- [0484] 140. 구체예 137의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하고, 여기서 상기 (a) 및 (b) 단계의 반복은 상기 (a) 및 (b) 단계의 제1 작업 시 표적과는 다른 표적과 접촉시키는 것을 더 포함한다.
- [0485] 141. 구체예 137의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득한 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하고, 상기 루프는 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 것이다.
- [0486] 142. 구체예 137의 방법에서, 상기 방법은 단계 (b)에서 획득한 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 루프를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함하고, 여기서 상기 루프는 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 것이고, 상기 (a) 및 (b) 단계의 반복은 상기 (a) 및 (b)의 제1 작업시 표적과는 상이한 표적과 접촉시키는 것을 더 포함한다.
- [0487] 143. 구체예 136-142 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화된 루프, 및 AB, CD 및 EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다.
- [0488] 144. 구체예 140-142 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 AB, CD, EF 루프로 이루어진 군에서 선택된 제1 무작위화된 루프, 및 BC, DE 및 FG 루프로 이루어진 군에서 선택된 상기 라이브러리에서 무작위화되지 않은 제2 루프를 포함한다.
- [0489] 145. 구체예 128-144 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득된 상기 단백질의 스캐폴드의 1 이상의 베타 스트랜드를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 더 포함한다.
- [0490] 146. 구체예 145의 방법에서, 상기 방법은 (b) 단계에서 획득된 상기 단백질의 스캐폴드의 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 베타 스트랜드를 무작위화하여 추가로 무작위화된 스캐폴드를 생성시키고, 상기 추가로 무작위화된 스캐폴드를 사용하여 (a) 및 (b) 단계를 반복하는 것을 포함한다.
- [0491] 147. 표적에 결합하는 2 이상의 스캐폴드를 획득하는 방법으로서, 상기 방법은 스캐폴드:표적 리간드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체예 38의 라이브러리와 표적 리간드를 접촉시키는 단계, (b) 가교제로 상기 스캐폴드를 결합시키는 단계로서, 여기서 상기 스캐폴드의 가교결합은 검출가능한 반응을 유도하는 것인 단계, 및 (c) 복합체로부터, 표적에 결합한 상기 스캐폴드를 획득하는 단계를 포함한다.
- [0492] 148. 구체예 147의 방법에서, 상기 스캐폴드는 동일한 에피토프를 인식한다.
- [0493] 149. 구체예 147의 방법에서, 상기 스캐폴드는 상이한 에피토프를 인식한다.

- [0494] 150. 구체예 147의 방법에서, 상기 가교제는 항체, 항체 단편, 이량체화 모티프, 화학적 가교결합제, 결합 펩티드, 또는 에피토프 태그로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0495] 151. 샘플에서 화합물을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 화합물:스캐폴드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체예 112의 스캐폴드와 상기 샘플을 접촉하는 단계, 및 상기 복합체를 검출하여 상기 샘플 내 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0496] 152. 샘플에서 화합물을 포획하는 방법으로서, 상기 방법은 화합물:스캐폴드 복합체를 형성하는 조건 하에서, 구체예 112의 고정화 스캐폴드와 상기 샘플을 접촉하는 단계, 및 상기 고정화 스캐폴드를 분리하여, 상기 샘플에서 상기 화합물을 포획하는 단계를 포함한다.
- [0497] 153. 구체예 101 또는 102의 스캐폴드를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 15분 이상 동안 70℃ 이하로 상기 스캐폴드를 함유하는 조성물을 가열하는 단계, 및 원심분리를 통해 응집된 화합물을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0498] 154. 구체예 101 또는 102의 스캐폴드를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 스캐폴드를 함유하는 조성물을 pH 3.0 또는 pH 3.5 또는 pH 4.0, 또는 pH 4.5, 또는 pH 5.0으로 조정하는 단계; 1-30분간 50℃, 또는 55℃, 또는 60℃, 또는 65℃, 또는 70℃에서 최종 조성물을 가열하는 단계; 및 후속하여 원심분리를 통해 응집된 화합물을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0499] 155. 구체예 100-124 중 어느 하나의 스캐폴드를 포함하는 발열원 무함유, 멸균 조성물.
- [0500] 156. 구체예 100-124 중 어느 하나의 스캐폴드를 포함하는 약학 조성물.
- [0501] 157. 환자에서 질환을 예방, 치료 또는 완화하는 방법으로서, 환자에게 구체예 156의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0502] 158. 환자에서 질환 진행을 모니터링하는 방법으로서, 상기 모니터링을 필요로하는 환자에게 구체예 156의 조성물을 투여하는 단계; 상기 환자에서 조성물을 영상화하는 단계; 및 상기 환자를 평가하는 단계를 포함한다.
- [0503] 159. 구체예 157 또는 158의 방법에서, 상기 질환은 자가면역 질환, 염증성 질환, 증식성 질환, 감염성 질환, 호흡기 질환, 위장 질환, 당뇨병, 루푸스, 또는 비만증이다.
- [0504] 160. 본 발명의 규모조정가능한 방법으로서, 상기 방법에 의한 구체예 1-47 또는 100-124 중 어느 하나의 스캐폴드의 생산 효율이 1 g/L이다.
- [0505] 161. 구체예 160의 방법에서, 상기 방법은 방법에서 사용된 배양 배지로부터 정제된 스캐폴드를 포함한다.
- [0506] 162. 구체예 1-47 또는 100-124 중 어느 하나의 스캐폴드를 제조하는 방법으로서, 상기 스캐폴드는 생산되어 배양 배지로 분리된다.
- [0507] 163. 구체예 162의 방법에서, 상기 방법은 oppA 신호 펩티드(서열 번호 227)를 포함하는 발현 벡터를 사용하는 것을 포함한다.
- [0508] 164. 구체예 162의 방법에서 획득한 무세포 물질을 사용하여 표적과 스캐폴드의 결합을 분석 또는 검출하는 방법.
- [0509] 165. 구체예 162의 방법으로 제조된 스캐폴드를 정제하는 방법.
- [0510] 166. 구체예 1의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 TRAIL-R2에 특이적으로 결합한다.
- [0511] 167. 구체예 166의 스캐폴드에서, 상기 TRAIL-R2는 인간 유래이다.
- [0512] 168. 구체예 166의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 2F4, 5B10, 10D9, 6F11, 8B3, 5E5, 2Hb, 7G11, 6C7, 1E03, 2B04, 1C12, 1A03, 1C10, 1B12, 2G03, 2D3, 1C06, 2F08, 1B04, 3B11, 1D8, 2A12, 1E05, 2F02, 1H05, 2A11, 또는 1G11에서 선택되는 TRAIL-R2 결합 스캐폴드에서 유래된 서열을 포함한다.
- [0513] 169. 구체예 166의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 다량체 스캐폴드이다.
- [0514] 170. 구체예 168의 스캐폴드에서, 상기 다량체 스캐폴드는 2 이상의 스캐폴드 도메인을 포함한다.
- [0515] 171. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 2 이상의 2 스캐폴드 도메인은 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0516] 172. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 2 이상의 스캐폴드 도메인은 동일한 에피토프에 결합한다.

- [0517] 173. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 IgG 분자에서 유래한 Fc 영역에 연결된다.
- [0518] 174. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 IgG 분자에서 유래한 CH1 영역에 연결된다.
- [0519] 175. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 IgG 분자에서 유래한 CH2 영역에 연결된다.
- [0520] 176. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 IgG 분자에서 유래한 힌지 영역에 연결된다.
- [0521] 177. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 IgG 분자에서 유래한 C카파 또는 C람다 영역에 연결된다.
- [0522] 178. 구체예 170의 스캐폴드에서, 1 이상의 스캐폴드 도메인은 2D3 또는 1C12이다.
- [0523] 179. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자에서 유래한 힌지 영역에 연결된 1C12를 포함한다.
- [0524] 180. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자에서 유래한 힌지 영역에 연결된 2D3을 포함한다.
- [0525] 181. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자에서 유래한 CH1 영역에 연결된 1C12를 포함한다.
- [0526] 182. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자에서 유래한 CH1 영역에 연결된 2D3을 포함한다.
- [0527] 183. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자의 C카파 영역에 연결된 1C12를 포함한다.
- [0528] 184. 구체예 170의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 IgG 분자의 C카파 영역에 연결된 2D3를 포함한다.
- [0529] 185. 구체예 166-184 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 및 198로 이루어진 군에서 선택된 BC 루프 서열을 포함한다.
- [0530] 186. 구체예 166-184 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 및 199로 이루어진 군에서 선택된 DE 루프 서열을 포함한다.
- [0531] 187. 구체예 166-184 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 서열 번호 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 및 200으로 이루어진 군에서 선택된 FG 루프 서열을 포함한다.
- [0532] 188. 구체예 166-188 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 결합 시 TRAIL-R2 수용체를 작동시킨다.
- [0533] 189. 구체예 166-189 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 결합시 TRAIL와 TRAIL-R2 수용체의 결합을 모방한다.
- [0534] 190. 구체예 166-190 중 어느 하나의 스캐폴드에서, 상기 스캐폴드는 결합시 TRAIL-R2 수용체를 이량체화하는 작용을 한다.
- [0535] 191. TRAIL-R2 수용체를 작동시키는 방법으로서, 구체예 166-190 중 어느 하나의 스캐폴드와 TRAIL-R2 수용체를 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0536] 192. 구체예 191의 방법에서, 상기 스캐폴드는 TRAIL과 TRAIL-R2의 결합을 모방한다.
- [0537] 193. 구체예 192의 방법에서, 상기 스캐폴드는 TRAIL-R2 수용체를 이량체화하여 작용한다.
- [0538] 194. 세포 생존능을 감소시키거나 억제하는 방법으로서, 구체예 166-190 중 어느 하나의 스캐폴드와 세포 상의 TRAIL-R2 수용체를 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0539] 195. 세포에서 아폽토시스를 활성화하거나 촉진하는 방법으로서, 구체예 166-190 중 어느 하나의 스캐폴드와 세포 상의 TRAIL-R2 수용체를 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0540] 196. 구체예 166-190 중 어느 하나의 스캐폴드 또는 이의 조성물을 투여하여, 암을 예방, 치료, 완화 또는 관리하는 방법이 필요한 환자에서 암을 예방, 치료, 완화 또는 관리하는 방법.
- [0541] 197. 구체예 196의 방법에서, 상기 암은 편평세포 암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암(NSCLC), 비호지킨 림프종, 아세포종, 위장암, 신장부 암, 난소암, 간암, 위암, 방광암, hepatoma, 유방암, 결장암, 직결장암, 췌장암, 자궁내막 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 두경부암, 폐암,



선암종, 신장 세포 암종, 또는 간세포 암종에서 선택된다.

- [0542] 198. 재조합 폴리펩티드 스캐폴드로서,
- [0543] I. A, B, C, D, E, F 및 G로 명명된 7개의 베타 스트랜드 도메인을 포함하고;
- [0544] II. 6개 루프 영역과 연결되며, 여기서 루프 영역은 각각의 베타 스트랜드를 연결하고 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프로 명명되며;
- [0545] III. 여기서 1 이상의 루프 영역은 서열 번호 1-32 또는 68-88 중 어느 하나의 동족 루프 영역의 비천연 발생 변이체이고;
- [0546] IV. 1 이상의 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 1-32 또는 68-88 중 어느 하나의 동족 베타 스트랜드 도메인과 상동성이 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상이다.
- [0547] 199. 구체예 198의 스캐폴드에서, 상기 베타 스트랜드 도메인은 서열 번호 1-32 또는 68-88 중 어느 하나에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0548] 200. 구체예 199의 스캐폴드에서, 상기 베타 스트랜드 도메인은 하기 a 또는 b의 아미노산 서열을 포함한다:
- [0549] a. A 베타 스트랜드(서열 번호 228), B 베타 스트랜드(서열 번호 229), C 베타 스트랜드(서열 번호 230), D 베타 스트랜드(서열 번호 231), E 베타 스트랜드(서열 번호 232), F 베타 스트랜드(서열 번호 233) 및 G 베타 스트랜드(서열 번호 234)에 대한 아미노산 서열; 또는
- [0550] b. A 베타 스트랜드(서열 번호 235), B 베타 스트랜드(서열 번호 229), C 베타 스트랜드(서열 번호 230), D 베타 스트랜드(서열 번호 236), E 베타 스트랜드(서열 번호 232), F 베타 스트랜드(서열 번호 237) 및 G 베타 스트랜드(서열 번호 234)에 대한 아미노산 서열.
- [0551] **서열**
- [0552] Tn3 야생형 루프(제1 구체예):
- [0553] AB (서열 번호 201) = DVTDTT
- [0554] BC (서열 번호 202) = FKPLAEIDG
- [0555] CD (서열 번호 203) = KDVPGRD
- [0556] DE (서열 번호 204) = LTEDENQ
- [0557] EF (서열 번호 205) = GNLKPD
- [0558] FG (서열 번호 206) =RRGDMSSNPA
- [0559] Tn3 야생형 베타 스트랜드(제1 구체예):
- [0560] A (서열 번호 228) = RLDAPSQIEVK
- [0561] B (서열 번호 229) = ALITW
- [0562] C (서열 번호 230) = IELTYGI
- [0563] D (서열 번호 231) = TTID
- [0564] E (서열 번호 232) = YSI
- [0565] F (서열 번호 233) = TEYEVSLIS
- [0566] G (서열 번호 234) = KETFTT
- [0567] Tn3 야생형 루프(제2 구체예):
- [0568] AB (서열 번호 207) = KDVTDTT
- [0569] BC (서열 번호 202) = FKPLAEIDG
- [0570] CD (서열 번호 203) = KDVPGRD

- [0571] DE (서열 번호 208) = TEDENQ
- [0572] EF (서열 번호 209) = GNLKPDTE
- [0573] FG (서열 번호 206) =RRGDMSSNPA
- [0574] Tn3 야생형 베타 스트랜드(제2 구체예):
- [0575] A (서열 번호 235) =RLDAPSQIEV
- [0576] B (서열 번호 229) = ALITW
- [0577] C (서열 번호 230) = IELTYGI
- [0578] D (서열 번호 236) = TTIDL
- [0579] E (서열 번호 232) = YSI
- [0580] F (서열 번호 237) = YEVSLIS
- [0581] G (서열 번호 234) = KETFTT

#### 단백질 서열

대문자는 Tn3 구조 모티프에 해당하는 것이며, 소문자는 합성 cDNA 및 발현 벡터에서 유래된 측접 서열 부속부이다.

#### 1P:

서열 번호 5

aaLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKP  
GVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTgggtlehhhhhh

서열 번호 6

LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG  
VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT

#### 2P:

서열 번호 7

aaPTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPG  
VQYNITIYAVEENQUESTPVVIQQETgggtlehhhhhh

서열 번호 8

PTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGV  
QYNITIYAVEENQUESTPVVIQQET

#### 3P:

서열 번호 9

aaPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYV  
YTIQVLRDGGQERDAPIVNKVVTgggtlehhhhhh

서열 번호 10

PYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYVY  
TIQVLRDGGQERDAPIVNKVVT

#### 4P:

서열 번호 11

aaPPIALNWTLLNVSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETHK  
KMMDPILTTSPVYSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLPgggtlehhhhhh

서열 번호 12

PPIALNWTLLNVSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETHKWK  
MMDPILTTSPVYSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLP

#### 5P:

서열 번호 13

aaPPSLNVTKDGDYSYLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHS  
MALPALEPSTRYWARVRVTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTEgggtlehhhhhh

[0582]

서열 번호 14

PPSLNVTKDGDYSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSM  
ALPALEPSTRYWARVRVTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTE

**6P:**

서열 번호 15

aaPPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKIV  
TILHKGFSASVRITLQNDHSLASSWASAEHHAaggglehhhhhh

서열 번호 16

PPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKIVTI  
LHKGFSASVRITLQNDHSLASSWASAEHHA

**7P:**

서열 번호 17

aaLSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPTLEPHRPLLQRELMVPGTRHS  
AVLRDLRSGTLYSLTLYGLRGPHKADSIQGTARTgggglehhhhhh

서열 번호 18

LSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPTLEPHRPLLQRELMVPGTRHSA  
VLRDLRSGTLYSLTLYGLRGPHKADSIQGTART

**8P:**

서열 번호 19

aaLRALNLTEGFAVLHWKPPQNPDYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVL  
HTNYTATVRGLRGPNTSPASITFTTgggglehhhhhh

서열 번호 20

LRALNLTEGFAVLHWKPPQNPDYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVLHT  
NYTATVRGLRGPNTSPASITFTT

**9P:**

서열 번호 21

aaLEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTS  
YNARLQAMWQGSLPPVSTSFTTgggglehhhhhh

서열 번호 22

LEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTSY  
NARLQAMWQGSLPPVSTSFTT

**10P:**

서열 번호 23

aaIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEENQYSIGNLKPD  
TEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTTgggglehhhhhh

서열 번호 24

IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEENQYSIGNLKPD  
EYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

[0583]

**11P:**

서열 번호 25

aaPKFTKCRSPERETFSCHWTDEVHHGKTNLGPQLFYTRRNTQEWQEWKECPDYV  
SAGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLTSNNGTVDEKCFSVgggtlehhhhhh

서열 번호 26

PKFTKCRSPERETFSCHWTDEVHHGKTNLGPQLFYTRRNTQEWQEWKECPDYVS  
AGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLTSNNGTVDEKCFSV

**12P:**

서열 번호 27

aaPSGFPQNLHVTGLTTSTTELAWDPPVLAERNRIISYTVVFRDINSQQELQNITTD  
RFTLTGLKPDTTYDIKVRWTSKSGSPLSPSIQSRTMPVEgggtlehhhhhh

서열 번호 28

PSGFPQNLHVTGLTTSTTELAWDPPVLAERNRIISYTVVFRDINSQQELQNITTDTRF  
TLTGLKPDTTYDIKVRWTSKSGSPLSPSIQSRTMPVE

**13P:**

서열 번호 29

aaPKPPIDLVTETTATSVTLTWDSGNSEPVTTYGIQYRAAGTEGPFQEVDPVATTRY  
SIGGLSPFSEYAFRVLAVNSIGRGPPEAVRARTGEQAgggtlehhhhhh

서열 번호 30

PKPPIDLVTETTATSVTLTWDSGNSEPVTTYGIQYRAAGTEGPFQEVDPVATTRYSI  
GGLSPFSEYAFRVLAVNSIGRGPPEAVRARTGE

**14P:**

서열 번호 31

aaLSPPRNLRISNVGSNSARLTWDPTSRQINGYRIVYNNADGTEINEVEVDPITTFPLKG  
LTPLTEYTIAIFSIYDEGQSEPLTGVTFTgggtlehhhhhh

서열 번호 32

LSPPRNLRISNVGSNSARLTWDPTSRQINGYRIVYNNADGTEINEVEVDPITTFPLKGL  
TPLTEYTIAIFSIYDEGQSEPLTGVTFT

**DNA 서열**

대문자는 Tn3 구조 모티프에 해당되는 것이고, 소문자는 측접 서열 부속부이다.

**1D:**

서열 번호 33

gccatggccgccCTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGG  
ATGCGCCGGCGGTGACCGTGCGCTATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGG  
CAATAGCCCGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGGCAGCAAAAGCACCGCGACCAT  
TAGCGGCCTGAAACCGGGCGTGGATTATACCATACCGTGTATGCGGTGACCGGC  
CGTGGCGATAGCCCGGCGAGCAGCAAACCGATTAGCATTAACCTATCGTACCggtgg  
cggtacc

[0584]

서열 번호 34

CTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGGATGCGCCG  
GCGGTGACCGTGCGCTATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGGCAATAGCC  
CGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGGAGCAAAAGCACCGCGACCATTAGCGGCC  
TGAAACCGGGCGTGGATTATACCATTAACCGTGTATGCGGTGACCGGCCGTGGCG  
ATAGCCCGGCGAGCAGCAAAACCGATTAGCATTAACATATCGTACC

**2D:**

서열 번호 35

gccatggcggccCCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGCGCTGGA  
GCCGTCCGCAGGCGCCGATTACCGGCTATCGTATTGTGTATAGCCCGAGCGTGGA  
AGGCAGCAGCACCGAACTGAACCTGCCGGAACCGCGAATAGCGTGACCCTGAG  
CGATCTGCAGCCGGGCGTGCACTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAAA  
CCAGGAAAGCACCCCGGTGGTGTATCAGCAGGAAACCGgtggcggtacc

서열 번호 36

CCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGCGCTGGAGCCGTCCG  
CAGGCGCCGATTACCGGCTATCGTATTGTGTATAGCCCGAGCGTGGAAGGCAGC  
AGCACCGAACTGAACCTGCCGGAACCGCGAATAGCGTGACCCTGAGCGATCTG  
CAGCCGGGCGTGCACTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAAAACAGGAA  
AGCACCCCGGTGGTGTATCAGCAGGAAACC

**3D:**

서열 번호 37

gccatggcggccCCGTATAACACCGAAAGTGACCGAAACCACCATTTGTGATTACCTGGAC  
CCCGGCGCCGCGTATTGGCTTTAAACTGGGCGTGCGTCCGAGCCAGGGCGGTGA  
AGCGCCGCGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAGCATTGTGGTGAGCGGCCTGAC  
CCCGGGCGTGGAATATGTGTATACCATTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGT  
GATGCGCCGATTGTGAACAAAGTGGTGACCgtggcggtacc

서열 번호 38

CCGTATAACACCGAAAGTGACCGAAACCACCATTTGTGATTACCTGGACCCCGGCG  
CCGCGTATTGGCTTTAAACTGGGCGTGCGTCCGAGCCAGGGCGGTGAAGCGCCG  
CGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAGCATTGTGGTGAGCGGCCTGACCCCGGGC  
GTGGAATATGTGTATACCATTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGTGATGCGC  
CGATTGTGAACAAAGTGGTGACC

**4D:**

서열 번호 39

gccatggcggccCCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGG  
TATTATGCCGATATTCAGGTGCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAG  
AAAGGCTGGATGGTGCTGGAATATGAACTGCAGTATAAAGAAGTGAATGAAACC  
AAATGGAAAATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTG  
AAAGTGGATAAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAAACAGCGTAATAGCGGC  
AATTATGGTGAATTTAGTGAAGTCCTGTATGTTACCCTGCCGgtggcggtacc

[0585]



서열 번호 40

CCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGGTATTCATG  
CCGATATTCAGGTGCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAGAAAAGGCT  
GGATGGTGTGGAATATGAACTGCAGTATAAAGAAGTGAATGAAACCAAATGGA  
AAATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTGAAAGTGG  
ATAAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAAACAGCGTAATAGCGGCAATTATG  
GTGAATTTAGTGAAGTCCTGTATGTTACCCTGCCG

**5D:**

서열 번호 41

gccatggccgccCCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCTGC  
GCTGGGAAACCATGAAAATGCGCTATGAACATATTGATCATACCTTTGAAATTCA  
GTATCGCAAAGATACCGCGACCTGGAAAGATAGCAAAACCGAAACCTGCAGAA  
CGCGCATAGCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCGCG  
TGTGCGTGTGCGTACCAGCCGTACCGGCTATAATGGCATTGAGCGAATGGAGC  
GAAGCGCGTAGCTGGGATACCGAAAggtggcggtacc

서열 번호 238

CCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCTGCGCTGGGAA  
ACCATGAAAATGCGCTATGAACATATTGATCATACCTTTGAAATTCAGTATCGCA  
AAGATACCGCGACCTGGAAAGATAGCAAAACCGAAACCTGCAGAACGCGCATA  
GCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCGCGTGTGCGTGT  
GCGTACCAGCCGTACCGGCTATAATGGCATTGAGCGAATGGAGCGAAGCGCG  
TAGCTGGGATACCGAA

**6D:**

서열 번호 42

gccatggccgccCCGCCGGTGAACCTTACCATTAAAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCT  
GCTGCAGTGGAACCGAACCCGGATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATA  
TCAGTGAAAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGATTATGAAACCCGCATTACCGA  
AAGCAAACCTGGTGACCATCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATT  
CTGCAGAACGATCATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGAACTGCAT  
GCGggtggcggtacc

서열 번호 43

CCGCCGGTGAACCTTACCATTAAAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCTGCTGCAGT  
GGAAACCGAACC CGGATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATATCAGGTGA  
AAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGATTATGAAACCCGCATTACCGAAAGCAAAC  
TGGTGACCATCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATTCTGCAGAA  
CGATCATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGGAACTGCATGCG

**7D:**

서열 번호 44

gccatggccgccCTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGG  
AAGCGCCGCCGGGCGCGTTTGATAGCTTTCTGCTGCGTTTGGCGTGCCGAGCCC  
GAGCACCTTGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCTGCAGCGTGAACCTGATGGTGCC  
GGGCACCCGTCATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCGTATAGC  
CTGACCCTGTATGGCCTGCGTGGCCCGCATAAAGCGGATAGCATTAGGGGCACC  
GCGCGTACCggtggcggtacc

[0586]

서열 번호 45

CTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGGAAGCGCCG  
CCGGGCGCGTTTGATAGCTTTCTGCTGCGTTTGGCGTGCCGAGCCCGAGCACCC  
TGGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCTGCAGCGTGAACTGATGGTGCCGGGCACCC  
GTCATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCTGTATAGCCTGACCCT  
GTATGGCCTGCGTGGCCCGCATAAAGCGGATAGCATTCAGGGCACCGCGCGTAC  
C

8D:

서열 번호 46

gccatggcggccCTGCGCGCGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAA  
ACCGCCGAGAACCCGGTGGATACCTATGATATTCAGGTGACCGCGCCGGGCGC  
GCCGCCGCTGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGCGGTGGATTATCCGCTGCATGA  
TCTGGTGCTGCATACCAACTATAACCGCGACCGTGCGTGGCCTGCGCGGCCCGAAT  
CTGACCAGCCCGGCGAGCATTACCTTTACCACCggtggcggtacc

서열 번호 47

CTGCGCGCGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAAACCGCCGC  
AGAACCCGGTGGATACCTATGATATTCAGGTGACCGCGCCGGGCGCGCCGCCGC  
TGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGCGGTGGATTATCCGCTGCATGATCTGGTGC  
TGCATACCAACTATAACCGCGACCGTGCGTGGCCTGCGCGGCCCGAATCTGACCAG  
CCCGGCGAGCATTACCTTTACCACC

9D:

서열 번호 48

gccatggcggccCTGGAAGCGAAAGAAAGTGACCCCGCGTACCGCGCTGCTGACCTGGA  
CCGAACCGCCGGTGCGCCCGGGGTTATCTGCTGAGCTTTCATACCCCGGGCGG  
CCAGACCCAGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCATTACCAGCCATCAGCTGCTGGG  
CCTGTTTCCGAGCACCACTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAG  
CCTGCTGCCGCCGGTGAGCACCAGCTTTACCACCggtggcggtacc

서열 번호 49

CTGGAAGCGAAAGAAAGTGACCCCGCGTACCGCGCTGCTGACCTGGACCGAACCG  
CCGGTGCGCCCGGGCGGGTTATCTGCTGAGCTTTCATACCCCGGGCGGCCAGACCC  
AGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCATTACCAGCCATCAGCTGCTGGGCCTGTTTCC  
GAGCACCACTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAGCCTGCTGCC  
GCCGGTGAGCACCAGCTTTACCACC

10D:

서열 번호 50

gccatggcggccATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGGTT  
TAAACCGCTGGCGGAAATTGATGGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGT  
GCCGGGCGATCGCACCACTTGATCTGACCGAAGATGAAAACAGTATAGCAT  
TGGCAACCTGAAACCGGATACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGG  
CGATATGAGCAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCggtggcggtacc

[0587]

서열 번호 51

ATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGC  
TGGCGGAAATTGATGGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCG  
ATCGCACCACCATTTGATCTGACCGAAGATGAAAACAGTATAGCATTGGCAACC  
TGAAACCGGATACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGGCGATATGA  
GCAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC

11D:

서열 번호 52

gccatggcggccCGGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTG  
CCATTGGACCGATGAAGTTCATCATGGCACCAAAAAATCTGGGCCCGATTGAGCTG  
TTTTATACCCGCCGTAATACCCAGGAATGGACCCAGGAATGGAAAGAATGCCCG  
GATTATGTTAGCGCGGGCGAAACAGCTGCTATTTTAAACAGCAGCTTTACCAGCA  
TTTGATTCCGTATTGCATTAACCTGACCAGCAACGGTGGCACCGTTGATGAAAA  
ATGCTTTAGCGTGggtggcggtacc

서열 번호 53

CCGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTGCCATTGGA  
CCGATGAAGTTCATCATGGCACCAAAAAATCTGGGCCCGATTGAGCTGTTTTATAC  
CCGCCGTAATACCCAGGAATGGACCCAGGAATGGAAAGAATGCCCGGATTATGT  
TAGCGCGGGCGAAAAACAGCTGCTATTTTAAACAGCAGCTTTACCAGCATTTGGATT  
CCGTATTGCATTAACCTGACCAGCAACGGTGGCACCGTTGATGAAAAATGCTTTA  
CGGTG

12D:

서열 번호 54

gccatggcagccCCGTCTGGTTTTCGCGAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAG  
CACCACCGAACTGGCGTGCGATCCGCCGGTGCTGGCGGAACGCAACGGCCGTAT  
TATTAGCTATACCGTGGTGTTTCGTGATATTAACAGCCAGCAGGAAGTGCAGAAC  
ATTACCACCGATACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACCTATG  
ATATTAAAGTGCGCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCGAGCA  
TTCAGAGCCCGACCATGCCGGTGGAAggtggcggtacc

서열 번호 55

CCGTCTGGTTTTTCGCGAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAGCACCACCG  
AACTGGCGTGGGATCCGCCGGTGCTGGCGGAACGCAACGGCCGTATTATTAGCT  
ATACCGTGGTGTTTCGTGATATTAACAGCCAGCAGGAAGTGCAGAACATTACCAC  
CGATACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACCTATGATATTAAA  
GTGCGCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCGAGCATTGAGAGC  
CGACCATGCCGGTGGAA

13D:

서열 번호 56

gccatggcggccCGGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACACCGCGACCA  
GCGTGACCCTGACCTGGGATAGCGGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTA  
TTCAGTATCGCGCGGCGGGCACCGAAGGTCCGTTTCAGGAAGTGGATGGCGTGG  
CGACCACCGTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTAGCGAATATGCGTTTCG  
CGTGCTGGCGGTTAATAGCATTGGCCGCGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGC  
GCGCACCGGCGAACAGGCGggtggcggtacc

서열 번호 57

CCGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACCACCGCGACCAGCGTGACC  
CTGACCTGGGATAGCGGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTATTTCAGTATC  
GCGCGCGCGGCACCGAAGGTCCGTTTCAGGAAGTGGATGGCGTGGCGACCAACC  
GTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTTAGCGAATATGCGTTTCGCGTGCTGGC  
GGTTAATAGCATTGGCCGCGGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGCGCGCACCGG  
CGAACAGGCG

**14D:**

서열 번호 58

gccatggcggccCTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATA  
GCGCGCGCCTGACCTGGGATCCGACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGT  
GTATAACAACGCCGATGGCACCGAAATTAACGAAGTGAAGTGGATCCGATTAC  
CACCTTTCCGCTGAAAGGCTGACCCCGCTGACCGAATATACCATTGCGATTTTT  
AGCATTTATGATGAAGGTCAGAGCGAACCGCTGACCGGTGTGTTTACCACCggtggc  
ggtacc

서열 번호 59

CTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATAGCGCGCGC  
CTGACCTGGGATCCGACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGTGTATAACA  
ACGCCGATGGCACCGAAATTAACGAAGTGAAGTGGATCCGATTACCACCTTTC  
CGCTGAAAGGCCTGACCCCGCTGACCGAATATACCATTGCGATTTTTAGCATTTA  
TGATGAAGGTCAGAGCGAACCGCTGACCGGTGTGTTTACCACC

야생형 Tn3 도메인 서열 번호 1

RLDAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSI  
GNLKPDTHEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

테나신 Tn3 스캐폴드 단백질 서열

서열 번호 60

AAIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKP  
DTEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLEHHHHHH

서열 번호 61

IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDT  
EYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

Synagis 결합 Tn3 변이체 SynBP01

단백질 서열

서열 번호 62

AAIEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLK  
PDTEYEVSLISVTEFGRRRSKETFTTGGGTLEHHHHHH

서열 번호 63

IEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDT  
TEYEVSLISVTEFGRRRSKETFTT

[0589]

이황화-안정화된 Tn3 (SS1-4)

서열 번호 64

(SS1):IECKDVDTDTTALCTWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNL  
KPDTEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

서열 번호 210

(SS2):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTCDLTGEDEGNQCSIG  
NLKPDTEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

서열 번호 65

(SS3):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNL  
KPDTEYCVSLISRRGDMSSNPAKECFTT

서열 번호 66

(SS4):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNL  
KPDTEYEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

서열 번호 67

(SS3+4):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIG  
NLKPDTEYCVSLICRRGDMSSNPAKECFTT

고세균에서 동정된 스캐폴드

아케오글로버스 펠기더스 DSM 4304

NCBI 기탁번호: NC\_000917

단백질 서열:

서열 번호 68

PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLS  
GLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSIMSFTT

스타필로써머스 마리너스 F1

NCBI 기탁번호: NC\_009033

단백질 서열:

서열 번호 2

SEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYASVNGSTTTFI  
DKNIVYSQTYYYKVSANNIVEGPKSNTASATPTSS

셀폴로버스 엑시도칼다리우스 DSM 639

NCBI 기탁번호: NC\_007181

단백질 서열:

1<sup>st</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 69

PPPKPVIRFAQAGNNSISLSWYDTNTSGYYIQWWSSIDNNKSTINVGNVSSYLFINLTN  
GVTYYFRIIPYNQAGNGTSSDIISLTPGAV

[0590]



**2<sup>nd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 70**

PDSPSVKVIIVGDRNATVIWSKPYNGGFPILGYLLTVKTDNSSYTINVGNVSKYTLTNL  
TPEVLYEVMVVAAYNKLGNSSPGIVNFVALTT

**3<sup>rd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 71**

LTTASISVSVYKKVNGVLISWNKTENTTYNLLISDKKGIHVNTTTNTSYFAYIPYGIY  
NVTIRATNQVGTNSTSFPIVFYIPFFI

**4<sup>th</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 72**

PLVKFSIGNNSILNLKWNNVTGATFYLVYVNTTLIANVTSDSYSLNLTPGFHVIRVVA  
ANPIYNSSPASLGILIQHSTSSIT

**셀폴로버스 솔파타리커스 P2**

NCBI 기탁번호: NC\_002754

단백질 서열:

**1<sup>st</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 73**

PLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNMGFNSSINVGNVTSYTVTGLKD  
GITYYFEVLAAYNSIGYSSPSSIIALTPASV

**2<sup>nd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 74**

PNPPQLVSVKYGNDNVTLNWLPTFSGGYLLGYVIVKNENSMVSSHFNSTSLTI  
SNLTPNVTYNVFIYAVNKLGNSSPLVLTVPITKA

**3<sup>rd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 75**

PITKASVFAFITKLGNGILVNWTTSPANITLLELYNPNGNLISQIAAIKGNSSYLFRVPQ  
GNYTLVIIASNSAGVSKYVYQVYYL

**4<sup>th</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 76**

PPASPQVSLIGFGNNLYISWNNEANVITYLVYVNNSLVYEGPSNSIVTNISNGTYLVK  
VIGVNPAGSSSPGIAVIHYTG DYVT

**셀폴로버스 토코다이 균주 7**

NCBI 기탁번호: NC\_003106

단백질 서열:

**1<sup>st</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 3**

PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKDG  
VTYYIQIVPYNSLGNSTPSDIISATPSSV

**2<sup>nd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 4**

PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAGE  
LYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKA

**3<sup>rd</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 77**

ASKANLTVTVYKKINGFLVSWNSTSKAKYILTVSKENVLLNVSTTNTSYFVKVPFG  
VYNISLEAVNIVGITKYAFILIIYIQ

[0591]

4<sup>th</sup> Tn3 구조 모티프, 서열 번호 78

PASPTVNWSTLNTVSLNWSKVSGAEYYLIYDNGKLITNTTNTAFTFNLTIQNEIEV  
YAANAYYKSAPYIINDVRNYIVV

실시예 5의 단백질 서열

대문자는 Tn3 구조 모티프에 해당하는 것이고, 소문자는 합성 cDNA 및 발현 벡터에서 유래하는 측접 서열 부속부이다.

>아캐오글로버스

서열 번호 79

aaPAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMIT  
LSGLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSSIMSFTTgggtlehhhhhh

서열 번호 80

PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLS  
GLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSSIMSFTT

>스타펠로썬머스 마리너스

서열 번호 81

aaSEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYYASVNGSTTT  
FIDKNIVYSQTYYYKVSANVIVEGPKSNTASATPTSSgggtlehhhhhh

서열 번호 82

SEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYYASVNGSTTTFI  
DKNIVYSQTYYYKVSANVIVEGPKSNTASATPTSS

>셀폴로버스 솔파타리키스

서열 번호 83

aaPLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNNMGFNSSINVGNVTSYTVTGL  
KDGITYYFEVLAYNISIGYSSPSSIIALTPASVgggtlehhhhhh

서열 번호 84

PLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNNMGFNSSINVGNVTSYTVTGLKD  
GITYYFEVLAYNISIGYSSPSSIIALTPASV

>셀폴로버스 토코다이 1

서열 번호 85

aaPPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKD  
GVTTYIQIVPYNSLGNGTPSDIISATPSSVgggtlehhhhhh

서열 번호 86

PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKDG  
VTYYIQIVPYNSLGNGTPSDIISATPSSV

[0592]

>셀폴로버스 토코다이 2

서열 번호 87

aaPNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAG  
 ELYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKAgggtlehhhhhh

서열 번호 88

PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAG  
 ELYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKA

# **cDNA 서열**

>아케오로버스

서열 번호 89

gccatggcagccCCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCG  
 CCACCATTCGTTGGGATGTGAGCCTGGCGGCGAATAATCGCGTGCTGTTAGCAC  
 CAACAGCGATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGCGCGTGGGATAACAGCACCGATAG  
 CCCGATGATTACCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTAGCGTG  
 TATAGCTTTTCGTCCGGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCT  
 TTACCACCGgtggcggtacc

서열 번호 90

CCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCGCCACCAT  
 CGTTGGGATGTGAGCCTGGCGGCGAATAATCGCGTGCTGTTAGCACCAACAGC  
 GATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGCGCGTGGGATAACAGCACCGATAGCCCGATG  
 ATTACCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTAGCGTGTATAGCT  
 TTCGTCCGGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCTTACCAC  
 C

>스타펠로썬머스

서열 번호 91

gccatggcggccAGCGAACCAGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTA  
 CCCTGACCTGGGATCCGCCGATTGATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCG  
 TATTTATCGTGGCACCAATAATAACAACCTGGAATATTATGCGAGCGTTAACGGC  
 AGCACCAACACCTTTATTGATAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTATTATA  
 AAGTGAGCGCGGTGAACAATATTGTGGAAGGCCCGAAAAGCAACACCGCGAGC  
 GCGACCCCGACCAGCAGCgtggcggtacc

서열 번호 92

AGCGAACCAGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTACCCTGACC  
 TGGGATCCGCCGATTGATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCGTATTTATC  
 GTGGCACCAATAATAACAACCTGGAATATTATGCGAGCGTTAACGGCAGCACCA  
 CCACCTTTATTGATAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTATTATAAAGTGAG  
 CGCGGTGAACAATATTGTGGAAGGCCCGAAAAGCAACACCGCGAGCGCGACCCC  
 GACCAGCAGC

[0593]

>에스. 솔파타리쿠스 1

서열 번호 93

gccatggcgcgccCGCTCCCACCGAAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCG  
TGACCCTGGGCTGGAACCCGGTGCGTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTG  
GAACAATATGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGTGGGTAATGTGACCAGCTATACC  
GTGACCGGCCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTTGAAGTGCTGGCCTATAACA  
GCATTGGTTATAGCAGCCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGCGAGCGTGggt  
ggcgggtacc

서열 번호 94

CCGCTCCCACCGAAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCGTGACCCTG  
GGCTGGAACCCGGTGCGTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTGGAACAATA  
TGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGTGGGTAATGTGACCAGCTATACCGTGACCGG  
CCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTTGAAGTGCTGGCCTATAACAGCATTGGT  
TATAGCAGCCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGCGAGCGTG

>에스. 토코다이 1

서열 번호 95

gccatggcgcgccCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCA  
TTACCGTGAAATGGTATGATACCAATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAG  
CAATTTAGCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGGTAACGTGACCAGCTATACCATT  
AAACATCTGAAAGATGGCGTGACCTATTATATTTCAGATTGTGCCGTATAACAGCC  
TGGGCAATGGCACCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTTggtggcg  
gtacc

서열 번호 96

CCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCATTACCGTG  
AAATGGTATGATACCAATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAGCAATTTA  
GCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGGTAACGTGACCAGCTATACCATTAAACATCT  
GAAAGATGGCGTGACCTATTATATTTCAGATTGTGCCGTATAACAGCCTGGGCAAT  
GGCACCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTT

>에스. 토코다이 2

서열 번호 97

gccatggcgcgccCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAAATTGGCAATCTGAATGCGAC  
CCTGACCTGGTATGATACCTTTAATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGT  
ATGTGAACGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAACATTACCAGCTATGTGCTGACCA  
ATCTGACCGCCGGTGAACGTGTATACCATTGAACTGATTGCGTATAACAAAATCGG  
CAACAGCAGCATTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCGggtggcggtacc

서열 번호 98

CCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAAATTGGCAATCTGAATGCGACCCCTGACCT  
GGTATGATACCTTTAATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGTATGTGAA  
CGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAACATTACCAGCTATGTGCTGACCAATCTGACC  
GCCGGTGAACTGTATACCATTGAACTGATTGCGTATAACAAAATCGGCAACAGC  
AGCATTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCG

[0594]

백터 서열

서열 번호 99

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT  
GGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT  
TGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG  
ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT  
GTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTCCTGTTTTGCTCACCCAGAA  
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCTCGAGTGGGTAC  
ATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC  
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT  
ATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACT  
TGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA  
GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACT  
TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGG  
GGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC  
AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA  
ACTATTAACCTGGCGAACTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGG  
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT  
GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC  
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG  
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC  
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT  
GATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAA  
TCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC  
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT  
GCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAG  
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAA  
TACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCA  
CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG  
ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGC  
AGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCATACAGCCAGCTTGGAGCGAACGA  
CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTC  
CCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGCTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA  
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC  
GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC  
GGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTG  
CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC  
GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCG  
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCT  
CCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGTTTTCCGACTGG  
AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCA  
CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG  
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAG  
CCTTTTTTTTGGAGATTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTT  
GTTCTTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAAGTAAAAGATGTGA  
CCGATACACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGCTGGCGGAAATTGATGGCTG  
TGAAGTACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCGATCGCACCAACCATAGATCTG  
ACCGAAGATGAAAACAGTATAGCAATTGGTAACCTGAAACCGGATACCGAATAT  
GAAGTGAGCCTGATTTGCCGTGCTGGCGATATGAGCGGCGCGCCGGCGAAAGAA  
ACCTTTACCACCGGTGGCGGTACCCCAACCGACCCGCCAACCACTCCACCAACTG

[0595]



ATAGCCCAGGCGGTACTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGAT  
GGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACA  
GTCTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATC  
GATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTG  
ATTTTGCTGGCTCTAATTCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACC  
TTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTC  
GCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA  
ATAAACTTATCCGTGGTGCTTTTGCCTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTATGTAT  
GTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAAGAATTTCGACG  
GTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG  
TCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAG  
ATTGTACTGAGACTGCACCATAAAATTTGTAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCG  
CGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAA  
AATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTT  
TGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA  
ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTT  
TGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGAT  
TTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAA  
GCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA  
ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCT  
TTGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCAT  
CAGGCGCATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG  
GGCCTCTTCGTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATT  
AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGCGCCAG  
TTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGA

[0596]

클론	BC 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
SYNAGIS® 특이적 결합 스캐폴드				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKIIGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVGQKSNPA	104
4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110
리소자임 특이적 결합 스캐폴드				
1	FKPLAEIDG	111	YNRYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	111	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAIRS	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHR TG	124	HTPLGHLRS	125

[0597]

TRAIL-R2 2-루프 결합인자

클론 명칭	BC 루프	서열 번호.	FG 루프	서열 번호.
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMSGAPA	127
5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCQKTG	130	FKLTGFLYS	131
6F11	SPSVARMLTGT	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFSNPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDSHIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYIQG	142	AKLTGWLCS	143

[0598]

TRAIL-R2 3-루프 결합인자

클론	BC 루프	서열 번호	DE 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYYVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTGT	156	QSSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRQGGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161
2G03	SPGPLLRLHTTG	162	RPPIRA	163	RNRPQQSNPA	164
2D3	SPGGFQKITGT	165	VNRRNH	166	LTYPKARAI	167
1C06	SPRMYTWIQTGT	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HVWQVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTGT	174	HGLQRV	175	AKICGHLVS	176
3B11	SPCQLLALITGT	177	NSRHYH	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCQMLSSLTGT	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182
2A12	SPCCQEFTLTGT	183	HNHHHH	184	ITDAGNKSNA	185
1E05	SPCSPCQLVTGT	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNPA	188
2F02	SPSRGGTSLTGT	189	DQVRAT	190	HTNSGQPSNPA	191
1H05	SPGMFDDQVRTGT	192	GKYWER	193	RNQGQHQHS	194
2A11	SPPFRAGHVTGT	195	VTARCQ	196	TTGNGLRSNPA	197
1G11	SWAQANPGG	198	WHSITF	199	KTKVQSSNPA	200

[0599]

[0600]

## 실시예

[0601]

본 발명을 이제 하기 실시예들을 참조하여 설명한다. 이들 실시예들은 설명 목적으로만 제공되는 것이고, 본 발명을 이들 실시예에 제한해서는 안되며, 본 명세서에서 제공되는 설명들의 결과로서 증명되는 모든 그리고 임의의 변동 사항을 포함시키는 것으로 이해해야 한다.

[0602]

## 실시예 1. 후보 스캐폴드의 재조합 발현

[0603]

이 실시예는 후보 스캐폴드를 폴리아크릴아미드 겔(도 1) 상에서 쿠마시로 염색시 숙주 단백질 백그라운드와 대비하여 눈에 보이는 충분한 양으로 이.콜라이에서 재조합 발현시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 도 1에는 후보 스캐폴드를 발현하는 미정제 이.콜라이를 PAGE 분석한 도면을 도시한 것이다. 후보 스캐폴드 중 일부는 높은 발현 수준(예를 들어, 레인 3, 4, 5 및 10)을 나타내었고 후속 전개를 위해 선택되었다. 구체적으로, 레인 3은 피브로넥틴 III의 제6 도메인을 나타내고, 레인 4는  $\beta$ -공통 수용체 유래 스캐폴드를 나타내며, 레인 5는 성장 호르몬 수용체 유래 후보 스캐폴드이고, 레인 10은 Tn3 구조 모티프이다.

[0604]

## 재조합 발현

[0605]

인간-유래 Tn3 구조 모티프 서열의 패넬을 이.콜라이에서 이종 발현을 위해 선별하였다(표 1). 이들 단백질 각각을 코딩하고, 이.콜라이에서의 코돈 사용법으로 최적화된 합성 cDNA를 도식된 서열에 따라 GenScript Corporation에서 제공받았다. 각 cDNA는 축적한 Nco I 및 Kpn I 제한효소 부위를 함유하며, 이들 효소로 효소분해한 후, 삽입물을 상응하는 Nco I/Kpn I 부위를 함유하는 변형 pET22b 벡터(Novagen)에 클로닝하였다.

[0606]

다른 구체예에서, 벡터는 본 발명의 스캐폴드 조각을 용이하게 하는 임의 개수의 제한효소 부위를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 벡터는 1 이상의 제한효소 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 벡터는 1 이상의 루프 서열이 축적하는 1 이상의 제한효소 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 벡터는 NcoI, BglII, BstEII, AscI 및 KpnI로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 제한효소 부위를 포함한다. 추가 구체

예에서, 벡터는 리더 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 벡터는 링커 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 벡터는 서열 번호 99로 정해진 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0607] Tn3 구조 모티프 발현 플라스미드를 보유하는 BL21 DE3 이.콜라이의 형질전환체를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  카르베니실람을 함유하는 루리아 액체배지 중에 37°C에서 밤새 성장시켰다. 밤새 배양물을 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  카르베니실람과 2% w/v 포도당 함유 수퍼 액체배지에 20/1로 희석하고, 600 nm에서의 광학 밀도가 0.6이 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 이 시점에서, 200  $\mu\text{M}$ 의 IPTG를 부가하여 단백질 발현을 유도하였고, 배양물을 30°C 진탕 배양기로 옮겼다. 30°C에서 5시간 후, 소량의 배양 분취액을 분리하여 SDS-PAGE 분석하였고, 나머지 세포는 원심분리를 통해 펠렛화하고 -20°C에서 밤새 냉동시켰다. 전체 세포 용해물의 SDS-PAGE 분석 결과는 대략 10 kD의 겔 밴드로 판단시 Tn3 구조 모티프 3, 4, 5, 10이 이.콜라이에서 고도로 발현되었음을 보여주었다(도 1). 개별 실험에서, Tn3 구조 모티프 12가 과발현되는 것도 확인하였다.

[0608] 정제

[0609] 냉동시킨 세포 펠렛을 1 mg/ml 리소자임(Sigma)과 200 유닛/ml의 DNase(Invitrogen)를 함유하는 용해 완충액(50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, pH 8.0)에 재현탁시켰다. 초음파 처리를 통해 용해를 실시하고 투명해진 용해물은 원심분리 후 0.8  $\mu\text{m}$  필터를 통해 여과에 의해 세포 찌꺼기와 분리시켰다. 용해물을  $\text{Ni}^{2+}$ 로 하전된 HiTrap 킬레이팅 컬럼 상에 충전하고, 15 컬럼 부피의 세척 완충액(50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 세척하고 4 컬럼 부피의 용리 완충액(50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 용리하였다. 정제된 단백질의 농도는 Gill 및 von Hippel(Anal. Biochem. 182: 319, 1989)에 따라서 280 nm에서의 UV 흡광도를 통해 측정하였다. 다양한 Tn3 단백질의 정제후 수율을 하기 표1에 기록하였다. 인간 테나신 C(Tn3) 유래의 Tn3 구조 모티프는 최고 수율로서, 400 ml 배양물에서 정제된 Tn3을 110 mg으로 얻었다. 정제된 Tn3 샘플의 SDS-PAGE 분석결과는 도 2에 도시하였다.

표 1

[0610]

단백질 #	모단백질	발현도 (mg/L)	단백질 서열	DNA 서열
1	피브로넥틴	2 mg/ml	1P	1D
2	피브로넥틴	-	2P	2D
3	피브로넥틴	83	3P	3D
4	성장 호르몬 R	48	4P	4D
5	$\beta$ -공통 R	9	5P	5D
6	IL-5R	-	6P	6D
7	테나신 XB	-	7P	7D
8	테나신 XB	-	8P	8D
9	테나신 XB	-	9P	9D
10	테나신 C (Tn3)	265	10P	10D
11	성장 호르몬 R	-	11P	11D
12	PTPR-F	105	12P	12D
13	PTPR-F	3	13P	13D
14	XIV형 콜라겐	1	14P	14D

[0611] 특징규명

[0612] 가용성 Tn이 이.콜라이에서 높은 수율로 생성되었으므로, 이 단백질의 안정성 및 용액 특성을 분석하였다.

[0613] 안정성

[0614] 시차 주사 열량측정법(DSC)으로 Tn3의 열적 언폴딩을 평가하였다. pH 7.0의 20 mM 인산나트륨 중 1 mg/ml Tn3 샘플은 용점( $T_m$ )이 45°C로 나타났고(도 3a), 또한 열적 언폴딩은 동일 샘플을 냉각시키고 재가열시 중첩가능한 온도기록도로 증명된 바와 같이 가역적이었다. Tn3은 낮은 pH 또는 고염 농도에서 열적 언폴딩에 보다 안정하였다. pH 5.0인 20 mM 아세트산나트륨 중에서  $T_m$ 은 56°C였고, 1 M NaCl을 함유하는 pH 7.0의 20 mM 인산나트륨 중에서는 55°C였다.

[0615] 카오토로픽제에 의한 Tn3의 언폴딩을 고유의 형광발광을 통해 모니터링하였다. 상이한 농도의 우레아 또는 구아니딘 히드록로라이드를 함유하는 0.1 mg/ml Tn3 샘플을 20 mM 인산나트륨(pH 7.0), 또는 20 mM Tris(pH 7.

5)에 제조하였다. 280 nm의 여기 파장으로 Photon Technology QuantaMaster 분광형광계 상에서 형광발광 스펙트럼을 얻었다. 카오트로픽제 부재하에서, 폴딩된 Tn3 샘플은 319 nm에서 발광 최대값을 나타내었다. 우레아 또는 GuHCl에 의해 언폴딩된 Tn3은 348 nm로 최대값의 적색 이동이 일어났고, 또한 형광발광 강도가 증가하였다. pH 7.0 또는 7.5에서 언폴딩 중간점은 대략 2M 우레아(도 3b) 또는 0.8M GuHCl에서 발생하였다.

[0616] 단백질 가수분해에 대한 Tn3의 안정성은 써몰리신과 항온반응을 통해 실험하였다. 효소분해 완충액(10 mM CaCl<sub>2</sub> 함유 20 mM Tris pH 7.5) 중 Tn3(45 μM)을 실온에서 써몰리신(0.45 μM)과 항온반응시켰다. 상기 분해물의 분취액을 상이한 시점에서 분리하고, 과량의 EDTA를 부가하여 반응물을 급랭시켰다. 다음으로, 샘플을 SDS-PAGE를 통해 분석하였다(도 10g 중 WT 레인). 도 10g에 도시한 바와 같이, 야생형 Tn3 도메인은 써몰리신과 항온반응시 급격하게 분해되었다.

[0617] 다중각 광 산란법(SEC-MALS)과 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 Tn3이 용액 중에서 단량체로 존재하는지 확인하였다. 크기 배제 분리법은 0.75 ml/분의 유속으로 Bio-Rad Bio-Sil SEC 125-5 컬럼(7.8 x 300 mm)을 사용하여 수행하였다. 이종상은 인산 완충 염수(PBS)(pH 7.2)를 사용하였다. Wyatt Technologies Optilab rEX 시차 굴절률 검출기 및 Agilent 1100 Series 가변 파장 UV 검출기가 커플링된 Wyatt Technologies DAWN EOS 다중각 광산란 검출기를 사용하여 삼중 검출을 수행하였다. SEC-MALS 분석은 2 개월 동안 4℃에서 보관된 4.5 mg/ml Tn3의 단량체 함량이 97%인 것으로 나타났다(도 3c). 실험적으로 유도된 단량체 질량은 10.6 kDa으로서 산출된 10.8 kDa의 질량과 거의 동일하였다. Tn3 스캐폴드는 장기 보관한 경우에도 단량체로 유지되었다.

## [0618] 실시예 2. 루프 길이 및 서열 다양성의 확인

[0619] 이상적인 스캐폴드는 가용성과 안정성이 높은 것이다. 이상적인 스캐폴드는 구조 분석을 위해 충분히 작으면서, 다수의 변화를 수용하여 표적 결합이 용이하도록 충분히 커야한다. 비항체 단백질 스캐폴드의 식별 및 조작을 비롯하여 스캐폴드의 조합적 라이브러리 디자인이 수월하도록, 스캐폴드 서열의 생물정보학적 분석을 수행하였다.

[0620] Tn3 구조 모티프는 작고, 단량체이며, 가용성이고 안정하다. 또한, Tn3 구조 모티프는 수많은 상이한 인간 단백질에 존재하므로, 신규한 결합 기능을 도입하기 위해 활용할 수 있는, 다양성 영역뿐만 아니라 안정성과 폴딩에 중요한 보존성 잔기에 대한 중요한 정보를 제공한다. 서열 분석 결과, BC와 FG 루프에 상당한 변이성이 존재하였는데, 이러한 결과는 이들 루프가 안정성에 결정적이지 않다는 것을 시사한다. 이러한 성질을 이용하여, 이들 2 변수에서 일어나는 자연적인 변이성을 특징규명하고자 루프 길이와 서열 다양성을 분석하고 후소 단백질 스캐폴드를 동정하기 위한 전략을 개발하였다.

[0621] 이용가능한 단백질 데이터베이스를 검색하여 상당량의 Tn3 구조 모티프를 기반으로 하는 단백질 스캐폴드를 동정하였다. 후보 스캐폴드들은 Tn3 구조 모티프와 유사한 예측 구조, 즉 루프 영역에 의해 각각이 분리된 7개의 베타 스트랜드를 함유하였다. 베타 스트랜드와 루프 영역의 위치를 분석한 결과 구조가 입수불가한 후보 스캐폴드에 대한 루프 길이 및 서열 조성을 예측하는데 도움이 될 수 있는 다양성 패턴이 밝혀졌다. 이용가능한 단백질 데이터베이스에서 후보 스캐폴드의 BC, DE 및 FG 루프에 대한 길이 다양성 분석을 수행하였다.

[0622] 동정된 스캐폴드 서열을 편집하여 도 4, 5 및 6에 도시한 루프 길이 다양성 그래프가 개발되었다. 도 4a는 단백질 데이터뱅크(PDB)에서 51 서열을 분석하여 얻은 B 루프 길이 다양성을 도시한 도면이다. 이 그래프를 통해서, 이 서열 컬렉션의 BC 루프 길이는 약 8 아미노산 잔기 내지 약 26 아미노산 잔기 범위이며, 9 아미노산 잔기 루프가 가장 지배적이라는 것을 알 수 있다. 도 4b는 Swiss-prot 데이터베이스에서 동정한 397 서열을 분석하여 얻은 루프 길이 다양성을 도시한 도면이다. 이 그래프에서는, 이 서열 컬렉션 내 BC 루프 길이가 약 7 아미노산 잔기 내지 약 19 아미노산 잔기 범위이고, 12 아미노산 잔기 루프가 가장 우세하다는 것을 알 수 있다. 도 5는 PDB 데이터베이스에서 동정한 51 서열을 분석하여 얻은 FG 루프 길이 다양성을 도시한 도면이다. 이 그래프에서는, 상기 서열 컬렉션 내 FG 루프 길이가 약 6 아미노산 잔기 내지 약 18 아미노산 잔기 범위이고, 10 아미노산 잔기 루프가 가장 우세하다는 것을 알 수 있다. 본 명세서에서 기술한 것과 유사한 분석을 DE 루프 서열에 대해서 수행하였다. 도 6은 DE 루프 길이 다양성을 도시한 도면으로서, DE 루프의 길이가 약 4 아미노산 잔기 내지 약 17 아미노산 잔기 범위이고, 6 잔기 루프가 가장 우세한 길이라는 것을 알 수 있다.

[0623] 길이 다양성 이외에도, 보다 풍부한 루프 길이에 대해서, 공통 서열을 확립하고자 서열 다양성 분석을 수행하였다. 도 7a는 9 아미노산 잔기 BC 루프의 서열 다양성 그래프이다. 각 위치에서 특정 아미노산의 발생률(prevalence)은 각 위치에 대해 그 잔기를 함유하는 박스의 상대적 크기로 나타내었다. 예를 들어, 9 아미노산 잔기 루프의 위치 3에서는, 프롤린 또는 알라닌이 우선되었다. 또한, 위치 5에는, 글리신과 알라닌이 우세하였

다. 위치 7에는, 발린, 이소류신 및 페닐알라닌 아미노산이 우세하였다. 루프의 다른 위치는 서열 다양성이 보다 높았으며, 이러한 결과는 이들 위치가 Tn3 스캐폴드 라이브러리 제작시 완전한 무작위화에 적합할 수 있다는 것을 의미한다. 도 7b는 12 아미노산 잔기 BC 루프의 서열 다양성 그래프이다. 이 분석에서는, 예를 들어, 위치 3에서는 프롤린 잔기가 우선적이었다. 또한, 위치 1, 4, 5 및 12는 아미노산 잔기에 대한 선택성이 보이지 않았기 때문에 이들 위치가 완전 무작위화에 적합한 것으로 확인되었다. 도 8은 모든 길이의 FG 루프에 대한 서열 다양성 그래프이다. 이 분석을 통해, 위치 2는 주로 아스파라긴이 존재하였고, 위치 5는 글리신이 우선되었으며, 위치 7은 대체로 글리신 또는 세린이었다. 또한, 위치 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12 및 13은 아미노산 잔기에 대한 선택성이 보이지 않았기 때문에 라이브러리 제작시 완전 무작위화를 위한 후보 위치가 될 수 있다. 이러한 분석 결과는 서열 보존성을 보이는 위치에 루프 다양성을 한정하여 라이브러리에서 보다 많은 비율의 분자가 야생형과 유사한 안정성, 발현도 및 가용성을 유지할 수 있을 것이라는 이로인 가능성을 의미한다.

[0624] 실시예 3. 파지 디스플레이된 Tn3 라이브러리의 제작 및 특이적 결합인자의 선별

[0625] 상기에서 확립된 루프 및 서열 다양성을 통해서, 라이브러리를 개발하는 직접적인 접근법을 수행하였다. 보다 구체적으로, 루프 BC 및 FG를 제한적 방식으로 무작위화시켰다. BC 및 FG 루프에 대해 하기 전략을 채택하였다.

[0626] 라이브러리 디자인 및 제작

[0627] 서열 번호 10d(서열 부분 참조)의 NcoI-KpnI 단편에 상응하는, Tn3을 코딩하는 합성 cDNA를 유전자 III 코트 단백질의 단편에 융합되어 M13 박테리오파지의 표면 상에 Tn3 단백질이 디스플레이될 수 있도록 파지 디스플레이 벡터에 클로닝하였다. 이 구성체는 M13 유전자 III의 코돈 251-406과 Tn3의 C-말단 사이 20 아미노산 Thr/Pro-풍부 링커 서열을 코딩한다.

[0628] 무작위적으로 돌연변이된 Tn3의 라이브러리를 축퇴성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 Kunkel 돌연변이 유발법(Kunkel TA et al., Methods Enzym. 204, 125, 1991)을 통해 제조하였다. 3종의 축퇴성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 BC 루프의 코딩 서열을 무작위화하였고, FG 루프에 대해서도 3종의 축퇴성 올리고뉴클레오티드를 사용하였다(표 2). 이러한 전략을 통해서 천연 Tn3 도메인에 대해 기술한 다양성 패턴과 일관되게, Tn3 라이브러리에 특징적인 서열 및 루프 길이 다양성을 도입시켰다.

표 2

[0629]

Tn3 라이브러리 제작용 축퇴성 올리고뉴클레오티드			
올리고 칭	루프 무작위화	서열	서열 번호
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNKKGSTNNK NNKNNKGGCATTGAACTGACCTATGGC	211
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNK NNKNNKNNKACCGGCATTGAACTGACCTATGGC	212
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNK RRCRGCNKATTNNKGGTATTGAACTGACCTATGGC	213
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGAT태 3CNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKNNKAGCAAAGAAACCTTTACCACC	214
FG10	FG	TATGAAGTGAGCCTGAT태 3CNNKAMSNNKNNKNNK NNKRGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	215
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGAT태 3CNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	216

[0630] 무작위적으로 돌연변이된 파지미드 구성체로 일렉트로컴피턴트(electrocompetent) 이.콜라이를 형질전환시킨 후, M13K07 헬퍼 파지를 부가하고 배양물을 카르베니실륨을 함유하는 500 ml의 2YT 배지에 37℃에서 밤새 성장시켰다. 이어서 염수 폴리에틸렌 글리콜 용액에 의한 침전을 통해 배양 상등액으로부터 파지를 분리하고 소량의 PBS에 재현탁시켰다.

[0631] 특이적 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 스캐폴드에 대한 라이브러리의 패닝

[0632] SYNAGIS<sup>®</sup>를 부동태적으로 마이크로타이터 평판 웰 상에 흡착시키고, 자유 부위는 10 mg/ml BSA 또는 카제인을 함유하는 PBS로 블로킹시켰다. 파지 스톱을 20 mg/ml BSA 또는 카제인 및 0.1% v/v Tween-20을 함유하는 PBS로



회석하였다. 회석된 파지 샘플( $100 \mu\text{l}$ ;  $\sim 10^{12}$  파지)을 SYNAGIS<sup>®</sup>-코팅된 웰에 부가하고 적당하게 진탕하면서 실온에서 2시간 동안 항온반응시켰다. 다음으로, 평판을 0.1% v/v Tween 20을 함유하는 PBS로 10 내지 15회 세척하고, 결합된 파지를 0.1 M HCl의  $100 \mu\text{l}$ /웰로 용리한 후, 1.0 M Tris-HCl(pH 8.0)을 부가하여 중성화시켰다. 용리된 파지를 XL-1 블루 이.콜라이를 감염시켜 재증식시키고  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  카르베니실람 함유 50 ml 2YT 배지 중에서 M13K07 헬퍼 파지로 공동감염시킨 밤샘 배양물로부터 회수하였다. 총 4 라운드 동안 이러한 방식으로 SYNAGIS<sup>®</sup>에 대해 라이브러리를 패닝하였으며, 제1 및 제3 라운드에서는 블로킹 및 회석 완충액에 BSA를 사용하였고, 제2 및 제4 라운드에서는 카제인을 사용하였다.

[0633] SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 클론의 스크리닝

[0634] 최종 패닝 라운드 이후, 용리된 파지를 연속 회석하고 이를 사용하여 1시간 동안 XL-1 블루 이.콜라이를 감염시킨 후  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  카르베니실람 함유 LB 아가 상에서 밤새 평판배양하였다. 개별 콜로니를 선택하고 2YT/카르베니실람에  $37^\circ\text{C}$ 에서 밤새 성장시켰다. 이어서, 배양물을 1:100으로 2YT/카르베니실람에 회석하고 광학 밀도( $600 \text{ nm}$ )가 0.4가 될 때까지 성장시키고, M13K07 헬퍼 파지를 부가시킨 후 진탕하면서  $37^\circ\text{C}$ 에서 밤새 성장시켰다. 원심분리 후,  $50 \mu\text{l}$ 의 배양 상등액을 0.1% v/v Tween 20 및 2% w/v 탈지분유를 함유하는 동량의 PBS로 회석하여, ELISA 분석에 사용하였다. SYNAGIS<sup>®</sup>와의 반응에 대해 최고 반응성을 보이지만 BSA/카제인 코팅된 ELISA 평판에서는 그렇지 않았던 클론을 서열 분석을 위해 선별하였다. 선별된 클론에 의해 디스플레이되는 Tn3 변이체의 서열을 결정하기 위해서,  $1 \mu\text{l}$ 의 배양 상등액을 PCR에 사용하여 코딩된 Tn3 서열을 포함하는 단편을 증폭하였다. 이 PCR 생성물을 ExoSAPit(USB Corp., Cleveland, OH)로 처리하여 소비되지 않은 데옥시뉴클레오타이드 및 프라이머를 분해하고, 직접 서열분석하였다.

[0635] SYNAGIS<sup>®</sup>-결합 Tn3 변이체 SynBP01의 동정

[0636] SYNAGIS<sup>®</sup>-결합 Tn3 변이체의 DNA 서열분석으로 3개의 고유한 클론을 동정하였다. SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 ELISA에서 최고 신호를 보이는 클론, SynBP01은 표 3에 도시한 바와 같은 신규한 BC 및 FG 루프 서열을 함유한다. 가용성 SynBP01을 발현시키기 위해, NcoI-KpnI cDNA 단편을 파지 디스플레이 벡터로부터 잘라내서 앞서 기술한 이.콜라이 발현 벡터의 대응 부위에 클로닝하였다. 다음으로, 재조합 SynBP01을 이.콜라이에서 발현시키고 야생형 Tn3에 대해 기술한 바와 같이 정제하였다. 정제된 SynBP01의 수율은  $400 \text{ ml}$  이.콜라이 배양물로부터  $18 \text{ mg}$ 이었고, SDS-PAGE 분석으로 판단컨대 순도는 95%가 넘었다(도 9a). 이 회수율은 사용된  $1 \text{ ml}$  니켈 킬레이트 친화성 컬럼의 용량에 가깝기 때문에, 이 수율은 SynBP01의 실제 발현도보다 낮게 나타났다.

[0637] SynBP01에 의해 나타나는 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 친화성의 측정

[0638] SYNAGIS<sup>®</sup>에 대한 SynBP01의 결합을 위한 평형 해리 상수( $K_D$ )는 BIAcore 3000 장치 상에서 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정하였다. 1차 아미노기를 통해서 바이오센서 칩 상에 SYNAGIS<sup>®</sup>를 공유적으로 고정시켰다. SynBP01의 평형 결합은  $10 \mu\text{l}$ /분의 유속으로 칩 상에 HBS-EP 완충액( $10 \text{ mM}$  HEPES,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $3 \text{ mM}$  EDTA, pH 7.5, 0.005% v/v Tween 20) 중 SynBP01 샘플을 주입하여 측정하였다(도 9b). 각각의 평형 결합 측정 후, 다음 SynBP01 샘플을 주입하기 전 적어도 25분 동안 칩 상에 HBS-EP 완충액을 흘려주어 SynBP01이 완전하게 해리되도록 하였다. 결합 프로파일은 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 분석하였고, SynBP01과 SYNAGIS<sup>®</sup>의 결합에 대한  $K_D$ 는  $16 \mu\text{M}$ 이었다.

[0639] SynBP01의 안정성 시험

[0640] pH 7.0에서 우레아에 의한 언폴딩에 대한 SynBP01의 안정성을 Tn3(실시예 1 참조)에 대해 앞서 기술한 바와 같이 측정하였다. Tn3 및 SynBP01의 카오토로프 유도된 언폴딩의 비교가 용이하도록,  $360 \text{ nm}$ 에서 상대적 형광발광 강도를 각 단백질에 대한 카오토로프 농도 함수에 따라 그래프화하였다.

[0641] pH 7.0에서 Tn3 및 SynBP01의 우레아 유도된 언폴딩 비교 결과(도 9c)는 50% 언폴딩을 이루기 위해 요구되는 우레아의 농도는 양쪽 단백질에 대해 유사한 것으로 나타났다. 이 결과는 SynBP01의 안정성이 야생형 Tn3의 안정성과 유사하다는 것을 의미한다.

[0642] 다른 라이브러리 스크리닝에서, 추가적인 SYNAGIS<sup>®</sup> 및 리소자임 특이적 결합 스캐폴드를 동정하였다. 특이적인

BC 및 FG 루프 서열은 하기와 같다.

표 3

[0643]

SYNAGIS <sup>®</sup> 및 리소자임 특이적 결합 스캐폴드의 BC 및 FG 루프 서열				
클론	BC 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
SYNAGIS <sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKI IGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVGQKSNPA	104
리소자임 특이적 결합 스캐폴드				
1	FKPLAEIDG	102	YNYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	102	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAIIRS	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHRTG	124	HTPLGHLRS	125

[0644]

쌍이론 스캐폴드의 mAb 포획

[0645]

2개의 동일한 또는 2개의 상이한 스캐폴드를 함유하는 2가 또는 이중특이적 스캐폴드는 동시에 2 표적 단백질에 결합하는 이들의 능력을 기반으로 유용한 치료 분자가 될 수 있다. 탠덤 또는 융합 스캐폴드를 리포맷하여 발현 시키지 않고, 목적하는 2가 또는 이중특이적 활성을 위한 스캐폴드 쌍의 직접 스크리닝 방법은 유용한 스캐폴드 쌍을 동정하는 매우 간단한 방법이다. 이 스크리닝에서 동정된 쌍들만이 2가 또는 이중특이적 스캐폴드(예를 들어, 다량체 스캐폴드)의 제조를 위해 적합한 형태로 리포맷하는 것이 요구된다.

[0646]

전체 길이 IgG 항체 분자는 2개의 항원 결합 부위를 함유하므로, 2개의 표적 항원에 동시에 결합할 수 있다. 따라서, 스캐폴드의 비공유 단일클론 항체 포획 결과 항체의 각 항원 결합 암(arm) 상에 2개의 스캐폴드가 존재하게 되었다. 이러한 방법으로 포획된 스캐폴드를 BC, DE 및 FG 루프에 의해 형성된 결합 표면에 다른 단백질에 결합가능하도록 방향을 맞추면, 이는 스캐폴드 쌍을 스크리닝하기 위한 근간을 형성할 수 있다. 이러한 이유로, 스캐폴드의 C 말단을 포함하는 에피토프를 인식하는 항체에 의한 포획물, 또는 임의의/모든 AB, CD, EF 루프가 최적이다. 2개의 동일한 스캐폴드의 항체 포획으로 2가 스캐폴드의 활성을 모방할 수 있는 동종이량체 mAb-스캐폴드 복합체가 형성된다. 2개의 상이한 스캐폴드의 포획은 동종이량체 및 이종이량체 mAb-스캐폴드 복합체의 혼합물이 생성되며, 여기서 이종이량체 복합체는 이중특이적 스캐폴드의 활성을 모방할 수 있다.

[0647]

이러한 분석 전략의 실행가능성을 증명하기 위해, 다양한 농도의 펜타His, 항-히스티딘 태그 단일클론 항체(Qiagen)를 HBS-EP 완충액 중 1  $\mu$ M SynBP01과 2시간 동안 항온반응시켰다. C 말단 헥사히스티딘 태그가 BC, DE 및 FG 루프에 의해 형성된 결합 표면에 대해 분자의 반대면에 위치해야만 하므로, SynBP01의 펜타His 포획이 SYNAGIS<sup>®</sup>에 결합하는 그 능력을 방해할 것으로 예상하지 않았다(도 9d). 다음으로, 펜타His-SynBP01 샘플을 이전에 기술한 바와 같이 SYNAGIS<sup>®</sup>을 고정시킨 BIAcore<sup>®</sup> 칩 상에 주입하였다. SynBP01 부재하 펜타His 주입에 상응하는 센서그램을 빼서 백그라운드에 대해 센서그램을 보정한 후, 펜타His 부재하에 1  $\mu$ M SynBP01을 주입하여 얻은 센서그램과 비교하였다.

[0648]

SYNAGIS<sup>®</sup>에 펜타His-SynBP01 복합체의 결합은, 1  $\mu$ M SynBP01과 0.19  $\mu$ M 펜타His의 복합체에 상응하는 센서그램으로 예시한 바와 같이, 자유 SynBP01의 결합보다 상당히 강하였다(도 9d). 구체적으로, 펜타His-복합체화된 SynBP01은 자유 SynBP01에 비하여, 상당히 느린 SYNAGIS<sup>®</sup> 표면으로부터의 해리율을 나타냈고, 이는 2가 결합의 지표이다. 대조군 실험에서 펜타His가 단독으로 주입시 어떠한 검출가능한 SynBP01와의 결합도 보이지 않았고, SynBP01/비관련 마우스 mAb 혼합물(펜타His와 매칭된 이소타입)의 주입은 SynBP01 단독에 비하여 증가된 결합을 보이지 않는 것으로 확인되었다.

- [0649] 실시예 4. 이황화-안정화된 Tn3 변이체의 디자인, 발현 및 특징규명
- [0650] 이황화결합-함유 Tn3 변이체의 디자인
- [0651] 많은 천연 발생 Tn3 구조 모티프는 이황화 결합이 결여된 반면, 다른 것들은 1 이상의 이황화 결합을 함유한다. 따라서, 아미노산 측쇄 간 거리와 각을 측정하여 Tn3에 이황화 결합을 새롭게 디자인하기보다는, 본 발명자들은 천연 발생 이황화 결합을 함유하는 Tn3 구조 도메인과 유사한 위치에서 Tn3 스케폴드에 시스테인 잔기를 도입시켰다.
- [0652] 천연적으로 이황화 결합을 함유하는 21개의 Tn3 구조 모티프의 3차원 구조를 중첩시켰다. 이들 구조에 대한 PDB 코드 및 서열을 도 10a에 도시하였다. 이들 21 구조에서, 스케폴드 내 다양한 위치에서 이황화 결합이 일어났지만, 이들 다수는 이황화 결합이 중첩된 구조 패밀리 내에서 겹쳤다. 21 구조 전반에 걸쳐 2회 이상 나타나는 이황화 결합의 3가지 예를 발견하였다. 이들 3가지 중 2가지는 사이토카인 수용체 내에서 공통적으로 보존되는 이전에 기술한 이황화 결합 쌍과 상응되었다(Bazan et al., PNAS, 87, 6934, 1990). 이들 2 이황화 결합의 총 8 및 12예들을 21 구조에서 주목하였다. 제3 이황화 결합은 보다 낮은 빈도로 일어났고(5 사례/21 구조), F 스트랜드와 G 스트랜드 간에 가교결합을 생성시켰다.
- [0653] 이들 3 천연 발생 이황화 결합에 상응하는 위치에 이황화 결합을 도입하고자 3개 시스테인 함유 Tn3 돌연변이체를 디자인하였다. 마우스 G-CSF 수용체(PDB 코드 1pgr) 유래의 Tn3 구조 모티프 중 하나에서 천연적으로 발생하는 이황화 결합을 도입시켜 제4 시스테인 함유 돌연변이체도 디자인하였다. 21 구조 중에서 이 이황화 결합의 예는 하나만 존재하였지만, 단백질 코어 내에 묻혀있고 BC 루프와 FG 루프에 근접하여 발생하는, C 스트랜드 및 F 스트랜드 간 이황화 가교결합을 생성시킨다. Tn3<sup>SS1-4</sup>라 명명된 각각의 Tn3 돌연변이체에 대해, 이황화 결합 함유 Tn 단백질과 함께 Tn3의 구조 기반 서열 정렬을 통해 결정된 위치에 2 시스테인을 도입시켰다(도 10a). 이황화 결합 2는 보다 긴 DE 루프를 갖는 Tn3 구조 모티프에서 DE 루프의 염기를 가로질러 발생하므로, Tn3<sup>SS2</sup>에 상응하는 돌연변이체에 2 글리신 잔기도 삽입하였다. 이황화 결합 조작 전략을 도 10b에 도시하였다.
- [0654] 이황화 결합 돌연변이체 생성 및 재조합 발현
- [0655] Tn3<sup>SS1-4</sup>에 대한 발현 벡터는 실시예 1에 기술한 야생형 발현 구성체를 부위 지정 돌연변이화시켜 생성시켰다. 재조합 단백질을 이.콜라이에서 발현시키고 실시예 1에 기술한 바와 같이, 고정화 니켈 킬레이트 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 모든 Tn3 돌연변이체는 50 mg/L을 넘는 수준으로 발현되었다.
- [0656] Tn3<sup>SS1-4</sup>의 리폴딩
- [0657] 대체로 이.콜라이에서 단백질의 세포질 발현으로 환원 상태이거나, 또는 어느 정도 부적절한 이황화 결합이 형성된, 시스테인 함유 단백질이 생성된다. 재조합 Tn3<sup>SS1-4</sup> 단백질이 산화(즉, 이황화 결합 함유) 또는 환원(즉, 이황화 결합 결여)되었는지 확인하기 위해, 정제된 물질을 역상 HPLC로 분석하고, 구아니딘 히드로클로라이드의 존재하에서 강한 환원제 DTT와 먼저 사전 항온반응시킨 물질과 비교하였다. 모든 경우에서, DTT 처리된 물질은 단일 피크로 분석된 반면, 미처리 샘플은 제2의 소수 피크가 존재한 것으로 나타났는데, 이는 이황화 결합 함유 형태로 부분 산화되었음을 의미한다(Tn<sup>SS3</sup> 및 Tn<sup>SS4</sup>의 대표적인 HPLC 분석 결과를 도 10c에 도시하였음).
- [0658] 환원된 Tn3<sup>SS1-4</sup>를 상응하는 이황화 함유 단백질로 완전하게 전환시키기 위해서, 샘플을 10 mM DTT를 함유하고 pH 8로 완충시킨 6 M 구아니딘 히드로클로라이드를 사용하여 1 mg/ml로 희석하였다. 실온에서 10분간 항온반응시킨 후, 샘플을 20 mM Tris-HCl을 사용하여 pH 8.5로 완충된 0.5 M 구아니딘 히드로클로라이드에 대해 밤새 투석하였다. 이러한 방식으로 리폴딩된 물질의 HPLC 분석 결과 대체로 이황화 함유 종으로의 전환율이 30 내지 70%로 나타났다(도 10c). 37°C에서 밤새 항온반응시키거나, 샘플을 4°C에서 > 2주간 보관하여, 이황화 함유 종으로 90-100%의 추가 전환율을 얻었다. 대안적으로, 환원 및 변성된 단백질을 0.5M 구아니딘 히드로클로라이드, 4 mM 환원 글루타티온, 0.8 mM 산화 글루타티온을 함유하고 20 mM Tris-HCl에 의해 pH 8.5로 완충된 완충액으로 밤새 투석하여 이황화 함유 생성물로 거의 양적인 리폴딩을 수행할 수 있었다.
- [0659] 특징규명
- [0660] 리폴딩된 Tn3<sup>SS1-4</sup> 샘플 내 이황화 결합이 분자간 또는 분자내에 존재하는지와 순도를 확인하기 위해, 환원 및 비 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다(도 10d). 환원제 존재하에서, 모든 리폴딩된 Tn3<sup>SS1-4</sup> 샘플은 Tn3

와 유사한 위치로 이동하였다. 환원제 부재하에서,  $Tn3^{SS1}$ ,  $Tn3^{SS3}$  및  $Tn3^{SS4}$ 는  $Tn$ 과 유사하게 이동하였으며, 따라서, 디자인한 바와 같이, 분자내 이황화 결합을 포함하는 것으로 예상되었다. 대조적으로,  $Tn3^{SS2}$ 는 주로 이량체로 이동하였고, 소량의 단백질만 단량체로 이동하였다. 따라서,  $Tn3^{SS2}$ 는 분자간 이황화-결합된 이량체를 형성하는 것으로 보이며 그에 따라 추가 실험하지 않았다.

[0661] 안정성

[0662] 카오토로픽제에 의한  $Tn3^{SS1,3,4}$ 의 언폴딩을 야생형  $Tn3$ 에 대해 이전에 기술한 바와 같이, 고유 형광발광을 통해 모니터링하였다. 야생형 및 이황화 함유  $Tn$ 의 카오토로프 유도된 언폴딩 비교가 용이하도록, 각 단백질에 대해 카오토로프 농도 함수로서 360 nm에서의 상대적 형광발광 강도를 그래프화하였다.

[0663] pH 7.0에서  $Tn3$  및  $Tn3^{SS1,3,4}$ 의 우레아 유도된 언폴딩을 비교한 결과(도 10e)  $Tn3^{SS1}$ 은 야생형 단백질보다 덜 안정하였지만,  $Tn3^{SS3}$ 과  $Tn3^{SS4}$ 는 보다 상당히 안정적이었다. pH 7.0에서, 야생형  $Tn3$ 의 50% 폴딩 획득에 필요한 우레아 농도(Cm)는 2 M이었다. 이와 대조적으로  $Tn3^{SS3}$ 의 언폴딩을 위한 Cm은 4 M 우레아였고, 반면  $Tn3^{SS4}$  Cm은 적어도 6 M을 넘었지만, 이 단백질은 이들 실험에서 사용된 최고 우레아 농도(8 M)에서 완전하게 언폴딩되지 않았기 때문에 정확하게 측정할 수 없었다.

[0664] pH 5.0에서 구아니딘 히드로클로라이드(GuHCl)에 의한  $Tn3^{SS4}$ 의 언폴딩을 또한 형광발광으로 측정하고 야생형  $Tn3$ 의 언폴딩과 비교하였다. GuHCl은 우레아보다 더 강력한 변성제이므로, 0~5.5 M의 GuHCl 농도 범위에서 단백질 샘플의 형광발광성을 분석하여 완전한 언폴딩 전이를 획득하였다(도 10f). pH 5.0에서 야생형  $Tn3$ 의 언폴딩을 위한 Cm은 1M GuHCl이었고,  $Tn3^{SS4}$ 에 대해서는 대략 3.2 M이었다.

[0665] 단백질 가수분해에 대한  $Tn3^{SS4}$ 의 안정성은 야생형 단백질에 대해 실시예 1에서 앞서 기술한 바와 같이 썬몰리신과 항온반응시켜 시험하였다. 야생형 단백질과 달리,  $Tn3^{SS4}$ 는 실온에서 밤새 항온반응시킨 후에도, 단백질 가수분해에 내성을 보였다(도 10g).

[0666]  $Tn3^{SS4}$ 의 열적 언폴딩은 앞서 기술한 바와 같이 시차 주사 열량측정법(DSC)으로 측정하였다. pH 7.0에 20 mM 인산나트륨 중 1 mg/ml  $Tn3^{SS4}$  샘플은 용점( $T_m$ )이 71°C로 나타났는데, 이는 동일 조건 하에서 야생형 단백질의  $T_m$ 보다 26°C가 높은 것이다(도 10h). 20 mM 아세트산나트륨 pH 5.0 중  $Tn3^{SS4}$ 의  $T_m$ 은 약간 상승하였다. 이 pH에서  $Tn3^{SS4}$ 의  $T_m$ 은 74°C로서, 야생형 단백질보다 18°C가 높았다. 야생형 단백질과 유사하게,  $Tn3^{SS4}$ 의 열적 언폴딩은 pH 7.0에서 완전하게 가역적인 것으로 나타났지만, pH 5.0에서는 침전되었다.

[0667] 다중각 광산란법 결합된 크기 배제 크로마토그래피(SEC-MALS)를 사용하고, 야생형 단백질에 대해 기술한 바와 동일한 조건을 이용하여, 용액중에서  $Tn3^{SS4}$ 가 단량체로 존재하는지 확인하였다. 2.0 mg/ml  $Tn3^{SS4}$  샘플을 SEC-MALS 분석한 결과 이 단백질은 완전하게 단량체 상태인 것으로 밝혀졌다(도 10i). 실험적으로 추정된 단량체 질량은 10.7 kDa 였고, 산출된 질량 10.8 kDa와 거의 근접하였다.

[0668] 이중 이황화 결합 함유  $Tn3$  변이체의 제조

[0669] 야생형 단백질에 비하여 2 돌연변이체  $Tn3^{SS3}$  및  $Tn3^{SS4}$ 의 안정성이 향상되었기 때문에, 조합 돌연변이체에서 각 이황화 결합의 안정화 효과가 부가적인지 확인하기 위해 새로운  $Tn3$  변이체를 준비하였다.

[0670]  $Tn3^{SS3+4}$ 라 명명한 테트라-시스테인 변이체의 제조합 발현용 구성체를 앞서 기술한 방법으로 제조하였으며, 이 구성체는 이황화 결합 3 및 4에 상응하는 위치에 4 시스테인 잔기를 함유한다(도 10b). 실시예 1에 기술한 바와 같이 단백질을 발현시키고 정제하였다. 이 변이체에 대해 얻은 정제 단백질의 수율은 200 ml 이.콜라이 배양물에 대해 22 mg이었다. 이 수율은 정제에 사용된 컬럼의 최대 결합 용량이므로, 실제 발현 수준은 적어도 110 mg/L 이상이다.

[0671]  $Tn3^{SS3+4}$ 의 리폴딩



- [0672] 정제된  $Tn3^{SS3+4}$ 를 역상 HPLC로 분석하고, 구아니딘 히드로클로라이드 존재하에 강한 환원제 DTT와 먼저 사전항온 반응시킨 물질과 비교하였다. DTT 처리한 물질은 단일 피크를 나타낸 반면, 미처리된  $Tn3^{SS3+4}$ 는 3개의 추가적인 초기 용리 피크가 존재하였는데 이는 아마도 둘 중 하나 또는 둘모두의 가능한 이황화 결합의 부분 형성에 의한 피크인 듯하다(도 10j).
- [0673] 올바른 이중 이황화 함유 단백질로  $Tn3^{SS3+4}$ 를 리폴딩하기 위해, 10 mM DTT를 함유하고 pH 8로 완충된 6 M 구아니딘 히드로클로라이드를 사용하여 샘플을 1 mg/ml로 희석하였다. 실온에서 10분간 항온반응시킨 후, 4 mM 환원 글루타티온을 함유하고, 20 mM Tris-HCl로 pH 8.5로 완충된 0.5 M 구아니딘 히드로클로라이드에 대해 밤새 샘플을 투석시켰다. 래폴딩된 물질의 HPLC-분석 결과 언폴딩된 조제물 내 가장 초기 용리 피크에 상응하는 단일 피크로 환원 단백질이 > 95% 전환된 것으로 나타났다. 그 용리 시간 프로파일에 따라, 이 생성물은 2개의 바르게 형성된 이황화 결합을 함유하는 것으로 추정되었다(도 10j).
- [0674]  $Tn3^{SS3+4}$ 의 특징규명
- [0675] pH 5.0에서 구아니딘 히드로클로라이드(GuHCl)에 의한  $Tn3^{SS3+4}$ 의 언폴딩을 형광발광으로 측정하고  $Tn3$  및  $Tn3^{SS4}$ 에 대한 이전 데이터와 비교하였다. pH 5.0에서  $Tn3^{SS3+4}$ 의 언폴딩을 위한  $C_m$ 은 5.0~5.5M GuHCl(도 10k)이었고, 이는 야생형 또는  $Tn3^{SS4}$ 의  $C_m$  보다 상당히 높은 것이다. GuHCl-유도된 변성에 대한 안정성이 상당히 증가되어, 2 돌연변이 세트를 하나의 스캐폴드에 조합시킨 경우에 이황화 3 및 4의 안정화 효과가 부가된다는 것을 알 수 있었다.
- [0676] 실시예 5. 초호열성 유기체에서 유래한  $Tn3$  구조 모티프의 동정, 발현 및 특징규명
- [0677]  $Tn3$  구조 모티프 동정
- [0678] MCB1 데이터베이스 내에 48종의 고세균 게놈에서 코딩되는 추정  $Tn3$  구조 모티프 서열을 동정하기 위해 BLAST 검색을 수행하였다. 이 검색은 초호열성 유기체의 게놈으로 더욱 제한하였으며, 본 발명자들은 본 명세서에서 초호열성 유기체를 70℃ 또는 그 이상의 온도에서 최적으로 성장하는 유기체로서 정의한다.  $Tn3$ 을 질의 서열로서 사용하여서, 아캐오글로버스 펠기더스 유기체 유래의 가설 단백질 내에서  $Tn3$  구조 모티프를 동정하였다. 다음으로, 이  $Tn3$  구조 모티프를 질의 서열로 사용하여  $Tn3$  구조 모티프를 더욱 동정한 후, 이들을 이어 질의 서열로서 사용하였다. 총 14개의 가능한  $Tn3$ -코딩 서열이 5종의 초호열성 유기체 유래의 가설 단백질 내에서 동정되었다. 이렇게 얻은 서열을 본 명세서의 서열 섹션에 기재하였다.
- [0679] 초호열성  $Tn3$ 의 발현 및 정제
- [0680] 5개의 예측되는 초호열성 유기체 유래의  $Tn3$  단백질을 이.콜라이에서 발현시키기 위해 선별하였다. 이들 각 단백질을 코딩하고, 이.콜라이의 코돈 용법으로 최적화된 합성 cDNA는 기재된 서열에 따라서 GenScript Corporation에서 공급받았다. 각 cDNA는 축적하는 Nco I 및 Kpn I 제한효소 부위를 함유하고, 이들 효소로 효소 분해한 후, 상응하는 Nco I/Kpn I 부위를 함유하는 변형된 pET22b 벡터(Novagen)에 삽입물을 클로닝하였다. 인간 유래  $Tn3$  구조 모티프에 대해 앞서 기술한 방법에 따라서 이.콜라이로부터 코딩된 C-말단 헥사히스티딘-태깅된 단백질의 제조를 발현시키고 정제시켰다. 스타필로써머스 마리너스 유래의  $Tn3$  구조 모티프, 설폴로버스 토코다이 유래의  $Tn3$  구조 모티프 2개는 발현이 잘 되었는데 반해, 설폴로버스 슬파타리커스와 아캐오글로버스 펠기더스에서 유래한  $Tn3$  구조 모티프는 낮은 수준으로 발현되었다(도 11a).
- [0681] 특징규명
- [0682] 설폴로버스 슬파타리커스 유래의  $Tn3$ 을 제외하고, 각  $Tn3$  구조 모티프의 안정성을 앞서 기술한 바와 같이, DSC, 형광발광 및 써몰리신 처리법을 통해 분석하였다(실시예 1 참조).
- [0683] pH 7.0에서 에스. 토코다이 유래의  $Tn3$  구조 모티프에 대한 열분석도는 열적 언폴딩에 상응하는 명확한 피크가 나타나지 않았다. 그보다, 이 데이터는 에스.토코다이의 1  $Tn3$ 이 70℃보다 높은 온도에서 침전되고, 반면, 에스. 토코다이의 1  $Tn3$ 은 50℃ 보다 높은 온도에서 침전되는 것으로 나타났다(도 11c). 에이.펠기더스 유래  $Tn3$  구조 모티프에 대한 열분석도는 77℃에서 언폴딩  $T_m$ 의 특징적인 피크를 나타냈고, 에스.마리너스 유래  $Tn3$  구조 모티프는  $T_m$ 이 83℃였다(도 11b).  $T_m$  보다 높은 온도에서 침전되는, 이들 2 단백질은 열적 언폴딩이 가역적이지 않았다.



- [0684] 구아니딘 히드로클로라이드(GuHCl)에 의해 pH 7.0에서 Tn3 구조 모티프의 언폴딩을 형광발광으로 분석하였다. 모든 Tn3 구조 모티프는 언폴딩되기 위해 높은 농도의 GuHCl을 필요로 하였는데, 에스. 마리너스에 대해 예시한 바와 같이, 언폴딩 중간점은 4.5 M~6 M GuHCl 범위였다(도 11d).
- [0685] 썬폴리신의 단백질 가수분해에 대한 안정성을 앞서 기술한 바와 동일한 조건을 사용하여 분석하였는데(실시에 1 참조), 여기서 45  $\mu$ M Tn3 샘플을 0.45  $\mu$ M의 썬폴리신과 반응시켰다. 모든 Tn3 구조 모티프가 단백질 가수분해에 내성을 나타냈지만, 에이.펠리디스, 에스. 마리너스 유래 Tn3 단백질 및 에스.토코다이 유래 2 Tn3에서 작은 1~2 kDa 단편이 빠르게 절단되는 것이 관찰되었는데, 본 발명자들은 코어 Tn3 구조 모티프의 일부를 형성하지 않는 N 말단 및/또는 C 말단 단편일 것으로 추정하고 있다. 에스.마리너스 및 에스.토코다이 유래 Tn3에 대해 예시한 것과 같이, 16시간 썬폴리신 처리 후 모든 4개의 코어 Tn3 구조 모티프의 상당량이 미분해 상태로 남았다(도 11f + g).
- [0686] 에스.토코다이 유래의 Tn3 구조 모티프의 안정성을 pH 3.0의 20 mM 시트르산나트륨 완충액 중에서도 평가하였는데, 이 유기체가 초호열성일뿐만 아니라 호산성이기 때문이다. 에스.토코다이의 1Tn3 및 2Tn3은 pH 7.0에서 보다 pH 3.0에서 GuHCl-유도된 언폴딩에 더 안정하였는데, 1Tn3이 2Tn3 보다 안정하였다. pH 3.0의 20 mM 시트르산나트륨 중에서 에스.토코다이 1Tn3의 열적 언폴딩도 DSC를 통해 평가하였는데, pH 3.0에서 열분석도는 Tm이 98℃로 나타나는 특징적인 피크를 보여주었으며, 또한, 이 pH에서의 언폴딩은 부분 가역적이었다. 에스. 토코다이 1Tn3에 대한 열적 및 GuHCl-매개된 언폴딩의 비교 결과를 도 11c 및 11e에 도시하였다.
- [0687] Tn3 구조 모티프의 정제를 위한 안정성의 활용
- [0688] 극한 온도, pH 및 단백질 가수분해에 대한 초호열성 유래 Tn3 구조 모티프의 안정성을 활용하여 이들 단백질을 미정제 이.콜라이 용해물로부터 정제하였다. 앞서 기술한 바와 같이 에스.마리너스 및 에스.토코다이(1Tn3) 유래의 Tn3 단백질을 이.콜라이에서 발현시키고 가용성 용해물을 준비하였다. 에스.마리너스 Tn3을 함유하는 용해물을 70℃에서 15분간 가열하고, 침전된 단백질을 원심분리를 통해 제거한 후, 상등액을 SDS-PAGE로 분석하여 가열시키지 않은 용해물과 비교하였다(도 11h). 겔 상에 나타난 바와 같이, 대부분의 이.콜라이 오염물들이 열처리 후 제거되어 Tn3 단백질이 상당히 정제되었다. 유사하게, 55℃에서 45분간 썬폴리신으로 가용성 이.콜라이 용해물을 처리한 결과도 이.콜라이 유래의 단백질이 상당량 제거되고 에스.마리너스 Tn3의 정제도 동시에 일어났다(도 11i).
- [0689] 에스.토코다이 1Tn3 단백질의 pH 및 고온 안정성을 활용하여 미정제 용해물에서 이.콜라이 단백질을 제거하였다. 4부피의 200 mM 시트르산나트륨(pH 3.0)을 사용하고, pH 7로 완충시킨, 용해물의 회석 결과 이.콜라이 유래 단백질의 상당히 침전되었다. 원심분리를 통해 침전물을 제거한 후, 상등액을 70℃에서 15분간 가열하였고, 새롭게 침전된 단백질을 다시 원심분리로 제거하였다. 미처리, pH 30-처리, 및 pH 3/열처리 샘플의 SDS-PAGE 분석 결과 이들 2 단계를 통해서 백그라운드의 이.콜라이 단백질이 상당히 제거되었다(도 11j).
- [0690] **실시에 6. SynBP01의 루프 스와핑 분석**
- [0691] 요약
- [0692] 3개의 상이한 SynBP01 변이체를 제작하여, BC 및 FG 루프 둘 모두가 Tn3의 결합 계면에 기여하는지 시험하였다(도 12). 또한, Tn3<sup>SS4</sup> 돌연변이를 이 시험에 추가하여 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합에 영향을 주는지 시험하였다. 이들 변이체는 하기와 같이 SynBP01와 아미노산 서열이 상이하다:
- [0693] "SynBP01-BC 단독" - FG 루프 서열이 RRGDMSSNPA로 교체
- [0694] "SynBP01-FG 단독" - BC 루프 서열이 FKPLAEIDG로 교체
- [0695] "SynBP-1 SS4" - 도 10b의 라인 4에 도시된 Ile 및 Ser이 Cys로 교체
- [0696] 실험 절차
- [0697] SynBP01 및 이의 3 변이체의 유전자 3 단편 융합물을 코딩하는 파지 디스플레이 벡터를 이.콜라이로 형질전환시키고, 이들 박테리아를 를 사용하여 실시에 3에 기술한 바와 같이 이들 각각 Tn3 단백질을 디스플레이하는 파지를 준비하였다. 플레이트를 PBS(pH 7.2) 중 10  $\mu$ g/ml의 SYNAGIS<sup>®</sup>로 밤새 4℃에서 코팅하였다. 0.1% v/v Tween-20과 4% w/v 탈지분유를 함유하는 PBS(PBST 4% 탈지분유)로 평판을 블로킹하였다. 회석한 파지 스톱을 컬럼 1에 부가하고 회석제로서 PBST 1% 탈지분유를 사용하여 평판 전체에서 3배 연속 회석을 수행하였다. 평판을 적절하

게 진탕시키면서 2시간 동안 실온에서 항온반응시켰다. 세척한 후, 결합된 파지를 항-M13 HRP 접합된 항체(GE Healthcare, Piscataway, NJ)로 표지화하고 TMB 기질(KPL Laboratories, Gaithersburg, MD)을 부가하여 비색 검출하였다. 2.5 M 인산을 부가하여 발색을 쉼칭한 후 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0698] 결과: 도 12에 도시한 데이터는 BC 루프와 FG 루프 둘 모두는 Tn3 스캐폴드가 SYNAGIS<sup>®</sup>에 결합하는데 필수적이라는 것을 보여준다. 양쪽 루프가 야생형 Tn3 서열로 교체되어 포함된 SynBP01 변이체는 평판 결합된 SYNAGIS<sup>®</sup>에 결합되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Tn3 스캐폴드 중 적어도 2 루프가 기능성 결합 표면을 존재 시키기 위해 협력적으로 작용한다는 것을 보여준다.

[0699] 또한, SynBP01 스캐폴드로 SS4 이황화 결합을 도입하면 SYNAGIS<sup>®</sup>에 대한 결합이 없어진다(도 12). SynBP01의 SS4-함유 변이체가 활성이 손실된 이유는 아마도 이 이황화 결합이 Tn3 스캐폴드 단백질의 구조에 커다란 변화를 초래한 것으로 예측되지 않으므로 미세한 구조적 영향 때문인 듯하다. 이 결과는 추가적으로 SYNAGIS<sup>®</sup>의 결합이 SynBP01의 3차원 구조에 정교하게 의존적이라는 것을 시사한다.

[0700] 실시예 7. Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드에 기초하는 2 루프 라이브러리의 제작

[0701] 도 10b에 도시한 Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드를 기반으로 신규한 라이브러리를 제작하였다. BC 루프 다양성은 PCR을 사용하여 도입하였고 FG 루프 다양성은 Kinkel 돌연변이 유발법을 사용하여 도입하였다(표 5). 대략  $1.12 \times 10^{10}$  구성원의 라이브러리가 제작되었다.

표 5

[0702] Tn3<sup>SS4</sup> 라이브러리 제작을 위한 축퇴성 올리고뉴클레오타이드

올리고	루프	서열	서열 번호
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNKNGSTNNKNNKNNKGGCTGTGAAGTACCTATGGC	217
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNKNNKNNKACCGGCTGTGAAGTACCTA TGGC	218
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNKRRRCRCNNKATTNNKGGTTGTGAAGTAC CTATGGC	219
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTCNNKAMSNNKNNKGGTNNKNNKNNKAGCAAAGAAACCTTTACCAC C	220
FG10	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTCNNKAMSNNKNNKNNKNNKRGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTAC CACC	221
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTCNNKAMSNNKNNKGGTNNKNNKAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTT TACCACC	222

[0703] 실험 절차

[0704] BC 루프 다양성은 표 5의 BC9, 11 또는 12 프라이머를 사용하여 생성시켰다. 이들 프라이머는 이들의 3' 말단 상에서 Tn3 DNA와 어닐링되었고 축퇴성에 의해 PCR 완료 시 라이브러리가 형성되었다. PCR 생성물은 이후에 *NcoI* 및 *KpnI*로 효소분해하여 파지 디스플레이 벡터에 결합되는 완전한 Tn3 유전자를 만들기 위해 프라이머를 축적시켜 증폭되었다. 전기천공을 통해 DNA로 이.콜라이를 형질전환시켰다. BC 라이브러리의 최종 다양성은 대략  $3.4 \times 10^9$  구성원으로 추정되었다.

[0705] 전기천공 이후, BC 라이브러리를 1시간 동안 37℃에서 진탕하면서 항온반응시켰다. M13K07 헬퍼 파지를 부가하고 1시간 후 세포를 보다 큰 부피로 희석하여 진탕하면서 밤새 37℃에서 성장시켰다. 다음날, PEG 8000을 사용한 침전을 통해 상등액에서 파지를 분리하고 농축시켰다.

[0706] BC 라이브러리 파지를 사용하여 CJ236 이.콜라이를 감염시켰다. 감염 1시간 후, 세포를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  카르베니실람 함유 2xYT에 희석시키고 진탕하면서 37℃에서 밤새 성장시켰다. 다음날, PEG 8000을 사용한 침전을 통해 상등액에서 파지를 분리하고 농축하였다. 단일 가닥 DNA를 Qiagen(Valencia, CA) QIAprep spin M13 키트를 사용하여 회수하였다. 이 DNA를 표 5의 FG 프라이머를 사용한 Kunkel 돌연변이 유발법용 주형으로 사용하였다.

[0707] 실시예 8. SYNAGIS<sup>®</sup> 특이적 스캐폴드에 대한 2 루프 Tn3<sup>SS4</sup> 라이브러리 패닝

[0708] SYNAGIS<sup>®</sup>를 15몰 당량의 EZ Link *sulfo*-NHS-SS-비오틴(Pierce, Rockford, IL)으로 비오틴화하였다. 실온에서, 1시간 동안 항온반응시킨 후, 샘플을 밤새 PBS에서 투석하여 비접합된 비오틴을 제거하였다. 다음날, M280 스트렙타비딘 비드(Dynal, Carlsbad, CA)와 2 루프 라이브러리를 10 mg/ml BSA 함유 PBS에서 1시간 동안 블로킹하였다. 10  $\mu$ g의 비오틴화 SYNAGIS<sup>®</sup>를 블로킹된 파지에 부가하고 2시간 동안 실온에 엔드 오버 엔드 회전식 혼합기 상에서 항온반응시켰다. SYNAGIS<sup>®</sup>을 실온에 상기 회전식 혼합기 상에서 30분간 블로킹된 스트렙타비딘 비드를 사용하여 포획하였다. 미결합된 파지를 제거하기 위해 PBST로 3회 세척한 후, 결합된 파지는 75 mM DTT로 용리하였다. XL-1 Blue 이.콜라이를 용리된 파지로 감염시키고, M13K07 헬퍼 파지를 공동 감염시킨 후, 실시예 3에 기술한 바와 같이 밤새 재증식시켰다. 다음날, 실시예 3에 기술한 바와 같이 밤샘 배양 배지로부터 파지를 회수하였다.

[0709] 제2 라운드 패닝은 블로킹 시약으로 10 mg/ml의 카제인을 사용하여 제1 라운드와 동일하게 하였다. 제2 라운드에서 사용된 비드는 Spherotech(Lake Forest, IL) 아비딘 코팅된 자성 입자였다. 제3 라운드에서, 카제인을 블로킹 시약으로 사용하였고, M280 스트렙타비딘 비드를 사용하여 SYNAGIS<sup>®</sup>를 포획하였다. 제4 라운드에서는 블로킹 시약으로 BSA를 사용하였고 Spherotech 아비딘 자성 입자를 사용하여 SYNAGIS<sup>®</sup>를 포획하였다. 제4 라운드 패닝 후, 이.콜라이를 용리된 파지로 감염시키고 평판배양하였다. 개별 콜로니를 96웰 포맷에서 배양하고, M13K07를 감염시킨 후, 배양 상등액을 파지 ELISA에 사용하여 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 클론을 동정하였다. 3개의 신규한 SS4 안정화 클론을 동정하고, 그 서열을 하기 표 6에 열거하였다.

표 6

[0710]

SYNAGIS <sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드의 BC 및 FG 루프 서열				
클론	BC 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
SYNAGIS <sup>®</sup> 특이적 결합 스캐폴드				
4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110

[0711]

#### 실시예 9. TRAIL-R2 특이적 스캐폴드에 대한 2 루프 Tn3<sup>SS4</sup> 라이브의 패닝

[0712]

M280 스트렙타비딘 비드를 PBST로 세척하고 비오틴화된 염소 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 부가하였다. 4℃에서 밤새 항온반응시킨 후, 대조군 IgG1 항체 또는 TRAIL-R2/Fc 융합 단백질(R & D 시스템스, Minneapolis, MN)을 부가하고, 다시 4℃에서 밤새 항온반응시켰다. 비드를 PBST로 세척하고 사용 전에 PBST 2% 탈지분유 중에서 블로킹하였다.

[0713]

2 루프 Tn3<sup>SS4</sup> 파지 라이브러리를 밤새 4℃에서 대조군 IgG1 항체-코팅된 비드와 항온반응시켜서 비드 또는 인간 IgG1 Fc에 대해 결합인자 라이브러리를 격감시켰다. 격감시킨 라이브러리를 이어서 TRAIL-R2 코팅된 비드에 부가하고 2시간 동안 실온에 흔들 플랫폼에서 항온반응시켰다. 비드를 PBST로 세척하고 XL-1 Blue 이.콜라이에 첨가하여 실시예 8에 기술된 바와 같이 결합된 파지를 증폭시켰다. 이러한 패닝 절차를 추가 4 라운드 반복하였는데, 단, 백그라운드 격감을 위한 대조군 항체 비드와의 항온반응은 밤새하기 보다는 1시간 동안 수행하였다. 개별 클론은 패닝 제4 및 제5 라운드 이후에 파지 ELISA를 통해 분석하여 TRAIL-R2 결합 변이체를 동정하였다.

[0714]

TRAIL-R2 파지 ELISA로부터의 양성 클론을 서열분석한 후, 9개의 고유한 결합 클론을 동정하였다(표 7). 아래쪽 q는 TAG 중지 코돈이 그 위치에 존재했다는 것을 의미한다. 서프레스 균주 예컨대 XL-1은 이 위치에 글루타민을 삽입시켜 TAG 중지 코돈을 갖는 유전자의 발현을 가능하게 한다.

표 7

[0715]

TRAIL-R2 특이적 결합 스캐폴드의 BC 및 FG 루프				
클론 명칭	BC 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMSGAPA	127
5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCqKTG	130	FKLTGFLYS	131

6F11	SPSVARMLETG	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFNSPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDShIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYIqG	142	AKLTGWLCS	143

[0716] 실시예 10. TRAIL-R2 특이적 스캐폴드에 대한 결합 친화성 측정

[0717] 염소 항-인간-Fc IgG를 표준 아미노 커플링 프로토콜을 사용하여 CM5 Biacore 센서(BIAcore, Inc.) 칩 표면 상의 유세포 위에 ~7700 RUs 밀도로 고정시켰다. 개별적으로, 블랭크 표면도 동일한 커플링 프로토콜을 사용하여 단백질이 빠진 동일한 칩 상에 준비하였다. 이 블랭크 표면을 실험 전반에 걸쳐 기준 세포로 사용하였고, 비특이적 결합과 일정한 하우스키핑 인공물 양쪽에 대한 보정을 위해 제공하였다.

[0718] TRAIL-R2/Fc 단백질은 장치 완충액(HBS-EP 완충액, BIAcore, Inc.: 10mM HEPES 완충액, pH7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 및 0.005% P20로 이루어짐) 중 100 nM로 준비하고, 이어서, 75  $\mu$ l/분의 유속으로 Fc-포획 및 대조군 표면 양쪽에 주입하였다. 리간드의 포획 수준은 대략 800 RUs였다.

[0719] 베이스라인 안정화 이후, Tn3 클론 5E5(표 7)의 용액을 포획된 리간드 및 대조군 표면 양쪽에 주입하였다. 주입 사이에, Fc-포획 표면을 10 mM Gly, pH 2를 2회 1분 주입하여 재생시켰다.

[0720] 주입 시리즈 전반에 걸쳐 몇몇 완충액 및 대조군 단백질 주입도 수행하였다. 이후에, 이들 완충액 주입 결과를 기준 세포 데이터와 함께 사용하여, 통상 "이중-참조(double-referencing)"법(Myszka, D.G. (1999) *J. Mol. Recognit.* 12, pp. 279-84)으로 알려진 방법을 통해 주입 인공물 및/또는 비특이적 '결합'에 대해 미편집 데이터 세트를 보정하였다. 완전히 보정된 데이터의 센서그램 중첩도를 BIAevaluation 4.1 소프트웨어(BIAcore, Inc, Uppsala, Sweden)를 사용하여 생성시켰다. TRAIL-R2에 결합하는 5E5의 친화성은 도 13에 도시한 센서그램에 대해 BIAevaluation 소프트웨어에서  $k_{on}$  및  $k_{off}$  값을 측정하여 산출하였다. 이 분석결과는 TRAIL-R2에 대한 5E5 결합에 대해  $K_d$ 가 대략 700 nM로 확인되었다.

[0721] 실시예 11. 클론 5E5 및 7G11을 사용한 TRAIL-R2와의 결합에 대한 경쟁

[0722] 가용성 5E5 및 7G11(실시예 9에서 단리된 TRAIL-R2 특이적 클론)을 발현시키고 경쟁성 파지 ELISA 분석에 사용하여 이들이 TRAIL-R2에 특이적으로 결합하는지 검토하였다. 가용성 Tn3 클론 7G11 또는 5E5 존재 또는 부재하에서 TRAIL-2 특이적 Tn3을 디스플레이하는 파지와 TRAIL-R2 코팅된 평판을 항온반응시켰다. 도 14에 도시한 바와 같이, 가용성 5E5를 파지 디스플레이된 5E5, 및 2H6와 7G11를 제외한 모든 다른 파지 디스플레이된 클론을 경쟁시켰다. 가용성 7G11만이 파지 디스플레이된 7G11 및 2H6과 경쟁하였다. 이 실험은 모든 클론이 TRAIL-R2에 대해 특이적이고 TRAIL-R2 상에 이 Tn3 단백질 패널에 의해 인식되는 2종의 상이한 에피토프가 존재한다는 것을 의미한다.

[0723] 실시예 12. 3 루프 Tn3<sup>SS4</sup> 라이브러리의 제작

[0724] Tn3<sup>SS4</sup> 스캐폴드를 기반으로 파지 디스플레이된 3 루프 라이브러리를 하기 표 8에 열거한 프라이머를 사용하여 BC, DE 및 FG 루프의 서열을 무작위화시켜 제조하였다. 간략하게, Tn3<sup>SS4</sup>를 갖는 2 루프 Tn3 BC 루프 라이브러리(실시예 7) 유래의 단일 가닥 DNA를 표 8의 DE rev 프라이머를 사용한 PCR용 주형으로 사용하였다. 이 PCR에 의해서 BC 및 DE를 무작위화시킨 Tn3 유전자의 일부를 함유하는 생성물이 생성되었다. 제2 PCR에서는 이 BC, DE 루프 무작위화된 PCR 생성물을 표 8에 열거한 FG 프라이머를 사용하여 증폭하기 위한 주형으로서 사용하였다. 얻어진 PCR 생성물은 이후에 *NcoI*와 *KpnI*로 효소절단되어 파지 디스플레이 벡터에 결합되는 완전한 Tn3 유전자를 만들기 위해 프라이머를 측정시켜 증폭시켰다. 전기천공을 통해 이 DNA를 이.콜라이에 형질전환시켰다.

[0725] 전기천공 후, 라이브러리를 진탕하면서 1시간 동안 37°C에서 항온반응시켰다. M13K07 헬퍼 파지를 부가하고 1시간 이후에, 세포를 보다 큰 부피로 희석한 후 진탕하면서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 다음날, 염수 PEG 8000 용액을 사용한 침전에 의해 배양 상등액에서 파지를 정제하였다. 라이브러리 크기는 이.콜라이 형질전환체의 수를 기준으로 대략  $1.5 \times 10^9$  구성원을 함유하는 것으로 추정되었다.

[0727]

[0728]

[0729]

TRAIL-R2 특이적 결합 스캐폴드의 BC, DE 및 FG 루프 서열						
클론	BC 루프	서열 번호	DE 루프	서열 번호	FG 루프	서열 번호
1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYVVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTG	156	QSSRSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRqGGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161
2G03	SPGPLLRHTTG	162	RPiPRA	163	RNRPQqSNPA	164
2D3	SPGGFqKITTG	165	VNRRNH	166	LTYKARAI S	167
1C06	SPRMYTWIqTG	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HWVqVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTG	174	HGLqRV	175	AKICGHLVS	176
3B11	SPCqLLALITG	177	NSRHYYH	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCqMLSSLTG	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182
2A12	SPCCqEFTLTG	183	HNHHHHH	184	ITDAGNKS NPA	185
1E05	SPCSPCqLVTG	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNPA	188
2F02	SPSRGGTSLTG	189	DqVRAT	190	HTNSGqPSNPA	191
1H05	SPGMFdqVRTG	192	GKYWER	193	RNQYGqHqS	194
2A11	SPPFRAGHVTG	195	VTARCq	196	TTGNGLRSNPA	197
1G11	SWAqANPGG	198	WHSITF	199	KTKVqASNPA	200

[0731]

[0732]

– 102 –



대한 결합에서 경쟁하는지 확인하기 위해 파지 ELISA에서 시험하였다. 이 분석은 실시예 11의 결합에 대한 경쟁 분석과 유사하게 실시하였고, 그 결과는 도 15a, b 및 c에 도시하였다. 클론 8B3과 7G11을 제외하고, 가용성 Tn3 클론 1E3, 1C12 및 2D3은 대부분의 파지 연결된 Tn3이 TRAIL R2에 결합하는 것을 유의하게 억제하였다. 가용성 1G11은 어떠한 파지 결합된 클론과도 유의하게 경쟁하지 않았다. 가용성 2B4는 대부분의 경우에 약간에서 중간 정도로 억제하는 것으로 나타났다. 1E3, 1C12 및 2D3이 동일 세트의 파지 연결된 Tn3과 결합한다는 사실은 이들 3 가용성 Tn3 및 파지 연결된 Tn3이 TRAIL-R2 상의 동일 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 시사한다.

#### [0733] 실시예 15. 항-His 단일클론 항체에 연결된 Tn3 단량체를 사용한 세포 생존능 분석

[0734] Colo 205는 TRAIL-유도된 사멸에 매우 민감한 세포주이다. 마우스 항-His 태그 항체 및 항-마우스 IgG의 복합체에 결합하여 다량체화될 때, TRAIL-R2 결합 Tn3에 대해 Colo205 세포의 사멸을 유도하는 능력을 시험하였다. 10% FBS를 포함하는 100  $\mu$ l의 RPMI 1640 배지 중 Colo205 세포를 바닥이 편평한 96-웰 배양 평판 각 웰에 파종하고 37°C에서 항온배양하였다. Tn3 단백질 7G11 및 5E5(표 7), 1C12, 2D3 및 1E3(표 9) 및 Tn3<sup>SS4</sup>(실시예 4)를 마우스 항-His 태그 항체(Penta-His; Qiagen Inc) 그리고 토끼 항 마우스 IgG와 2:1:0.5의 몰비율로 항온반응시켰다. 각 Tn3 복합체의 연속 희석물을 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지로 만들어서 Tn3 함량을 기준으로 최종 농도가 5  $\mu$ M, 1.66  $\mu$ M, 0.55  $\mu$ M, 0.185  $\mu$ M 및 0  $\mu$ M이 되도록 하였다. 밤새 배양한 세포에서 배지를 제거하고, 100  $\mu$ l의 Tn3-항체 복합체를 부가하였다. 각 분석은 삼중으로 수행하였다.

[0735] Tn3 복합체를 부가한 후, 세포를 3일간 37°C에서 항온반응시키고, 이후에 세포 생존능은 제조사 지침에 따라서 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 발광성 세포 생존능 분석법(Promega Corp., Madison, WI)으로 측정하였다. TRAIL-R2 결합 Tn3으로 처리한 세포에 대한 생존률은 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 분석으로 얻은 발광 신호를 동일 농도의 비 TRAIL-R2 결합 대조군 Tn3으로 처리한 세포에서 얻은 상응하는 신호로 나누어 계산하였다.

[0736] 세포 생존능 분석법(도 16)은 항체 복합체화로 다량체화될 때, Tn3 클론 5E5, 1C12 및 2D3은 비-TRAIL-R2 결합 Tn3으로 처리한 세포에 대해서 용량 의존적인 방식으로 Colo205 생존능을 억제할 수 있었다. 이러한 세포 생존능 억제는 아마도 TRAIL-R2 결합에 의해 촉발된 세포 아포토시스에 의한 것으로 보이지만, 이를 확증하기 위해서는 경로 특이적 분석이 필요하다. 클론 7G11 및 1E3은 이 분석에서 사용된 농도에서 검출가능한 활성을 보이지 않았다. 추가적인 세포 분석에서는 항-His 태그 포획 항체없이 분석 시 어떠한 활성 Tn3 단백질도 세포 생존능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 활성이 다량체화된 TRAIL-R2 결합 부분의 존재에 의존적이라는 것을 보여준다. 클론 5E5는 또한 항-IgG 항체가 존재하지 않으면 활성이 결여되었지만, 클론 1C12 및 2D3은 항-IgG의 부재 하에서 활성이 있었는데, 이러한 결과는 항 His-태그 항체 포획을 통한 이량체 존재가 TRAIL-R2 신호화를 촉발시키는데 충분하다는 것을 의미한다.

#### [0737] 실시예 16. 다가 항 TRAIL R2 Tn3 항체 융합체의 제작

[0738] TRAIL-R2-의존적인 세포 사멸을 수행하기 위해서 올리고머 Tn3 복합체가 존재하는 것이 요구되므로, 2가 및 4가 Tn3-함유 단백질의 제조하기 위한 Tn3 융합 구성체를 디자인하였다(도 17). 2가 Tn3 구성체는 Tn3을 인간 IgG1의 Fc 영역에 융합시켜 디자인하였고, 한편 2쇄 4가 Tn3 구성체는 Tn3-IGHG1과 Tn3-C $\kappa$  융합체의 공동 발현물을 기초로 디자인되었는데, 즉 Tn3을 인간 C-카파영역, 및 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역에 융합시켰다. 후자의 구성체는 경쇄와 중쇄 가변 영역이 Tn3 부분으로 치환된 것을 제외하고는 천연 항체와 유사하다.

[0739] 도 17a 및 b에 도시한 구성체를 각 단백질을 코딩하는 인하우스 pOE 발현 벡터로 일시 형질감염된 293F 세포에서 발현시켰다. 배양 10일 후, 배지(250 mL)를 회수하고, 단백질을 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 도 10은 다가 Tn3 구성체 선별물의 발현 수준을 나타낸 것이다. 1C12, 및 D1이라 명명한 대조군 SYNAGIS<sup>®</sup> 결합 Tn3(실시예 8, 서열 번호 105 및 서열 번호 106)은 Fc 융합체, 또는 2쇄 Tn3-C $\kappa$ /Tn3-IGHG1 융합체와 유사하게 충분히 발현되었다. 2D3 Fc 융합체와 함께, 1C12 및 2D3의 하이브리드 4가 융합체(1C12는 IGHG1에 연결, 2D3는 C $\kappa$ 에 연결, 및 반대의 경우)는 물질 수율이 보다 적었으며, 한편 2쇄 2D3-C $\kappa$ /2D3-IGHG1 융합체는 발현되지 않았다. 단백질 A 정제된 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 도 18에 도시하였다.

표 10

상이한 Fc 융합 및 4가 항체 융합 구성체의 수율		
#	명칭	최종
1	D1-Fc	15mg
2	1C12-Fc	15mg

3	2D3-Fc	3.5 mg
4	D1-C $\kappa$ /D1-IGHG1	13mg
5	1C12-C $\kappa$ /1C12-IGHG1	10mg
6	2D3-C $\kappa$ /1C12-IGHG1	4mg
7	1C12-C $\kappa$ /2D3-IGHG1	4mg

[0741] 1C12, 1C12 Fc 및 1C12 4가의 바이오센서 분석

[0742] 단량체 1C12, 1C12-Fc 및 1C12-C $\kappa$ /1C12-IGHG1 단백질에 의한 결합의 정성 비교를 Attana 바이오센서 장치 상의 TRAIL-R2 칩에 이들 단백질 각각의 샘플을 주입하여 수행하였다. 도 19에 도시한 바와 같이, 1C12의 올리고머화된 형태와 TRAIL-R2의 복합체는 단량체 1C12에 비하여 실질적으로 개선된 친화성을 보여주었다. 결합 특이성은 고정화된 TRAIL-R2와 상호작용하지 않는 D1-Fc 및 D1-C $\kappa$ /D1-IGHG1 단백질을 주입하여 확인하였다. 상이한 1C12 구성체에 대한 해리 속도는 1C12 > 1C12-Fc > 1C12-C $\kappa$ /1C12-IGHG1 순이었으며, 이러한 결과는 Trail-R2와의 상호작용에서 화합력을 나타내는 2가 및 4가 구성체와 일관되는 것이다.

[0743] 실시예 17. 다가 항 TRAIL-R2 Tn3 융합 단백질을 사용한 세포 생존능 분석

[0744] H2122 세포를 50  $\mu$ l의 완전 배지(10% FBS가 보충된 RPMI 1640 배지) 중 10000 세포/웰의 밀도로 96웰 평판에 파종하였다. 세포를 37°C에서 밤새 항온배양하였다. 다음날, 다가 Tn3 융합 단백질(Fc 융합체 또는 2쇄 4가 구성체) 단독으로 또는 염소 항-인간 Fc와 조합하여 완전 배지에 연속 희석하였다. 용량 곡선을 얻기 위해, 3배 희석 계획을 사용하였다(최고 최종 농도가 3.6  $\mu$ M임). 염소 항-인간 Fc를 1:2 몰 비율로 부가하였다(즉, Tn3-함유 분자 농도의 절반). Tn3 및 항-인간 Fc 단독, 및 조합을 2X 농도(각 처리물 50  $\mu$ l를 웰당 부가함)로 준비하였다. 모든 처리는 3개 웰에 삼중으로 수행하였다. 시판되는 TRAIL 리간드(Chemicon Cat# GF092)를 Trail-유도 세포 사멸을 위한 양성 대조군으로 사용하였다. Trail의 최종 농도는 1, 0.1 및 0.01 nM이었다. 48시간 후, Promega 사의 CellTiter-Glo 키트를 사용하여 세포 생존능을 측정하였다. 간략하게, 세포를 약 10분간 실온으로 평형화시켰다. 제조사의 지침대로 CellTiter-Glo 완충액과 기질을 혼합하여 CellTiter-Glo 시약을 준비하였다. 각 웰에 100  $\mu$ l의 CellTiter-Glo 시약을 넣고 평판을 10분간 실온에서 항온반응시킨 후, Wallac 평판 판독기에서 발광성을 반독하였다. 결과를 도 20-22에 나타내었다. 각각의 1C12 및 2D3 함유 다가 구성체는 H2122 세포의 생존능을 억제할 수 있었는데, 아마도 TRAIL-R2 의존적 아포토시스에 의해 활성화에 의한 것인 듯하며, 또한, 이러한 활성은 항-Fc 항체와의 협력을 통한 고도의 가교결합에 의존적이지 않았다. 1C12의 4량체는 이의 이량체 형태보다 세포 분석에서 보다 강력하였으며(도 20과 21 비교), 이러한 결과는 사멸 활성이 수가와 상관 관계라는 것과 일치한다. Fc-가교 결합은 사멸능을 증가시키지 않았고 단일특이적 1C12 구성체의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. TRAIL-R2에 결합하지 않는, D1-Fc나 또는 D1-C $\kappa$ /D1-IGHG1 대조군 단백질도 세포 생존능에 영향을 미치지 않았다. 이중 특이적인 4가 구성체(도 22)는 H2122 세포 생존능을 억제하는 최고의 능력을 가졌으며, 이는 항-Fc 항체와 공동 항온반응시키면 약간 증가하였다. 단일특이적인 1C12-C $\kappa$ /1C12-IGHG1에 비하여 2D3/1C12 이중특이적 구성체에 대한 활성 증가는 1C12 Tn3 유닛과 대비하여 2D3의 우수한 능력에 의한 것이거나, 또는 2D3 및 1C12가 TRAIL-R2 상의 상이한 에피토프를 인식하여 세포 표면 TRAIL-R2가 고도로 응집될 수도 있기 때문이다.

[0745] 실시예 18. 박테리아에 의한 Tn3 스캐폴드 분비

[0746] 이.콜라이에서 올바르게 폴딩된 Tn3 스캐폴드를 분비하도록 박테리아 발현 벡터를 디자인하였다. 이 시스템은 Tn3 내에서 올바른 이황화 결합 형성을 가능하게 하여 실시예 4에 기술한 바와 같이, 세포 내에서 발현된 물질에 요구되는 리폴딩 과정이 없어도 된다. 분비 벡터를 제조하기 위해, 실시예 4에서 기술한 것과 유사하지만, T7 프로모터 대신 Ptac 프로모터를 함유하는 세포내 Tn3 발현 벡터에 이.콜라이 올리고펩티드 결합 단백질(oppA) 유래의 신호 펩티드 서열을 삽입시켜 이 벡터를 변형시켰다. Tn3의 바로 상류에 클로닝시킨 이 신호 서열은, oppA가 고도로 발현되는 이.콜라이 단백질이기 때문에 선택된 것이다. 정체가 용이하도록 연장된 8xHis 태그를 Tn3의 하류에서 코딩되도록 하였다. 이 플라스미드와 다른 플라스미드 간에 Tn 카세트 전달이 간단하도록, oppA 신호 서열의 3' 말단에 Nco I 부위를 도입하여 상기 벡터의 변형된 형태로 생성시켰다. 이러한 변형으로 oppA 신호 서열 내 끝에서 2번째에 단일 아미노산 치환(L25M)이 생겼다(도 23). 이들 벡터를 pSec-oppA-Tn3 및 pSec-oppA(L25M)-Tn3이라 명명하였다.

[0747] 카르바니실륨을 함유하는 수퍼액체 배지(100  $\mu$ g/ml, 1% 글루코스)에 pSec-oppA-Tn3 또는 pSec-oppA(L25M)-Tn3로 형질전환된 이.콜라이 BL21 DE3 배양물을 접종하였다. 이 배양물을 37°C에서 OD가 0.5~0.8이 될 때까지

배양한 후, 0.2 mM IPTG로 유도시켰다. 37°C에서 5시간 동안 진탕한 후, 원심분리하여 세포를 배지에서 분리하였다. 세포 펠렛을 1/10 부피의 빙냉 추출 완충액(10 mM Tris, pH 8 및 1 mM EDTA)에 재현탁하고, 10분간 얼음에서 항온반응시킨 후, 원심분리하여 세포를 제거시켜 주변세포질 추출물을 준비하였다. 주변세포질 추출물 샘플과 배지를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다. Tn3이 배지와 주변세포질 분획에서 모두 검출되었고, 발현도는 야생형 또는 L25M oppA 신호 펩티드를 함유하는 구성체에 대해서 유사하였다(도 24a). pSec-oppA(L25M)-Tn3이 편리한 5' Tn3 클로닝 부위를 함유하기 때문에, 디스플레이 라이브러리에서 유래된 Tn3 클론의 발현을 위해 이 구성체가 선호되었다.

[0748] 배지로부터 Tn3의 정제는 분비된 단백질을 65% w/v 황산암모늄으로 침전시키고, 펠렛을 50 mM Tris pH 8 완충액에 재현탁한 후, 이전에 기술한 바와 같이,  $\text{Ni}^{2+}$ 가 충전된 HiTrap 킬레이팅 컬럼 상에서 정제하여 실시하였다. 정제된 샘플의 SDS-PAGE 분석 결과를 도 24b에 도시하였다. 정제된 Tn3은 임의의 이황화 결합을 환원시키기 위하여 DTT를 사전처리하거나 또는 사전처리하지 않고 역상 HPLC(본 발명에 기술한 바와 같음)를 통해 분석하였다. Tn3을 단일 피크로 용리하였고, DTT로 환원 후 용리 시간이 이동하였는데, 이는 예상하는 바와 같이, 정제된 샘플이 이황화 결합을 함유한다는 것을 의미한다(도 23c). 이 물질의 비환원 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피는 단일한 단량체 종과 일치하였고, 질량 분광분석법은 분자 중량이 10,896 Da로 확인되어, 도 28a에 도시한 성숙한, 이황화 함유 서열에 대한 예상 분자량의 3 Da 이내였다.

[0749] 최종적으로, 배지 내 분비 Tn3의 발현도는 바이오센서 분석에서 확인하였다. 항-His 태그 항체(Penta-His, Qiagen Inc.)를 표준 아민 커플링을 통해 Attana A100 카르복실 센서 칩 상에 고정화시켰다. 이.콜라이 BL21 DE3을 pSec-oppA(L25M)-Tn3로 형질전환시키고, 단백질 발현을 상기 기술한 대로 유도하였다. 맑은 배지의 희석 물을 상기 칩에 주입하고, 결합된 His-태그 함유 Tn3의 농도를 정제된 Tn3 표준물의 주입시 생성된 농도와 비교하였다. 이 방법을 통해서, 미정제 배지에서 검출된 Tn3의 농도는 250 mg/L였다.

#### [0750] 실시예 19. SynBP01-Fc 융합물의 생성

[0751] 요약: SYNAGIS<sup>®</sup>-결합 Tn3과 IgG1의 Fc 영역의 키메라 융합물을 생성시켰다.

[0752] 방법: SynBP01-Fc의 발현

[0753] 상기 기술한 바와 같이, SynBP01는 SYNAGIS<sup>®</sup>에 대해 패닝한 BC 루프 및 FG 루프 무작위화된 Tn3 변이체의 라이브러리에서 동정된 Tn3 변이체이다. 측정한 NheI 및 KasI 부위를 침묵 돌연변이 유발법을 통해 도입시키고 이 구성체를 pOE-Fc 벡터로 서브클로닝하는데 사용하였다. pOE-Fc 벡터는 KasI 제한효소 부위의 3'에 IgG1 Fc의 ICH2 및 CH3 도메인을 함유한다. SynBP01을 pOE-Fc에 서브클로닝하여 생성시킨 벡터를 pOE-SynBP01라고 명명하였다.

[0754] 293EBNA 세포(120 ml 부피)를 표준 방법을 사용하여 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 통해 pOE-SynBP01로 형질전환시켰다. 형질감염 10일 후, 상등액을 회수하고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피(GE Healthcare)를 통해서, 0.1 M 글리신, 0.15M NaCl, pH 3.08로 용리하고, Tris-HCl 완충액(pH 8)으로 중성화시켜 정제하였다. 정제된 샘플을 PBS 완충액(pH 7.2)으로 투석시켰다. 정제된 SynBP01-Fc의 수율은 4 mg이었고, 발현도는 33 mg/L였다.

[0755] SynBP01-Fc의 BIAcore 분석

[0756] 이 분자의 BIAcore 분석은, 실시예 3에 기술한 바와 같이, BIAcore 3000(GE Healthcare)에서 실시하였다. 이 실험은 SynBP01-Fc가 SYNAGIS에 결합할 수 있는 능력이 있는지 확인하고, 본래 SynBP01과 Fc 융합체 간에 분명한 친화성 차이를 정성적으로 검출하기 위해 디자인되었다.

[0757] 결과: 1  $\mu\text{M}$  당량 농도로 주입시, SynBP01-Fc 수율은 SynBP01에 비하여 전체 반응 유니트가 대략 6배 증가되었다(도 26). 또한, SynBP01-Fc는 무엇보다도 2가 Fc 융합체의 화합력 증가로 인하여, SynBP01에 비하여 실질적으로 비율을 벗어나(off-rate) 감소하였다. SynBP01-Fc/SYNAGIS<sup>®</sup> 상호작용의 해리 상수( $K_D$ )를 이 실험에서 결정하지 않았지만, 결합 표면이 동역학 분석을 위해 준비되지 않았기 때문에, 실시예 3에서 SynBP01/SYNAGIS<sup>®</sup> 상호작용으로 보여준 16  $\mu\text{M}$ 의  $K_D$ 로부터  $K_D$ 가 향상되었다는 것은 분명하다.

#### [0758] 실시예 20. STn3 스캐폴드의 부위 특이적 PEG화

- [0759] PEG화를 통한 단백질 변형은 주로 이의 치료적 특성을 개선시키기 위해, 예컨대 신장 제거를 피하도록 소형 단백질의 유효 크기를 증가시켜 약동역학 및 생체 이용률 개선시키거나, 면역원성을 감소시키기 위해 사용된다. 단백질 내 1 이상의 특정 잔기에 부착되는, PEG를 사용한 부위 특이적 변형을 통해서, 단백질 내 기능성 부위 또는 그 근처에 PEG가 부착되어 일어날 수 있는 표적 단백질 활성의 불활성화를 피할 수 있다. Tn3 유사 스캐폴드 단백질의 부위 특이적 PEG화를 위해서, 시스테인 잔기를 STn3(실시에 5의 에스.토코다이 1Tn3)의 C 말단에서 조작하였다. STn3의 야생형 서열이 시스테인을 함유하지 않기 때문에, Cys-특이적 PEG화 반응으로 조작 스캐폴드를 처리하여 PEG를 부위 특이적으로 부착시킬 수 있다. STn3은 pET-22b 벡터(Novagen)의 변형체 중에서, C 말단 6xHis 태그에 융합시켜 발현시켰다. 이벡터는 단백질과 His 태그 사이에 링커 서열 GGGLE을 함유한다. QuikChange (Stratagene) 돌연변이유발법에 의한 변이를 사용하여 링커 내 류신 잔기를 시스테인으로 돌연변이시켰으며, 이는 말레이미드 시약에 의해 변형될 수 있다. 이 단백질을 STn3(CTC)로 명명하였고, 발현시킨 후 실시에 1에서 기술한 바와 같이, IMAC 컬럼을 사용하여 BL21(DE3) 세포로부터 정제하였다.
- [0760] PEG화 시약, Sunbright ME-200MA(NOF)를 STn3(CTC)에 4:1(PEG 시약:단백질)의 과 몰량으로 부가하고, 실온에서 72시간 동안 항온반응시켰다. 단백질 PEG화는 SDS-PAGE(도 27a, 레인 5)로 모니터링하였는데, 대부분의 단백질이 단일 PEG 부분으로 PEG화된 것으로 확인되었다. 대체로 PEG화는 단백질의 표면 전하를 가리는 효과가 있기 때문에, 단백질이 컬럼에 효과적으로 결합할 수 있도록 양이온 교환 크로마토그래프를 위한 pH는 6.0(야생형 정제용)에서 4.5로 낮추었다. 50 mM 아세트산(pH 4.5)을 사용하여 1 mL SP XL 컬럼(GE Healthcare) 상에서 단백질을 정제하였다. 염화나트륨 농도 구배를 사용해서 단백질을 용리하였는데, 단백질 피크는 대략 120 mM NaCl에서 나타났다. PEG화 생성물에서 나머지 PEG화되지 않은 STn3(CTC)이 성공적으로 제거되었는지는 양이온 교환 정제 분석에서 얻은 분석의 SDS-PAGE 분석으로 확인하였다(도 27b, 레인 1-5).
- [0761] **실시에 21. AB, CD 및 EF 루프의 분석 및 무작위화된 라이브러리의 디자인**
- [0762] AB, CD 및 EF 루프를 무작위화시킨 Tn3 라이브러리를 디자인하기 위해, 천연 발생 Fn3 도메인 내 이들 루프의 길이 및 서열 다양성에 관한 정보 추출을 위한 생물정보학 분석을 수행하였다. 서열 정보만을 기초로 AB, CD 및 EF 루프 영역을 예측하는 것은 무리이므로, pdb 데이터베이스에서 103개의 상이한 Fn3 도메인의 3차원 구조를 보충하였고, 이를 사용하여 상응하는 아미노산 서열을 정렬시켰다(데이터 도시하지 않음). 루프 영역의 위치를 사용하여 각 루프에 대한 길이 및 서열 다양성 정보를 추출하였다. 각각의 AB, CD 및 EF 루프에 대한 길이 가변성을 도 28에 도시하였다.
- [0763] Tn3 분자의 반대면 상에 루프를 사용하였기 때문에, AB, CD 및 EF 루프는 상이한 Fn3 도메인에 대해 길이 및 서열 조성이 다양하다. AB 및 CD 루프는 일반적으로 5 내지 9 아미노산 길이지만, 이보다 길거나 짧은 AB 및/또는 CD 루프를 갖는 일부 Fn3 도메인이 예외적으로 생길 수 있다. 이 데이터 세트 내에서 가장 일반적인 길이는 CD 루프에 대해 6 잔기 길이(서열의 31%), AB 루프에 대해 7 잔기(서열의 61%)였다. 길이 가변성은 EF 루프의 경우는 덜 빈번하게 일어났으며, 8 잔기 루프가 가장 일반적으로 관찰되었다(서열의 80%). AB 및 CD 루프 둘 모두는 서열에 상당한 다양성을 보였는데 특정 위치에서 특이적 아미노산에 대한 선호도는 분명하게 보이지 않았다. 예외는 종종 Ser 또는 Thr(58/103 서열)이 존재하는 AB 루프의 마지막 위치였다. EF 루프의 서열은 특정 위치에서 상당히 선호되는 아미노산이 밝혀졌지만, 이는 8 잔기 길이로 제한된다. 이들 루프 내에 위치 3에서 Leu가 상당히 보존적이었고(76/82 서열), 이 잔기의 측쇄가 각각의 구조 내에서 묻혀있기 때문에, 스캐폴드의 구조 보존성에 중요할 것으로 보인다. Pro 잔기도 위치 5에서 일반적으로 관찰되었고(44/82 서열), 한편, Gly, Asn, Asp 및 Ser는 종종 위치 2(71/82 서열)에 존재하였으며, 위치 7에는 Thr가 존재하였다(40/82).
- [0764] 이들 Tn3 라이브러리의 디자인에서 실제적인 추가 고려 사항은 임의의 아미노산을 코딩하기 위한 축퇴성 올리고뉴클레오티드에서 통상적으로 사용되는 "NNK"(N = A, G, T, C; K = G, T) 혼합 코돈 전략에 대한 대체안을 찾는 것이다. "NNK" 혼합이 모든 20개 아미노산을 코딩하는 32개의 상이한 코돈을 제공하지만, 이들은 동등하게 코딩되지 않는다(표 11). 예를 들어, "NNK" 설계안의 3/32 코돈이 Leu를 코딩하고(CTG, CTT, TTG), 1/32만이 Asp(GAT)를 코딩한다. 또한, "NNK" 혼합체는 1개의 중지 코돈(TAG)과 Cys 코돈(TGT)을 코딩하지만, 이들 중 어떠한 것도 참신한(naive) 라이브러리를 생성시키는 경우에는 적절하지 않다. 대체안을 고려하여, 본 발명자들은 합성 항체 라이브러리가 적은 아미노산 서브셋으로 구성된 CDR 서열을 코딩한다는 사실에 주목하였다. 단지 4개의 아미노산(Tyr, Ala, Asp, Ser), 또는 2성분 쌍(Tyr, Ser)으로 구성된 CDR을 갖는 항체 라이브러리는 단백질 항원에 대해 특이적인 높은 친화성 mAb를 생성시키는 것으로 보고되었다(Fellouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101: 12467-72; J. Mol. Biol. 2005, 348: 1153-62). 유사하게, Tyr 및 Ser 만을 포함하는 무작위화된 루프 서열을 갖는 스캐폴드 단백질의 라이브러리도 단백질 표적에 특이적인 결합인자를 생성시켰다(Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104: 6632-7). 고도로 제한된 아미노산 세트를 함유하는



라이브러리가 특이적 결합 단백질을 생성시킬 수 있지만, 이러한 라이브러리에서 얻어지는 결합인자의 다양성은 제한적일 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 Tn3 라이브러리에 다양성을 도입시키기 위해 대안적인 "NHT" 혼합 코돈 설계안(H = A, T, C)을 디자인하였다. "NHT"는 타당한 20개 아미노산의 서브셋을 위한 코돈을 혼합하였지만, "NNK" 혼합 코돈과 관련되어 기술한 단점은 피하였다(표 12). 이 설계안은 12/20 아미노산을 코딩하는 12 코돈을 생성시키는데, 즉, 각각의 코돈은 고유 아미노산을 코딩한다. 또한, 여기에는 중지 코돈이나 Cys 코돈이 존재하지 않는다.

표 11

[0765]

"NNK" 코돈 혼합체에 의해 코딩되는 아미노산					
A	AAG = Lys	ATG = Met	ACG = Thr	AGG = Arg	G
	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr	AGT = Ser	T
G	GAG = Glu	GTG = Val	GCG = Ala	GGG = Gly	G
	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala	GGT = Gly	T
C	CAG = Gln	CTG = Leu	CCG = Pro	CGG = Arg	G
	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro	CGT = Arg	T
T	태그 = STOP	TTG = Leu	TCG = Ser	TGG = Trp	G
	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser	TGT = Cys	T
	A	T	C	G	

표 12

[0766]

"NHT" 코돈 혼합체에 의해 코딩되는 아미노산			
A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

[0767]

무작위화된 AB, CD 및 EF 루프를 함유하는 Tn3 라이브러리에 대한 최종 디자인을 하기에 도사하였다. 이 디자인은 천연 Fn3 서열에서 관찰되는 다양성, AB 및 CD 루프에 대한 2종의 상이한 길이를 도입하였고, "NHT" 코돈 혼합체를 사용하였다.

[0768]

AB 루프 (7 및 9 잔기):

[0769]

Tn3 야생형 아미노산 서열(서열 번호 239): KDVTDDT

[0770]

라이브러리 아미노산 서열 (7 aa): Kxxxxxa

[0771]

DNA 서열: AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST

[0772]

라이브러리 아미노산 서열 (9 aa): Kxxxxxxxxa

[0773]

DNA 서열: AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST

[0774]

CD 루프 (7 및 9 잔기):

[0775]

Tn3 야생형 아미노산 서열(서열 번호 240): KDVPGDR

[0776]

라이브러리 아미노산 서열 (7 aa): xxxxxxx

[0777]

DNA 서열: NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT

[0778]

라이브러리 아미노산 서열 (9 aa): xxxxxxxxxxx

[0779]

DNA 서열: NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT

[0780]

EF 루프 (8 잔기):

[0781]

Tn3 야생형 아미노산 서열(서열 번호 241): GNLKPDTE



- [0782] 라이브리리 아미노산 서열: xblxPxcx
- [0783] DNA 서열: NHT-RRB-CTG-NHT-CCG-NHT-RBT-NHT
- [0784] 아미노산 코드: x = N/D/H/Y/I/V/L/F/T/A/P/S; a = S/T/A/G; b = N/K/S/R/D/E/G; c = I/T/S/V/A/G
- [0785] 뉴클레오티드 코드: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G
- [0786] **실시예 22. 안정성이 향상된, 전하 조작된 Tn3 변이체의 디자인, 발현 및 특징규명**
- [0787] 전하 조작된 Tn3 변이체의 디자인
- [0788] 열적 언폴딩에 대한 Tn3의 안정성은 pH 7과 비교하여 pH 5에서 보다 높았으며, 염을 함유하지 않은 동일한 완충액보다 1 M 염을 함유하는 pH 7 완충액에서 보다 높았다(도 29). 고 염 농도가 표면 단백질 전하를 감출 수 있기 때문에, 완충액 산성화는 음으로 하전된 Asp 및 Glu 측쇄를 중성화시킬 수 있는 한편, 이러한 관찰 결과는 Tn3 표면의 음 전하는 탈안정화 효과가 있다는 것을 시사한다.
- [0789] 표적 전하의 조작을 통해 Tn3의 안정성을 향상시킬 수 있는 가능성을 조사하기 위해, Asp 및 Glu 측쇄의 위치를 Tn3 의 3차원 구조 상에 지도화하였다. Tn3(서열 번호 1)에 함유된 총 18개의 Asp 및 Glu 잔기로부터, 개별 Asp 또는 Glu 잔기를 중성 등전자 잔기인 Asn 또는 Gln로 치환시켜 8 돌연변이체 패널을 디자인하였다(도 30a). 8개의 치환 부위 선택은 다른 Asp 또는 Glu와 근접하게 위치된 Asp 및 Glu 잔기에 편중하였는데, 유사 전하가 근접 위치하는 것은 정전기적 반발력을 통해, 탈안정화의 원인이 될 수 있기 때문이다.
- [0790] 전하 돌연변이체 생성 및 재조합 발현
- [0791] Tn3 돌연변이체에 대한 발현 구성체는 앞서 기술한 바와 같이 야생형 발현 구성체의 부위 지정 돌연변이 유발법으로 생성시켰다. 앞서 기술한 바와 같이 재조합 단백질을 이.콜라이에서 발현시키고 고정화된 니켈 킬레이트 친화성 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 모든 Tn3 돌연변이체가 높은 수준으로 발현되었고, 용이하게 정제되었지만, E54Q 돌연변이체 제조물을 SDS-PAGE 분석에 따르면 일부 불순물이 함유된 것으로 확인되었다(도 30b).
- [0792] 안정성의 특징 규명
- [0793] 우레아에 의한 전하 돌연변이체의 언폴딩을 야생형 Tn3에 대해 기술한 바와 같이 고유 형광발광으로 모니터링하였다. 야생형 및 Tn3의 전하 돌연변이체 간 우레아 유도된 언폴딩 프로파일 비교가 용이하도록, 각 단백질에 대해 우레아 농도 함수에 따른 360 nm에서의 상대적 형광발광 강도를 그래프화하였다.
- [0794] 야생형 Tn3 및 다양한 전하 돌연변이체에 대한 pH 7.0에서의 우레아 유도된 언폴딩을 비교한 결과(도 31a), 돌연변이체 중 3 변이체(D40N, E54Q 및 E67Q)는 야생형 단백질과 동일하거나 또는 그 보다 약간 낮은 안정성을 갖는 것으로 확인되었다. 돌연변이체 중 5 변이체(E33Q, D49N, E52Q, D53N, E86Q)는 우레아 유도된 언폴딩의 중간점에서 적지만 분명하게 정해진 증가가 나타나서, 단백질 안정성이 증가되었음을 알 수 있다. 50% 언폴딩을 유도하는데 요구되는 우레아의 농도는 야생형 Tn3에 비하여 최고 3 돌연변이체(E33Q, D49N 및 E86Q)에 대해 대략 0.5 M 높았다.
- [0795] 다중 전하 돌연변이를 함유하는 Tn3 변이체의 제조 및 분석
- [0796] 다수의 Tn3 전하 변이체가 그 안정성이 향상되었기 때문에, 조합된 전하 돌연변이를 함유하는 새로운 Tn3 변이체를 제조하여 안정성이 추가적으로 개선되는지 여부를 조사하였다. 이 목적을 위해, 쌍 돌연변이(D49N/E86Q 및 E33Q/D49N) 또는 삼중 돌연변이(E33Q/D49N/E86Q)를 함유하는 3종의 신규 변이체를 제조하였다. 이들 돌연변이체를 재조합 발현시키고 정제한 후, 이들의 우레아 변성 프로파일을 형광발광으로 특징규명하였다.
- [0797] Tn3의 단일 전하 돌연변이체와 비교한 경우, 각각의 조합 돌연변이체는 언폴딩에 요구되는 우레아 농도 증가를 통해 측정시 안정성이 추가적으로 향상된 것으로 나타났다(도 31b). 개별 전하 돌연변이체 E33Q, D49N 및 E86Q의 우레아 유도된 언폴딩의 중간점이 ~2.5M 우레아인데 반해, D49N/E86Q, E33Q/D49N 및 E33Q/D49N/E86Q 돌연변이체 각각에 대한 언폴딩의 중간점은 ~3.0 M 우레아에 해당되었다. 이 결과는 다중 탈안정화 Asp 또는 Glu 잔기의 조합 치환은 Tn3 안정성을 추가적으로 개선시킬 수 있었지만, 여기서 실험한 실시예에서, 삼중 돌연변이체가 이중 돌연변이체보다 안정적이지는 않았다.
- [0798] 야생형 Tn3와 비교하여 조합 전하 돌연변이체의 안정성을 추가적으로 특징규명하기 위해, 이들 단백질을 앞서 기술한 바와 같이 pH 7에서 DSC를 통해 분석하였다. 이 분석 결과 전하 돌연변이가 Tn3 스캐폴드의 안정성을 개선시킬 수 있다는 것이 더욱 검증되었다. 야생형 단백질은 열적 언폴딩의 중간점( $T_m$ )이 45°C이지만, E33Q/D49N

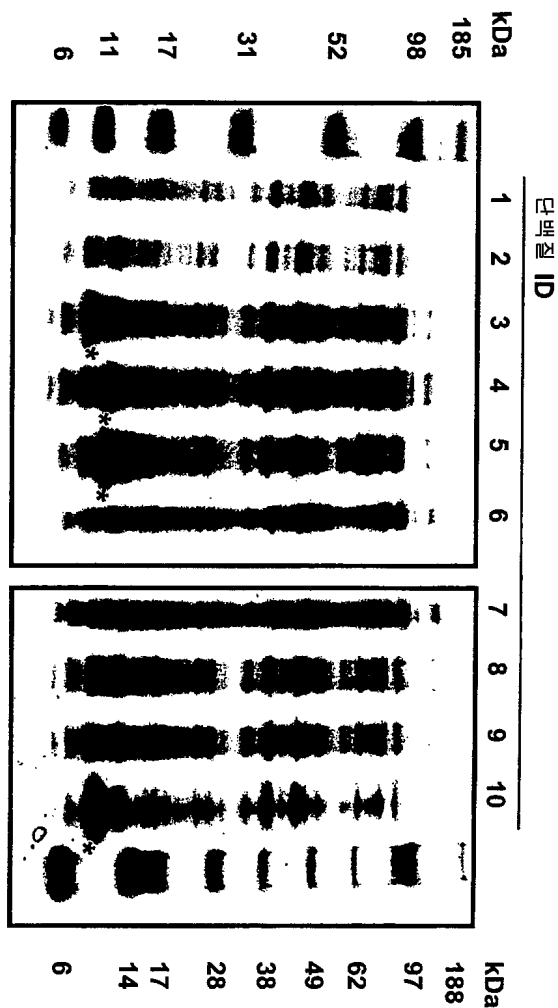
Tn3 돌연변이체는  $T_m$ 이 50℃였고, 한편, D49N/E86Q 및 E33Q/D49N/E86Q 돌연변이체는  $T_m$ 이 52℃였다(도 32).

[0799]

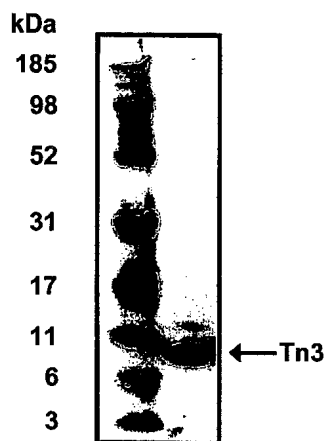
전술한 본 발명을 명확한 이해를 위해 일부 구체적으로 기술하였지만, 본 발명의 진정한 범주를 벗어나지 않으면서 그 형태 및 세부 사항을 다양하게 변화시킬 수 있다는 것은 당분야의 당업자라면 본 개시내용을 통해 분명하게 이해할 것이다. 예를 들어, 상기 기술된 모든 방법 및 장치들을 다양하게 조합하여 사용할 수 있다. 본 출원서에서 인용된 모든 출판물, 특허, 특허 출원 또는 다른 문서들을 각 개별 출판물, 특허, 특허 출원 또는 다른 문서들이 개별적으로 모든 목적을 위해 참조되어 포함된다고 지시된 것과 동등한 정도로 모든 목적을 위해 전체로 참조되어 포함된다.

## 도면

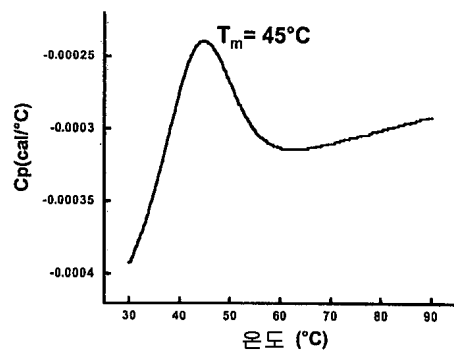
### 도면1



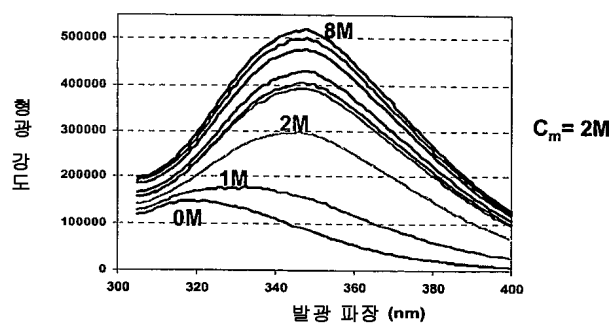
도면2



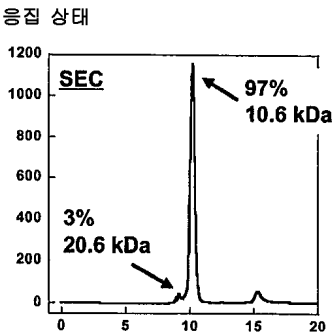
도면3a



도면3b



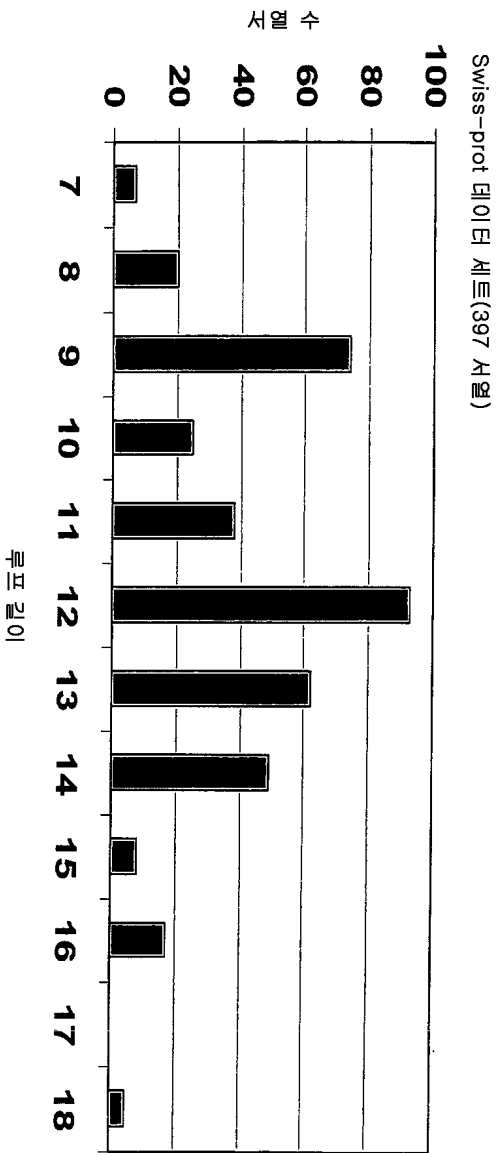
도면3c



도면4a

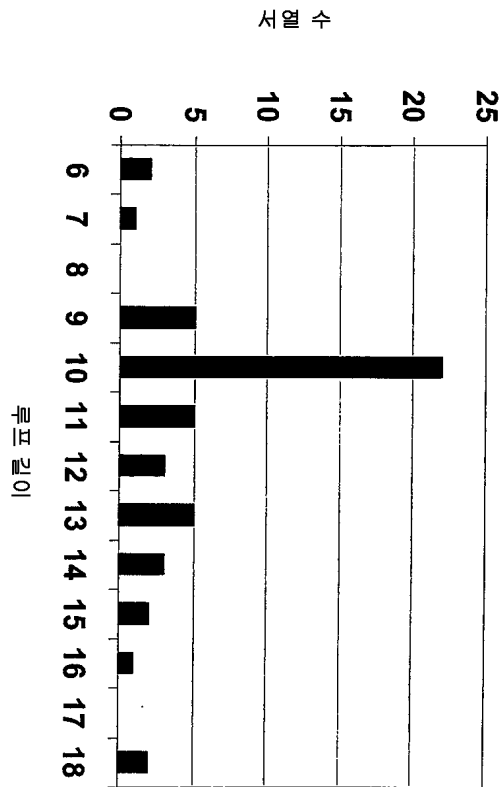


도면4b

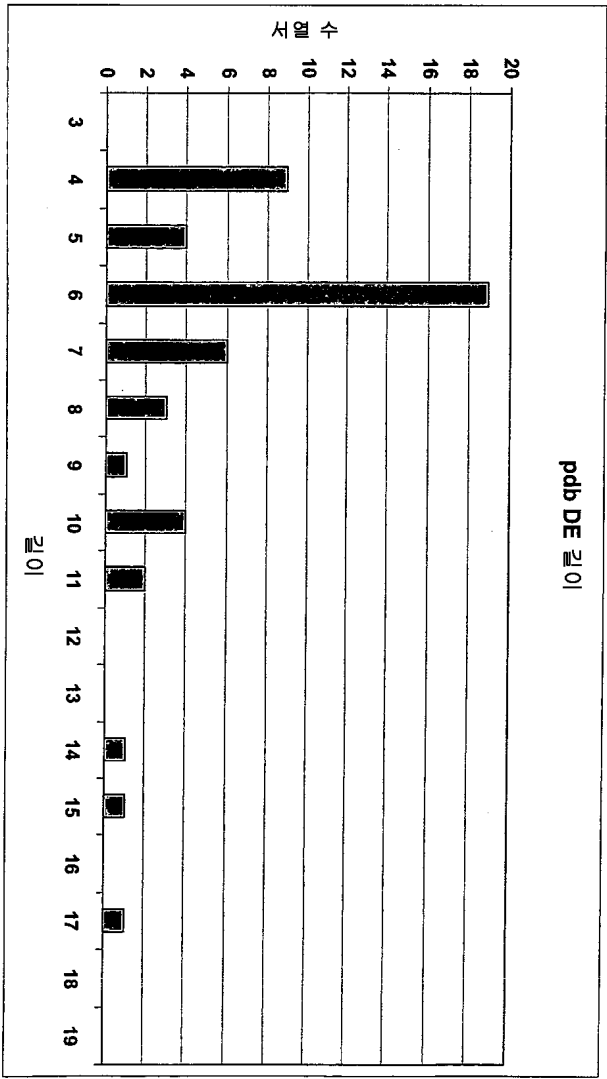




도면5

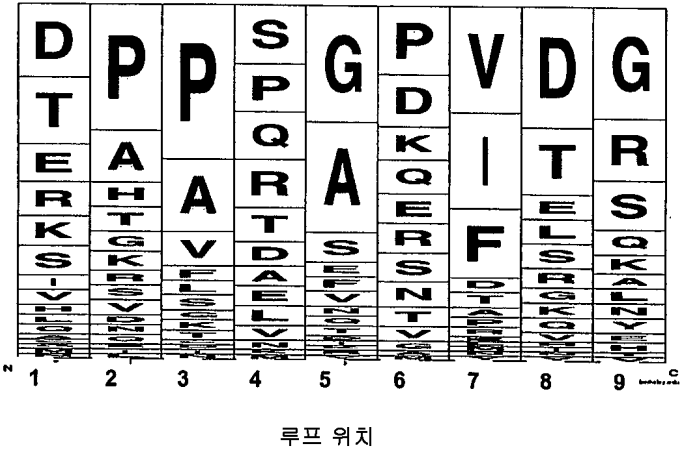


도면6



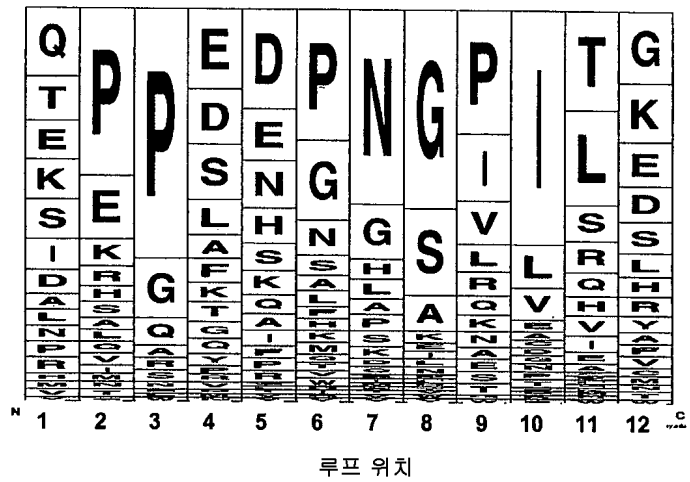
도면7a

9잔기 길이(73 서열)



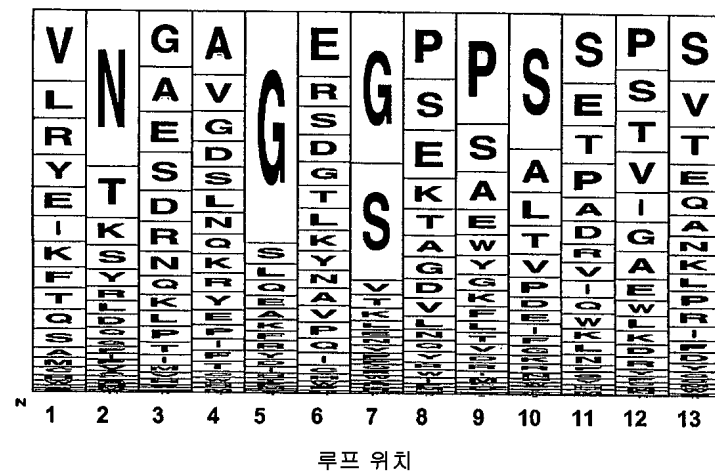
도면7b

12잔기 길이(99 서열)

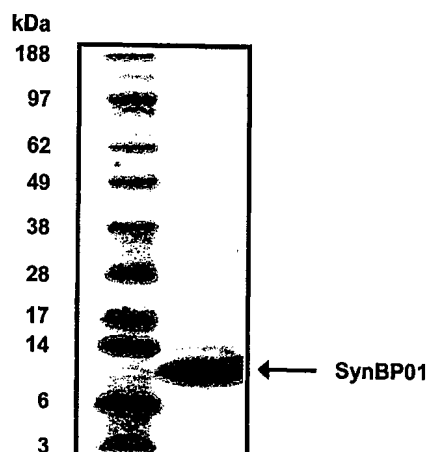


도면8

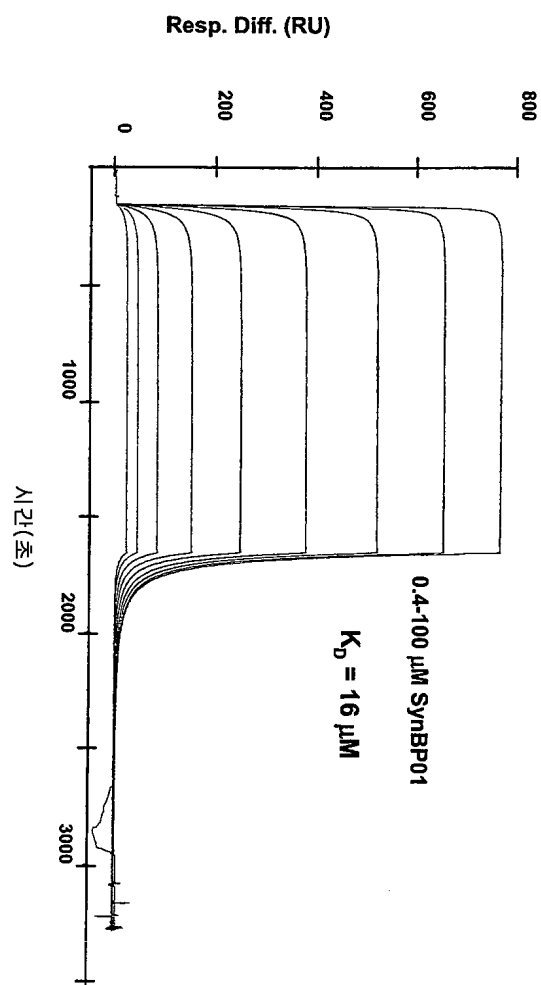
모든 길이(393 서열)



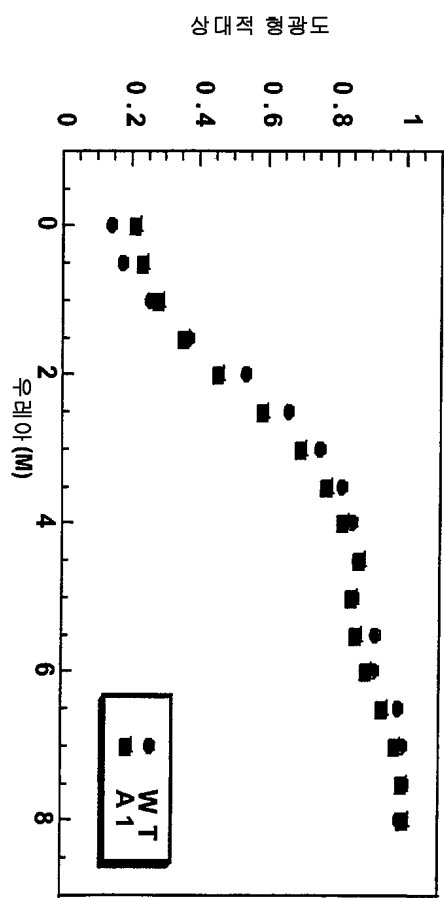
도면9a



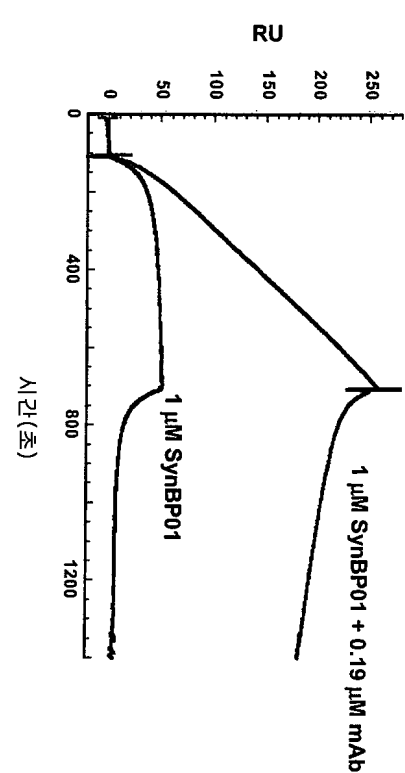
도면9b



도면9c



도면9d





도면 10aa

[illegible]

```
1tea,pro
1boy,pro
1a2b1,pro
1f9,pro
1ira,pro
1cm4_d1,pro
1ia_d1,pro
n26_d2,pro
1bp3_d1,pro
1p9f_d2,pro
1f6f_d1,pro
1k49_d1,pro
1boy_d2,pro
1a2b1,pro
1f9_d2,pro
1f9s_d2,pro
1p9f,pro
1cb,pro
1f42,pro
1lgr,pro
1f42_d2,pro
zerijg_d2,pro
```

서로  
의미:

도면10ab

- - - I E L T Y G I K D V P G D R T T - - - - I D L T E D E N Q - - - - - Y S I G N - - -	1ten.pro
- - - Y T V Q I S T K S G D W K S K - - - - C P Y T T D T E - - - - - C D L T D E - - -	1boy.pro
- - - Y T V Q I S T R L E N W K S K - - - - C P L T A E T E - - - - - C D L T D E - - -	1a21B_D1.pro
- - - F T V E V K N Y G V K N S E W I D A - - - - C I N I S H H Y - - - - - C N I S D H - - -	1fg9.pro
- - - F T L K S E W A T H K F A D - - - - - C K A K R D T P T S - - - - - C T V D Y S - - -	111ix.pro
- - - Y S F S Y Q L E D E P W K L - - - - - C R L H Q A P T A R G A V R F W - - - - - C S L P T A D - - -	1cm4_D1.pro
- - - L R L Y Q L V F L S E A H T - - - - - C I P E N N G A G C V - - - - - C H L L M D D - - -	11ax_D1.pro
- - - A V L L V R K F Q N S P A E D F Q E P - - - - - C Q Y S Q E S Q K F S - - - - - C Q L A - - -	1n26_D2.pro
- - - Y S L T Y H R E G E T L M H E - - - - - C P D Y I T G G P N S - - - - - C H F G K Q Y - - -	1bp3_D1.pro
- - - F I L K S F R S R A D C Q Y Q G D T I P D C V A K K R Q N N - - - - - C S I P R K N - - -	1p9rf_D2.pro
- - - Y S L T Y S K E G E K T T Y E - - - - - C P D Y K T S G P N S - - - - - C P F S K Q Y - - -	1kf9_D1.pro
- - - I Q L F Y T R R N T Q E W T Q E W K E - - - - - C P D Y V S A G E N S - - - - - C Y F N S S F - - -	1boy_D2.pro
D L I - Y T L Y W K S S S S G K K T A K - - - - - T N T N E - - - - - - - - - - F L I D - - -	1boy_D2.pro
D L N - Y T L Y W R A S S T G K K T A T - - - - - T N T N E - - - - - - - - - - F L I D - - -	1a21B.pro
Y I R V Y N V Y V R M N G S E I Q Y K - - - - - I L T Q K E D D C D E I Q C Q - - - - - L A I P - - -	1fg9_D2.pro
E - - - Y E I A I R K V P G Q F T P T H K K - - - - - V K H E Q - - - - - - - - - - F S L L - - -	11qs_D2.pro
- - - C E L R Y Q P Q L K G A N W T L V F H - - - - - L P S S K D Q - - - - - - - - - - F E L C G - - -	1p9rf.pro
- - - Y T I Q F N T S F T P A S W D A A Y B K - - - - - V P N T D S S - - - - - - - - - - F V V Q - - -	1cftb.pro
- - - F C V Q V Q G K S K R E K K D R V F - - - - - T D K T S - - - - - - - - - - A T V I - - -	1f42.pro
- - - Y E V A L L R Y G I E S W N S I S Q C - - - - - S Q T L S - - - - - - - - - - Y D L T A - - -	11qsk.pro
- - - F S V K S S R G S S D P Q G V T C G A - - - - - A T L S A E R V R G D N K E Y E Y S V E C Q E D S A - - -	1f42_D2.pro
- - - H L V Q Y R T D W D H S W T E Q S - - - - - V D Y R H K - - - - - - - - - - F S L P S - - -	2erjg_D2.pro

서열  
번호:

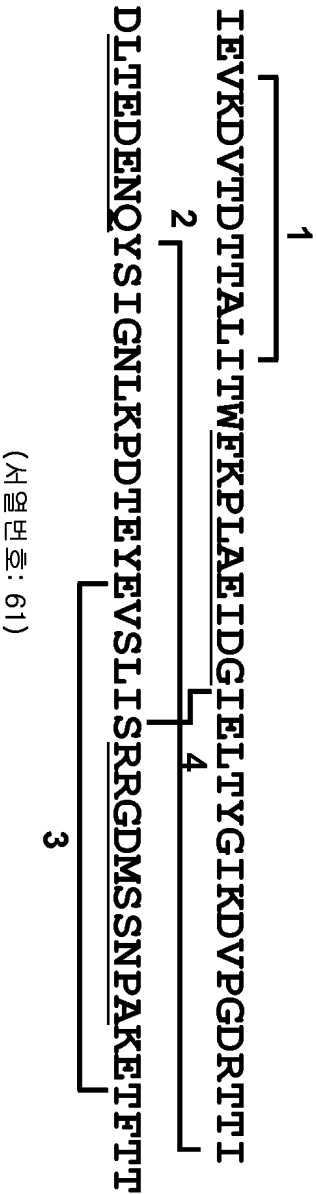
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288

도면10ac

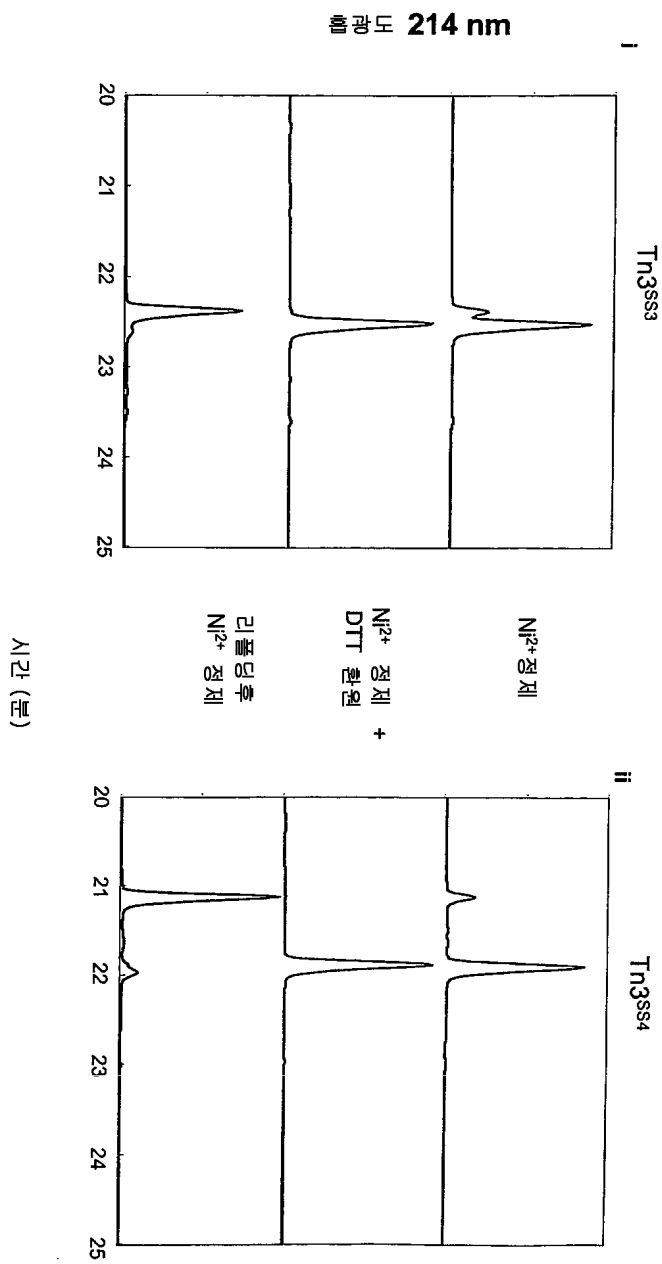
L K P D T E - - - Y E V S L I S R R G D M S S N P A - - - - K E T - F T T	1ten.pro	267
I V K D V K Q T - - Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S A G E P L Y E N S P E F T P	1boy.pro	268
V K D V G Q T - - Y M A R V L S Y P A R N G N T T G F P E E P P F R N S P E F T P Y L D T N	1a21B_D1.pro	269
V G D P S N S - - L W V R V K A R V G Q K E S A Y A - - - - K S E E F A V	1fg9.pro	270
T V Y F V N - - - I E V W V E A E N A L G K V T S - - - - D H I N F D P	111rA.pro	271
T S S F V P - - - L E L R V T A A S G A P R Y - - - - H R V I H I N E V V L	1cn4_D1.pro	272
V V S A D N - - - Y T L D L W A G Q L L W - - - - K G S - F K P S E H V K	11ar_D1.pro	273
V P E G D S S F - - Y I V S M C V A S S V G S K F S - - - - K T Q T F Q G	1n26_D2.pro	274
T S M W R T - - - Y I M M V N A T N Q M G S S P S D - - - - E L Y V D V T Y I V Q	1bp3_D1.pro	275
L L L Y Q Y - - - M A I W Q A E N M L G S S E S - - - - P K L G - - L D P M D V	1pgrf_D2.pro	276
T S I W K I - - - Y I I T V N A T N Q M G S S S - - - - D P L Y V D V T Y I V E	1f6f_D1.pro	277
T S I W T P - - - Y C I K L T S N G T V D - - - - E K - C F S V D E I V	1kf9_D1.pro	278
V D K G E N - - - Y C F S V Q A V I P S R T V N R K S T D S - - - P V E C M G Q E K G E F R E	1boy_D2.pro	279
V D K G E N - - - Y C F S V Q A V I P S R T V N R K S T D S - - - L T E C T S R	1a21B.pro	280
V S S L N S Q - - - Y C V S A E G V L H V W G V T T E K S - - - K E V C I T I F N S	1fg9_D2.pro	281
T S G E V G E - - F C V Q V K P S V A S R S N K G M W S - - - K E B C I S L T	1lgs_D2.pro	282
L H Q A P V - - - Y T L Q M R C I R S S L P G F W S P W S - - - P G L Q L R P	1pgrf.pro	283
M S P W A N - - - Y T F R V I A F N K I G A S P S - - - A H S D S C T	1cftb.pro	284
C R K N - - - - A S I S V R A Q D R Y Y S S S W S E W A - - - S V P C S	1f42.pro	285
V T L D L Y H S N G Y R A R V R A V D G S R H S Q W T - - - - V T N T R F S V	1lgsR.pro	286
C P A A E E S L P - I E V M V D A V H K L K Y E N Y - - - - T S S F F I R D I I K	1f42_D2.pro	287
V D G Q K R - - - Y T F R V R S R F N P L C G S A Q H W S E W S - - H P I H W G S N T S K E N P R T	2erjg_D2.pro	288

서열  
번호:

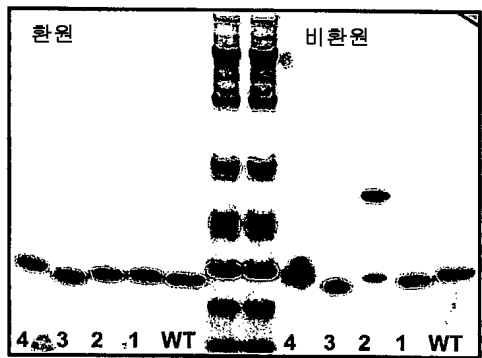
도면10b



도면10c

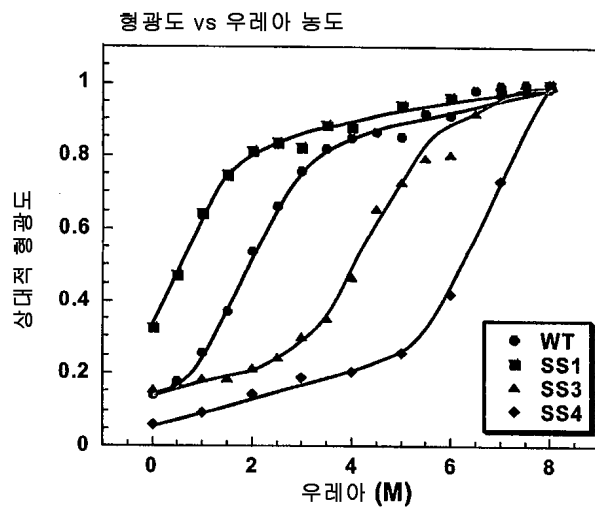


도면10d

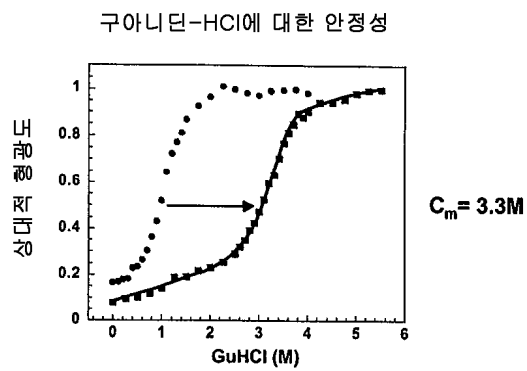




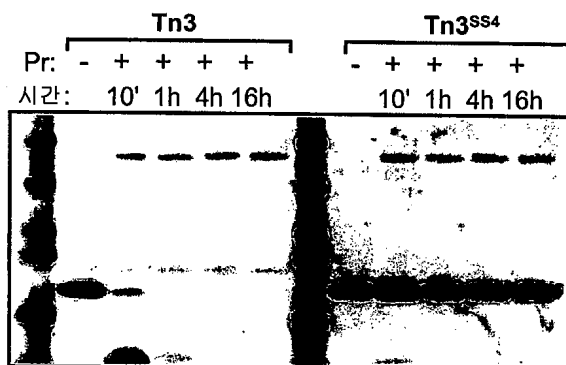
도면10e



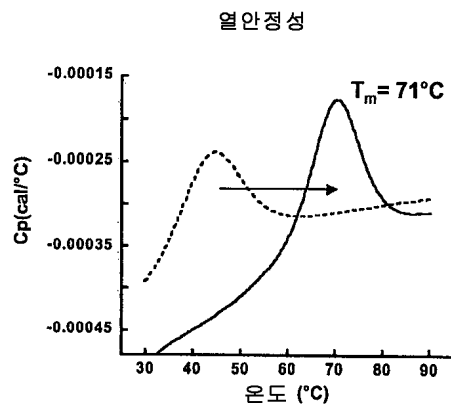
도면10f



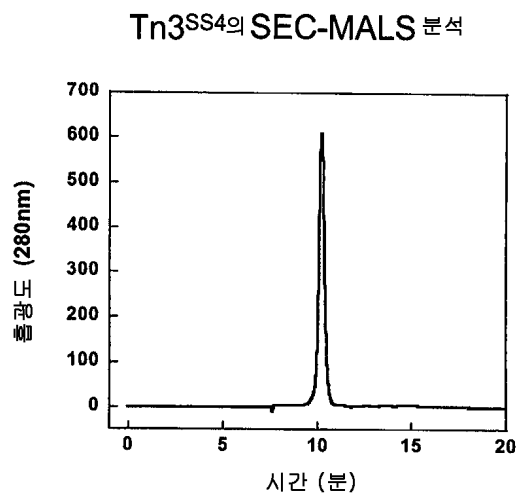
도면10g



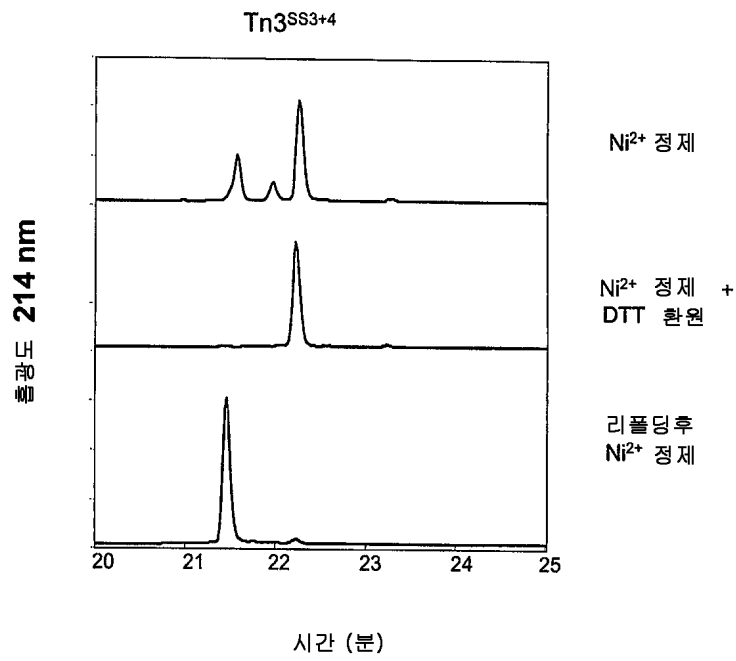
도면10h



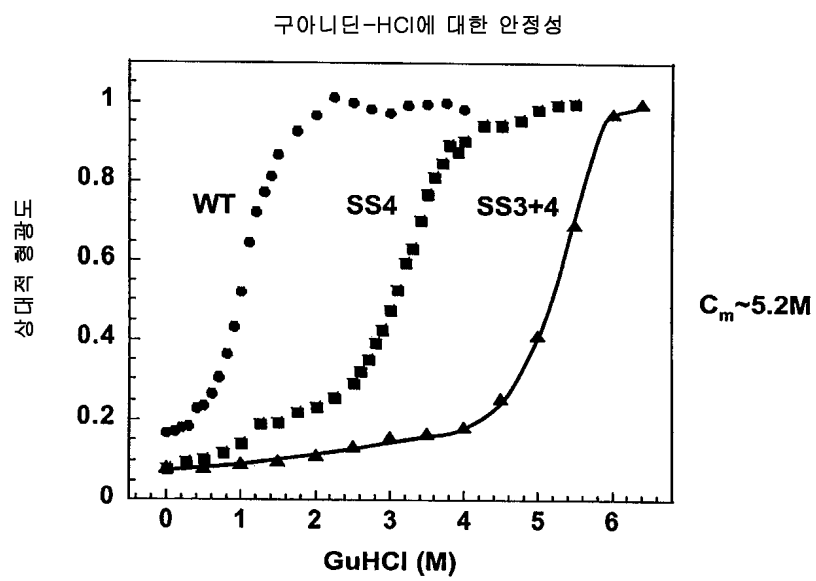
도면10i



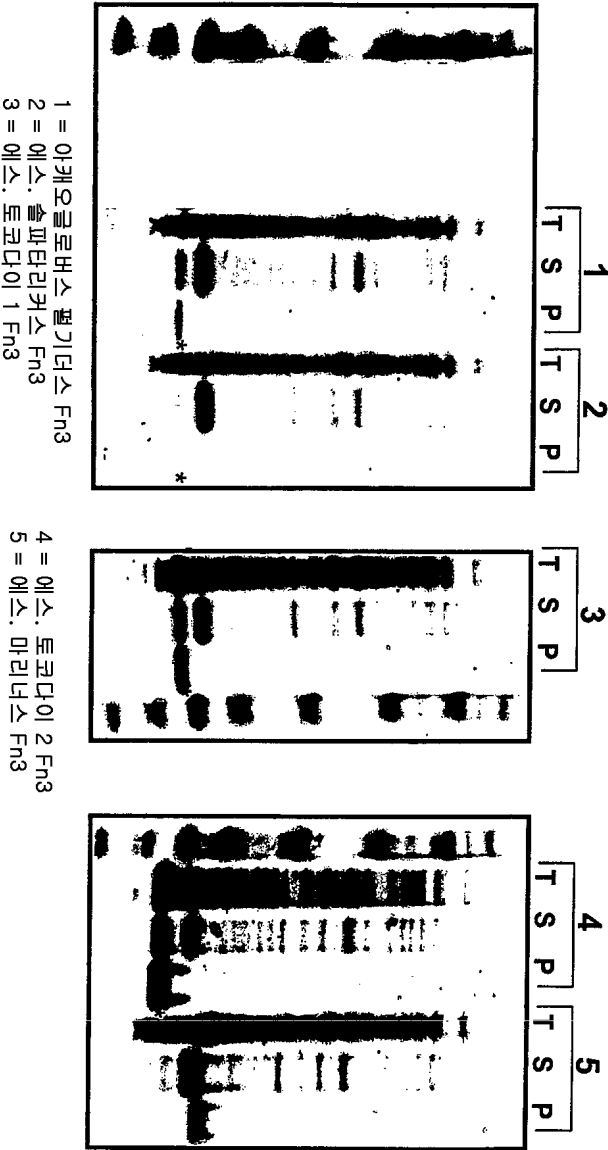
도면10j



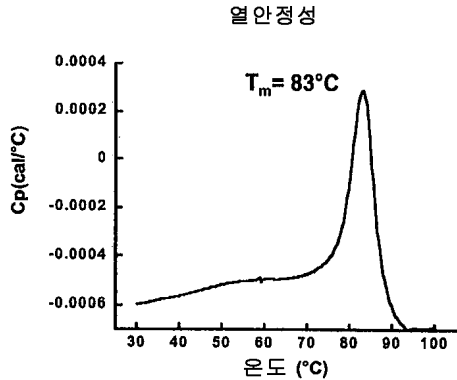
도면10k



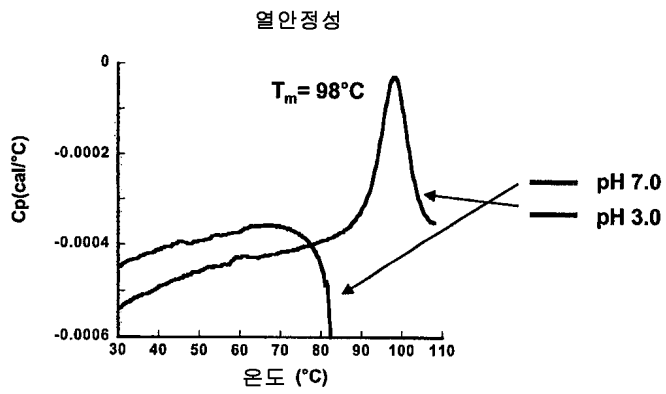
도면11a



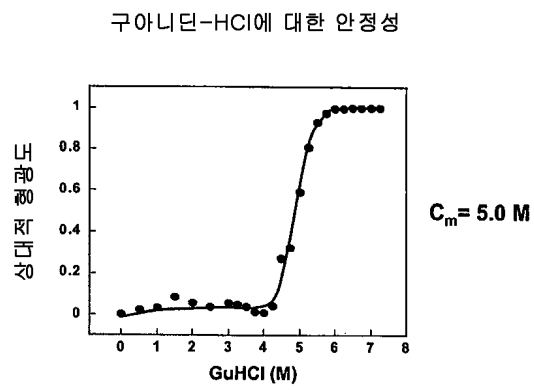
도면11b



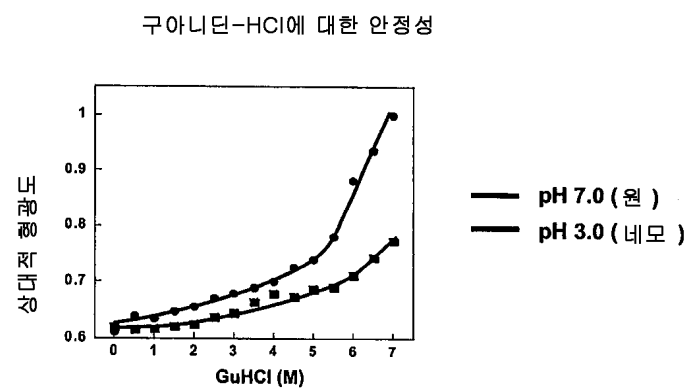
도면11c



도면11d

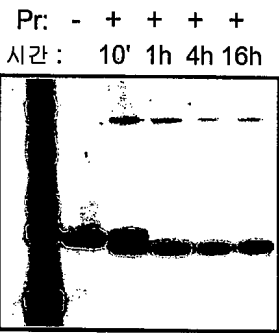


도면11e

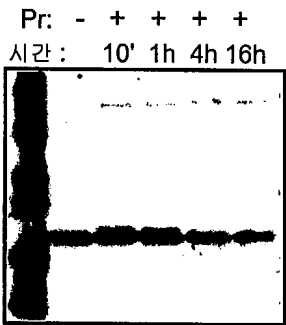




도면11f

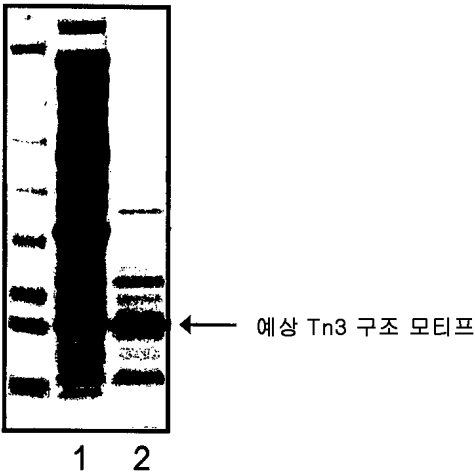


도면11g



도면11h

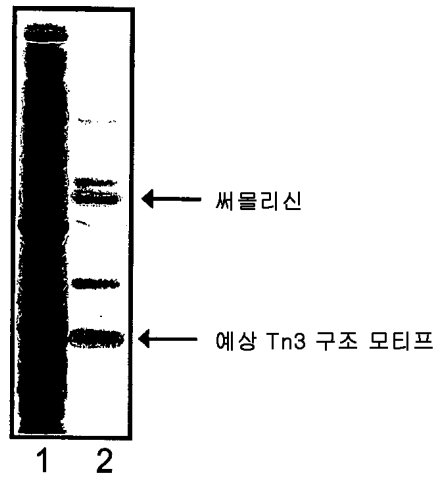
열처리  
미정제 용해물 70℃, 15분



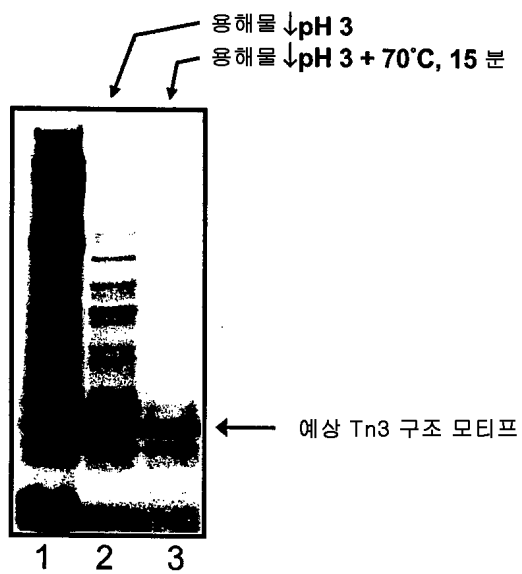
### 도면11i

단백질 가수분해 처리

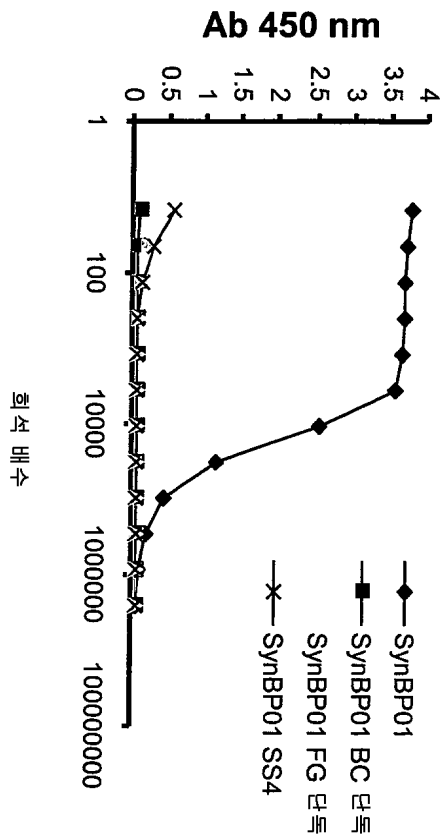
미정제 용해물 + 썬리신 55℃, 45분



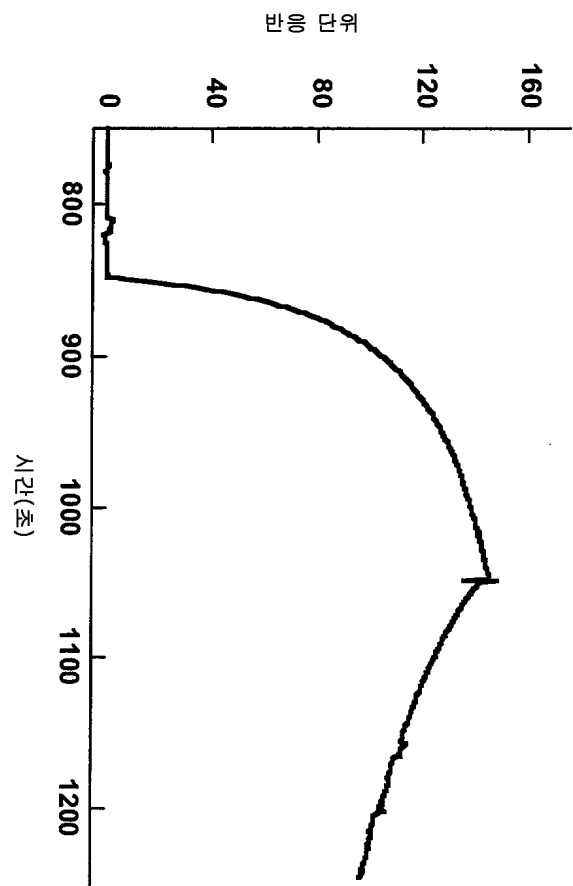
### 도면11j



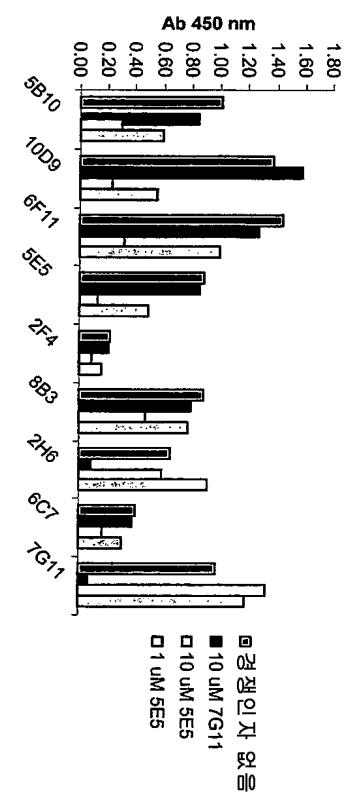
도면12



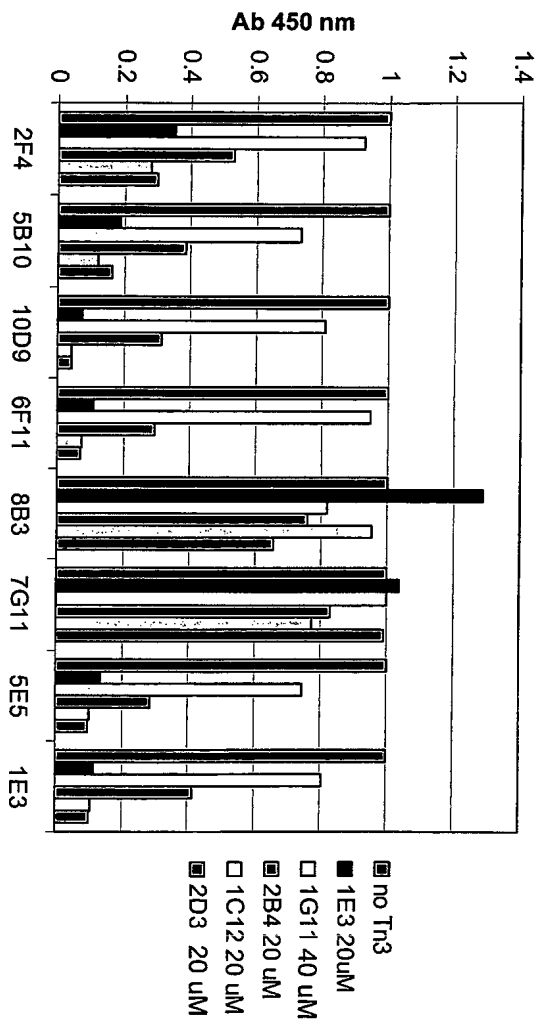
도면13



도면14

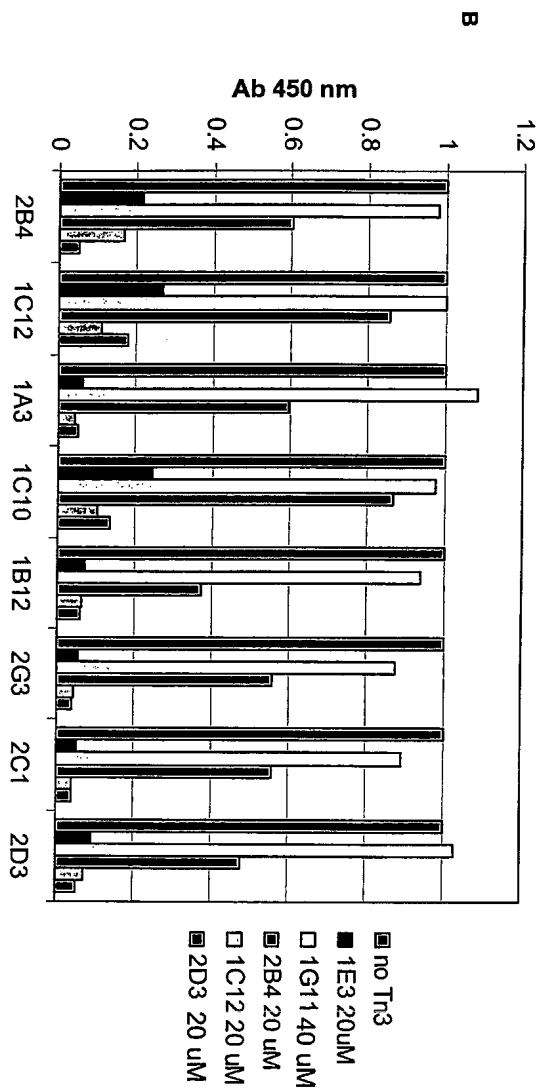


도면15a

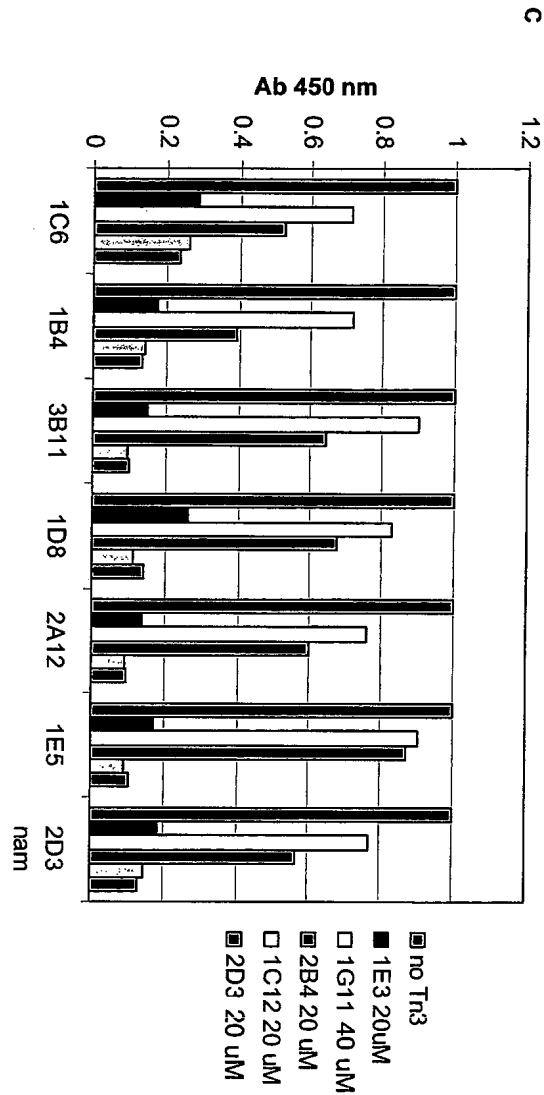




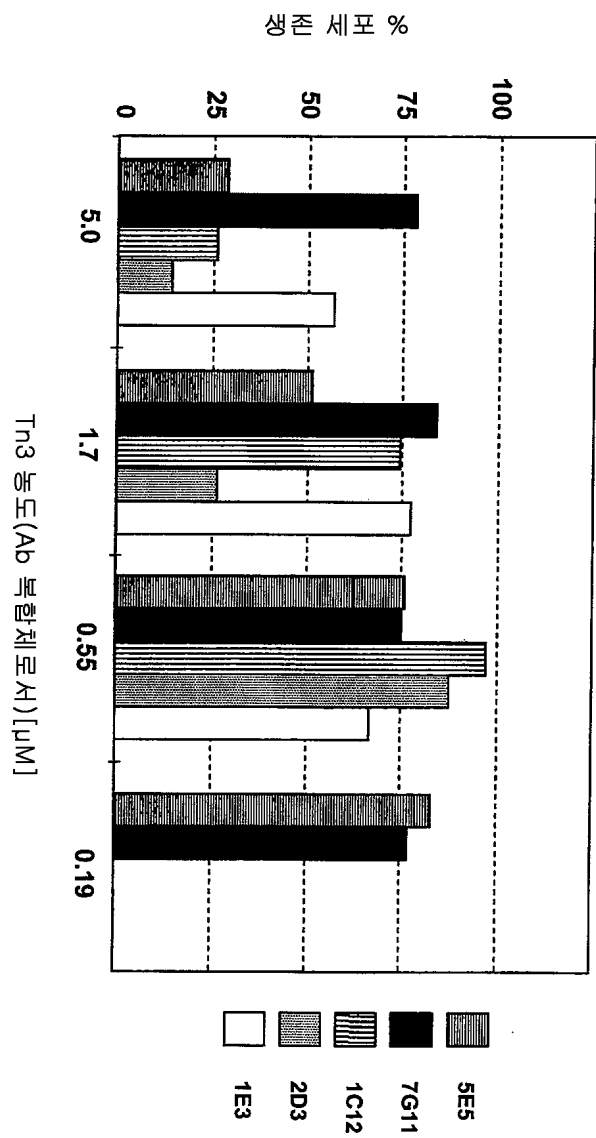
도면15b



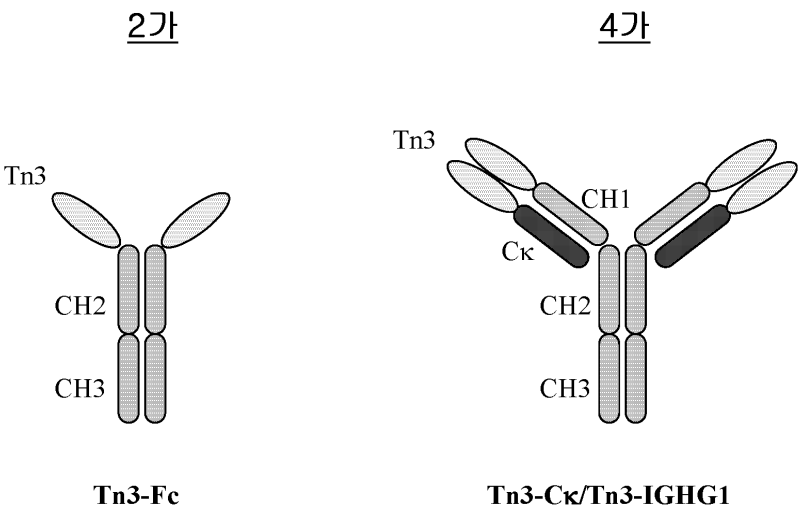
도면15c



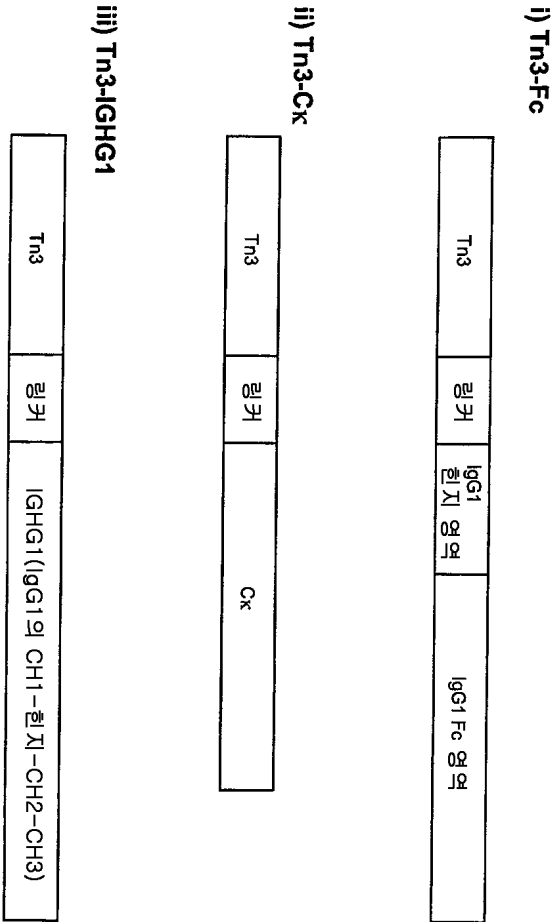
도면16



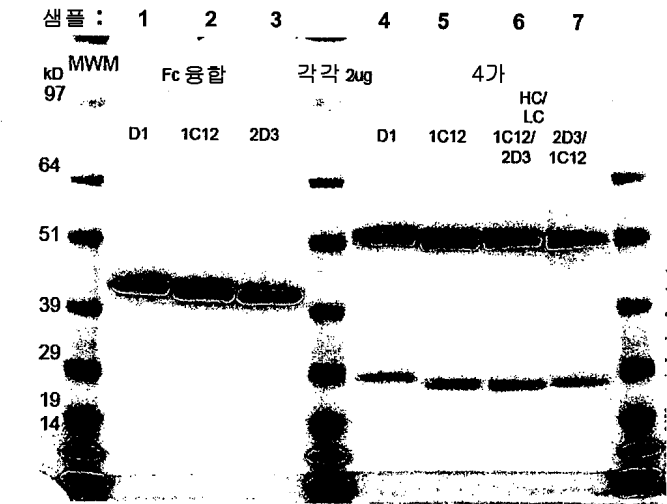
도면17a



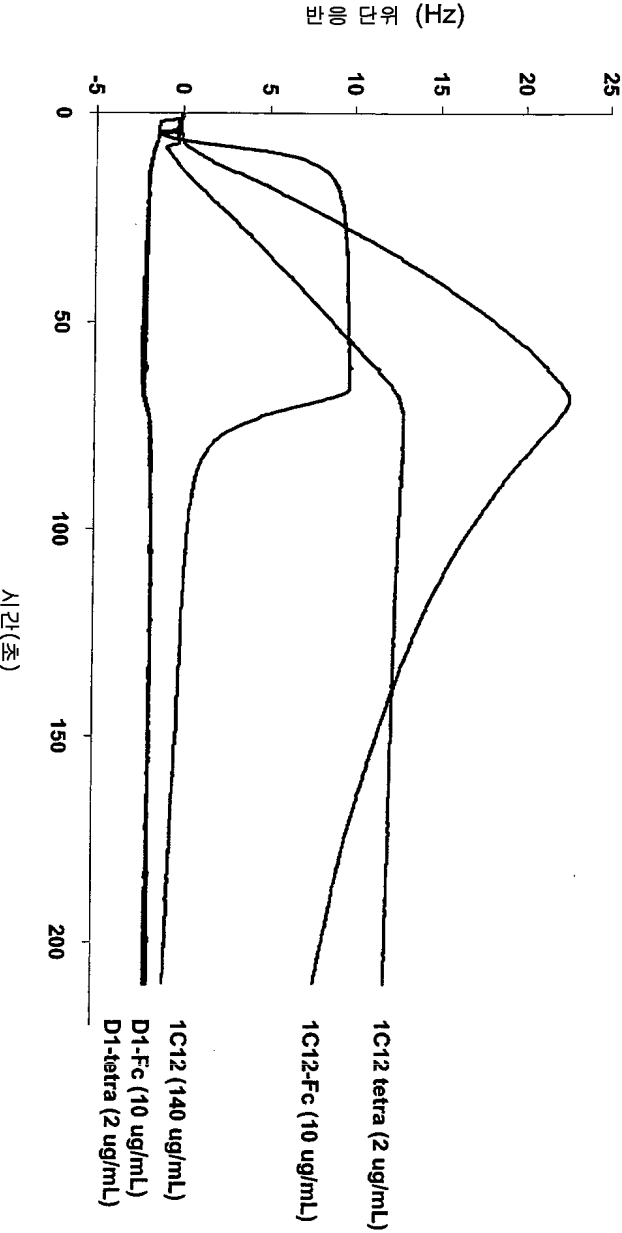
도면17b



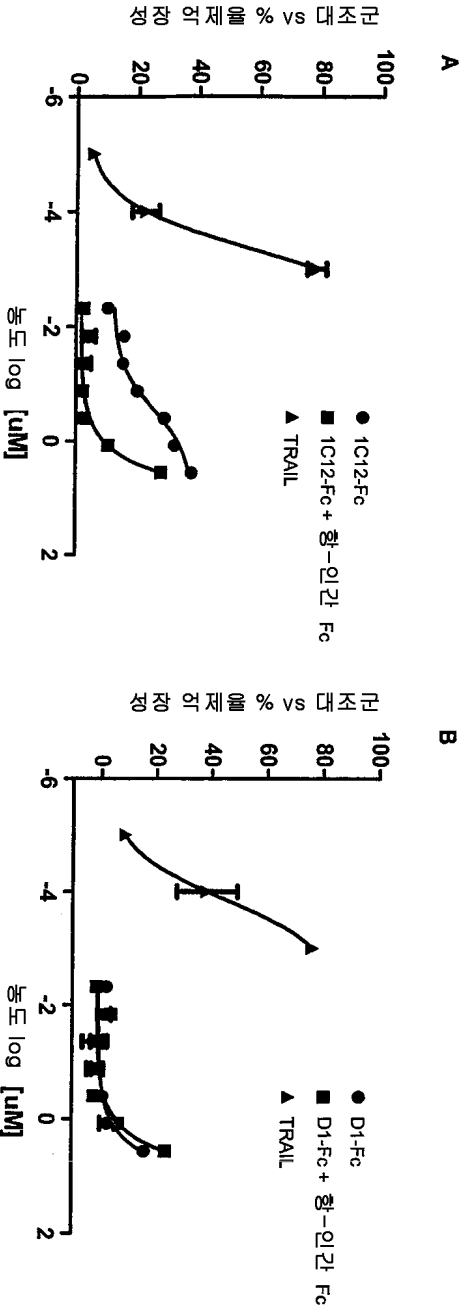
도면18



도면19

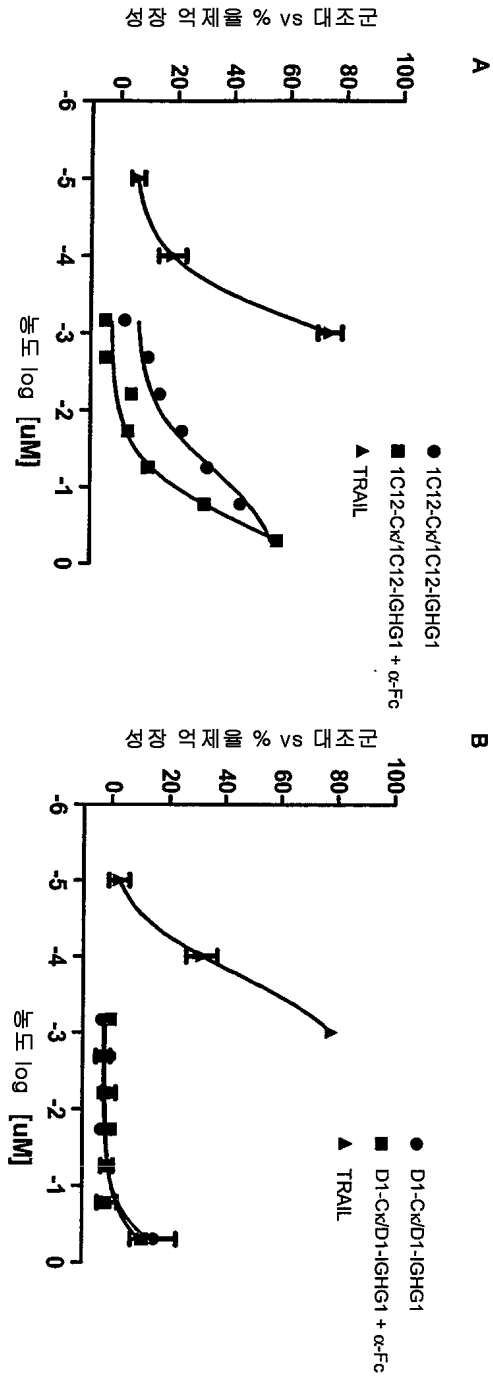


도면20

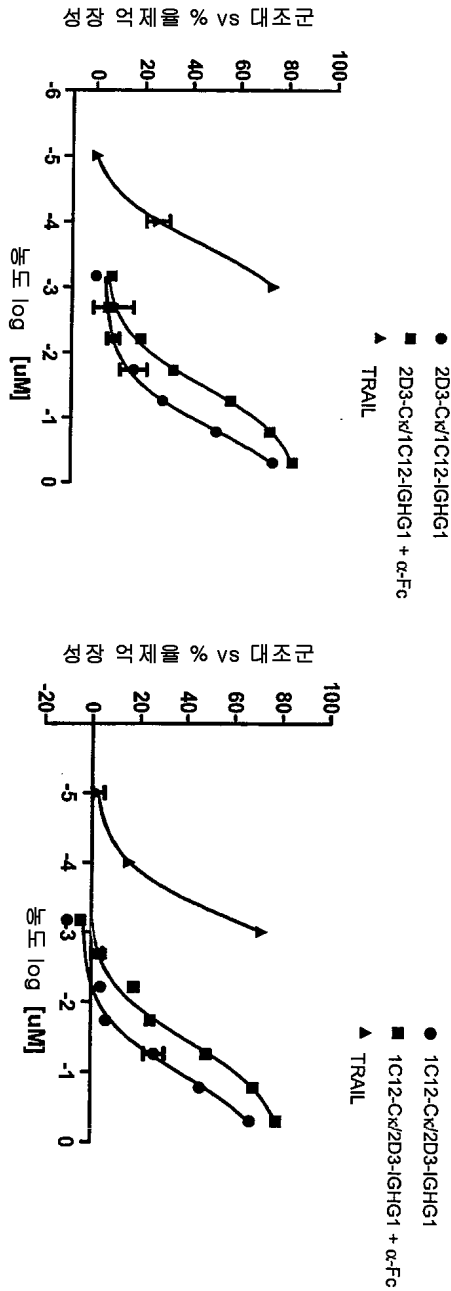




도면21



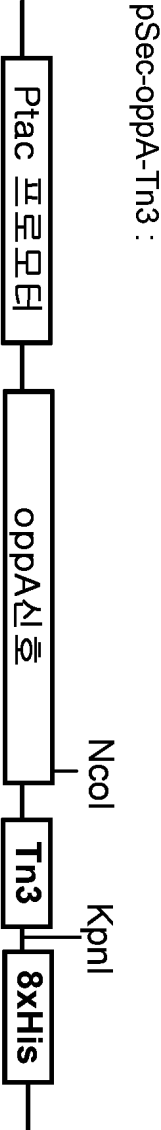
도면22



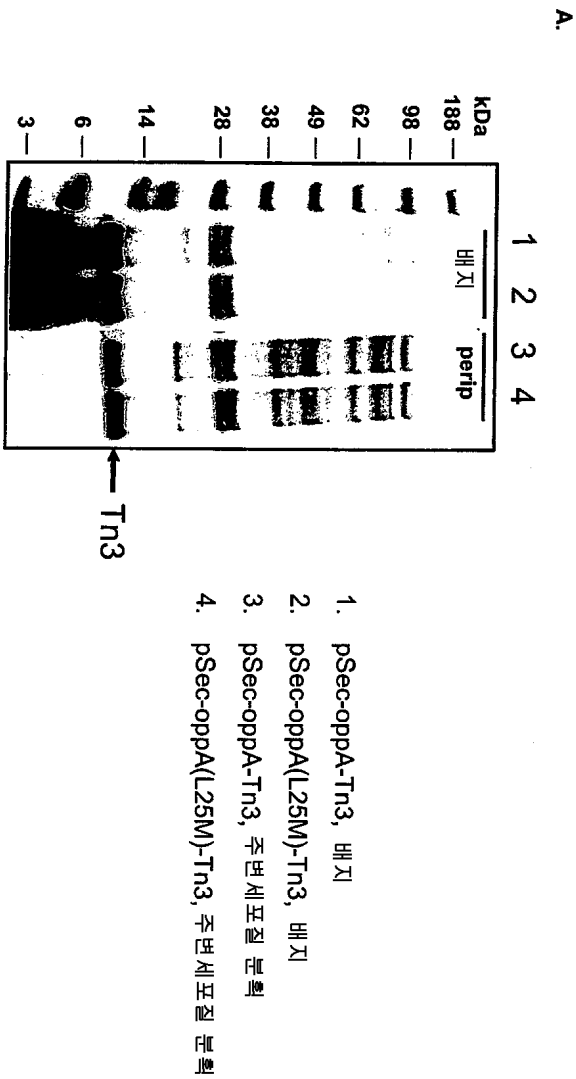
A

MTNITKRSLVAGVLAALMAGNVALAIEVKDVTDTALTWFKPLAEID  
GCELTYGIKDVPGDRRTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLICRGDM  
SSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH (서열번호: 289)

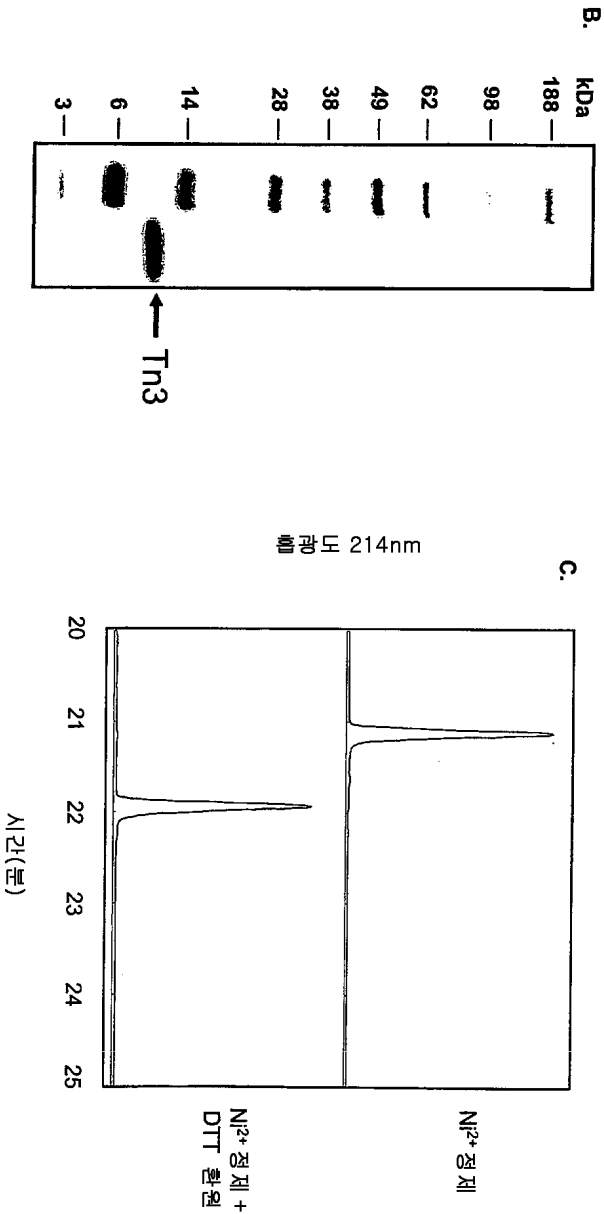
B



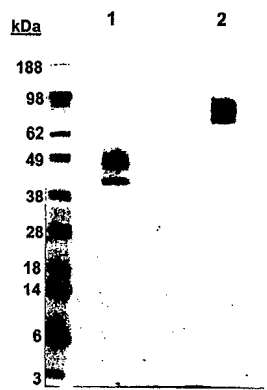
도면24a



도면24b

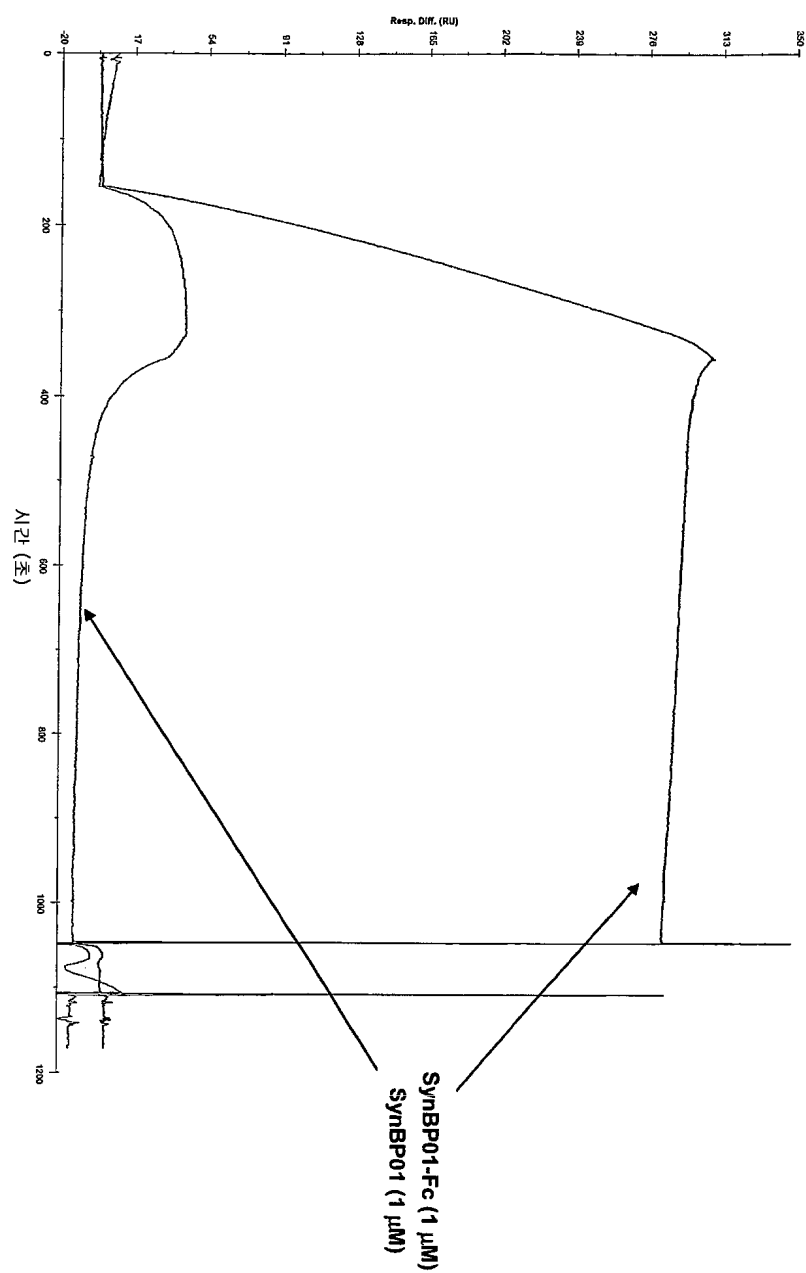


도면25

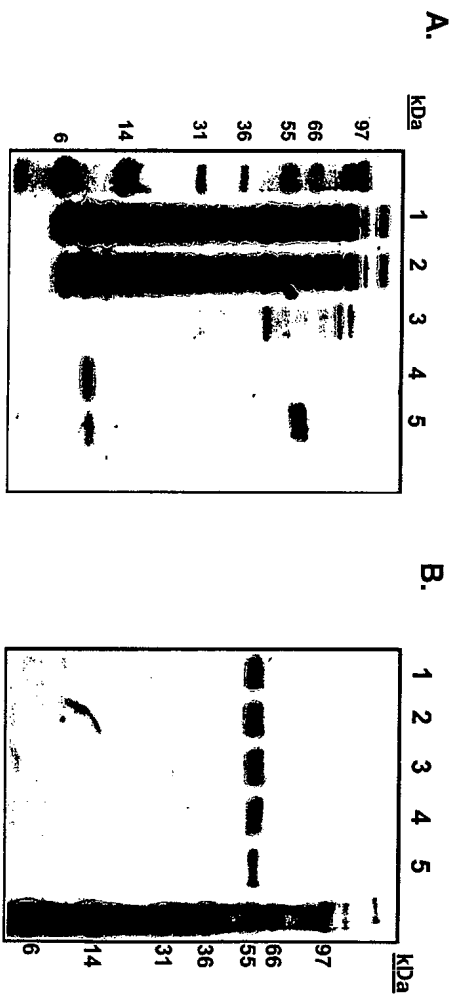




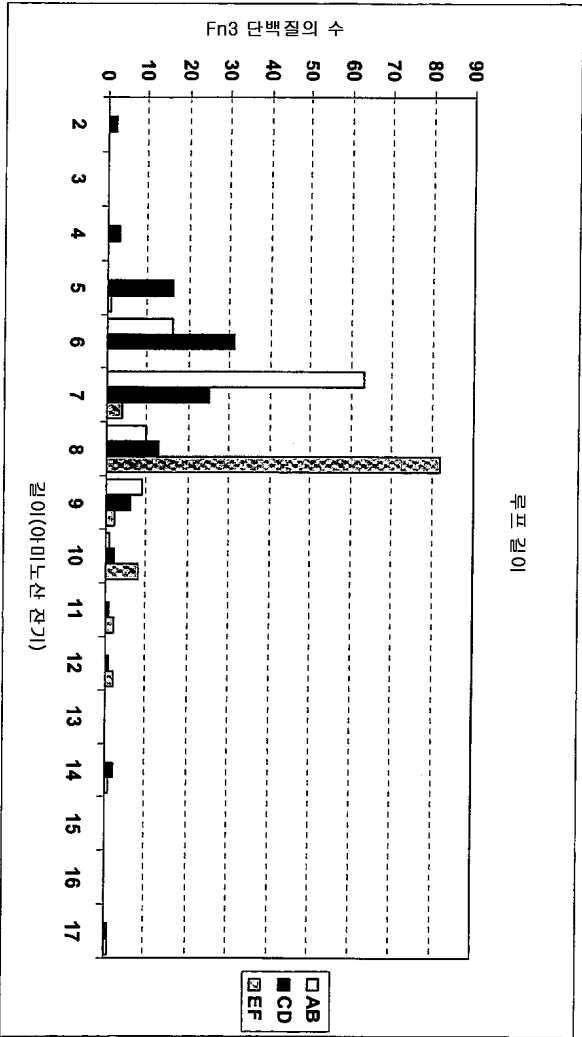
도면26



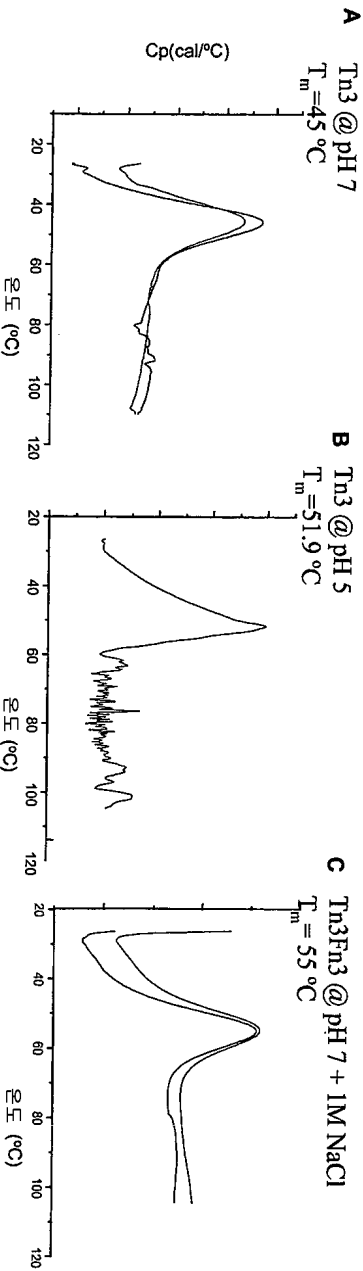
도면27



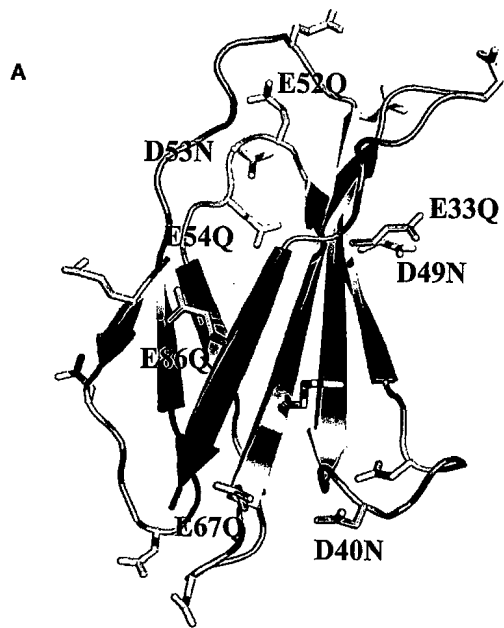
도면28



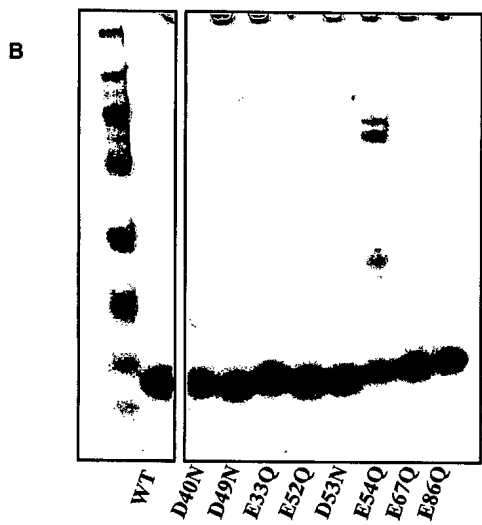
도면29



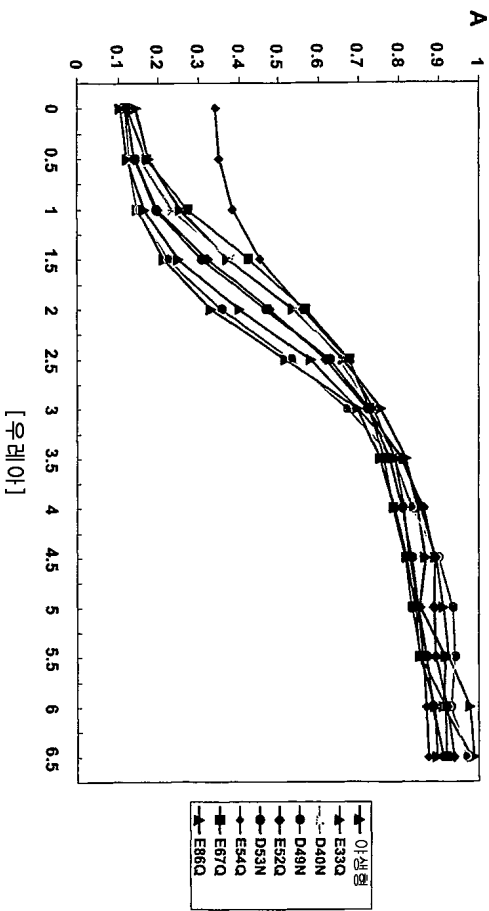
도면30a



도면30b

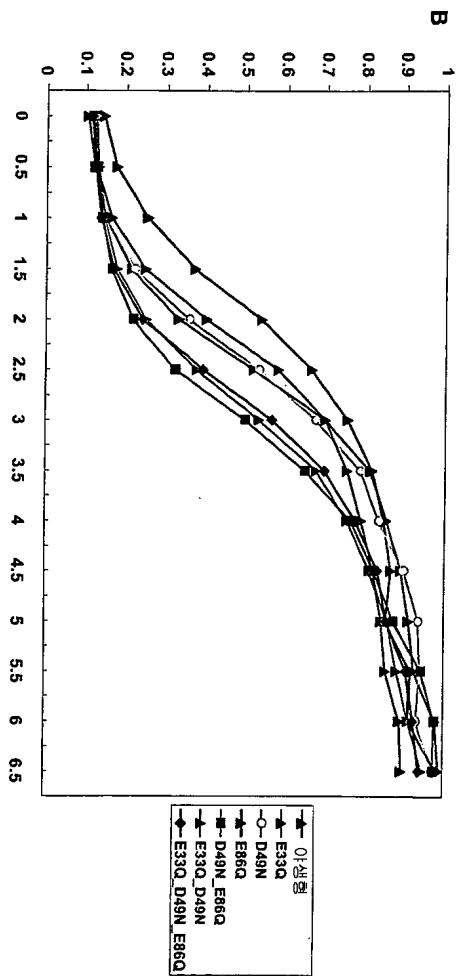


도면31a

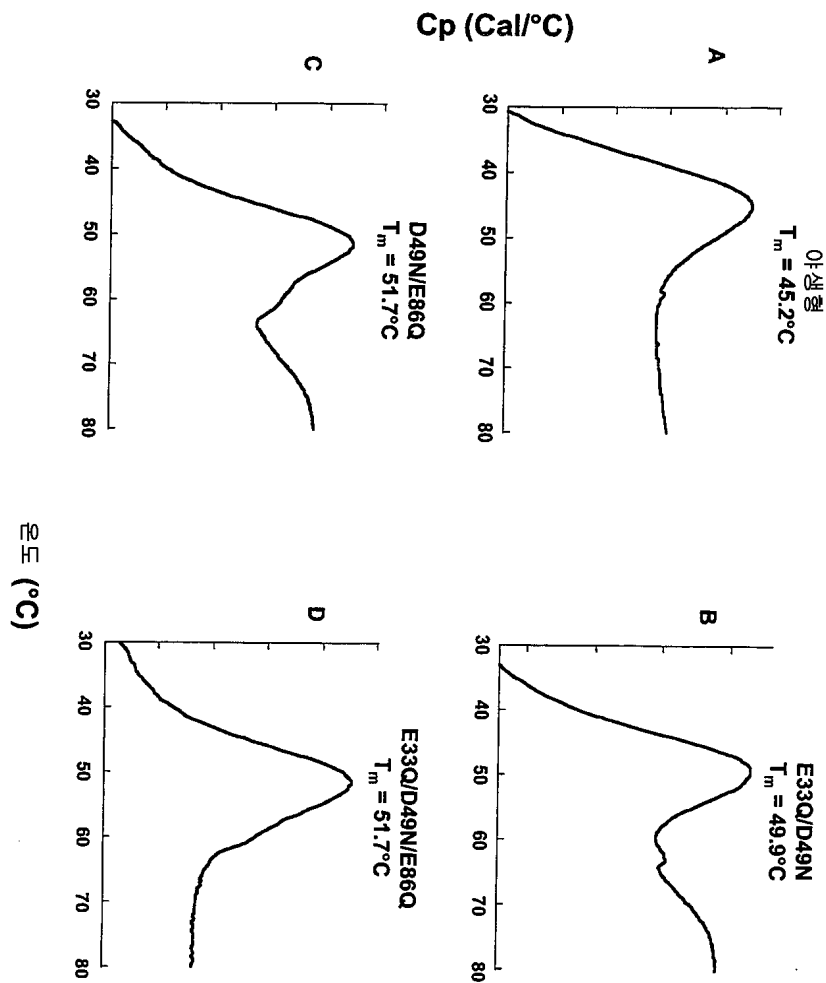




도면31b



도면32



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MedImmune LLC.
  
- <120> Protein Scaffolds
- <130> TN3-100W01
- <150> US 60/984,209
- <151> 2007-10-31
- <150> PCT/US2008/012398
- <151> 2008-10-31
- <160> 289
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 90
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr

1 5 10 15

Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile

20 25 30

Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile

35 40 45

Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro

50 55 60

Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser

65 70 75 80

Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85 90

<210> 2

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

Ser Glu Pro Gln Asn Leu Lys Ala Thr Ala Gly Asn Asn Asn Ile Thr

1 5 10 15

Leu Thr Trp Asp Pro Pro Ile Asp Asp Gly Gly Cys Arg Ile Val Glu

20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Arg Gly Thr Asn Asn Asn Asn Leu Glu Tyr Tyr Ala

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gln Thr Tyr Tyr Tyr Lys Val Ser Ala Val Asn Asn Ile Val Glu

65 70 75 80

Gly Pro Lys Ser Asn Thr Ala Ser Ala Thr Pro Thr Ser Ser

85 90

<210> 3

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 3

Pro Pro Lys Pro Gln Ile Ala Ser Ile Ala Ser Gly Asn Glu Thr Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ser Asn Phe Ser Gln Lys Val Thr Ile Asn Val Gly Asn Val Thr

35 40 45

Ser Tyr Thr Ile Lys His Leu Lys Asp Gly Val Thr Tyr Tyr Ile Gln

50 55 60

Ile Val Pro Tyr Asn Ser Leu Gly Asn Gly Thr Pro Ser Asp Ile Ile

65 70 75 80

Ser Ala Thr Pro Ser Ser Val

85

<210> 4

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 4

Pro Asn Pro Pro Ile Ile Lys Val Lys Ile Gly Asn Leu Asn Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Trp Tyr Asp Thr Phe Asn Gly Gly Tyr Pro Ile Glu Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Val Leu Thr Asn Leu Thr Ala Gly Glu Leu Tyr Thr Ile Glu Leu

50 55 60  
 Ile Ala Tyr Asn Lys Ile Gly Asn Ser Ser Ile Ser Ser Val Ser Phe  
 65 70 75 80  
 Ile Ala Ala Ser Lys Ala

85  
 <210> 5  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 5

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

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

Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His  
 85 90 95  
 His His His His His  
 100

<210> 6  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 6

Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp  
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr  
20 25 30

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser  
35 40 45

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

Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro  
65 70 75 80

Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr  
85

<210> 7

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 7

Ala Ala Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg  
1 5 10 15

Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser  
20 25 30

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

Asn Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile  
50 55 60

Thr Ile Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Val Ile  
65 70 75 80

Gln Gln Glu Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His  
85 90 95

<210> 8

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 8

Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr Ile

50 55 60

Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Val Ile Gln Gln

65 70 75 80

Glu Thr

<210> 9

<211> 94

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 9

Ala Ala Pro Tyr Asn Thr Glu Val Thr Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr

1 5 10 15

Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile Gly Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser

20 25 30

Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg Glu Val Thr Ser Asp Ser Gly Ser Ile

35 40 45

Val Val Ser Gly Leu Thr Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Gln

50 55 60

Val Leu Arg Asp Gly Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Asn Lys Val

65 70 75 80

Val Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

85 90



<210> 10

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 10

Pro Tyr Asn Thr Glu Val Thr Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr  
1 5 10 15

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

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 11

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

Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser  
85 90 95

Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His  
100 105 110

His His His His  
115

<210> 12

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 12

Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu Thr Gly  
1 5 10 15

Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn Ala Asp  
20 25 30

Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr Lys Glu  
35 40 45

Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ser

50 55 60

Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val Arg Val  
65 70 75 80

Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser Glu Val  
85 90 95

Leu Tyr Val Thr Leu Pro  
100

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 13

Ala Ala Pro Pro Ser Leu Asn Val Thr Lys Asp Gly Asp Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Arg Trp Glu Thr Met Lys Met Arg Tyr Glu His Ile Asp His Thr

20 25 30

Phe Glu Ile Gln Tyr Arg Lys Asp Thr Ala Thr Trp Lys Asp Ser Lys

35 40 45

Thr Glu Thr Leu Gln Asn Ala His Ser Met Ala Leu Pro Ala Leu Glu

50 55 60

Pro Ser Thr Arg Tyr Trp Ala Arg Val Arg Val Arg Thr Ser Arg Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Glu Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

100 105 110

<210> 14

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 14

Pro Pro Ser Leu Asn Val Thr Lys Asp Gly Asp Ser Tyr Ser Leu Arg

1 5 10 15

Trp Glu Thr Met Lys Met Arg Tyr Glu His Ile Asp His Thr Phe Glu

20 25 30

Ile Gln Tyr Arg Lys Asp Thr Ala Thr Trp Lys Asp Ser Lys Thr Glu

35 40 45

Thr Leu Gln Asn Ala His Ser Met Ala Leu Pro Ala Leu Glu Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ser Glu Ala Arg Ser Trp Asp Thr Glu

85 90 95

<210> 15

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 15

Ala Ala Pro Pro Val Asn Phe Thr Ile Lys Val Thr Gly Leu Ala Gln

1 5 10 15

Val Leu Leu Gln Trp Lys Pro Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn Val

20 25 30

Asn Leu Glu Tyr Gln Val Lys Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr

35 40 45

Glu Thr Arg Ile Thr Glu Ser Lys Leu Val Thr Ile Leu His Lys Gly

50 55 60

Phe Ser Ala Ser Val Arg Thr Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu

65 70 75 80

Ala Ser Ser Trp Ala Ser Ala Glu Leu His Ala Gly Gly Gly Thr Leu

85 90 95

Glu His His His His His His

100

<210> 16

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 16

Pro Pro Val Asn Phe Thr Ile Lys Val Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu

1 5 10 15

Leu Gln Trp Lys Pro Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn Val Asn Leu

20 25 30

Glu Tyr Gln Val Lys Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr Glu Thr

35 40 45

Arg Ile Thr Glu Ser Lys Leu Val Thr Ile Leu His Lys Gly Phe Ser

50

55

60

Ala Ser Val Arg Thr Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu Ala Ser

65

70

75

80

Ser Trp Ala Ser Ala Glu Leu His Ala

85

<210> 17

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 17

Ala Ala Leu Ser Val Thr Asp Val Thr Thr Ser Ser Leu Arg Leu Asn

1

5

10

15

Trp Glu Ala Pro Pro Gly Ala Phe Asp Ser Phe Leu Leu Arg Phe Gly

20

25

30

Val Pro Ser Pro Ser Thr Leu Glu Pro His Pro Arg Pro Leu Leu Gln

35

40

45

Arg Glu Leu Met Val Pro Gly Thr Arg His Ser Ala Val Leu Arg Asp

50

55

60

Leu Arg Ser Gly Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Leu Tyr Gly Leu Arg Gly

65

70

75

80

Pro His Lys Ala Asp Ser Ile Gln Gly Thr Ala Arg Thr Gly Gly Gly

85

90

95

Thr Leu Glu His His His His His His

100

105

<210> 18

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 18

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

<210> 19

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 19

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

<210> 20

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 20

Leu Arg Ala Leu Asn Leu Thr Glu Gly Phe Ala Val Leu His Trp Lys

1 5 10 15

Pro Pro Gln Asn Pro Val Asp Thr Tyr Asp Ile Gln Val Thr Ala Pro

20 25 30

Gly Ala Pro Pro Leu Gln Ala Glu Thr Pro Gly Ser Ala Val Asp Tyr

35 40 45

Pro Leu His Asp Leu Val Leu His Thr Asn Tyr Thr Ala Thr Val Arg

50 55 60

Gly Leu Arg Gly Pro Asn Leu Thr Ser Pro Ala Ser Ile Thr Phe Thr

65 70 75 80

Thr

<210> 21

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic consrtuct

<400> 21

Ala Ala Leu Glu Ala Lys Glu Val Thr Pro Arg Thr Ala Leu Leu Thr

1 5 10 15

Trp Thr Glu Pro Pro Val Arg Pro Ala Gly Tyr Leu Leu Ser Phe His

20 25 30

Thr Pro Gly Gly Gln Thr Gln Glu Ile Leu Leu Pro Gly Gly Ile Thr

35 40 45

Ser His Gln Leu Leu Gly Leu Phe Pro Ser Thr Ser Tyr Asn Ala Arg

50 55 60

Leu Gln Ala Met Trp Gly Gln Ser Leu Leu Pro Pro Val Ser Thr Ser

65 70 75 80



Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

85 90 95

<210> 22

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

Leu Glu Ala Lys Glu Val Thr Pro Arg Thr Ala Leu Leu Thr Trp Thr

1 5 10 15

Glu Pro Pro Val Arg Pro Ala Gly Tyr Leu Leu Ser Phe His Thr Pro

20 25 30

Gly Gly Gln Thr Gln Glu Ile Leu Leu Pro Gly Gly Ile Thr Ser His

35 40 45

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

50 55 60

Ala Met Trp Gly Gln Ser Leu Leu Pro Pro Val Ser Thr Ser Phe Thr

65 70 75 80

Thr

<210> 23

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 23

Ala Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp

35 40 45

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

<210> 24

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 24

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

50 55 60  
Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr  
65 70 75 80  
Phe Thr Thr

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 25

Ala Ala Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe

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

                  85                    90                    95  
 Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His  
                   100                    105

<210> 26

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys  
 1                    5                    10                    15  
 His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile  
                   20                    25                    30

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

<210>

27

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Gln Glu Leu Gln Asn Ile Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr

50 55 60

Gly Leu Lys Pro Asp Thr Thr Tyr Asp Ile Lys Val Arg Ala Trp Thr

65 70 75 80

Ser Lys Gly Ser Gly Pro Leu Ser Pro Ser Ile Gln Ser Arg Thr Met

85 90 95

Pro Val Glu Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

100 105 110

<210> 28

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 28

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

1 5 10 15

Thr Thr Glu Leu Ala Trp Asp Pro Pro Val Leu Ala Glu Arg Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Glu Leu Gln Asn Ile Thr Thr Asp Thr Arg Phe Thr Leu Thr Gly Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 29

Ala Ala Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val Thr Glu Thr Thr Ala

1 5 10 15

Thr Ser Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn Ser Glu Pro Val Thr

20 25 30

Tyr Tyr Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr Glu Gly Pro Phe Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Phe Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala Val Asn Ser Ile Gly

65 70 75 80

Arg Gly Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg Thr Gly Glu Gln Ala

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

100 105

<210> 30

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 30

Pro Lys Pro Pro Ile Asp Leu Val Val Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ser  
1 5 10 15

Val Thr Leu Thr Trp Asp Ser Gly Asn Ser Glu Pro Val Thr Tyr Tyr

20 25 30  
Gly Ile Gln Tyr Arg Ala Ala Gly Thr Glu Gly Pro Phe Gln Glu Val

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

50 55 60  
Ser Glu Tyr Ala Phe Arg Val Leu Ala Val Asn Ser Ile Gly Arg Gly

65 70 75 80

Pro Pro Ser Glu Ala Val Arg Ala Arg Thr Gly Glu

85 90

<210> 31

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 31

Ala Ala Leu Ser Pro Pro Arg Asn Leu Arg Ile Ser Asn Val Gly Ser  
1 5 10 15

Asn Ser Ala Arg Leu Thr Trp Asp Pro Thr Ser Arg Gln Ile Asn Gly

20 25 30  
Tyr Arg Ile Val Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Thr Glu Ile Asn Glu Val

35 40 45

Glu Val Asp Pro Ile Thr Thr Phe Pro Leu Lys Gly Leu Thr Pro Leu  
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Ile Ala Ile Phe Ser Ile Tyr Asp Glu Gly Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Pro Leu Thr Gly Val Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His  
85 90 95

His His His His His

100

<210> 32

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Sythetic construct

<400> 32

Leu Ser Pro Pro Arg Asn Leu Arg Ile Ser Asn Val Gly Ser Asn Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Val Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Thr Glu Ile Asn Glu Val Glu Val

35 40 45

Asp Pro Ile Thr Thr Phe Pro Leu Lys Gly Leu Thr Pro Leu Thr Glu

50 55 60

Tyr Thr Ile Ala Ile Phe Ser Ile Tyr Asp Glu Gly Gln Ser Glu Pro

65 70 75 80

Leu Thr Gly Val Phe Thr Thr

85

<210> 33

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 33

gccatggcgg ccctggaagt ggtggcggcg accccgacca gcctgctgat tagctgggat 60

gcgcggcggg tgaccgtgcg ctattatcgt attacatatg gcgaaaccgg cggcaatagc 120

ccggtgcagg aatttaccgt gccgggcagc aaaagcaccg cgaccattag cggcctgaaa 180

ccgggcgtgg attataccat taccgtgtat gcggtgaccg gccgtggcga tagcccggcg 240

agcagcaaac cgattagcat taactatcgt accggtggcg gtacc 285

<210> 34

<211> 261



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 34

ctggaagtgg tggcggcgac cccgaccagc ctgctgatta gctgggatgc gccggcgggtg	60
accgtgcgct attatcgat tacctatggc gaaaccggcg gcaatagccc ggtgcaggaa	120
tttaccgtgc cgggcagcaa aagcaccgcg accattagcg gccigaaacc gggcgtggat	180
tataccatta ccgtgtatgc ggtgaccggc cgtggcgata gcccggcgag cagcaaaccg	240

attagcatta actatcgta c	261
------------------------	-----

<210> 35

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 35

gccatggcgg ccccgaccgt ggatcagggt gatgatacca gcattgtggt gcgctggagc	60
cgctccgagg cgccgattac cggctatcgt attgtgtata gcccgagcgt ggaaggcagc	120
agcaccgaac tgaacctgcc ggaaaccgcg aatagcgtga cctgagcga tctgcagccg	180
ggcgtgcagt ataacattac catttatgcg gtggaagaaa accaggaaaag caccgccgtg	240
gtgattcagc aggaaaccgg tggcggtacc	270

<210> 36

<211> 246

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 36

ccgaccgtgg atcagggtga tgataccagc attgtggtgc gctggagccg tccgcaggcg	60
ccgattaccg gctatcgat tgtgtatagc ccgagcgtgg aaggcagcag caccgaactg	120
aacctgccgg aaaccgcgaa tagcgtgacc ctgagcgatc tgcagccggg cgtgcagtat	180
aacattacca tttatgcgtt ggaagaaaac caggaaagca ccccggtggt gattcagcag	240
gaaacc	246

<210> 37

<211

> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 37

```
gccatggcgc ccccgataa caccgaagt accgaaacca ccattgtgat tacctggacc      60
ccggcgccgc gtattggctt taaactgggc gtgcgtccga gccagggcgg tgaagcgccg    120
cgcaagtga ccagcgatag cggcagcatt gtggtgagcg gcctgacccc gggcgtggaa    180
tatgtgtata ccattcaggt gctgcgtgat ggccaggaac gtgatgcgcc gattgtgaac    240
aaagtggatga ccggtggcgg tacc                                     264
```

<210> 38

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 38

```
ccgtataaca ccgaagtac cgaaaccacc atttgtatta cctggacccc ggcgcgcgt      60
attggcttta aactgggcgt gcgtccgagc cagggcgggtg aagcgccgcg cgaagtgacc    120
agcgatagcg gcagcattgt ggtgagcggc ctgaccccg gcgtggaata tgtgtatacc    180
attcaggtgc tgcgtgatgg ccaggaacgt gatgcgccga ttgtgaacaa agtgggtgacc    240
```

<210> 39

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 39

```
gccatggcgc ccccgccgat cgctctgaat tggaccctgc tgaatgttgc gctgaccggt    60

attcatgccg atattcaggt gcgttgggaa gcgccgcgta acgccgatat tcagaaaggc    120
tggatggatgc tggaatatga actgcagtat aaagaagtga atgaaaccaa atggaaaatg    180
atggaccgga ttctgaccac cagcgtgccg gtgtacagcc tgaaagtgga taaagaatac    240
gaagtccgtg tgcgttctaa acagcgtaat agcggcaatt atggtgaatt tagtgaagtc    300
ctgtatgtta ccctgccggg tggcgggtacc                                     330
```

<210> 40

<211> 306  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 40  
 ccgccgatcg ctctgaattg gacctgctg aatgtttcgc tgaccggtat tcatgccgat 60  
  
 attcaggtgc gttgggaagc gccgcgtaac gccgatattc agaaaggctg gatggtgctg 120  
 gaatatgaac tgcagtataa agaagtgaat gaaaccaaata ggaaaatgat ggacccgatt 180  
 ctgaccacca gcgtgccggt gtacagcctg aaagtggata aagaatacga agtccgtgtg 240  
 cgttctaaac agcgtaatat cggcaattat ggtgaattta gtgaagtcct gtatgttacc 300  
 ctgccg 306  
 <210> 41  
 <211> 312  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 41  
 gccatggccg ccccgccgag cctgaacgtg accaaagatg gcgatagcta tagcctgcgc 60  
  
 tgggaaacca tgaaaatgcg ctatgaacat attgatcata cctttgaaat tcagtatcgc 120  
 aaagataccg cgacctggaa agatagcaaa accgaaaccc tgcagaacgc gcatagcgatg 180  
 gcgctgccgg cgctggaacc gagcacccgt tattgggcgc gtgtgcgtgt gcgtaccagc 240  
 cgtaccggct ataattggcat ttggagcgaa tggagcgaag cgcgtagctg ggataccgaa 300  
 ggtggcggta cc 312  
 <210> 42  
 <211> 291  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 42  
 gccatggccg ccccgccggt gaactttacc attaaagtga ccggcctggc gcaggtgctg 60  
  
 ctgcagtgga aaccgaaccc ggatcaggaa cagcgtaacg tgaacctgga atatcaggtg 120  
 aaaattaacg cgccgaaaga agatgattat gaaacccgca ttaccgaaag caaactggtg 180

accattctgc ataaaggctt tagcgcgagc gtgcgtacca ttctgcagaa cgatcatagc 240  
ctgctggcga gcagctgggc gagcgcggaa ctgcatgcgg gtggcggta c 291  
<210> 43  
<211> 267  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 43  
ccgccgtga actttacat taaagtacc ggcttggcgc aggtgctgct gcagtggaaa 60  
ccgaacccgg atcaggaaca gcgtaacgtg aacctggaat atcaggtgaa aattaacgcg 120  
  
ccgaaagaag atgattatga aaccgcatt accgaaagca aactggtgac cattctgcat 180  
aaaggcttta gcgcgagcgt gcgtaccatt ctgcagaacg atcatagcct gctggcgagc 240  
agctgggcga gcgcggaact gcatgcg 267  
<210> 44  
<211> 297  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 44  
gccatggcgc cctgagcgt gaccgatgtg accaccagca gcctgcgtct gaactgggaa 60  
gcgccgccgg gcgcgtttga tagctttctg ctgcgttttg gcgtgccgag cccgagcacc 120  
ctggaaccgc atccgcgtcc gctgctgcag cgtgaactga tgggtccggg caccctcat 180  
  
agcgcggtgc tgcgtgatct gcgtagcggc accctgtata gcctgaccct gtatggcctg 240  
cgtggcccg ataaagcgga tagcattcag ggcaccgcgc gtaccggtgg cggtaac 297  
<210> 45  
<211> 273  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 45  
ctgagcgtga ccgatgtgac caccagcagc ctgcgtctga actgggaagc gccgccgggc 60  
gcgtttgata gctttctgct gcgttttggc gtgccgagcc cgagcaccct ggaaccgcat 120  
ccgcgtccgc tgctgcagcg tgaactgatg gtgccgggca cccgtcatag cgcggtgctg 180

cgatgatctgc gtagcggcac cctgtatagc ctgaccctgt atggcctgcg tggcccgcat	240
aaagcggata gcattcaggg caccgcgcgt acc	273
<210> 46	
<211> 267	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic construct	
<400> 46	
gccatggcgg ccctgcgcgc gctgaacctg accgaaggct ttgcggtgct gcattggaaa	60
ccgcgcgaga acccgggtgga tacctatgat attcaggtga ccgcgccggg cgcgccgccg	120
ctgcaggcgg aaaccccggg cagcgcggtg gattatccgc tgcattgatct ggtgctgcat	180
accaactata ccgcgaccgt gcgtggcctg cgcggcccca atctgaccag cccggcgagc	240
attaccttta ccaccggtgg cgggtacc	267
<210> 47	
<211> 243	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic construct	
<400> 47	
ctgcgcgcgc tgaacctgac cgaaggcttt gcggtgctgc attggaaacc gccgcagaac	60
ccggtggata cctatgatat tcaggtgacc gcgccgggcg cgcgcccgct gcaggcggaa	120
accccgggca gcgcggtgga ttatccgctg catgatctgg tgctgcatac caactatacc	180
gcgacgtgct gtggcctgcg cggccccaat ctgaccagcc cggcgagcat tacctttacc	240
acc	243
<210> 48	
<211>	
> 267	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic construct	
<400> 48	
gccatggcgg ccctggaagc gaaagaagtg accccgcgta ccgcgctgct gacctggacc	60
gaaccgccgg tgcgcccggc gggttatctg ctgagctttc ataccccggg cggccagacc	120

caggaaattc tgctgccggg cggcattacc agccatcagc tgctgggcct gtttccgagc 180  
accagctata acgcgcgtct gcagcgatg tggggccaga gcctgctgcc gccggtgagc 240  
accagcttta ccaccgtgg cggtacc 267

<210> 49

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 49

ctggaagcga aagaagtac cccgcgtacc gcgctgctga cctggaccga accgccggtg 60  
cgcccgccgg gttatctgct gagctttcat accccgggcg gccagacca ggaaattctg 120  
ctgccgggcg gcattaccag ccatcagctg ctgggcctgt ttccgagcac cagctataac 180  
gcgcgtctgc agcgcatgtg gggccagagc ctgctgccgc cggtagcac cagctttacc 240  
acc 243

<210> 50

<211> 273

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 50

gccatggcgg ccattgaagt gaaagatgtg accgatacca ccgcgctgat tacctggttt 60  
aaaccgctgg cggaattga tggcattgaa ctgacctatg gcattaaaga tgtgccgggc 120  
gatcgcacca ccattgatct gaccgaagat gaaaaccagt atagcattgg caacctgaaa 180  
ccgataccg aatatgaagt gagcctgatt agccgtcgtg gcgatatgag cagcaacccg 240  
gcgaaagaaa cctttaccac cggtagcggt acc 273

<210> 51

<211> 249

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 51

attgaagtga aagatgtgac cgataccacc gcgctgatta cctggtttaa accgctggcg 60

gaaattgatg gcattgaact gacctatggc attaaagatg tgccgggcga tcgcaccacc 120  
attgatctga ccgaagatga aaaccagtat agcattggca acctgaaacc ggataccgaa 180  
tatgaagtga gcctgattag ccgtcgtggc gatatgagca gcaacccggc gaaagaaacc 240  
tttaccacc 249

<210> 52

<211> 303

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 52

gccatggcgc ccccgaaatt taccaaatgc cgtagcccgg aacgcgaaac ctttagctgc 60

cattggaccg atgaagtcca tcatggcacc aaaaatctgg gcccgattca gctgttttat 120  
accgccgta ataccagga atggaccag gaatggaaag aatgcccgga ttatgttagc 180  
gcgggcgaaa acagctgcta ttttaacagc agctttacca gcatttggat tccgtattgc 240  
attaaactga ccagcaacgg tggcaccgtt gatgaaaaat gctttagcgt gggtagcggt 300  
acc 303

<210> 53

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 53

ccgaaattta ccaaatgccg tagcccgga cgcgaaacct ttagctgcca ttggaccgat 60

gaagttcatc atggcaccaa aaatctgggc ccgattcagc tgttttatac ccgccgtaat 120  
accaggaat ggaccagga atggaaagaa tgcccgatt atgttagcgc gggcgaaaac 180  
agctgctatt ttaacagcag ctttaccagc atttggattc cgtattgcat taaactgacc 240  
agcaacggtg gcaccgttga tgaaaaatgc tttagcgtg 279

<210> 54

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 54



gccatggcag ccccgctctgg ttttccgcag aatctgcatg tgaccggcct gaccaccagc 60  
accaccgaac tggcgtggga tccgccggtg ctggcggaac gcaacggccg tattattagc 120

tataccgtgg tgtttcgtga tattaacagc cagcaggaac tgcagaacat taccaccgat 180  
acccgcttta ccctgaccgg tctgaaaccg gataccacct atgatattaa agtgcgcgcc 240  
tggaccagca aaggcagcgg cccgctgagc ccgagcattc agagccgcac catgccggtg 300  
gaaggtggcg gtacc 315

<210> 55  
<211> 291  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 55

ccgtctggtt ttccgcagaa tctgcatgtg accggcctga ccaccagcac caccgaactg 60  
gcgtggggtc cgccggtgct ggccggaacgc aacggccgta ttattagcta taccgtggtg 120

tttcgtgata ttaacagcca gcaggaactg cagaacatta ccaccgatac ccgctttacc 180  
ctgaccggtc tgaaacggga taccacctat gatattaaag tgcgcgcctg gaccagcaaa 240  
ggcagcggcc cgctgagccc gagcattcag agccgcacca tgccggtgga a 291

<210> 56  
<211> 306  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 56

gccatggccg ccccgaaacc gccgattgat ctggtggtta ccgaaaccac cgcgaccagc 60  
gtgaccctga cctgggatag cggcaatagc gaaccggtga cctattatgg tattcagtat 120  
cgcgcgccgg gcaccgaagg tccgtttcag gaagtggatg gcgtggcgac caccgttat 180

agcattggcg gtcctagccc gtttagcgaa tatgcgtttc gcgtgctggc ggttaatagc 240  
attggccgcg gtccgccgag cgaagcgggtg cgtgcgcgca ccggcgaaca ggccgggtggc 300  
ggtacc 306

<210> 57  
<211> 282  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 57

ccgaaaccgc cgattgatct ggtgggttacc gaaaccaccg cgaccagcgt gaccctgacc 60  
tgggatagcg gcaatagcga accggtgacc tattatggta ttcagtatcg cgcggcgggc 120  
accgaaggtc cgtttcagga agtggatggc gtggcgacca cccgttatag cattggcgggt 180

ctgagcccggt ttagcgaata tgcgtttcgc gtgctggcgg ttaatagcat tggcccgcggt 240  
ccgccgagcg aagcgggtgcg tgccgcgacc ggccaacagg cg 282

<210> 58

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 58

gccatggcgg ccctgagccc gccgcgtaac ctgcgcatta gcaacgtggg tagcaatagc 60  
gcgcgcctga cctgggatcc gaccagccgc cagattaatg gctatcgcat tgtgtataac 120  
aacgccgatg gcaccgaaat taacgaagtg gaagtggatc cgattaccac ctttcgctg 180  
aaaggcctga ccccgctgac cgaatatacc attgcgattt ttagcattta tgatgaaggt 240

cagagcgaac cgtgaccgg tgtgtttacc accggtggcg gtacc 285

<210> 59

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 59

ctgagcccgcg cgcgtaacct gcgcattagc aacgtgggta gcaatagcgc gcgcctgacc 60  
tgggatccga ccagccgcca gattaatggc tatcgattg tgtataacaa cgccgatggc 120  
accgaaatta acgaagtgga agtggatccg attaccacct ttccgctgaa aggcctgacc 180  
ccgctgaccg aatataccat tgcgattttt agcatttatg atgaaggtca gagcgaaccg 240  
ctgaccggtg tgtttaccac c 261

<210> 60

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 60

Ala Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp

35 40 45

Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His

85 90 95

His

<210> 61

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 61

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn

35 40 45

Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60

Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 62

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 62

Ala Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu

35 40 45

Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Ser Val Thr Glu Phe Gly Arg Arg Arg Ser Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His

85 90 95

His

<210> 63

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

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

<210> 64

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

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

<210> 65

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Cys

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 66

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 66

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn

35 40 45

Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 67

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 67

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Cys

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 68

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 68

Pro Ala Ile Ser Asn Val Arg Val Ser Asp Val Thr Asn Ser Ser Ala

1 5 10 15

Thr Ile Arg Trp Asp Val Ser Leu Ala Ala Asn Asn Arg Val Leu Phe

20 25 30

Ser Thr Asn Ser Asp Leu Ser Ser Pro Gln Trp Ser Ala Trp Asp Asn

35 40 45

Ser Thr Asp Ser Pro Met Ile Thr Leu Ser Gly Leu Ser Ala Gly Thr

50 55 60

Ala Tyr Tyr Phe Ser Val Tyr Ser Phe Arg Pro Asp Asn Ala Ser Leu

65                      70                      75                      80  
Tyr Ser Asn Ser Ser Ile Met Ser Phe Thr Thr  
                              85                      90

<210> 69

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

69

Pro Pro Pro Lys Pro Val Ile Arg Phe Ala Gln Ala Gly Asn Asn Ser

1                      5                      10                      15

Ile Ser Leu Ser Trp Tyr Asp Thr Asn Thr Ser Gly Tyr Tyr Ile Gln

20                      25                      30

Trp Trp Ser Ser Ile Asp Asn Asn Lys Ser Thr Ile Asn Val Gly Asn

35                      40                      45

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

50                      55                      60

Phe Arg Ile Ile Pro Tyr Asn Gln Ala Gly Asn Gly Thr Ser Ser Asp

65                      70                      75                      80

Ile Ile Ser Leu Thr Pro Gly Ala Val

85

<210> 70

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 70

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

1                      5                      10                      15

Val Ile Trp Ser Lys Pro Tyr Asn Gly Gly Phe Pro Ile Leu Gly Tyr

20                      25                      30

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



35 40 45  
 Asn Val Ser Lys Tyr Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Glu Val Leu Tyr  
 50 55 60  
 Glu Val Met Val Val Ala Tyr Asn Lys Leu Gly Asn Ser Ser Pro Gly  
 65 70 75 80

Ile Val Asn Phe Val Ala Leu Thr Thr  
 85

<210> 71

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 71

Leu Thr Thr Ala Ser Ile Ser Val Ser Val Tyr Lys Lys Val Asn Gly  
 1 5 10 15  
 Val Leu Ile Ser Trp Asn Lys Thr Glu Asn Thr Thr Tyr Asn Leu Leu  
 20 25 30  
 Ile Ser Asp Lys Lys Gly Lys Ile Ile Val Asn Ile Thr Thr Thr Asn

35 40 45  
 Thr Ser Tyr Phe Ala Tyr Ile Pro Tyr Gly Ile Tyr Asn Val Thr Ile  
 50 55 60  
 Arg Ala Thr Asn Gln Val Gly Thr Asn Ser Thr Ser Phe Pro Ile Val  
 65 70 75 80  
 Phe Tyr Ile Pro Pro Phe Ile

85

<210> 72

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 72

Pro Leu Val Lys Phe Ser Ile Gly Asn Asn Ser Ile Leu Asn Leu Lys

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

65                    70                    75                    80  
 Ser Ser Ile Thr

<210> 73

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 73

Pro Leu Pro Pro Lys Ile Thr Ser Tyr Ser Ala Gly Asn Glu Ser Val  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Gly Trp Asn Pro Val Arg Leu Ser Ser Gly Tyr Glu Ile Ile  
                   20                    25                    30  
 Tyr Trp Asn Asn Met Gly Phe Asn Ser Ser Ile Asn Val Gly Asn Val

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

85

<210> 74

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 74

```

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

```

```

Thr Tyr Asn Val Phe Ile Tyr Ala Val Asn Lys Leu Gly Asn Ser Ser
65           70           75           80
Pro Leu Val Leu Thr Val Val Pro Ile Thr Lys Ala
          85           90

```

<210> 75

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 75

```

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

```

<210> 76

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 76

Pro Pro Ala Ser Pro Gln Val Ser Leu Ile Gly Phe Gly Asn Asn Leu

1 5 10 15

Tyr Ile Ser Trp Asn Asn Glu Ala Asn Val Ile Thr Tyr Leu Val Tyr

20 25 30

Val Asn Asn Ser Leu Val Tyr Glu Gly Pro Ser Asn Ser Ile Val Thr

35 40 45

Asn Ile Ser Asn Gly Thr Tyr Leu Val Lys Val Ile Gly Val Asn Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Thr

<210> 77

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Lys Glu Asn Val Val Leu Leu Asn Val Ser Thr Thr Asn Thr

35 40 45

Ser Tyr Phe Val Lys Val Pro Phe Gly Val Tyr Asn Ile Ser Leu Glu

50 55 60  
Ala Val Asn Ile Val Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Phe Ile Leu Ile Tyr  
65 70 75 80  
Tyr Ile Gln

<210> 78

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 78

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

50 55 60  
Tyr Lys Ser Ala Pro Tyr Ile Ile Asn Asp Val Arg Asn Tyr Ile Val  
65 70 75 80  
Val

<210> 79

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 79

Ala Ala Pro Ala Ile Ser Asn Val Arg Val Ser Asp Val Thr Asn Ser  
1 5 10 15  
Ser Ala Thr Ile Arg Trp Asp Val Ser Leu Ala Ala Asn Asn Arg Val

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

85 90 95  
 Thr Leu Glu His His His His His His  
 100 105

<210> 80

<211> 91

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 80

Pro Ala Ile Ser Asn Val Arg Val Ser Asp Val Thr Asn Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Arg Trp Asp Val Ser Leu Ala Ala Asn Asn Arg Val Leu Phe  
 20 25 30

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

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 81

Ala Ala Ser Glu Pro Gln Asn Leu Lys Ala Thr Ala Gly Asn Asn Asn

1 5 10 15

Ile Thr Leu Thr Trp Asp Pro Pro Ile Asp Asp Gly Gly Cys Arg Ile

20 25 30

Val Glu Tyr Arg Ile Tyr Arg Gly Thr Asn Asn Asn Asn Leu Glu Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Ser Gln Thr Tyr Tyr Tyr Lys Val Ser Ala Val Asn Asn Ile

65 70 75 80

Val Glu Gly Pro Lys Ser Asn Thr Ala Ser Ala Thr Pro Thr Ser Ser

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His His His His His

100 105

<210> 82

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 82

Ser Glu Pro Gln Asn Leu Lys Ala Thr Ala Gly Asn Asn Asn Ile Thr

1 5 10 15

Leu Thr Trp Asp Pro Pro Ile Asp Asp Gly Gly Cys Arg Ile Val Glu

20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Arg Gly Thr Asn Asn Asn Asn Leu Glu Tyr Tyr Ala

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gln Thr Tyr Tyr Tyr Lys Val Ser Ala Val Asn Asn Ile Val Glu

65						70						75						80
Gly	Pro	Lys	Ser	Asn	Thr	Ala	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Ser					
					85						90							
<210>	83																	
<211>	102																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial Sequence																	
<220><223>	Synthetic construct																	
<400>	83																	
Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Pro	Lys	Ile	Thr	Ser	Tyr	Ser	Ala	Gly	Asn	Glu			
1					5					10					15			
Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Trp	Asn	Pro	Val	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	Tyr	Glu			
				20					25					30				
Ile	Ile	Tyr	Trp	Asn	Asn	Met	Gly	Phe	Asn	Ser	Ser	Ile	Asn	Val	Gly			
				35					40					45				
Asn	Val	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Thr	Tyr			
				50					55					60				
Tyr	Phe	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ser			
65						70						75						80
Ser	Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Thr	Leu	Glu			

85 90 95

His His His His His His

100

<210> 84

<211> 88

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic cosntruct

<400> 84

Pro Leu Pro Pro Lys Ile Thr Ser Tyr Ser Ala Gly Asn Glu Ser Val

1 5 10 15

Thr Leu Gly Trp Asn Pro Val Arg Leu Ser Ser Gly Tyr Glu Ile Ile

20 25 30



Tyr Trp Asn Asn Met Gly Phe Asn Ser Ser Ile Asn Val Gly Asn Val

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Leu Ala Tyr Asn Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Pro Ser Ser Ile

65 70 75 80

Ile Ala Leu Thr Pro Ala Ser Val

85

<210> 85

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 85

Ala Ala Pro Pro Lys Pro Gln Ile Ala Ser Ile Ala Ser Gly Asn Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gln Ile Val Pro Tyr Asn Ser Leu Gly Asn Gly Thr Pro Ser Asp

65 70 75 80

Ile Ile Ser Ala Thr Pro Ser Ser Val Gly Gly Gly Thr Leu Glu His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 86

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 86

Pro Pro Lys Pro Gln Ile Ala Ser Ile Ala Ser Gly Asn Glu Thr Ile  
1 5 10 15

Thr Val Lys Trp Tyr Asp Thr Asn Ala Ser Gly Tyr Tyr Ile Thr Tyr  
20 25 30

Trp Ser Asn Phe Ser Gln Lys Val Thr Ile Asn Val Gly Asn Val Thr  
35 40 45

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

Ile Val Pro Tyr Asn Ser Leu Gly Asn Gly Thr Pro Ser Asp Ile Ile  
65 70 75 80

Ser Ala Thr Pro Ser Ser Val  
85

<210> 87

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 87

Ala Ala Pro Asn Pro Pro Ile Ile Lys Val Lys Ile Gly Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ala Thr Leu Thr Trp Tyr Asp Thr Phe Asn Gly Gly Tyr Pro Ile Glu  
20 25 30

Gly Tyr Tyr Leu Tyr Val Asn Gly Lys Gly Ile Asn Val Gly Asn Ile  
35 40 45

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

Glu Leu Ile Ala Tyr Asn Lys Ile Gly Asn Ser Ser Ile Ser Ser Val  
65 70 75 80

Ser Phe Ile Ala Ala Ser Lys Ala Gly Gly Gly Thr Leu Glu His His  
85 90 95

His His His His

100

<210> 88

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 88

Pro Asn Pro Pro Ile Ile Lys Val Lys Ile Gly Asn Leu Asn Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Trp Tyr Asp Thr Phe Asn Gly Gly Tyr Pro Ile Glu Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Val Leu Thr Asn Leu Thr Ala Gly Glu Leu Tyr Thr Ile Glu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ala Ala Ser Lys Ala

85

<210> 89

<211> 297

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 89

gccatggcag ccccgcgat tagcaatgtg cgcgttagcg atgtgaccaa cagcagcgcc 60

accattcggtt gggatgtgag cctggcggcg aataatcgcg tgctgtttag caccaacagc 120

gatctgagca gcccgcagtg gagcgcgtgg gataacagca ccgatagccc gatgattacc 180

ctgagcggtc tgagcgcggg caccgcgtat tatttttagcg tgtatagctt tcgtccggat 240

aatgcgagcc tgtatagcaa cagcagcatt atgagcttta ccaccggtgg cggtagc 297

<210> 90

<211> 273

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 90

ccggcgatta gcaatgtgcg cgtttagcgat gtgaccaaca gcagcgccac cattcgttgg	60
gatgtgagcc tggcggcgaa taatcgctg ctgttttagca ccaacagcga tctgagcagc	120
ccgcagtgga gcgcgtggga taacagcacc gatagcccga tgattaccct gagcggtctg	180
agcgcgggca ccgcgtatta ttttagcgtg tatagcttgc gtccggataa tgcgagcctg	240

tatagcaaca gcagcattat gagctttacc acc	273
--------------------------------------	-----

<210> 91

<211> 306

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 91

gccatggcgc ccagcgaacc gcagaacctg aaagcgaccg cgggtaataa caatattacc	60
ctgacctggg atccgccgat tgatgatggt ggctgccgca ttgtggaata tcgtatttat	120
cgtggcacca ataataacaa cctggaatat tatgcgagcg ttaacggcag caccaccacc	180
tttattgata aaaatattgt gtatagccag acctattatt ataaagtgag cgcggtgaac	240
aatattgttg aagggccgaa aagcaacacc gcgagcgcgga ccccgaccag cagcggtggc	300

ggtacc	306
--------	-----

<210> 92

<211> 282

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic cosntruct

<400> 92

agcgaaccgc agaacctgaa agcgaccgcg ggtaataaca atattaccct gacctgggat	60
ccgccgattg atgatgttgg ctgccgcatt gtggaatata gtatttatcg tggcaccaat	120
aataacaacc tggaatatta tgcgagcgtt aacggcagca ccaccacctt tattgataaa	180
aatatttgtt atagccagac ctattattat aaagtgagcg cggtaacaa tatttgtgaa	240

ggccccgaaaa gcaacaccgc gagcgcgacc ccgaccagca gc 282

<210> 93

<211> 288

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic cosntruct

<400> 93

gccatggccg ccccgctccc accgaaaatt accagctata gcgcgggcaa cgaaagcgtg 60  
accctgggct ggaacccggg gcgtctgagc agcggctatg aaattattta ttggaacaat 120  
atgggcttta acagcagcat taatgtgggt aatgtgacca gctataccgt gaccggcctg 180  
aaagatggca ttacctatta ttttgaagtg ctggcctata acagcattgg ttatagcagc 240  
ccgagcagca ttatcgcgct gaccccggcg agcgtgggtg gcggtacc 288

<210> 94

<211

> 264

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 94

ccgctcccac cgaaaattac cagctatagc gcgggcaacg aaagcgtgac cctgggctgg 60  
aaccgggtgc gtctgagcag cggtctatgaa attatttatt ggaacaatat gggctttaac 120  
agcagcatta atgtgggtaa tgtgaccagc tataccgtga ccggcctgaa agatggcatt 180  
acctattatt ttgaagtgtt ggcctataac agcattgggt atagcagccc gagcagcatt 240  
atcgcgctga ccccggcgag cgtg 264

<210> 95

<211> 285

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 95

gccatggccg ccccgccgaa accgcagatt gccagcattg ccagcggtaa tgaaaccatt 60  
accgtgaaat ggtatgatac caatgcgagc ggctattata ttacctattg gagcaatttt 120  
agccagaaag tgaccattaa tgtgggtaac gtgaccagct ataccattaa acatctgaaa 180

gatggcgtga cctattatat tcagattgtg ccgtataaca gcctgggcaa tggcaccccg 240

agcgatatta ttagcgcgac cccgagcagc gttgggtggcg gtacc 285

<210> 96

<211> 261

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 96

ccgccgaaac cgcagattgc cagcattgcc agcggtaatg aaaccattac cgtgaaatgg 60

tatgatacca atgcgagcgg ctattatatt acctattgga gcaattttag ccagaaagtg 120

accattaatg tgggtaacgt gaccagctat accattaaac atctgaaaga tggcgtgacc 180

tattatattc agattgtgcc gtataacagc ctgggcaatg gcaccccgag cgatattatt 240

agcgcgaccc cgagcagcgt t 261

<210> 97

<211> 282

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 97

gccatggcgg ccccgaaatcc gccgattatt aaagtgaataa ttggcaatct gaatgcgacc 60

ctgacctggt atgatacctt taatgggtgt tatccgattg aaggctatta tctgtatgtg 120

aacggtaaag gtattaacgt gggcaacatt accagctatg tgctgaccaa tctgaccgcc 180

ggtgaactgt ataccattga actgattgcg tataacaaaa tcggcaacag cagcattagc 240

agcgtgagct ttattgcggc gagcaaagcg ggtggcggtta cc 282

<210> 98

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 98

ccgaatccgc cgattattaa agtgaataat ggcaatctga atgcgaccct gacctggtat 60

gataccttta atggtgggta tccgattgaa ggctattatc tgtatgtgaa cggtaaaggt 120

attaacgtgg gcaacattac cagctatgtg ctgaccaatc tgaccgccgg tgaactgtat	180
accattgaac tgattgcgta taacaaaatc ggcaacagca gcattagcag cgtgagcttt	240
attgcggcga gcaaagcg	258
<210> 99	
<211> 3994	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic construct	
<400> 99	
gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt	60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt	120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt	240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg	300
ctgaagatca gttgggtgct cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc	420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac	480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacatc gactgataac actgcggcca	600
acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc	720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg gtttattgct gataaatctg	900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
agatcgtgta gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	1080
cataataact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt	1200
cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaactt	1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc	1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcataca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agctatgaga aagcgccacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggat ccggtaaagc	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacagagg agcttcagg gggaaacgcc tggatatctt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt	1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt	1980
cagttagcga ggaagcgaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca	2100
acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
accatgatta cgccaagctt tggagccttt tttttggaga ttttcaactg gaaaaatta	2280
ttattcgcaa ttcttttagt gtgttccttc tatgcggccc agccggccat ggccgccatt	2340
gaagtgaag atgtgaccga taccaccgcg ctgattacct ggtttaaacc gctggcggaa	2400
attgatggct gtgaactgac ctatggcatt aaagatgtgc cgggcgatcg caccaccata	2460
gatctgaccg aagatgaaaa ccagtatagc attggtaacc tgaaacggga taccgaatat	2520
gaagtgagcc tgatttgccg tcgtggcgat atgagcggcg cgccggcgaa agaaaccttt	2580
accacgggtg gcggtacccc aaccgaccg ccaaccactc caccaactga tagcccaggc	2640
ggtactgggtg gctctgggtc cggtgatttt gattatgaaa agatggcaaa cgctaataag	2700
ggggctatga ccgaaaatgc cgatgaaaac gcgctacagt ctgacgctaa aggcaaactt	2760
gattctgtcg ctactgatta cgggtctgct atcgatgggt tcatttggtga cgtttccggc	2820
cttgctaattg gtaatgggtc tactgggtgat ttgctggct ctaattccca aatggctcaa	2880
gtcggtgacg gtgataattc acctttaatg aataatttc gtcaatatat accttccctc	2940
cctcaatcgg ttgaatgtcg cctttttgtc tttagcgtg gtaaacata tgaattttct	3000
attgattgtg acaaaaataa cttattccgt ggtgtctttg cgtttctttt atatgttgc	3060



acctttatgt atgtattttc tacgtttgct aacatactgc gtaataagga gtccttaagaa 3120  
 ttcgacggtc acagcttgtc tgtaagcgga tgcggggagc agacaagccc gtcagggcgc 3180  
 gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt 3240  
 actgagactg caccataaaa ttgtaaacgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt 3300  
 ttgttaaate agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaatcc cttataaatc 3360  
 aaaagaatag cccgagatag gggttagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt 3420  
 aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggcccact 3480

acgtgaacca tcacccaaat caagtttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg 3540  
 gaaccctaaa gggagccccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag 3600  
 aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagt tagcggtcac 3660  
 gctgcgcgta accaccacac ccgcccgcgt taatgcgccg ctacagggcg cgtactatgg 3720  
 ttgctttgac gtatgcgggt tgaaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 3780  
 aggcgccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggt gcgggcctct 3840  
 tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 3900

ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gttccgggag ctgcatgtgt 3960  
 cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcga 3994

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 100

Ser Pro Pro Ser Val Leu Val Gly Tyr Thr Gly

1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 101

Val Thr Glu Phe Gly Arg Arg Arg Ser

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 102

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

1 5

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 103

Arg Lys Ile Ile Gly Leu Leu Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 104

Gly Thr Val Val Gly Gln Lys Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 105

Ser Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly

1 5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 106

Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 107

Ser Pro Ser Gly Arg Val Ile Leu Trp Thr Gly

1 5 10

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 108

Asp Asn Leu Tyr Gly Arg Ile Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 109

Ala Thr Pro Gly Cys Arg Asn Gly Lys Ile Val Gly

1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 110

Thr Thr Ser Val Gly Ala Thr Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 111

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 112

Tyr Asn Arg Tyr Gly Leu Cys Pro Ser

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 113

Ser Asn Arg Ile Gly Met Cys Pro Ser

1 5

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 114

Ala Gln Pro Thr Ser Pro Asn Gly Ser Ile Xaa Gly

1 5 10

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 115

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 116

Asp Thr Val His Gly Arg Leu Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 117

Arg Lys Val Leu Gly Arg Leu Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 118

Arg Lys Leu Val Gly Ala Leu Arg Ser

1 5

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 119

Arg Lys Val Leu Arg Tyr Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 120

Ser Pro Cys Asn Gly Gly Lys Arg Cys Thr Gly

1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 121

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 122

Phe Lys Trp Leu Gly Ala Ile Arg Ser

1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 123

Gly Asn Cys Val Gly Asn Leu Trp Ser

1 5

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 124

Ser Pro Ala Trp Ile Thr Trp His Arg Thr Gly

1 5 10

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 125

His Thr Pro Leu Gly His Leu Arg Ser

1 5

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 126

Ser Pro Cys Ile Met Val Cys Leu Arg Thr Gly

1 5 10

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 127

Arg Arg Gly Asp Met Ser Gly Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 128

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 128

Ser Pro Cys Leu Phe Val Cys Leu Arg Thr Gly

1 5 10

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 129

Arg Arg Gly Asp Met Ser Gly Ala Pro Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 130

Ser Pro Pro Leu Phe Cys Cys Gln Lys Thr Gly



1                    5                    10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 131

Phe Lys Leu Thr Gly Phe Leu Tyr Ser

1                    5

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 132

Ser Pro Ser Val Ala Arg Met Leu Glu Thr Gly

1                    5                    10

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic construct

<400> 133

Ile Thr Leu Cys Gly Arg Gly Val Ser

1                    5

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 134

Ser Pro Pro Glu Tyr Ala Phe Tyr Tyr Thr Gly

1                    5                    10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 135

Val Lys Asn Cys Gly Leu Phe Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 136

Ser Leu Ala Pro Gly Tyr Arg Leu Gly

1 5

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 137

Val Lys Leu Cys Met Arg Gly Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 138

Ala Thr Pro Ser Val Phe Asp Ser His Ile Glu Gly

1 5 10

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 139

Trp Lys His His Gly Asp Ala Trp Ser

1 5

<210> 140

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 140

Ala Lys Pro Ser Ile Val Asn Gly Phe Ile Ser Gly

1 5 10

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 141

Asp Lys Cys Phe Gly Ala Met Lys Ser

1 5

<210> 142

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 142

Ala Lys Pro Met Ser Cys Ser Gly Tyr Ile Gln Gly

1 5 10

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 143

Ala Lys Leu Thr Gly Trp Leu Cys Ser

1 5

<210> 144

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 144

Ala Ala Pro Phe Phe Gly Ser Ser Tyr Ile Ser Gly

1 5 10

<210> 145

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 145

His Tyr Tyr Val Thr Arg

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 146

Val Asn Leu Ser Gly His Met Pro Ser

1 5

<210> 147

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 147

Ala Pro Pro Met Leu Thr Asp Ser Glu Ile Asn Gly

1 5 10

<210> 148

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 148

Thr Ser Ser Tyr Trp Ser

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 149

Ser Thr Leu Arg Arg Asn Ala Ile Ser

1 5

<210> 150

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 150

Ala Lys Pro Glu Lys Trp Asp Gly Ser Ile Tyr Gly

1 5 10

<210> 151

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 151

Asn Ser Arg His Thr Ala

1                    5

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 152

Phe Thr Pro Tyr Gly Ala Lys Ser Asn Pro Ala

1                    5                    10

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 153

Ala Pro Pro Pro Phe Ser Asn Ser Cys Ile Ile Gly

1                    5                    10

<210> 154

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 154

Arg Pro Gly Arg Ala Ser

1                    5

<210> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 155

Ser Thr Gly Thr Gly Leu Pro Ser Asn Pro Ala

1                    5                    10

<210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 156

Ser Pro Cys Cys Pro Tyr Asp Arg Tyr Thr Gly

1 5 10

<210> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic construct

<400> 157

Gln Ser Ser Arg Ser His

1 5

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 158

Ile Thr Thr Phe Gly His Val Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 159

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 159

Ala Lys Pro Arg Gln Gly Gly Ser Asn Ile Ser Gly

1 5 10

<210> 160

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 160

Tyr His Lys Gly Leu His

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 161

Pro Lys Met Thr Gly Tyr Thr Tyr Ser

1 5

<210> 162

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 162

Ser Pro Gly Pro Leu Leu Arg His Thr Thr Gly

1 5 10

<210> 163

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 163

Arg Pro Ile Pro Arg Ala

1 5

<210> 164

<211> 10

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 164

Arg Asn Arg Pro Gln Gln Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 165

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 165

Ser Pro Gly Gly Phe Gln Lys Ile Thr Thr Gly

1 5 10

<210> 166

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 166

Val Asn Arg Arg Asn His

1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 167

Leu Thr Tyr Lys Ala Arg Ala Ile Ser

1 5

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 168

Ser Pro Arg Met Tyr Thr Trp Ile Gln Thr Gly

1 5 10

<210> 169

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 169

Thr His Leu Ser Gly Ser

1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 170

Leu Lys Leu Thr Arg Thr His Ile Ser

1 5

<210> 171

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 171

Ser His Ala Gly Gly Ile Arg Ile Gly

1 5

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 172

His Val Trp Gln Val Tyr

1 5

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 173

Met Thr Pro Tyr Leu Leu Gly Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 174

Ser Pro Ser His Gly Val Glu Ser Ser Thr Gly

1 5 10

<210> 175

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 175

His Gly Leu Gln Arg Val

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 176

Ala Lys Ile Cys Gly His Leu Val Ser

1                      5

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 177

Ser Pro Cys Gln Leu Leu Ala Leu Ile Thr Gly

1                      5                      10

<210> 178

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 178

Asn Ser Arg His Tyr His

1                      5

<210> 179

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 179

Tyr Thr Ser Thr Gly Gln Arg Ser Asn Pro Ala

1                      5                      10

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 180

Ser Pro Cys Gln Met Leu Ser Ser Leu Thr Gly

1                      5                      10

<210> 181

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 181

Asn Ile Glu Arg Pro Lys

1 5

<210> 182

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 182

Phe Thr Met Thr Gly Tyr Arg Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 183

Ser Pro Cys Cys Gln Glu Phe Thr Leu Thr Gly

1 5 10

<210> 184

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 184

His Asn His His His His

1 5

<210> 185

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 185

Ile Thr Asp Ala Gly Asn Lys Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 186

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 186

Ser Pro Cys Ser Pro Cys Gln Leu Val Thr Gly

1 5 10

<210> 187

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic construct

<400> 187

Ser Cys Thr Arg Ala Lys

1 5

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 188

Ile Asn Lys Leu Gly Asp Thr Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 189

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 189

Ser Pro Ser Arg Gly Gly Thr Ser Leu Thr Gly

1 5 10

<210>

190

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 190

Asp Gln Val Arg Ala Thr

1 5

<210> 191

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 191

His Thr Asn Ser Gly Gln Pro Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 192

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 192

Ser Pro Gly Met Phe Asp Gln Val Arg Thr Gly

1 5 10

<210> 193

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 193

Gly Lys Tyr Trp Glu Arg

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 194

Arg Asn Gln Tyr Gly Gln His Gln Ser

1 5

<210> 195

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 195

Ser Pro Pro Phe Arg Ala Gly His Val Thr Gly

1 5 10

<210> 196

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 196

Val Thr Ala Arg Cys Gln

1 5

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 197

Thr Thr Gly Asn Gly Leu Arg Ser Asn Pro Ala



1                      5                      10

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 198

Ser Trp Ala Gln Ala Asn Pro Gly Gly

1                      5

<210> 199

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 199

Trp His Ser Ile Thr Phe

1                      5

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 200

Lys Thr Lys Val Gln Ser Ser Asn Pro Ala

1                      5                      10

<210> 201

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 201

Asp Val Thr Asp Thr Thr

1                      5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 202

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

1 5

<210> 203

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 203

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg

1 5

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 204

Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln

1 5

<210> 205

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 205

Gly Asn Leu Lys Pro Asp

1 5

<210> 206

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 206

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 207

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 207

Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5

<210> 208

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 208

Thr Glu Asp Glu Asn Gln

1 5

<210> 209

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 209

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu

1 5

<210> 210

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 210

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Cys Asp Leu Thr Gly Glu Asp Glu

35 40 45

Gly Asn Gln Cys Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 211

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (28)..(29)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (37)..(38)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (40)..(41)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 211

accgcgctga ttacctgggc tnnkscgnnk gstnnknnkn nkggcattga actgacctat 60

ggc 63

<210> 212

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (28)..(29)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (43)..(44)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (49)..(50)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 212

accgcgctga ttacctgggc gvmaccgnnk nnknnkrrcr gcnnkattnn kggtattgaa 60

ctgacctatg gc 72

<210> 213

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (34)..(35)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 213  
 accgcgctga ttacctggtc tccgbstnnk nnknnknnkn nknnkaccgg cattgaactg 60  
 acctatggc 69  
 <210> 214  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (37)..(38)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (40)..(41)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (43)..(44)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 214

tatgaagtga gcctgattag cnnkamsnnk nnkggtnnkn nknkagcaa agaaaccttt 60

accacc 66

<210> 215

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (28)..(29)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (37)..(38)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 215  
 tatgaagtga gcctgattag cnnkamsnnk nnknnknnkr gcaacccggc gaaagaaacc 60  
 ttaccacc 69

<210> 216  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 216

tatgaagtga gcctgattag cnnkamsnnk nnkggtnnkn nkagcaaccc ggcgaaagaa 60  
 acctttacca cc 72

<210> 217  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)



<223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (34)..(35)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)

<223> n is a, c, g, or t  
 <400> 217  
 accgcgctga ttacctggtc tnnkscgnnk gstnnknkn nkggctgtga actgacctat 60  
 ggc 63

<210> 218  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (34)..(35)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 218  
 accgcgctga ttacctggtc tccgbstnnk nnknnknnkn nknnkaccgg ctgtgaactg 60  
 acctatggc 69  
 <210> 219  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 219  
 Ala Cys Cys Gly Cys Gly Cys Thr Gly Ala Thr Thr Ala Cys Cys Thr  
  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Cys Gly Val Met Ala Cys Cys Gly Asn Asn Lys Asn Asn  
 20 25 30  
 Lys Asn Asn Lys Arg Arg Cys Arg Gly Cys Asn Asn Lys Ala Thr Thr  
 35 40 45  
 Asn Asn Lys Gly Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala  
 50 55 60  
 Cys Cys Thr Ala Thr Gly Gly Cys  
 65 70  
  
 <210> 220  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 220  
 tatgaagtga gcctgatttg cnnkamsnnk nnkggtnnkn nknnkagcaa agaaaccttt 60  
 accacc 66  
 <210> 221  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
  
 <220><221> misc\_feature

<222> (34)..(35)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 221  
 tatgaagtga gcctgatttg cnnkamsnnk nnknnknnkr gcaacccggc gaaagaaacc 60  
 ttaccacc 69  
 <210> 222  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (22)..(23)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (28)..(29)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 222  
 tatgaagtga gcctgatttg cnnkamsnnk nnkggtnnkn nkagcaaccc ggcgaaagaa 60  
 acctttacca cc 72  
 <210> 223  
 <211> 67  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (27)..(28)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (30)..(31)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (33)..(34)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (36)..(37)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (39)..(40)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (42)..(43)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 223

ccggtttcag gttaccaatg ctatamnnmn nmnnmnnmnn mnnccagatct atgggtgtgc 60

gatcgcc 67

<210> 224

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (34)..(35)

<223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (37)..(38)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (46)..(47)

<223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (52)..(53)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 224

ccgccaccgg tggtaaaggt ttctttgctm nnnnnmnnac cmnnmnnskt mnngcaaadc	60
aggctcactt catattcgg	79

<210> 225  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (39)..(40)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (42)..(43)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (45)..(46)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (48)..(49)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (54)..(55)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 225  
 cgccaccggt ggtaaagggt tctttcgccg ggttgcymin mnnmnmnmns ktmnngcaaa 60  
 tcaggtctac ttcattatcg g 81  
 <210> 226  
 <211> 85  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (40)..(41)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (43)..(44)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (49)..(50)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (52)..(53)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (58)..(59)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 226  
 ccgccaccgg tggtaaagggt ttctttcgcc gggttgctmn nmnnaccmnn mnnsktmnng 60  
 caaatcaggc tcacttcata ttccg 85  
  
 <210> 227  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 227

Met Thr Asn Ile Thr Lys Arg Ser Leu Val Ala Ala Gly Val Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Met Ala Gly Asn Val Ala Leu Ala

20 25

<210> 228

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 228

Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys

1 5 10

<210> 229

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 229

Ala Leu Ile Thr Trp

1 5

<210> 230

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 230

Ile Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

1 5

<210> 231

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



<220><223> Synthetic construct

<400> 231

Thr Thr Ile Asp

1

<210> 232

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 232

Tyr Ser Ile

1

<210> 233

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 233

Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser

1 5

<210> 234

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 234

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

1 5

<210> 235

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 235

Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val

1 5 10

<210> 236

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 236

Thr Thr Ile Asp Leu

1 5

<210> 237

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 237

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser

1 5

<210> 238

<211> 288

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 238

ccgccgagcc tgaacgtgac caaagatggc gatagctata gcctgcgctg ggaaaccatg	60
aaaatgcgct atgaacatat tgatcatacc ttgaaattc agtatcgcaa agataccgcg	120
acctggaaaag atagcaaaac cgaaaccctg cagaacgcgc atagcatggc gctgccggcg	180
ctggaaccga gcacccgtta ttgggcgcgt gtgcgtgtgc gtaccagccg taccggctat	240
aatggcattt ggagcgaatg gagcgaagcg cgtagctggg ataccgaa	288

<210> 239

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 239

Ile Glu Val

1

<210> 240

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 240

Ile Glu Val Lys

1

<210> 241

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 241

Ile Glu Cys

1

<210> 242

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 242

Ala Leu Cys Thr Trp

1 5

<210> 243

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 243

Thr Thr Cys Asp Leu

1 5

<210> 244

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 244

Cys Ser Ile

1

<210> 245

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 245

Tyr Cys Val Ser Leu Ile Ser

1 5

<210> 246

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 246

Lys Glu Cys Phe Thr Thr

1 5

<210> 247

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 247

Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

1 5  
 <210> 248  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 248  
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys

1 5  
 <210> 249  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct  
 <400> 249  
 Tyr Cys Val Ser Leu Ile Cys

1 5  
 <210> 250  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 250  
 Ile Glu Cys Lys

1  
 <210> 251  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 251  
 Thr Thr Cys Asp

1  
 <210> 252

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400>  
 252  
 Glu Tyr Cys Val Ser Leu Ile Ser  
 1 5  
 <210> 253  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 253  
 Glu Tyr Glu Val Ser Leu Cys Ser  
 1 5  
 <210> 254  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 254  
 Glu Tyr Cys Val Ser Leu Cys Ser  
 1 5  
 <210> 255  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><  
 223> synthetic construct  
 <400> 255  
 Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr  
 1 5  
 <210> 256  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 256  
 Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser  
 1 5  
 <210> 257  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic sequence  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = pro, glu or lys,  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(6)  
 <223> Xaa = any amino acid  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = Asp or Gly  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = Ser or Gly  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = any amino acid  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa = any amino acid  
 <400> 257  
 Ala Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Gly  
 1 5 10  
 <210> 258  
 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220

><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Pro, Ser, or Gly

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(9)

<223> each Xaa may be any amino acid

<400> 258

Ser Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gly

1                      5                      10

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Asp, Thr, Lys,

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> Xaa = any amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(7)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 259

Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Ser Asn Pro Ala

1                      5                      10

<210> 260



<211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 260  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
 <210> 261  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
  
 <400> 261  
 Gly Gly Gly Thr Pro Thr  
 1 5  
 <210> 262  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)

<223

> n is a, c, g, or t

<400> 262

aaanhtnhtn htnhtnhts t

21

<210> 263

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

<223> n is a, c, g, or t

<220

><221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (19)..(19)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 263

aaanhtnhtn htnhtnhtnh tnhtst

27

<210> 264

<211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <  
 222> (4)..(4)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 264

nhthnhtnhtn htnhtnhtnh t

21

<210>

265

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<

223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (19)..(19)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (25)..(25)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 265

nhthnhtnhtn htnhtnhtnh tnhtnht

27

<210> 266

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (22)..(22)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 266

nhtrrbctgn htccgnhtrb tnht

24

<210> 267

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5 10 15

Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu

20 25 30

Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp

35 40 45

Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp

50 55 60

Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Ser Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser

65 70 75 80

Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 268

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 268

Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn Phe Lys Thr

1 5 10 15

Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln Val Tyr Thr Val Gln

20 25 30

Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys Cys Phe Tyr Thr Thr

35 40 45

Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val Lys Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro

<210> 269

<211> 105

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 269

Ala Asp Thr Thr Gly Arg Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser Thr Asn

1 5 10 15

Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Ser Ile Asp His Val Tyr

20 25 30

Thr Val Gln Ile Ser Thr Arg Leu Glu Asn Trp Lys Ser Lys Cys Phe

35 40 45

Leu Thr Ala Glu Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Val Val Lys Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Asn Thr Thr Gly Phe Pro Glu Glu Pro Pro Phe Arg Asn Ser Pro

85 90 95  
 Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Asp Thr Asn  
 100 105  
 <210> 270  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 270  
 Val Pro Thr Pro Thr Asn Val Thr Ile Glu Ser Tyr Asn Met Asn Pro  
 1 5 10 15  
 Ile Val Tyr Trp Glu Tyr Gln Ile Met Pro Gln Val Pro Val Phe Thr  
 20 25 30  
 Val Glu Val Lys Asn Tyr Gly Val Lys Asn Ser Glu Trp Ile Asp Ala  
 35 40 45  
 Cys Ile Asn Ile Ser His His Tyr Cys Asn Ile Ser Asp His Val Gly  
 50 55 60  
 Asp Pro Ser Asn Ser Leu Trp Val Arg Val Lys Ala Arg Val Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Ser Ala Tyr Ala Lys Ser Glu Glu Phe Ala Val

85 90  
 <210> 271  
 <211> 91  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 271  
 Pro Glu Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Met Arg Cys Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn  
 20 25 30  
 Phe Thr Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys  
 35 40 45  
 Ala Lys Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val

50 55 60  
Tyr Phe Val Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly  
65 70 75 80  
Lys Val Thr Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro

85 90

<210> 272

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Gly Pro Glu Glu Leu Leu Cys Phe Thr Glu Arg Leu Glu Asp Leu Val  
1 5 10 15

Cys Phe Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Gly Val Gly Pro Gly Gln Tyr  
20 25 30

Ser Phe Ser Tyr Gln Leu Glu Asp Glu Pro Trp Lys Leu Cys Arg Leu  
35 40 45

His Gln Ala Pro Thr Ala Arg Gly Ala Val Arg Phe Trp Cys Ser Leu  
50 55 60

Pro Thr Ala Asp Thr Ser Ser Phe Val Pro Leu Glu Leu Arg Val Thr  
65 70 75 80

Ala Ala Ser Gly Ala Pro Arg Tyr His Arg Val Ile His Ile Asn Glu  
85 90 95

Val Val Leu

<210> 273

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

Phe Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile  
1 5 10 15

Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu  
20 25 30



Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr

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

<210> 274

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

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

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

<210> 275

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Pro Gly Lys Pro Glu Ile Phe Lys Cys Arg Ser Pro Asn Lys Glu Thr

1 5 10 15

Phe Thr Cys Trp Trp Arg Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu Pro Thr Asn

20 25 30

Tyr Ser Leu Thr Tyr His Arg Glu Gly Glu Thr Leu Met His Glu Cys

35 40 45

Pro Asp Tyr Ile Thr Gly Gly Pro Asn Ser Cys His Phe Gly Lys Gln

50 55 60

Tyr Thr Ser Met Trp Arg Thr Tyr Ile Met Met Val Asn Ala Thr Asn

65 70 75 80

Gln Met Gly Ser Ser Phe Ser Asp Glu Leu Tyr Val Asp Val Thr Tyr

85 90 95

Ile Val Gln

<210> 276

<211> 102

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 276

Pro Ala Ser Pro Ser Asn Leu Ser Cys Leu Met His Leu Thr Thr Asn

1 5 10 15

Ser Leu Val Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu Pro Thr

20 25 30

Ser Phe Ile Leu Lys Ser Phe Arg Ser Arg Ala Asp Cys Gln Tyr Gln

35 40 45

Gly Asp Thr Ile Pro Asp Cys Val Ala Lys Lys Arg Gln Asn Asn Cys

50 55 60

Ser Ile Pro Arg Lys Asn Leu Leu Leu Tyr Gln Tyr Met Ala Ile Trp

65 70 75 80

Val Gln Ala Glu Asn Met Leu Gly Ser Ser Glu Ser Pro Lys Leu Cys

85 90 95

Leu Asp Pro Met Asp Val

100

<210> 277

<211> 99

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 277

Pro Gly Lys Pro Glu Ile His Lys Cys Arg Ser Pro Asp Lys Glu Thr

1 5 10 15

Phe Thr Cys Trp Trp Asn Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu Pro Thr Asn

20 25 30

Tyr Ser Leu Thr Tyr Ser Lys Glu Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Glu Cys

35 40 45

Pro Asp Tyr Lys Thr Ser Gly Pro Asn Ser Cys Phe Phe Ser Lys Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Gly Ser Ser Ser Ser Asp Pro Leu Tyr Val Asp Val Thr Tyr

85 90 95

Ile Val Glu

<210> 278

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys

1 5 10 15

His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile

20 25 30

Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp

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

85 90 95  
Val

<210> 279

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 279

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

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

<210> 280

<211> 105

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 280

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

1 5 10 15

Asn Val Thr Val Gln Asp Ala Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Gly Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Thr Asn Glu Phe Leu Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe

65 70 75 80

Ser Val Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Lys Arg Lys Gln Arg Ser Pro

85 90 95

Glu Ser Leu Thr Glu Cys Thr Ser Arg

100 105

<210> 281

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

Ile Gly Pro Pro Lys Leu Asp Ile Arg Lys Glu Glu Lys Gln Ile Met

1 5 10 15

Ile Asp Ile Phe His Pro Ser Val Phe Val Asn Gly Asp Glu Gln Glu

20 25 30

Val Asp Tyr Asp Pro Glu Thr Thr Cys Tyr Ile Arg Val Tyr Asn Val

35 40 45

Tyr Val Arg Met Asn Gly Ser Glu Ile Gln Tyr Lys Ile Leu Thr Gln

50 55 60

Lys Glu Asp Asp Cys Asp Glu Ile Gln Cys Gln Leu Ala Ile Pro Val

65 70 75 80

Ser Ser Leu Asn Ser Gln Tyr Cys Val Ser Ala Glu Gly Val Leu His

85 90 95

Val Trp Gly Val Thr Thr Glu Lys Ser Lys Glu Val Cys Ile Thr Ile  
100 105 110

Phe Asn Ser  
115

<210> 282

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val Asn Leu Glu Ile His Asn Gly Phe  
1 5 10 15

Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro Arg Pro Lys Met Ala Pro Ala Gln  
20 25 30

Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser His Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala  
35 40 45

Ile Arg Lys Val Pro Gly Gln Phe Thr Phe Thr His Lys Lys Val Lys  
50 55 60

His Glu Gln Phe Ser Leu Leu Thr Ser Gly Glu Val Gly Glu Phe Cys  
65 70 75 80

Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala Ser Arg Ser Asn Lys Gly Met Trp  
85 90 95

Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu Thr  
100 105

<210> 283

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 283

Leu Glu Pro Pro Met Leu Gln Ala Leu Asp Ile Gly Pro Asp Val Val  
1 5 10 15

Ser His Gln Pro Gly Cys Leu Trp Leu Ser Trp Lys Pro Trp Lys Pro  
20 25 30

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

Pro Gly Leu Gln Leu Arg Pro  
100

<210> 284

<211> 93

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 284

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

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

<210> 285

<211> 94

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 285

Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg

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

65                    70                    75                    80  
Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser  
                  85                    90

<210> 286

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 286

Pro Ser Pro Pro Ser Val Trp Phe Glu Ala Glu Phe Phe His His Ile

1                    5                    10                    15  
Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Gln Gln Ser Glu Ser Thr Cys Tyr Glu  
                  20                    25                    30

Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile Glu Ser Trp Asn Ser Ile Ser Gln  
                  35                    40                    45

Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp Leu Thr Ala Val Thr Leu Asp Leu  
                  50                    55                    60

Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Val Asp Gly Ser  
65                    70                    75                    80

Arg His Ser Gln Trp Thr Val Thr Asn Thr Arg Phe Ser Val  
                  85                    90

<210> 287

<211> 115



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 287

Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn

1 5 10 15

Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp

20 25 30

Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly

35 40 45

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

50 55 60

Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys

65 70 75 80

Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val

85 90 95

His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp

100 105 110

Ile Ile Lys

115

<210> 288

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln

1 5 10 15

Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His

20 25 30

Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser

35 40 45

Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys

50 55 60

Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser  
65 70 75 80

Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn  
85 90 95

Thr Ser Lys Glu Asn Pro Arg Thr  
100

<210> 289

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 289

Met Thr Asn Ile Thr Lys Arg Ser Leu Val Ala Ala Gly Val Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Met Ala Gly Asn Val Ala Leu Ala Ala Ile Glu Val Lys Asp  
20 25 30

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Glu  
35 40 45

Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp  
50 55 60

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

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Arg  
85 90 95

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly  
100 105 110

Gly Thr Leu Gly His His His His His His His His  
115 120