



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0158680
(43) 공개일자 2022년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/78 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/78 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7026036
(22) 출원일자(국제) 2021년01월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/050409
(87) 국제공개번호 WO 2021/130390
국제공개일자 2021년07월01일
(30) 우선권주장
19383201.1 2019년12월26일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유니버시티트 아우토노마 데 바르셀로나
스페인 08193 세르다놀라 델 발레스 에디피시 아
캄푸스 데 라 우아베 에세/에네
나노리젠트, 에스엘.
스페인 바르셀로나, 세르단올라 델 발레스, 에스
/엔 캄푸스 데 라 유에이비 08193 벨라테라, 에디
피시오 유레카 아베니다 데 칸 도메네크
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
바즈퀴에즈 고메즈, 에스터
스페인, 세르단올라 델 발레스, 에스/엔 08193 벨
라테라, 캄푸스 데 라 유에이비, 유니버시티트 아
우토노마 데 바르셀로나 아이비비
빌라베르데 콜라레스, 안토니오
스페인, 세르단올라 델 발레스, 에스/엔 08193 벨
라테라, 캄푸스 데 라 유에이비, 유니버시티트 아
우토노마 데 바르셀로나 아이비비
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인주원

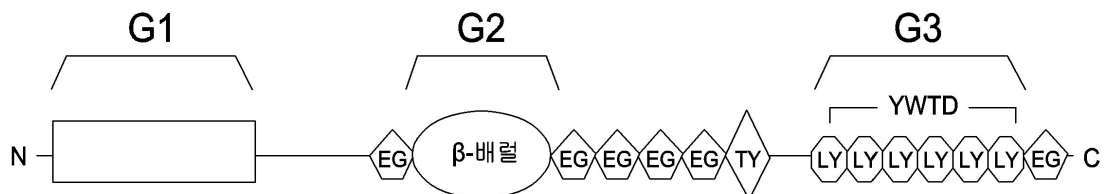
전체 청구항 수 : 총 103 항

(54) 발명의 명칭 스캐폴드 단백질 및 니도젠 기반 치료용 나노접합체

(57) 요약

본 발명은 관심 펩티드가 결합되거나, 관심 제제가 부착된 접합체 내에 포함되는 스캐폴드로 사용하기에 적합한 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그들의 접합된 관심 제제의 특정 세포 및 조직 유형으로의 선택적 전달에 적합한 접합체에 관한 것으로 여기서 상기 제제는 치료제 또는 영상화제일 수 있다. 본 발명은 또한 이러한 접합체를 포함하는 나노입자 및 그의 치료 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/6845 (2013.01)

(71) 출원인

**콘소르시오 센트로 데 인베스티카시온 바이오메디카
엔 레드**

스페인 28029 마드리드 칼레 몬포르테 데 레모스
누메로 5

**퐁다시오 인스티튜트 드 레세르카 드 로' 스피탈
드 라 산타 크루 아이 상 파우**

스페인 이-08025 바르셀로나 167 산트 안토니 마리아
클라렛

(72) 발명자

세르나 로메로, 나로아

스페인, 세르단올라 델 발레스, 에스/엔 08193 벨
라테라, 캠퍼스 데 라 유에이비, 유니버시티타트 아
우토노마 데 바르셀로나 아이비비

세다노 로드리구에즈, 주안

스페인, 세르단올라 델 발레스, 에스/엔 08193 벨
라테라, 캠퍼스 데 라 유에이비, 유니버시티타트 아
우토노마 데 바르셀로나 아이비비

카노 갈리도, 올리비아

스페인 바르셀로나, 세르단올라 델 발레스, 에스/
엔 캠퍼스 데 라 유에이비 08193 벨라테라, 에디피
시오 유레카 아베니다 데 칸 도메네크,
나노리젠트, 에스엘.

운주에타 에를자, 우겔즈

스페인, 바르셀로나, 167 08025, 안토니 마리아 클
라렛, 호스피탈 데 라 산단 크레우 이 산트 파우

만구에스 바팔루이, 라몬

스페인, 바르셀로나, 167 08025, 안토니 마리아 클
라렛, 호스피탈 데 라 산단 크레우 이 산트 파우

아라모 발가스, 패트리시아 빌지니아

스페인, 파멜론 11 28029 마드리드, 3-5 몬포르테
데 레모스, 콘소르시오 센트로 데 인베스티카시온
바이오메디카 엔 레드

팔라데 모리스트, 에로이

스페인, 바르셀로나, 칼렐 데 라 빈야 08193 벨라
테라, 팔크 데 레셀카 유에이비 (모듈비), 유니버
시티타트 아우토노마 데 바르셀로나 그룹 데 나노테
크노로지아 아이비비

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 폴리펩티드:

(i) A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 및 K 로 지정된 11개의 베타 가닥 도메인 및

(ii) AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프로 지정된 10개의 루프 영역, 여기서, 각 루프 영역은 2 개의 연속적인 베타 가닥 도메인 각각에 연결됨;

여기서 상기 루프 영역 중 적어도 하나는 서열번호:62의 동족 루프 영역의 변이체이고, 여기서 서열번호 62의 상기 동족 루프 영역은 서열번호 1 (루프 영역 AB), 서열번호 2 (루프 영역 BC), 서열번호 3 (루프 영역 CD), 서열번호 4 (루프 영역 DE), 서열번호 5 (루프 영역 EF), 서열번호 6 (루프 영역 FG), 서열번호 62 (루프 영역 GH)의 아미노산 149 내지 150, 서열번호 7 (루프 영역 HI), 서열번호 8 (루프 영역 IJ) 및 서열번호 9 (루프 영역 JK)에 정의된 바와 같고

그리고

여기서 적어도 하나의 베타 가닥 도메인은 서열번호 62의 동족 베타 가닥의 변이체이고 여기서 적어도 하나의 베타 가닥은 서열 번호 62의 동족 베타 가닥의 변이체이고 상기 동족 베타 가닥 도메인과 적어도 50%의 서열 동일성을 가지고,

여기서 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 9 (베타 가닥 도메인 A), 서열번호 11 (베타 가닥 도메인 B), 서열번호 12 (베타 가닥 도메인 C), 서열번호 13 (베타 가닥 도메인 D), 서열번호 14 (베타 가닥 도메인 E), 서열번호 15 (베타 가닥 도메인 F), 서열번호 16 (베타 가닥 도메인 G), 서열번호 17 (베타 가닥 도메인 H), 서열번호 18 (베타 가닥 도메인 I), 서열번호 19 (베타 가닥 도메인 J) 및 서열번호 20 (베타 가닥 도메인 K)에 정의된 바와 같음.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 루프 영역의 적어도 하나의 변이체가 동족 루프 영역의 서열에서 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가에 의한 돌연변이로부터 발생하는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

측면 1 또는 2에 있어서, 하나 이상의 베타 가닥에 돌연변이를 포함하고, 여기서 상기 돌연변이는 서열번호 11에 정의된 바와 같은 베타 가닥 B의 위치 9, 서열번호 12에 정의된 바와 같은 베타 가닥 C의 위치 1. 서열번호 19에서 정의된 바와 같은 베타 가닥 J의 위치 10 또는 서열번호 20에 정의된 바와 같은 베타 가닥 K의 위치 3에 위치하는 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이는 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 640, 641, 469 및/또는 518에 위치하고 여기서 숫자는 2009년 7월 7일자 Uniprot 데이터베이스 버전에서 수탁 번호 P14543-1의 단백질 서열에 정의된 바와 같은 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열번호 62의 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 641, 469 및/또는 518에서 하나 이상의 돌연변이는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E, V619T, V619T, C618S, V580T, I604T, V640Y, L641T, S469I 및 R518I 인 폴리펩티드.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 하나 이상의 돌연변이가 표 1에 정의된 바와 같은 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 복수의 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리로서, 복수의 폴리펩티드는 하나 이상의 루프 영역에서 서열이 상이한 폴리펩티드에 의해 형성되는 것인 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 라이브러리에서, 표현형인 각 폴리펩티드는 상기 표현형에 해당하는 유전자형인 핵산에 직접적으로 또는 간접적으로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 제7항 또는 제8항에 따른 디스플레이 라이브러리의 복수의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 집합체.

청구항 10

제9항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 11

제9항에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 제10항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 12

다음을 포함하는 집합체.

- (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적 등가인 변이체를 포함하는 제 1 폴리펩티드 영역 및
- (ii) 관심 제제

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 니도겐-1의 G2 도메인의 기능적으로 등가인 변이체인 집합체.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 폴리펩티드 영역은 2009년 7월 7일자 버전에서 수탁 번호 P14543-1을 갖는 UniProt 데이터베이스에 정의된 인간 니도겐-1의 서열에 대하여 아미노산 430 내지 667을 포함하는 집합체.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 니도겐-1의 도메인 G2의 기능적으로 등가인 변이체이고, 여기서 돌연변이는 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 640, 641, 469 및/또는 518 위치하고 여기서 상기 숫자는 2009년 7월 7일자 Uniprot 데이터베이스 버전에서 수탁 번호가 P14543-1인 단백질 서열에서 정의된 바와 같은 집합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 서열번호 62의 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 641, 469 및/또는 518에서 하나 이상의 돌연변이는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E, V619T, V619T, C618S, V580T, I604T, V640Y, L641T, S469I 및 R518I 인 집합체.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 하나 이상의 돌연변이는 표 1에 정의된 바와 같은 집합체.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 19

제18항에 있어서, 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역이 다중양이온성 펩티드인 접합체.

청구항 20

제19항에 있어서, 다중양이온성 펩티드가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 접합체.

- (i) 세포 표면 상의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고 상기 세포 상의 접합체의 내재화를 촉진할 수 있는 서열,
- (ii) 아르기닌-풍부 서열,
- (iii) GWH1 펩티드,
- (iv) CD44 리간드,
- (v) 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드,
- (vi) 세포 투과 펩티드 및
- (vii) 뉴클레올린-결합 펩티드.

청구항 21

제20항에 있어서, 다중양이온성 펩티드는 세포 표면 상의 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있고 상기 세포 상의 접합체의 내재화를 촉진할 수 있는 서열을 포함하고, 상기 서열은 CXCR4 리간드인 접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, CXCR4 리간드는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12(서열번호 27) 펩티드, vCCL2(서열번호:28), EPI-X4 서열(서열번호 29)를 포함하는 펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 펩티드 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, CXCR4 리간드의 N- 또는 C-말단, 바람직하게는 CXCR4 리간드의 C-말단에 위치한 양전하 펩티드 서열, 바람직하게는 RKRKRK(서열번호 77)를 포함하는 접합체.

청구항 24

제23항에 있어서, CXCR4 리간드는 EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 접합체.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 다중양이온성 펩티드는 RRRRRRRRRR(서열번호 30), RRRGRGRRR(서열번호 31), RARGRGRRR(서열번호 32), 및 RARGRGGA(서열번호 33)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 아르기닌-풍부 서열인 것을 특징으로 하는 접합체.

청구항 26

제20항에 있어서, 다중양이온성 펩티드가 CD44 리간드 A5G27(서열번호 34) 또는 FNI/II/V(서열번호 35)인 접합체.

청구항 27

제20항에 있어서, 상기 다중양이온성 펩티드는 Seq-1-7(서열번호 36), Seq-1-8(서열번호 37), Angiopep-2-7(서

열번호 38)로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드인 것을 특징으로 하는 집합체.

청구항 28

제12항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역을 추가로 포함하는 집합체.

청구항 29

제28항에 있어서, 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리히스티딘 영역인 집합체.

청구항 30

제29항에 있어서, 폴리히스티딘 영역은 2 내지 10개의 인접 히스티딘 잔기를 포함하는 집합체.

청구항 31

제12항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 다중양이온성 펩티드는 N-말단에 위치하고 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 C-말단에 위치하거나 또는 양전하 아미노산-풍부 영역은 N-말단에 위치하며 상기 다중양이온성 펩티드는 폴리펩티드의 C-말단에 위치하는 것을 특징으로 하는 집합체.

청구항 32

제12항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 제제가 치료제 또는 영상화제인 집합체.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 집합체:

- (i) 화학요법제,
- (ii) 세포독성 폴리펩티드,
- (iii) 항혈관신생 폴리펩티드,
- (iv) 종양 억제제 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드,
- (v) 세포사멸사 유도 폴리펩티드,
- (vi) 항-전이 활성을 갖는 폴리펩티드,
- (vii) 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및
- (viii) 항혈관신생 분자.
- (ix) 독소

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 폴리펩티드가 복수의 치료제에 접합되고, 여기서 상기 복수의 치료제가 동일하거나 상이한 집합체.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 치료제가 화학요법제인 집합체.

청구항 36

제35항에 있어서, 화학요법제가 항대사물질인 집합체.

청구항 37

제36항에 있어서, 항대사물질이 피리미딘 유사체 또는 그의 올리고머 형태인 집합체.

청구항 38

제37항에 있어서, 피리미딘 유사체가 폴록수리딘 또는 그의 오랑체 형태인 접합체.

청구항 39

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리펩티드 영역이 제1 펩티드 링커를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결되고 및/또는 제1 폴리펩티드 영역이 제2 펩티드 링커를 통해 제3 폴리펩티드 영역에 연결된 접합체.

청구항 40

하기를 포함하는 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 제조 방법:

- (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계, 및
- (ii) 상기 폴리펩티드를 상기 폴리펩티드 내의 적어도 하나의 기와 반응할 수 있는 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 접촉은 관심 제제의 반응성 기와 폴리펩티드의 기 사이의 결합 형성을 위한 적합한 조건 하에 수행되는 단계.

청구항 41

제40항에 있어서, 관심 제제의 활성화된 형태가 상기 폴리펩티드의 측쇄 중 적어도 하나와 반응하는 기를 함유하는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 폴리펩티드 영역의 측쇄 중 적어도 하나와 반응하는 기가 티올기, 아미노기 또는 카르복실산 기인 방법.

청구항 43

하기를 포함하는 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 제조방법:

- (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계로, 여기서 상기 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고,
- (ii) 상기 폴리펩티드를 폴리펩티드 내의 반응성 기와 반응할 수 있는 관심 제제와 접촉시키는 단계로서, 상기 접촉은 폴리펩티드 내의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합 형성을 위한 적합한 조건 하에 수행됨.

청구항 44

다음을 포함하는 폴리펩티드:

- (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 제1 영역 및
- (ii) 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 제2 영역.

청구항 45

제44항에 있어서, 제1 영역은 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 니도젠-1의 G2 도메인의 기능적으로 등가인 변이체인 폴리펩티드.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 제1 영역이 2009년 7월 7일자 버전에서 수탁 번호 P14543-1로 UniProt 데이터베이스에 정의된 인간 니도젠-1의 서열에 대하여 아미노산 430 내지 667을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 47

제44항 또는 제45항에 있어서, 폴리펩티드가 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 니도젠-1의 도메인 G2의 기능적

으로 등가인 변이체이고, 여기서 상기 돌연변이는 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 640, 641, 469 및/또는 518 에 위치하고 여기서 숫자들은 2009년 7월 7일자 버전 UniProt 데이터베이스에 수탁번호 P14543-1를 갖는 단백질 서열에 정의된 바와 같은 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 48

제47항에 있어서, 서열번호 62의 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 580, 604, 638, 641, 469 및/또는 518에서의 하나 이상의 돌연변이는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E, V619T, V619T, C618S, V580T, I604T, V640Y, L641T, S469I 및 R518I 인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 하나 이상의 돌연변이는 표 1에 정의된 바와 같은 폴리펩티드.

청구항 50

제44항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 영역은 EPI-X4 서열(서열 번호 29) 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 51

제50항에 있어서, 제2 영역은 양전하 아미노산 영역을 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 52

제51항에 있어서, 제2 영역의 아미노산의 적어도 50%는 양전하 아미노산인 폴리펩티드.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 양전하 아미노산 영역이 RKRKRK 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 54

제44항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 영역이 N-말단에 위치하고 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 C-말단에 위치하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 55

제44항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역을 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 56

제55항에 있어서, 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리히스티딘 영역인 폴리펩티드.

청구항 57

제56항에 있어서, 폴리히스티딘 영역이 2 내지 10개의 인접한 히스티딘 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 영역이 N-말단에 위치하고 제3 영역이 폴리펩티드의 C-말단에 위치하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 59

제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자 제조방법으로서, 상기 방법은 상기 폴리펩티드의 제조물을 폴리펩티드의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 두는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

다음으로부터 선택되는 제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 다중 카피 또는 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자의 제조방법:

(i) 상기 접합체 또는 상기 폴리펩티드의 제조물을 상기 접합체 또는 상기 폴리펩티드의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 두는 단계를 포함하는 방법 또는

(ii) 다음을 포함하는 방법

i. 각각 다음을 포함하는 복수의 폴리펩티드를 배치하는 단계

1. 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,
2. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및
3. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,

여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고, 상기 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태가 반응성 기를 함유하고, 여기서 상기 배치하는 상기 폴리펩티드의 복수의 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행되고, 및

ii. 단계 i에서 수득된 나노입자를 폴리펩티드 내 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합의 형성에 적합한 조건 하에 수행됨.

청구항 61

제60항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드 영역이 제13항 내지 제31항 또는 제45항 내지 제58항 중 어느 한 항의 접합체에서 정의된 바와 같은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제1 유형의 접합체의 다중 카피 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자의 제조방법으로서, 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고, 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 다중양이온성 펩티드의 서열이 상이하며, 상기 방법은 다음으로부터 선택됨

(i) 상기 제1 유형의 접합체 제조물을, 2가지 유형의 접합체의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건 하에서, 상기 제2 유형의 접합체 제조물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법 또는

(ii) 다음을 포함하는 방법

i. 제1 폴리펩티드 제조물을 제2 폴리펩티드 제조물과 접촉시키는 단계로 여기서 제1 및 제2 유형의 폴리펩티드는 다음을 포함함

- a. 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,
- b. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및/또는 그의 N- 또는 C-말단에 위치한 추가의 양전하 펩티드 서열을 포함하며 하나의 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열은 나머지 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하고,
- c. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,
- d. 선택적으로, 다중양이온성 펩티드의 N- 또는 C-말단에 위치한 양전하 펩티드 서열,

여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고,

여기서 제1 및 제2 폴리펩티드는 그들의 다중양이온성 펩티드가 상이하고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 제28항 내지 제39항에 정의된 접합체와 같고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 상기 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태는 반응성 기를 함유하고, 여기서 상기 배치는 폴리펩티드의 복수의 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하

에 수행되고,

ii. 단계 i에서 수득한 나노입자를 각 폴리펩티드의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합 형성에 적합한 조건 하에 수행됨.

청구항 63

제62항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드 영역은 제13항 내지 제31항 중 어느 한 항의 접합체에서 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 64

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 접합체의 다중 카피 및 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 바이오파라토픽 나노입자의 제조 방법으로서, 여기서 제1 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 적어도 하나의 폴리펩티드의 제 2 영역의 서열과 상이하며, 상기 방법은 다음으로부터 선택됨:

(i) 상기 적어도 하나의 접합체의 다중 카피 및 상기 적어도 하나의 폴리펩티드의 다중 카피의 제조물을 상기 2 개의 접합체의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 배치하는 것을 포함하는 방법 또는

(ii) 다음을 포함하는 방법

i. 제1 폴리펩티드 제조물을 제2 폴리펩티드 제조물과 접촉시키는 단계로 여기서 제1 및 제2 유형의 폴리펩티드는 다음을 포함함

a. 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,

b. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및/또는 N- 또는 C-말단에 위치한 추가의 양전하 펩티드 서열 및 다중양이온성 서열을 포함하고 하나의 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열은 나머지 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하며,

c. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,

여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고,

여기서 제1 폴리펩티드는 제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 정의된 접합체와 같고, 제2 폴리펩티드는 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고, 여기서 제1 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 제2 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드와 상이하고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태는 반응성 기를 함유하고, 상기 배치는 폴리펩티드의 복수의 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행됨

ii. 단계 i에서 수득한 나노입자를 각 폴리펩티드의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합 형성에 적절한 조건 하에 수행됨.

청구항 65

제64항에 있어서, 여기서 대안(i)의 접합체 및 폴리펩티드 또는 대안(ii)의 제1 및 제2 폴리펩티드의 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드 영역은 제13항 내지 제31항 또는 44-58 중 어느 한 항의 접합체에서 정의된 바와 같은 것인 방법.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 대안(i)에서의 접합체 또는 대안(ii)에서의 제1 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12(서열번호 27) 펩티드, vCCL2(서열번호 28) 및 그의 기능적으로 등가인 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 대안(i)에서의 접합체 또는 대안(ii)에서의 제1 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 서열 RRWCYRKCYKGICYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12(서열번호 27) 펩티드, vCCL2(서열번호 28) 및 그의 기능적으로 등가인 변이체로부터 선택되고 바람직하게는 RRWCYRKCYKGICYRKCR(서열번호 25)이고, 대안(i)에서의 폴리펩티드 또는 대안(ii)에서의 제2 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, EPI-X4 서열(서열번호 29)이 RKRRKK(서열번호 77) 서열에 연결된 것인 방법.

청구항 69

제59항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드의 복수의 카피의 나노입자로서의 조립에 적절한 조건은 저염 버퍼에서의 배양을 포함하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 저염 버퍼는 탄산염 버퍼, 시트르산염 버퍼, 아세트산염 버퍼, 트리스 버퍼 및 인산염 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 버퍼의 pH는 pH 4 내지 pH 8, 바람직하게는 pH 5 내지 pH 7.5, 더욱 바람직하게는 약 pH 5.3, pH 6.5 또는 pH 7.2인 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 시트르산염 버퍼, 아세트산염 버퍼 및/또는 인산염 버퍼는 폴리소르베이트 80 및/또는 수크로스를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 수크로스가 20 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도에서 발견되는 것인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 수크로스가 50 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 70 mg/ml의 농도에서 발견되는 것인 방법.

청구항 75

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시트르산염 버퍼가 폴리소르베이트 80(0.4 mg/ml), 수크로스(80 mg/ml), 시트르산나트륨 2-수화물(2.7 mg/ml) 및 시트르산 무수물(0.146 mg/ml)를 포함하고 약 6.5의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아세트산염 버퍼가 수크로스(70mg/ml), 빙초산(0.12mg/ml), 아세트산나트륨 3-수화물(2.45mg/ml)을 포함하고 약 5.3의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 77

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 인산염 버퍼가 폴리소르베이트 80(0.05 mg/ml), 수크로스(50 mg/ml), 인산나트륨 1염기성 1-수화물(0.22 mg/ml), 인산나트륨 이염기 무수물(0.49 mg/ml)을 포함하고 약 7.2의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 78

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 다중 카피, 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자 또는 제59항 내지 제77항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된 나노입자.

청구항 79

제1 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자로서, 상기 제1 및 제2 유형의 접합체 모두는 제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고, 또는 제55항 내지 제58항에서 정의된 폴리펩티드와 같고, 제1 및 제2 유형의 접합체는 제62항 내지 제77항에 따른 방법에 의해 수득된 다중양이온성 펩티드 또는 바이파라토픽 나노입자와 상이한 것을 특징으로 하는 바이파라토픽 나노입자.

청구항 80

제79항에 있어서, 제1 유형의 접합체 및 제2 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이고, 바람직하게는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12 펩티드(서열번호 27), vCCL2 펩티드(서열번호:28), EPI-X4 서열(서열번호:29) 및 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 바이파라토픽 나노입자.

청구항 81

제80항에 있어서, 제1 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR을 포함하는 펩티드로 이루어지고, 여기서 제2 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 EPI-X4 서열(서열번호 29)인 바이파라토픽 나노입자.

청구항 82

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체의 다중 카피 및 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자로서, 여기서 상기 접합체의 다중양이온성 영역은 상기 폴리펩티드의 제 1 영역과 상이하며, 또는 제62항 내지 제77항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된 바이파라토픽 나노입자.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 접합체의 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이고, 바람직하게는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26) CXCL12 펩티드(서열번호 27) 및 vCCL2 펩티드(서열번호 28)를 포함하는 펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이파라토픽 나노입자.

청구항 84

제83항에 있어서, 길항 CXCR4 리간드가 EPI-X4 서열(서열번호 29)인 바이파라토픽 나노입자.

청구항 85

제78항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 직경이 1 내지 100 nm인 나노입자.

청구항 86

의약에 사용하기 위한, 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체, 제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제78항 내지 제85항에 따른 나노입자.

청구항 87

암 치료에 사용하기 위한 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체, 제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제78항 내지 제85항에 따른 나노입자로서, 여기서 상기 접합체/들 또는 폴리펩티드/들은 세포 표면 상의 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있고 상기 세포 상의 접합체 또는 나노입자의 내재화를 촉진할 수 있는 서열을 포함하고, 여기서 상기 세포는 암에 존재하는 종양 세포인 것을 특징으로 함.

청구항 88

제87항에 있어서, 나노입자를 형성하는 접합체 또는 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이고, 상기 암은 CXCR4를 발현하거나 과발현하는 암세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 접합체, 폴리펩티드 또는 나노입자.

청구항 89

제88항에 있어서, CXCR4 리간드가 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26) 및 CXCL12 펩티드(서열번호 27), vCCL2 펩티드(서열번호 28), EPI-X4 서열(서열번호 29)를 포함하는 펩티드로 이루어진 군 으로부터 선택되는 접합체 또는 나노입자.

청구항 90

제89항에 있어서, CXCR4 리간드가 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25)을 갖는 펩티드인 것을 특징으로 하는 접합체 또는 나노입자.

청구항 91

제90항에 있어서, CXCR4 리간드가 EPI-X4 펩티드(서열번호 29)인 접합체 또는 나노입자.

청구항 92

제86항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자는 제79항 내지 제85항 중 어느 한 항에 정의된 바 와 같은 바이파라토픽 나노입자인 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 93

제88항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, CXCR4를 발현하거나 과발현하는 암 세포는 전이성 줄기 세포인 것 을 특징으로 하는 접합체, 폴리펩티드 또는 나노입자.

청구항 94

제87항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 췌장암 또는 결장직장암인 것을 특징으로 하는 접합체, 폴리펩티드 또는 나노입자.

청구항 95

제87항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 원발성 종양 또는 전이인 것을 특징으로 하는 접합체, 폴리펩티드 또는 나노입자.

청구항 96

다음을 포함하는, 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항의 접합체, 제44항 내지 제58항 중 어느 한 항의 폴리펩티 드 또는 제78항 내지 제85항의 나노입자의 하나 이상의 성분에 대한 특이적 결합 부위를 포함하는 표적 세포의 영상화 방법:

(i) 상기 세포를 함유하는 샘플을 제12항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 접합체, 제44항 내지 제58항 중 어 느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 제78항 내지 제85항에 따른 나노입자와 상기 접합체, 폴리펩티드 또는 나노 입자가 세포에 결합하기에 적절한 조건 하에 접촉시키는 단계, 그리고 여기서 상기 관심 제제는 영상화제이고, 및

(ii) 상기 영상화제에 의해 제공된 신호를 검출함으로써 세포를 영상화하는 단계.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 세포는 CXCR4를 발현하거나 과발현하고, 접합체 또는 나노입자의 하나 이상의 성분은 다 중양이온성 펩티드이고 상기 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드인 방법.

청구항 98

다음을 포함하는 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드를 확인하는 방법:

i) 폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 하는 조건 하에 표적 펩티드를 제7항 또는 제8항에 따른 폴리펩 티드 디스플레이 라이브러리와 접촉시키는 단계,

ii) 표적 펩티드와 특이적으로 상호작용한 라이브러리의 구성원을 회수하는 단계, 및

iii) 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 단계.

청구항 99

제98항에 있어서, 단계 i) -ii)가 1회 이상 반복되고, 각 반복에서 단계 i)에서 사용된 폴리펩티드 라이브러리는 단계 (ii)에서 회수된 라이브러리의 구성원에 의해 형성되는 것인 방법.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 상기 표적 펩티드는 고체 지지체에 고정화된 것인 방법.

청구항 101

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 용도로서, 상기 펩티드는 상기 루프 영역 중 하나에서 발견되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 102

다음을 포함하는, 샘플에서 표적 펩티드의 존재를 결정하는 방법:

i) 샘플에 존재하는 단백질을 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드와 접촉시키는 단계로서, 상기 폴리펩티드 내의 루프 영역 중 적어도 하나의 서열은 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 서열이고,

ii) 표적 펩티드와 폴리펩티드 사이에 상호작용이 있는지 여부를 결정하는 단계,

여기서 상기 폴리펩티드와 표적 펩티드 사이에 상호작용이 있는 경우라면, 표적 펩티드는 샘플에 존재함

청구항 103

제102항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 고체 지지체에 고정화된 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노구조 단백질 재료 분야, 보다 구체적으로는 치료에 사용될 수 있는 치료제-운반 폴리펩티드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 나노접합체 형태의 약물의 전신 투여는 유리 분자와 비교할 때 약물 안정성이 향상된다는 이점이 있다. 세포 표적화와 같은 가치 있는 추가 특성은 나노 재료의 높은 표면/부피 비율로부터 이익을 얻는, 나노스케일 비히클의 작용기들의 화학적 통합을 통해 주어진 하이브리드 복합체에 병합될 수도 있다. 전신적으로 투여될 때, 생성된 약물 로딩된 접합체는 8 내지 100 nm 크기로 페 또는 기타 고도로 혈관화된 기관에서 응집이 없는 경우 신장 여과로부터 벗어난다. 이 사실은 재료의 적절한 물리화학적 특성과 결합하여 순환 시간을 연장하고 표적 기관에 약물을 장기간 노출시켜, 환자에 대한 치료 영향과 이점을 향상시킬 수 있다.

[0003] 금속, 세라믹, 폴리머 및 탄소 나노튜브를 포함하여 약물 캐리어로 조사 중인 다양한 재료 중에서, 단백질은 생체 적합성 및 분해성과 관련하여 고유한 특성을 제공하여, 나노독성학적 문제가 증가하는 맥락에서 특히 매력적이다. 단백질 자가조립을 나노구조 재료로 만드는 공학이 빠르게 진행되고 최종 기하구조 및 물리화학적 특성에 대한 제어가 더욱 엄격해짐에 따라, 단백질 재료는 화학적으로 결합된 약물들로부터의 비히클로서 기능적 및 구조적 다양성을 얻고 있다.

[0004] 실제로, 항체-약물 접합체(ADC)를 형성하기 위해 항체에 세포독성 '페이로드'를 부착하는 것은 암 선택적인 세포 표면 분자에 항체의 특이적 결합을 통해 세포독성제를 암세포에 선택적으로 전달하는 메커니즘을 제공하는 것으로 나타났다. 이 전략의 여러 예는 급성 골수성 백혈병에 사용된, 매우 강력한 DNA-표적 항생제인 칼리케아미신에 접합된 항-CD33 항체를 포함하는 겔투주맙 오조가마이신(gemtuzumab ozogamicin)과 같이 효과적인 것으로 입증되었다. 또한, 매우 강력한 미세소관 교란제인 메이트탄시노이드가 ADCs의 페이로드로 테스트되어, HER2-양성 유방암 치료를 위한 아도-트라스투주맙 엠탄신(ado-trastuzumab emtansine) 제제가 생성되었다.

[0005] 그럼에도 불구하고, 항체의 구조적 복잡성은 비용 및 합성 측면에서 번거로운 장애가 될 수 있다. 본 발명자들은 이전에 코어 단백질에 양이온성 N-말단 도메인과 C-말단 폴리-히스티딘의 첨가에 기반한 나노구조적 원리를 적용함으로써 나노의학 분야를 조사하였다. [Serna, N. et al. 2016. *Nanomedicine*, 12:1241-51] 이러한 말단 태그 및 전체 융합에서 생성된 전하 균형이 혈장에서 안정한 견고한 토로이드 나노입자로서 단량체 단백질의 자가 조립 및 올리고머화를 촉진하고[Cespedes, M. V. et al. 2014. *ACS Nano.*, 8:4166-4176] 세포 표적화 펩티드로 강화된 경우 높은 세포 투과성을 갖는다는 것이 당업계에 설명되어 있다[Xu, Z.K. et al. 2015. *재료편지*, 154:140-3] 이러한 단백질 구조의 빌딩 블록은 또한 세포 표적화제, 엔도솜 용해제 또는 핵 국소화 신호와 같은 기능적 펩티드를 모듈식 조직과 융합된 스트레치 형태로 포함할 수 있다.

[0006] 현재의 치료 방법은 대부분 화학요법에 가장 내성이 있는 세포의 종양 내 클론 선택으로 인해 발생할 수 있는 종양 내성 현상으로 인해, 여전히 실패의 한계를 보여주기 때문에, 예를 들어, 치료제의 부작용 및 표적외 효과를 감소시키면서 치료 실패 및 종양 진행을 담당하는 구체적인 종양 세포를 표적화할 수 있는 보다 구체적인 치료 접근법의 개발이 여전히 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0007] 제1 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다:

[0008] (i) A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 및 K로 지정된 11개의 베타 가닥 도메인 및

[0009] (ii) AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프로 지정된 10개의 루프 영역으로 여기서 각 루프 영역은 각각 2개의 연속적 베타 가닥 도메인을 연결하고

[0010] 여기서 상기 루프 영역의 적어도 하나는 서열번호:62의 동족 루프 영역의 변이체이고 서열번호:62의 동족 루프 영역은 서열번호:1 (루프 영역 AB), 서열번호:2 (루프 영역 BC), 서열번호:3 (루프 영역 CD), 서열번호:4 (루프 영역 DE), 서열번호:5 (루프 영역 EF), 서열번호:6 (루프 영역 FG), 서열번호:62의 아미노산 149 내지 150 (루프 영역 GH), 서열번호:7 (루프 영역 HI), 서열번호:8 (루프 영역 IJ) and 서열번호:9 (루프 영역 JK)에 정의된 바와 같고, 그리고

[0011] 여기서 베타 가닥 도메인의 적어도 하나는 서열번호:62의 동족 베타 가닥의 변이체이고 상기 동족 베타 가닥 도메인과 적어도 50% 서열 동일성을 가지며, 여기서 서열번호:62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 9 (베타 가닥 도메인 A), 서열번호 11 (베타 가닥 도메인 B), 서열번호 12 (베타 가닥 도메인 C), 서열번호 13 (베타 가닥 도메인 D), 서열번호 14 (베타 가닥 도메인 E), 서열번호 15 (베타 가닥 도메인 F), 서열번호 16 (베타 가닥 도메인 G), 서열번호 17 (베타 가닥 도메인 H), 서열번호 18 (베타 가닥 도메인 I), 서열번호 19 (베타 가닥 도메인 J) 및 서열번호 20 (베타 가닥 도메인 K)에 정의된 바와 같다.

[0012] 제 2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제 1 측면에 따른 복수의 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리에 관한 것이고 여기서 상기 복수의 폴리펩티드는 하나 이상의 루프 영역의 서열과 상이한 폴리펩티드들에 의해 형성된다.

[0013] 제 3 측면에서, 본 발명은 상기 발명의 제 1 측면에 따른 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 발명의 제 2 측면에 따른 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0014] 제 4 측면에서, 본 발명은 상기 발명의 제 3 측면에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0015] 제 5 측면에서, 본 발명은 상기 발명의 제 3 측면에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 발명의 제 4 측면에 따른 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0016] 제 6 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 집합체에 관한 것이다:

[0017] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적 등가인 변이체를 포함하는 제 1 폴리펩티드 영역 및

[0018] (ii) 관심 제제

[0019] 제 7 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 집합체의 제조방법에 관한 것이다:

[0020] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 집합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계로, 상기 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 그리고

[0021] (ii) 상기 폴리펩티드를 상기 폴리펩티드 내의 반응 기와 반응할 수 있는 관심 제제와 접촉시키는 단계로서, 여

기서 상기 접촉은 상기 폴리펩티드 내 반응성 기와 관심 제제 내 상기 기 사이의 결합 형성을 위한 적합한 조건 하에 수행되는 단계.

- [0022] 제 8 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다:
- [0023] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 제1 영역 및
- [0024] (ii) 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 제2 영역.
- [0025] 제 9 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 제조방법에 관한 것이다:
- [0026] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계 및
- [0027] (ii) 상기 폴리펩티드를 상기 폴리펩티드 내 적어도 하나의 기와 반응할 수 있는 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계 그리고 상기 접촉은 관심 제제 내 반응성 기와 폴리펩티드 내 상기 기 사이의 결합의 형성에 적합한 조건 하에서 수행됨
- [0028] 제 10 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0029] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계이고 여기서 상기 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되며
- [0030] (ii) 상기 폴리펩티드를 상기 폴리펩티드 내 활성화 기와 반응할 수 있는 관심 제제와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 상기 폴리펩티드 내 반응성 기와 상기 관심 제제 내 상기 기 사이의 결합 형성을 위해 적절한 조건 하에서 수행됨
- [0031] 제 11 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 제 1 영역을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다:
- [0032] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체 및
- [0033] (ii) 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 제 2 영역.
- [0034] 제 12 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제 11 측면에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 폴리펩티드의 제조물을 상기 폴리펩티드의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 두는 단계를 포함한다.
- [0035] 제 13 측면에서, 본 발명은 다음으로부터 선택되는, 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 다중 카피 또는 본 발명의 제 11 측면에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자의 제조방법에 관한 것이다:
- [0036] (i) 상기 접합체 또는 상기 폴리펩티드의 제조물을 상기 접합체 또는 상기 폴리펩티드의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 두는 단계를 포함하는 방법 또는
- [0037] (ii) 다음을 포함하는 방법
- [0038] i. 다음을 포함하는 복수의 폴리펩티드를 각각 배치하는 단계
- [0039] 1. 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,
- [0040] 2. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및
- [0041] 3. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,
- [0042] 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고, 상기 폴리펩티드가 활성화된 형태로 제공되고, 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태가 반응성 기를 함유하고, 여기서 상기 배치가 복수의 폴리펩티드 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행되고 그리고
- [0043] ii. 단계 i에서 수득된 나노입자를 폴리펩티드의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 상기 기 사이의 결합의 형성에 적합한 조건 하에 수행됨.
- [0044] 제 14 측면에 있어서, 본 발명은 제1 유형의 접합체의 다중 카피 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에 관한 것으로, 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 본 발명의 제 6 측면에

서 정의된 바와 같고, 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하며, 상기 방법은 다음으로부터 선택되며,

(i) 상기 제1 유형의 접합체 제조물을 2가지 유형의 접합체의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건 하에 상기 제2 유형의 접합체 제조물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법 또는

(ii) 다음을 포함하는 방법

i. 제1 폴리펩티드 제조물을 제2 폴리펩티드 제조물과 접촉시키는 단계로 여기서 제1 및 제2 유형의 폴리펩티드는 다음을 포함함

a. 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,

b. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및/또는 N- 또는 C-말단에 위치한 추가의 양전하 펩티드 서열 및 다중양이온성 서열을 포함하며 하나의 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 나머지 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이함

c. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,

d. 선택적으로, 다중양이온성 펩티드의 N- 또는 C-말단에 위치한 양전하 펩티드 서열,

여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고,

여기서 제1 및 제2 폴리펩티드는 그들의 다중양이온성 펩티드가 상이하고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 본 발명의 제 6 측면에서 정의된 접합체와 같고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 상기 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태는 반응성기를 함유하고, 여기서 상기 배치는 복수의 폴리펩티드 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행되고,

ii. 단계 i에서 얻은 나노입자를 각 폴리펩티드의 반응성기와 반응할 수 있는기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 상기 폴리펩티드의 반응성기와 상기 관심 제제의 기 사이의 결합 형성에 적합한 조건 하에 수행됨

제 15 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제 6 측면에 따른 적어도 하나의 접합체의 다중 카피 및 본 발명의 제 11 측면에 따른 적어도 하나의 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에 관한 것으로, 여기서 제1 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 적어도 하나의 폴리펩티드의 제 2 영역의 서열과 상이하며, 상기 방법은 다음으로부터 선택됨:

(i) 상기 적어도 하나의 접합체의 다중 카피 및 상기 적어도 하나의 폴리펩티드의 다중 카피의 제조물을 상기 2개의 접합체의 복수의 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 두는 것을 포함하는 방법 또는

(ii) 다음을 포함하는 방법

i. 제1 폴리펩티드 제조물을 제2 폴리펩티드 제조물과 접촉시키는 단계로 여기서 제1 및 제2 유형의 폴리펩티드는 다음을 포함함

a. 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,

b. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및/또는 N- 또는 C-말단에 위치한 추가의 양전하 펩티드 서열 및 다중양이온성 서열을 포함하고 하나의 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드가 나머지 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하며

c. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,

여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고,

여기서 제1 폴리펩티드는 본 발명의 제 6 측면에서 정의된 접합체와 같고, 제2 폴리펩티드는 본 발명의 제 11 측면에서 정의된 바와 같고,

여기서 제1 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드는 제2 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드와 상이하고,

여기서 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 여기서 상기 폴리펩티드의 상기 활성화된 형

태는 반응성 기를 함유하고, 상기 배치는 폴리펩티드의 복수의 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행됨

- [0068] ii. 단계 i에서 얻은 나노입자를 각 폴리펩티드의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합 형성에 적절한 조건 하에 수행됨.
- [0069] 제 16 측면에서 본 발명은, 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 다중 카피, 본 발명의 제11 측면에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 나노입자 또는 본 발명의 제 12 측면 또는 제 13 측면에 따른 방법에 의해 수득된 나노입자에 관한 것이다.
- [0070] 제 17 측면에서, 본 발명은 제1 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자에 관한 것으로, 상기 제1 및 제2 유형의 접합체 모두는 본 발명의 제 6 측면에서 정의된 바와 같고, 또는 본 발명의 제 11 측면에서 정의된 폴리펩티드와 같고 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 본 발명의 제 14 측면 또는 제 15 측면에 따른 방법에 의해 수득된 다중양이온성 펩티드 또는 바이파라토픽 나노입자와 상이하다.
- [0071] 제 18 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체의 다중 카피 및 본 발명의 제 11 측면에 따른 폴리펩티드의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자에 관한 것으로, 여기서 상기 접합체의 다중양이온성 영역은 상기 폴리펩티드의 제 1 영역과 상이하고, 또는 본 발명의 제 14 또는 제 15 측면에 따른 방법에 의해 수득된 바이파라토픽 나노입자에 관한 것이다.
- [0072] 제 19 측면에서, 본 발명은 의약에 사용을 위한, 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체, 본 발명의 제11 측면에 따른 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 17 또는 제 18 측면에 따른 나노입자에 관한 것이다.
- [0073] 제 20 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체, 본 발명의 제 11 측면에 따른 폴리펩티드 또는 본 발명의 제 16, 제 17 또는 제 18 측면에 따른 나노입자의 하나 이상의 성분에 대한 특이적 결합 부위를 포함하는 표적 세포의 영상화 방법에 관한 것으로:
- [0074] (i) 상기 세포를 함유하는 샘플을 본 발명의 제 6 측면에 따른 접합체, 본 발명의 제 11 측면에 따른 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 16, 제 17, 또는 제 18 측면에 따른 나노입자와 상기 접합체, 폴리펩티드 또는 나노입자가 상기 세포에 결합하기에 적절한 조건 하에 접촉시키는 단계 및 여기서 상기 관심 제제는 영상화제이고, 및
- [0075] (ii) 영상화제에 의해 제공된 신호를 검출함으로써 세포를 영상화하는 단계.
- [0076] 제 21 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드를 확인하는 방법에 관한 것이다:
- [0077] i) 표적 펩티드를 폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 하는 조건 하에 본 발명의 제 2 측면에 따른 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리와 접촉시키는 단계,
- [0078] ii) 상기 표적 펩티드와 특이적으로 상호작용한 라이브러리의 구성원을 회수하는 단계, 및
- [0079] iii) 상기 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 단계
- [0080] 제 22 측면에서, 본 발명은 펩티드를 제시하기 위한 본 발명의 제 1 측면에 따른 폴리펩티드의 용도에 관한 것으로, 여기서 상기 펩티드는 루프 영역 중 하나에서 발견된다.
- [0081] 제 23 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 샘플에서 표적 펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다:
- [0082] i) 샘플에 존재하는 단백질을 본 발명의 제 1 측면에 따른 폴리펩티드와 접촉시키는 단계로서, 상기 폴리펩티드 내의 루프 영역 중 적어도 하나의 서열은 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 서열이고,
- [0083] ii) 표적 펩티드와 상기 폴리펩티드 사이에 상호작용이 있는지 여부를 결정하는 단계,
- [0084] 여기서 폴리펩티드와 표적 펩티드 사이에 상호작용이 있는 경우라면, 표적 펩티드는 샘플에 존재한다.

도면의 간단한 설명

- [0085] 도. 1은 Takagi J. 외.에 묘사된 인간 니도겐-1 단백질의 구조를 보여준다. (Nature 424, 969-974, 2003). G1, G2 및 G3은 세 가지 주요 구형 도메인을 나타낸다. EG는 EGF 모듈을 나타내고, TY는 티로글로불린 반복을 나타내고, LY는 LDL 수용체 YWTD 반복을 나타낸다.

도 2는 T22-STM-H6(A), T22-NID0mut2-H6(B) 및 T22-GFP-H6(C) 나노입자의 특성을 나타낸다. MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼은(상단), 항-His 모노클로날 항체를 사용한 웨스턴 블롯 면역검출은(inset), DLS에 의해 측정된 부피 크기 분포는 각 나노입자에 대해 표시된다(하단).

도 3은 T22-NID0mut2-H6 나노입자 특성화의 특성화를 나타낸다. A) SDS-PAGE 전기영동시 탄산염(-) 및 탄산염 + 염(+) 버퍼에서 T22-NID0mut2-H6 정제 피크 1(Pico1) 및 피크 2(Pico2)의 쿠마쎈-블루(Coomassie-blue) 염색. B) 항-His 모노클로날 항체에 의한 T22-NID0mut2-H6 단백질의 웨스턴 블롯 면역검출. C) DLS에 의해 결정된 T22-NID0mut2-H6 나노입자의 부피 크기 분포. D) T22-NID0mut2-H6 단백질의 MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼.

도 4는 T22-NID0mut2-H6 라벨링을 보여준다. A) 표시된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 단백질의 MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼. 30.3kDa 이상의 각 피크는 추가 ATTO 분자 통합에 해당한다. B) DLS에 의해 결정된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자의 부피 크기 분포.

도 5는 CXCR4+ 세포에서 T22-NID0mut2-H6 단백질의 CXCR4-특이적 내재화를 나타낸다. A) 다른 농도(1 nM 및 10 nM)에서 HeLa 세포(CXCR4+)를 통해 24시간 동안 배양시 표시된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자 내재화 및 경쟁(+AMD). CXCR4 수용체 길항제 AMD3100 (+AMD)의 존재 하에 세포 흡수 억제율(%)이 표시된다. B) 25nM의 T22-NID0mut2-H6-ATTO488의 존재하에 24시간 동안 배양된 HeLa 세포의 공초점 레이저 현미경 이미지. 세포 핵은 Hoechst로 염색하고, 세포막은 셀마스크(CellMask)로 염색하였으며, 세포 내부의 중단된 패턴(punctuated pattern)은 단백질 나노입자에 해당한다.

도 6은 올리고-FdU와 T22-NID0mut2-H6 나노입자 접합을 보여준다. A) 2단계 반응에서 6-말레이미도헥사노산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(EMCS) 이관능성 링커를 사용하는 단백질 리신 아민을 통한 티올 접합 올리고 5'-(FdU)5-헥사에틸렌글리콜티올-3'(올리고-FdU-SH)의 공유 결합의 도식적 표현. B) T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체의 MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼. C) DLS에 의해 결정된 T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체의 부피 크기 분포.

도 7은 CXCR4+ 세포에 대한 올리고-FdU 접합 나노입자의 세포독성을 나타낸다. 그래프는 25nM 또는 100nM의 T22-STM-H6-FdU, T22-NID0mut2-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 나노접합체의 두 가지 다른 스톡, 및 100nM의 유리 올리고-FdU(FdU)의 존재하에서 48시간 동안 배양시 MTT 생존력 테스트 분석으로 측정된 HeLa 세포(CXCR4+)의 생존율(%)을 보여준다.

도 8은 CXCR4+ 종양 모델에서 T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체가 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU보다 더 높은 성장 억제를 유도함을 보여준다. 그래프는 20ug q3d x 5 용량의 투여량에서 각 나노접합체-처리된 군(n=4)에 대한 시간에 따른 종양 부피의 변화와, CXCR4+ M5 피하(SC) 결장직장암(CRC) 모델에서 버퍼 처리(K, n=4)와의 비교를 표시한다.

도 9는 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 보다 CXCR4+ M5 종양 조직에서 T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체에 의한 더 높은 세포자멸사 유도를 보여준다. A) 실험 종료시 버퍼- 또는 나노접합체-처리된 종양의 종양 절편에서 관찰된 세포자멸사체의 수를 그래픽으로 표시 B) 각 비교 군에서 관찰된 세포자멸사 수치(검은색 화살표)를 식별하는 H&E-염색된 섹션의 대표적인 현미경 사진.

도 10은 비교 군 중 신장 또는 간에 조직학적 변화가 없음을 나타낸다. 대조군 버퍼-처리 또는 나노접합체-처리 마우스에서 치료가 끝날 때 두 기관 모두에서 변경된 아키텍처 또는 조직학(염증 또는 세포 사멸 수치가 관찰되지 않음)의 부족을 보여주는 신장 및 간 조직의 대표적인 H&E-염색된 섹션.

도 11은 H459A, R468N, F639S 및 R650A 돌연변이를 포함하는 인간 니도젠 G2의 인간 니도젠 G2 도메인의 분리된 헥사히스티딘-태그 버전 및 스테핀 A에 대한 고유 형광 대 온도 간의 상관관계를 보여준다. 화살표는 상기 샘플의 가열을 나타낸다. Nidomut2H6(B), NidoWTH6(C) 및 STMH6(D)에 대한 전개 곡선(온도 함수로서 CSM 값 포함). CSM 값은 도 1a에 예시된 실험으로부터 계산되었고 각 단백질에 대해 수행되었다. 검정 및 회색 화살표는 각각 T_m 및 T_{onset} 값을 나타낸다.

도 12는 니도젠 G2 도메인의 구조를 나타낸다. A) 다중-도메인 인간 니도젠 1 단백질의 도식적 표현 및 천연 리간드와의 상호작용. G2 도메인 내의 β -배럴 구조가 도시되어 있다. B) 니도젠 G2 β -배럴 도메인의 2차 구조. 회색은 서로 다른 β -시트(A-K)이고 파란색은 α -나선이다. C) 왼쪽 패널에 있는 니도젠 G2(RCSB PDB 데이터베이스의 1GL4 등록 번호, 13-07-2011부터 버전 1.2) 및 오른쪽 패널에 있는 녹색 형광 단백질(RCSB PDB 데이터베이스 체인 A의 1QY0 등록번호, 13-07-2011부터 버전 1.2)의 3차 β -배럴 구조의 만화 표현 D) 니도젠 G2 및

GFP β -배럴 구조의 중첩.

도 13은 NidoMut2 펩티드의 디자인을 보여준다. A) 인간 및 마우스 니도겐 G2 도메인의 유사성: 인간 니도겐 1(Uniprot 데이터베이스의 P14543, 2009년 7월 7일자 버전)과 마우스 니도겐 1(Uniprot 데이터베이스 버전 2011년 7월 27일의 P10493) 단백질 간의 아미노산 정렬은 Clustal Omega에 의해 분석되었다.(EMBL-EMI). 검은색 선은 G2 β -배럴 도메인의 시작점과 끝점을 나타낸다. "*"는 아미노산 일치치를 나타내고, ":"는 유사한 특성이 강한 아미노산을 나타내고, "."는 약한 유사한 특성을 가진 아미노산을 나타낸다. B) 인간 니도겐 1, HSNBT 스캐폴드 및 T22-HSNBT-H6 단백질의 아미노산 서열. 인간 니도겐에서 G2 β -배럴 도메인은 검은색으로 강조 표시되고 돌연변이될 후보 아미노산은 붉은 검은색과 밑줄로 표시된다. NIDOm2t2 서열에서 통합된 돌연변이는 붉은 검정색으로 표시된다. T22-NIDOm2t2-H6에서, N-말단 T22 리간드는 밑줄 친 검은색으로 표시되고, 짧은 링커는 붉은 검정으로 표시되고, 통합된 돌연변이는 붉은 밑줄로 표시되고, C-말단 폴리-히스티딘 꼬리는 붉은 검은색 이탤릭체로 강조 표시된다.

도 14는 도면에 나타난 단백질의 발현 시험의 세포 용해물의 가용성 분석의 웨스턴 블롯을 나타낸다.

도 15는 발현 시험 후 도면의 각 패널에 표시된 선별된 후보 단백질의 MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼을 나타낸다. 모든 단백질의 이론적 크기는 약 30.3kDa 이다.

도 16은 DLS에 의해 측정된, T22-NIDOm2t2-H6, T22-NIDOm2t3-H6, T22-NIDOm2t4_T215V-H6 및 T22-NIDOm2t5-H6 단백질 및 이들의 나노입자의 부피 크기 분포를 나타낸다.

도 17 A는 증가하는 농도의 $ZnCl_2$ 와 함께 배양한 후 T22-NIDOm2t2-H6, T22-NIDOm2t3-H6, T22-NIDOm2t4_T215V-H6 및 T22-NIDOm2t5-H6의 침전 프로파일을 보여준다. B. DLS에 의해 결정된, 상이한 $ZnCl_2$ 농도에서 조립된 T22-NIDOm2t2-H6, T22-NIDOm2t3-H6, T22-NIDOm2t4_T215V-H6 및 T22-NIDOm2t5-H6 나노입자의 부피 크기 분포.

도 18 A-C. 탄산염 버퍼와 3개의 FDA-승인 버퍼(A9, B6, D1)에서 T22-NIDOm2t2-H6, T22-NIDOm2t3-H6 및 T22-NIDOm2t5-H6의 CSM 프로파일. D. 테스트된 각 버퍼에 대한 주요 지표(T_m , Tonset 및 ΔT)의 그래픽 표현.

도 19 A-B는 T22-NIDOm2t3-H6-FdU 및 T22-NIDOm2t2-H6-FdU의 MALDI-TOF 질량 분석 스펙트럼을 보여준다. 단백질 중량(30.3kDa)에 대해 추가 2kDa를 갖는 각 피크는 추가 oligoFdU가 부착된 접합 단백질에 속한다. C. 비-접합 음성 대조군 및 참조 T22-NIDOm2t2-H6-FdU 양성 대조군과 함께 T22-NIDOm2t3-H6-FdU 나노접합체의 48시간 배양 후 세포독성 분석. D. T22-NIDOm2t3-H6-FdU의 부피 크기 분포.

도 20은 EPI-X4 기반 NPs의 구조적 및 기능적 특성을 보여준다. A. 모듈러 단백질 EPIX4-GFP-H6(상단) 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6(하단) 및 두 번째 것의 아미노산 서열의 도식. B. EPIX4-GFP-H6(좌) 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6(우)의 질량 분광 분석. 정제 시 단백질의 분자량은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯(Anti-His)에 의해 표시된다. C. 동적 광산란(DLS)에 의해 결정된 유체역학적 크기 및 pDI(다분산 지수). 피크 크기(평균) 값이 표시된다(nm). D. Superdex 200 증가 10/300GL 컬럼을 사용한 EPIX4-GFP-H6(검정색) 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6(회색)의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) E. EPIX4-GFP-H6(상단) 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6(하단) 단백질 NPs의 대표적인 FESEM(직접 증착). 크기 막대는 50 nm를 나타낸다. F 단백질 양은 4시간에 2 μ M의 EPIX4-GFP-H6 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6 투여 후 CXCR4+ HeLa 세포로 내재화되었다(진한 녹색). 천연 CXCR4 리간드 AMD3100(밝은 녹색)에 의해 촉진되는 흡수 억제. 세포내 형광은 단백질 양을 나타내는 값을 나타내기 위해 특정 형광에 의해 보정되었다. 별표는 EPIX4-GFP-H6 과 EPIX4-(RK)-GFP-H6 단백질 내재화 사이의 상당한 차이를 나타내고 해시는 EPIX4-(RK)-GFP-H6 과 AMD3100에 의해 촉진되는 억제 사이의 상당한 차이를 나타낸다($p \leq 0.001$). G. 24시간 동안 EPIX4-GFP-H6(왼쪽) 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6(오른쪽)에 노출된 HeLa 세포의 공초점 이미지. 파란색: 세포 핵, 빨간색: 세포 막, 녹색: 내재화된 NPs. 크기 막대는 10 μ m를 나타낸다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 21은 바이파라토픽(biparatopic) 나노입자 형성 및 특성화를 나타낸다. A. 단백질 EPIX4-(RK)-GFP-H6(상단) 및 T22-BFP-H6(하단)을 형성하는 하이브리드 NPs의 도식. B. 제어된 EPIX4-(RK)-GFP-H6은 0.2% SDS로 분해되고(검정색) 투석에 의해 SDS를 제거하여 조립됨(회색); 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정됨(위). T22-BFP-H6(회색), EPIX4-(RK)-GFP-H6(검정색) 및 바이파라토픽 NP(회색 점선)(하단)의 유체역학적 크기 비교. 피크 크기(평균) 값(nm) 및 PDI(다분산 지수)가 표시된다. C. 바이파라토픽 NPs의 대표적인 FESEM(직접 증착). 크기 막대는 50 nm를 나타낸다. D. 바이파라토픽(biparatopic) NPs 형성의 FRET 분석. 바이파라토픽 NPs, T22-BFP-H6 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6 단량체 혼합물 및 T22-BFP-H6 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6 NP 혼합물의 샘플은 405 nm 라인으로 여기되었고, 방출은 350-650nm에서 수집되었다. BFP는 기증자 형광색으로 사용되었고 GFP는 수용체로 사용되었다. E.

CXCR4+ HeLa 세포(왼쪽) 및 SW1417(오른쪽)에서 EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및 바이파라토픽 NPs(1 μ M)의 세포 내재화의 시간 경과 역학. 세포내 형광은 특정 형광에 의해 보정되어 단백질 양을 나타내는 값을 제공한다. 바이파라토픽 NPs와 이를 형성하는 두 단백질 간의 유의한 차이($p < 0.05$)는 *로 표시되고, 바이파라토픽 NPs와 EPIX4-(RK)-GFP-H6 간의 유의한 차이는 #으로 표시된다. **E.** CXCR4+ HeLa 세포(왼쪽) 및 SW1417(오른쪽)에서 EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및 바이파라토픽 NPs(1 μ M)의 세포 내재화의 시간 경과 역학. 세포내 형광은 특정 형광에 의해 보정되어 단백질 양을 나타내는 값을 제공한다. 바이파라토픽 NPs와 이를 형성하는 두 단백질 사이의 유의한 차이($p < 0.05$)는 *로 표시되고, 바이파라토픽 NPs와 EPIX4-(RK)-GFP-H6 간의 유의한 차이는 #으로 표시된다. **F.** CXCR4 길항제 AMD3100(항상 10:1의 과잉 몰비)에 의해 매개되는 1 μ M에 1시간 동안 노출된 HeLa 세포의 흡수 억제. &는 NPs와 AMD3100에 의해 촉진된 억제 사이의 유의한 차이를 나타낸다($p \leq 0.001$).

도 22는 CXCR4+인간 결장직장암의 피하 마우스 모델에서의 생체내 생체분포 및 독성 평가를 나타낸다. A. 종양의 다른 시간에 방출된 형광(FLI 비율로 측정)의 정량화. B. 나노입자 투여 후 세포자멸 세포체의 수. 대조군에 대한 EPIX4-(RK)-GFP-H6 또는 바이파라토픽 NPs 간의 유의한 차이($p < 0.05$)는 *로 표시되고, 바이파라토픽 NPs와 EPIX4-(RK)-GFP-H6 간의 유의한 차이는 #으로 표시된다. C. 나노입자 투여 후 유사분열체. EPIX4-(RK)-GFP-H6 또는 2중 파라토픽 NP 간의 유의한 차이가 표시된다(* $p < 0.05$). D. 치료 후 5시간 및 24시간 후 조직 절편(H&E)의 조직학적 분석에 의한 신장, 간, 신장 및 비장의 전신 독성 결여. 모든 사진은 400x로 촬영되었다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I - 본 발명의 폴리펩티드

본 발명자들은 그의 천연 리간드에 대한 감소된 친화성을 나타내도록 임의로 변형된 니도겐 단백질로부터의 G2 도메인이 스캐폴드로서 작용하고 상기 G2 도메인 내의 베타 가닥을 연결하는 하나 이상의 루프 영역에 삽입된 펩티드를 제시하기에 충분히 안정하다는 것을 관찰하였다. 또한, 본 발명자들은 니도겐 단백질의 G2 도메인이 또한 관심 세포에 의해 발현되는 수용체에 대해 친화성을 나타내는 리간드에 접합될 때 관심 세포에 대한 치료제 뿐 아니라 진단/영상화제를 포함하는 관심 체제를 전달하는데 사용될 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 니도겐 G2 도메인 및 CXCR4 특이적 리간드 T22를 포함하고 항암제와 결합된 융합 단백질이 CXCR4를 발현하는 세포에 항암제를 전달하여, T22 리간드가 GFP 또는 스테핀 A와 같은 다른 단백질들에 융합된 비교 가능한 체제에 의해 달성된 억제보다 상당히 우수한 정도로 세포 증식을 억제할 수 있음을 발견하였다.

따라서, 제 1 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다:

(i) A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 및 K로 지정된 11개의 베타 가닥 도메인 및

(ii) AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프로 지정된 10개의 루프 영역, 여기서, 각 루프 영역은 2개의 연속적인 베타 가닥 도메인 각각에 연결됨;

여기서 적어도 하나의 루프 영역은 서열번호 62의 동족 루프 영역의 변이체이고, 상기 서열번호 62의 동족 루프 영역은 서열번호:1 (루프 영역 AB), 서열번호 2 (루프 영역 BC), 서열번호 3 (루프 영역 CD), 서열번호 4 (루프 영역 DE), 서열번호 5 (루프 영역 EF), 서열번호 6 (루프 영역 FG), 서열번호 62의 아미노산 149에서 150 (루프 영역 GH), 서열번호 7 (루프 영역 HI), 서열번호 8 (루프 영역 IJ) 및 서열번호 9 (루프 영역 JK)에 정의된 바와 같고,

그리고

여기서 적어도 하나의 베타 가닥 도메인은 서열번호 62의 동족 베타 가닥의 변이체이고 상기 동족 베타 가닥 도메인과 적어도 50% 서열 동일성을 가지며, 여기서 서열번호 52의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 9 (베타 가닥 도메인 A), 서열번호 11 (베타 가닥 도메인 B), 서열번호 12 (베타 가닥 도메인 C), 서열번호 13 (베타 가닥 도메인 D), 서열번호 14 (베타 가닥 도메인 E), 서열번호 15 (베타 가닥 도메인 F), 서열번호 16 (베타 가닥 도메인 G), 서열번호 17 (베타 가닥 도메인 H), 서열번호 18 (베타 가닥 도메인 I), 서열번호 19 (베타 가닥 도메인 J) 및 서열번호 20 (베타 가닥 도메인 K)에 정의된 바와 같다.

폴리펩티드는 이하 "본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드" 또는 "본 발명의 폴리펩티드"로 지칭된다.

본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 일반적으로 펩티드 결합으로 함께 연결된 임의의 길이의 아미노산 잔기의

선형 사슬을 지칭한다. 본 명세서에 사용된 용어 "펩티드"는 비록 폴리펩티드보다 짧지만 폴리펩티드로서의 아미노산의 선형 사슬을 의미한다. 일반적으로 2-50개의 아미노산으로 구성된 아미노산 사슬을 말합니다. 용어 "펩티드 결합", "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 당업자에게 공지되어 있음이 이해될 것이다.

[0096] 본 발명의 폴리펩티드는 "니도젠 G2 도메인"의 변이체이다.

[0097] 본원에 사용된 용어 "니도젠-1"은, 이전에 엔탁틴으로 공지된 당단백질을 지칭한다. 니도젠-1은 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)(서열번호 72)로 Uniprot 데이터베이스에 개시되어 있다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "니도젠-1의 G2 도메인"은 상기 정의된 바와 같은 단백질 니도젠 1의 도메인 G2를 지칭한다. 니도젠-1 G2 도메인은 니도젠-1 단백질의 아미노산 서열의 아미노산 번호 430 및 667에 해당하는 서열번호 62에 나타난 바와 같으며, 유니프로트 데이터베이스(2009, 7월 7일자 버전)의 식별 번호 P14543-1 을 가진다.(서열번호 72)

[0099] 또 다른 실시양태에서, 니도젠 1의 도메인 G2는 서열번호 64에 나타난 바와 같으며, 이는 서열번호 62의 처음 2개의 아미노산이 결여되어 있고, 따라서 유니프로트 데이터베이스 (2009년 7월 7일자 버전)(서열번호 72)의 식별 번호 P14543-1을 갖는 니도젠-1 단백질 전구체의 아미노산 서열의 아미노산 번호 432 및 667로 구성된 영역에 상응한다. 천연 니도젠-1 서열에서, G2 도메인은 짧은 EGF-유사 도메인에 의해 측면에 위치한다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해, 니도젠-1 G2 도메인은 N-말단 또는 C-말단에서 EGF-유사 도메인이 결여되어 있다.

[0100] 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌 잔기를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 N-말단 위치에 메티오닌을 함유하지 않는다.

[0101] 본원에 사용된 "아미노산 잔기"는 임의의 천연 발생 아미노산, 임의의 아미노산 유도체 또는 당업계에 공지된 임의의 아미노산 모방체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 상기 아미노산 잔기는 아미노산, 즉 천연 발생 아미노산이다. 특정 실시양태에서, 단백질 또는 펩티드의 잔기는 아미노산 잔기의 서열을 방해하는 임의의 비-아미노산 없이 순차적이다. 다른 실시양태에서, 상기 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질 또는 펩티드의 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티에 의해 중단될 수 있다.

[0102] 본원에 사용된 "베타 가닥", "베타 가닥 도메인" 또는 "베타 가닥 서열"이라는 표현은 연장된 폴리펩티드 가닥 또는 서열을 의미하며, 이는 하나의 가닥으로부터 NH 기와 다른 가닥으로부터 CO 사이에, 수소 결합을 통해 다른 하나에 연결된다. 일반적으로, 베타 가닥은 길이가 약 3-10개 아미노산이지만 더 길 수도 있고, 예를 들어 13-15개 아미노산이 될 수도 있다. 가닥들 사이의 상기 가닥 연결의 결과로서, 베타 가닥은 시트와 유사한 2차 단백질 구조를 형성한다. 상기 2차 단백질 구조는 본원에서 "베타 시트"로 지칭된다. 베타 시트 내에서, 베타 가닥들은 평행, 역평행 또는 혼합(평행 및 역평행) 방식으로 배열될 수 있다. 평행 방식으로 배열될 때 베타 가닥은 한 말단(N 또는 C)에서 다른 말단까지 동일한 방향으로 정렬된다. 역평행 방식으로 배열될 때, 각 베타 가닥은 그것이 연결된 가닥의 반대 방향으로 정렬된다.

[0103] 본 명세서에 사용된 표현 "베타 배럴"은, 베타-시트에 의해 형성된 단백질 2차 구조를 말하며, 여기서 첫 번째 가닥은 수소 결합에 의해 마지막 가닥에 결합되어, 폐쇄된 토로이달 구조를 유도한다.

[0104] 본원에 사용된 " α -나선" 또는 "알파 나선"이라는 표현은, 아미노산의 NH 기가 단백질 서열에서 3개 또는 4개의 잔기 앞에 위치한 아미노산의 백본 C=O 기에 수소를 결합하는 오른쪽 나선으로 구성된 단백질 2차 구조를 의미한다.

[0105] 본원에 사용된 " α -나선 세그먼트" 또는 "알파 나선 세그먼트"이라는 표현은 본질적으로 하나 또는 여러 α -나선을 포함하는 단백질의 2차 구조의 모티프를 지칭한다.

[0106] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 사용된 베타 가닥은 단백질 도메인을 나타내고, 본원에 사용된 베타 시트는, 단백질 2차 구조를 의미한다.

[0107] 특정 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드의 11개의 베타 가닥 도메인은 베타 시트 2차 구조에 포함되거나 이를 구성한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드의 12개의 베타 가닥 도메인은 베타 배럴 2차 구조에 포함되거나 이를 구성한다.

[0108] 본원에 사용된 용어 "루프", "루프 영역", "루프 서열", "오메가 루프", "오메가 루프 영역" 또는 "오메가 루프 서열"은 비-규칙적, 비-반복 단백질 구조적 모티프를 지칭하며, 임의의 아미노산 서열을 갖는 6개 이상의 아미

노산 잔기의 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 루프의 시작과 끝을 구성하는 잔기는 그 사이에 규칙적인 2차 구조적 모티프가 개입하지 않고 공간에서 서로 가깝다. 그들은 일반적으로 베타 가닥과 같은 2차 단백질 구조, 또는 알파 나선과 같은 직접 2차 단백질 구조에 포함된 두 개의 단백질 도메인을 연결한다. 상기 루프는 종종 한쪽 말단에 의해 연결된 단백질 도메인 또는 단백질 2차 구조가 루프가 다른 말단에 의해 연결된 다른 단백질 도메인 또는 단백질 구조에 대해 그의 방향(N-에서 C-말단 또는 C-에서 N-말단)을 변경하도록 한다. 그들은 가장 자주 단백질의 외부 표면에 위치하고 따라서 일반적으로 그들이 속한 단백질과 다른 분자 사이의 상호 작용에 참여한다.

[0109] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 하나 이상의 루프 영역 내에 이중 폴리펩티드를 함유하는 변이체 니도겐 G2 도메인이다. 한 실시양태에서, 이중 폴리펩티드는 루프 영역 내에 삽입되는데, 즉 루프 영역은 서열번호 62 또는 서열번호 63의 동족 루프 도메인에서 발견되는 모든 아미노산을 보존하지만 이중 폴리펩티드는 2개의 연속적인 아미노산 사이에 삽입된다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 루프 영역 내의 이중 폴리펩티드는 루프 영역의 서열을 부분적으로 또는 완전히 대체하는 루프 영역 내의 삽입으로서 발견된다.

[0110] 이중 폴리펩티드의 길이는 특별히 제한되지 않는다. 따라서, 이중 폴리펩티드는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 55개, 적어도 60개, 적어도 65개, 적어도 70개, 적어도 75개, 적어도 80개, 적어도 85개, 적어도 90개, 적어도 95개 이상, 적어도 100개 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0111] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 하나 이상의 루프 영역 내에 이중 폴리펩티드를 함유하고 하나 이상의 베타 가닥에 돌연변이를 함유하는 변이체 니도겐 G2 도메인이고, 여기서 상기 돌연변이는 서열번호 11에 정의된 바와 같은 베타 가닥 B의 위치 9에서(서열번호 62에서 위치 30의 아미노산 또는 수탁 번호 P14543-1로 Uniprot 데이터베이스(2009, 7, 7 버전)에 제공된 서열에 정의된 바와 같은 인간 니도겐 1 전구체의 위치 459의 아미노산에 해당하고 또는 서열번호:72), 서열번호 12에 정의된 바와 같은 베타 가닥 C의 위치 1에서 (서열 번호 62에서 위치 39의 아미노산 또는 수탁 번호 P14543-1로 Uniprot 데이터베이스(2009, 7, 7 버전)에 제공된 서열에 정의된 바와 같은 인간 니도겐 1 전구체의 위치 468의 아미노산에 해당하고 또는 서열번호:72), 서열번호 19에 정의된 바와 같은 베타 가닥 J의 위치 10에서 (서열번호 62에서 위치 210의 아미노산 또는 수탁 번호 P14543-1로 Uniprot 데이터베이스(2009, 7, 7 버전)에 제공된 서열에 정의된 바와 같은 인간 니도겐 1 전구체의 위치 639의 아미노산에 해당하고 또는 서열번호:72), 서열번호 20에 정의된 바와 같은 베타 가닥 K의 위치 3에서 (서열번호 62에서 위치 221의 아미노산 또는 수탁 번호 P14543-1로 Uniprot 데이터베이스(2009, 7, 7 버전)에 제공된 서열에 정의된 바와 같은 인간 니도겐 1 전구체의 위치 650의 아미노산에 해당하고 또는 서열번호:72)에 위치한다.

[0112] 한 실시양태에서, 서열번호 11에 정의된 바와 같은 베타 가닥 B의 위치 9에서의 돌연변이는 H459A 돌연변이이고, 서열번호: 12에 정의된 바와 같은 베타 가닥 C의 위치 1에서의 돌연변이는 R468N 돌연변이이고, 서열번호 19에 정의된 바와 같은 베타 가닥 J의 위치 10에서의 돌연변이는 F639S 돌연변이 및/또는 서열번호 20에 정의된 바와 같은 베타 가닥 K의 위치 3에서의 돌연변이는 R650A이다.

[0113] 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A 및 R468N 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A 및 F639S 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A 및 R650A 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 R468N 및 F639S 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 R468N 및 R650A 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A, R468N, 및 F639S 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A, R468N, 및 R650A 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 R468N, F639S 및 R650A 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 인간 니도겐 G2 도메인은 H459A, R468N, F639S 및 R650A 돌연변이를 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 니도겐 G2 도메인 변이체는 서열번호 64 또는 65(이하 NID0mut2로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0114] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 임의의 상기 실시양태에서 정의된 바와 같은 니도겐 G2 도메인 변이체, 특히 H459A, R468N, F639S 및 R650A 돌연변이를 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체이며 이는 추가로, 위치 543(서열 번호 62의 114번 위치 히스티딘에 해당) 및 위치 545(서열번호 62의 116번 위치 히스티딘에 해당)로 이루어진 군에서 선택되는 위치에서의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 위치 H543은 Lys로 돌연변이된다. 다른 실시양태에서, 위치 H545는 Asn으로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제

1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A 및 H543K 돌연변이를 포함하는 변이체 니도젠 G2 도메인이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A 및 H545N 돌연변이를 포함하는 변이체 니도젠 G2 도메인이다. 또 다른 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 H543K 돌연변이 및 H545N 돌연변이를 포함한다. 한 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 서열번호: 87(이하, NID0mut3으로 지칭됨)을 포함하거나 이로 구성되며, 이는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K 및 H545N 돌연변이를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0115] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것, 특히 NID0mut3 변이체에서 정의된 바와 같은 변이체 니도젠 G2 도메인이며, 이는 추가로 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다:

[0116] - 위치 449의 발린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 20에 해당함). 바람직하게는, 위치 449의 발린은 Thr로 돌연변이된다. 바람직한 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 서열번호 88(이하 NID0mut3-V45T로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0117] - 위치 525의 발린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 96에 해당). 바람직하게는, 위치 449의 발린은 Gln으로 돌연변이된다. 바람직한 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 서열번호 89(이하 NID0mut3-V121Q로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0118] - 위치 561의 페닐알라닌에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 142에 해당). 바람직하게는, 위치 561의 페닐알라닌이 글루탐산으로 돌연변이된다. 바람직한 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 서열 90(이하 NID0mut3-F157E로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0119] - 위치 619의 발린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 190에 해당). 바람직하게는, 위치 619의 발린은 트레오닌으로 돌연변이된다. 바람직한 실시양태에서, 니도젠 G2 도메인 변이체는 서열번호 91(이하 NID0mut3-V215T로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 갖는다.

[0120] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것에서 정의된 바와 같은 변이체 니도젠 G2 도메인이고, 추가로 V449T, V525Q, F561E 및 V619T 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, V449T, V525Q, F561E 및 V619T 돌연변이를 포함하는 변이체 니도젠 G2 도메인이다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, V449T, H545N, V525Q, F561E 및 V619T 돌연변이를 포함하는 변이체 니도젠 G2 도메인이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E 및 V619T 돌연변이를 포함하는 변이체 니도젠 G2 도메인이다. 또 다른 실시양태에서, 변이체 니도젠 G2 도메인은 서열번호 92(이하, NID0mut4로 지칭됨)에 정의된 바와 같은 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0122] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것, 특히 NID0mut4에서 정의된 바와 같은 변이체 니도젠 G2 도메인이며, 이는 추가로 위치 619의 트레오닌에서의 돌연변이를 포함한다(서열번호 62의 위치 190에 대응함). 바람직하게는, 위치 619의 트레오닌은 발린으로 돌연변이된다.

[0123] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것에서 정의된 바와 같은 변이체 니도젠 G2 도메인이며 여기서 619번 위치의 아미노산(서열번호 62의 위치 190에 해당)은 UniProt 데이터베이스에 수탁 번호 P14534로 정의된 인간 니도젠 G2 도메인에 나타나는 동일한 잔기, 즉 발린이다.

[0124] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q 및 F561E 돌연변이를 갖는 니도젠 G2 도메인 변이체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 93의 서열을 갖는 니도젠 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut4_T215V로 지칭됨)이다.

[0125] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것, 특히 NID0mut4에서 정의된 바와 같은 변이체 니도젠 G2 도메인이며, 이는 추가로 위치 618의 시스테인에서의 돌연변이를 포함한다(서열번호 62의 위치 189에 대응함). 바람직하게는, 위치 618의 시스테인은 세린으로 돌연변이된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E 및 C618S 돌연변이를 가지는 니도젠 G2 도메인 변이체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 94의 서열을 갖는 니도젠 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut5로 지칭됨)이다.

[0126] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것, 특히 NID0mut3 변이

체에서 정의된 바와 같은 변이체 니도겐 G2 도메인이며, 이는 추가로 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이를 포함한다:

- [0127] - 위치 580의 발린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 151에 해당). 바람직하게는, 위치 580의 발린은 Thr로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 95의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-V176T로 지칭됨)이다.
- [0128] - 위치 604의 이소류신에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 175에 해당). 바람직하게는, 위치 604의 이소류신은 Thr로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 96의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-I200T로 지칭함)이다.
- [0129] - 위치 638의 발린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 209에 해당). 바람직하게는, 위치 638의 발린은 티로신으로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 97의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-V236Y로 지칭됨)이다.
- [0130] - 위치 641의 류신에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 212에 해당). 바람직하게는, 위치 641의 류신이 트레오닌으로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 98의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-L237T로 지칭됨)이다.
- [0131] - 위치 469의 세린에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 40에 해당). 바람직하게는, 위치 469의 세린은 Ile로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 99의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-S65I로 지칭됨)이다.
- [0132] - 위치 518의 아르기닌에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 89에 해당). 바람직하게는, 위치 518의 아르기닌은 Ile로 돌연변이된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 100의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-R114I로 지칭됨)이다.
- [0133] - 위치 618의 시스테인에서의 돌연변이(서열번호 62의 위치 189에 해당). 바람직하게는, 위치 618의 시스테인은 세린으로 돌연변이된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 101의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut3-C214S로 지칭됨)이다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것에서 정의된 바와 같은 변이체 니도겐 G2 도메인이며, 특히 NID0mut3 변이체는 추가로 469(바람직하게는 S469I 돌연변이) 및 518 위치(바람직하게는 R518I 돌연변이)에서 돌연변이를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, S469I 및 R518I 돌연변이를 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체이고 서열번호 102의 서열에 상응한다.(이하 NID0mut3-S65I_R114I로 칭함).
- [0135] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것에 정의된 바와 같은 니도겐 G2 도메인 변이체, 특히 NID0mut5 변이체이고, 이는 추가로 469 (바람직하게는 S469I 돌연변이) 및 518 위치 (바람직하게는 R518I 돌연변이)에서의 돌연변이를 함유한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, S469I 및 R518I 돌연변이를 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체며, 서열번호 103 에 정의된 바와 같다(이하 NID0mut5-S65I_R114I로 지칭).
- [0136] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것에서 정의된 바와 같은 니도겐 G2 도메인 변이체, 특히 NID0mut5 변이체이며, 이는 추가로 위치 469(서열번호 62의 위치 40에 해당함)의 세린에서 돌연변이를 함유한다. 바람직하게는, 위치 469의 세린은 Ile로 돌연변이된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E 및 S469I 돌연변이를 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 104의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut5-S65I로 지칭됨)이다.
- [0137] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드는 상기 실시양태 중 임의의 것, 특히 NID0mut5 변이체에서 정의된 바와 같은 변이체 니도겐 G2 도메인이며, 이는 추가로 위치 518의 아르기닌에서 돌연변이를 함유한다 (대응 서열번호 62의 위치89 에 해당함). 바람직하게는, 위치 518의 아르기닌은 Ile로 돌연변이된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E 및 R518I 돌연변이를 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 서열번호 104의 서열을 갖는 니도겐 G2 도메인 변이체(이하, NID0mut5-R114I로 지칭됨)이

다.

본 발명에 사용하기에 적합한 니도겐 G2 도메인 변이체는 하기 표에 요약되어 있다.

니도겐 G2 도메인 변이체	천연 인간 니도겐에 대한 돌연변이 (2009,7,7 일자 Uniprot 데이터베이스 버전에서 수탁번호 P14543-1 인 서열과 같은 위치 넘버링
NIDOmut2	H459A, R468N, F639S, R650A
NIDOmut3	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N
NIDOmut3_V45T	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T
NIDOmut3_V121Q	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V525Q
NIDOmut3-F157E	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, F561E
NIDOmut3-V215T	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V619T
NIDOmut4	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E, V619T
NIDOmut4_T215V	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, F561E
NIDOmut5	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, C618S
NIDOmut3-V176T	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V580T
NIDOmut3-I200T	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, I604T
NIDOmut3-V236Y	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V640Y
NIDOmut3-L237T	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, L641T
NIDOmut3-S65I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, S469I
NIDOmut3-R114I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, R518I
NIDOmut3-C214S	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, C618S
NIDOmut3-S65I_R114I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, S469I R518I
NIDOmut5-S65I_R114I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, C618S, S469I, R518I
NIDOmut5-S65I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, C618S, S469I
NIDOmut5_R114I	H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, C618S, R518I

표 1: 본 발명에서 사용하기에 적합한 니도겐 G2 도메인 변이체의 요약. 2009년 7월 7일자 Uniprot 데이터베이스 버전에서 수탁 번호 P14543-1의 서열에서의 G2 도메인의 위치 넘버링.

이중 폴리펩티드는 루프 영역 내에 삽입될 수 있으며, 즉 루프 영역은 서열번호 62 또는 서열번호 63의 동족 루프 도메인에서 발견되는 모든 아미노산을 보존하지만 이중 폴리펩티드는 2개의 연속적인 아미노산 사이에 삽입된다. 이중 폴리펩티드의 길이는 특별히 제한되지 않는다. 따라서, 이중 폴리펩티드는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 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 85개, 적어도 90개, 적어도 95개, 적어도 100개 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

또 다른 실시양태에서, 이중 폴리펩티드는 루프 영역의 일부를 대체할 수 있으며, 즉 루프 영역은 서열번호: 62

또는 서열번호: 63에서 동족 루프 도메인의 서열에 대한 결실을 함유하고 결실된 서열은 이중 폴리펩티드로 대체되고 이는 2개의 연속적인 아미노산 사이에 삽입된다. 결실의 길이가 이중 펩티드의 길이와 동일할 필요는 없음을 이해할 것이다. 따라서, 루프 영역은 상기 영역 전체 길이의 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%, 적어도 95% 또는 100%의 결실을 포함할 수 있다. 이중 폴리펩티드의 길이는 특별히 제한적이지 않다. 따라서, 이중 폴리펩티드는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 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 85개, 적어도 90개, 적어도 95개, 적어도 100개 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0143] 변이체 G2 니도젠 도메인이 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 함유하는 경우, 이중 폴리펩티드는 동일한 루프 영역 내에서, 또는 바람직하게는 상이한 루프 영역에서 발견될 수 있다. 더욱이, 변이체 G2 니도젠 도메인이 하나 이상의 이중 폴리펩티드를 함유하는 경우, 이중 폴리펩티드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0144] 본 발명에 따른 변이체 G2 니도젠 도메인의 일부를 형성하는 이중 폴리펩티드는 표적 펩티드에 특이적으로 결합한다. 보다 바람직하게는, 이중 폴리펩티드는 본 발명의 변이체 G2 니도젠 도메인 또는 본 발명의 제1 폴리펩티드의 임의의 다른 영역에 대해 특이적 결합을 나타내지 않는 표적 펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0145] 본 발명에 따른 용어 "결합하는 것", "결합", "결합하다"은 수소 결합, 소수성 상호 작용, 반 데르 발스 결합, 이온 결합 또는 이들의 조합과 같은 비공유 결합의 결과로서 친화성 결합 분자, 또는 그들 사이의 특이적 결합 쌍의 상호작용을 지칭하지만 이에 국한되지 않는다. .

[0146] "특이적으로 결합하는", "특이적으로 결합하는것", "특이적으로 인식하는" 또는 "특이적으로 상호작용하는" 표현, 특정 또는 표적 분자에 대한 폴리펩티드의 결합을 언급하기 위해 본 발명에서 사용되는 경우, 3차원 구조의 2개의 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 상보성에 의해 상기 분자에 특이적으로 결합하는 상기 폴리펩티드의 능력으로 이해되며, 실질적으로 높은 친화도를 가지고, 상기 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합이 바람직하게는 상기 폴리펩티드와 다른 분자와의 결합이 예를 들어 반응 혼합물에서 근접하게 존재하기 전에 일어난다. 반응 혼합물에서 표적 분자에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드의 능력을 예를 들어, 관심 표적 분자 뿐만 아니라 다소(구조적으로 및/또는 기능적으로) 밀접하게 관련된 분자에 대한 통상적인 조건 하에서 상기 폴리펩티드의 결합을 평가함으로써 시험할 수 있다. 폴리펩티드가 표적 분자에 결합하지만 다른 밀접하게 관련된 분자에는 결합하지 않거나 본질적으로 결합하지 않는 경우에만, 상기 결합은 표적 분자에 대해 특이적인 것으로 간주된다. 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합은 둘 사이의 결합 친화도가 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수를 갖는 경우 특이적으로 간주될 수 있다. 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합, 및 상기 결합의 KD를 결정하는 방법은, 해당 분야의 전문가에게 잘 알려진 방법을 포함한다. 이러한 방법의 비제한적 예는 겔 -시프트 분석, 예를 들어 전기영동 이동성 시프트 분석(EMSA), 공동-면역침전 분석에 이어 질량 분석, 질량 분석과 관련된 가스 크로마토그래피, 질량 분석과 관련된 액체 크로마토그래피 또는 웨스턴 블롯 분석을 포함한다. 추가적인 방법은 오일-쿠션 방법이다[Hesseltset 외, 1998, J.Immunol., 160:877-883 참조].

[0147] 특정 실시양태에서, 표적 분자에 대한 폴리펩티드의 결합은, 상기 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합이 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 10^{-15} M의 해리 상수(KD)를 갖는 경우 특이적으로 간주된다. 유사하게, 루프 영역과 특정 표적 분자 사이의 결합은, 루프 영역과 특정 표적 분자 사이의 결합이 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수(KD)를 갖는 경우 특이적으로 간주된다.

[0148] 본 발명의 폴리펩티드에서, 루프 영역 AB는 베타 가닥 A와 B를 연결하고, 루프 영역 BC는 베타 가닥 B와 C를 연결하고, 루프 영역 CD는 베타 가닥 C와 D를 연결하고, 루프 영역 DE는 베타 가닥 D와 E를 연결하고, 루프 영역 EF는 베타 가닥 E와 F를 연결, 루프 영역 FG'는 베타 가닥 F와 G를 연결하고, 루프 영역 GH는 베타 가닥 G와 H를 연결하고, 루프 영역 HI는 베타 가닥 H와 I를 연결하고, 루프 영역 IJ는 베타 가닥 I 및 J와 루프 영역을 연

결하고, 루프영역 JK는 베타 가닥 J와 K를 연결한다.

[0149] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 A는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 AB에 의해 베타 가닥 B에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 B는 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 BC에 의해 베타 가닥 C에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 C는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 CD에 의해 베타 가닥 D에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 D는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 DE에 의해 베타 가닥 E에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 E는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 EF에 의해 베타 가닥 F에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 F는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 FG에 의해 베타 가닥 G에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 G는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 GH에 의해 베타 가닥 H에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 H는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 HI에 의해 베타 가닥 I에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 I은 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 IJ에 의해 베타 가닥 J에 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 J는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 루프 영역 JK에 의해 베타 가닥 K에 연결된다.

[0150] 본원에 사용된 표현 "서열번호 62의 동족 루프 영역"은 인간 기원의 야생형 니도젠 G2 도메인인 서열번호 62에 나타나는 루프 영역을 의미한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 각 루프 영역은 서열번호 62에 그의 동족 루프 영역을 갖는다.

[0151] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 아미노산 서열은, 특정 정도의 서열 동일성을 나타내고 동일한 유형의 단백질 도메인 또는 단백질 2차 구조를 코딩하는 경우, 즉, 둘 다 베타 가닥, 루프 영역, 알파 나선, α 나선 세그먼트, 베타 시트 또는 베타 배럴을 형성하는 경우, 동일한 단백질 도메인 또는 2차 단백질 구조를 코딩하는 것으로 간주된다. 특정 실시양태에서, 동일한 것으로 간주되는 2개의 단백질 도메인 또는 2차 단백질 구조를 코딩하는 아미노산 서열은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 적어도 99.75%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9%, 적어도 99.95%, 적어도 99.975%, 적어도 99.99%의 서열 동일성의 정도를 나타낸다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 정도는 통상적인 방법에 의해 결정될 수 있다, 예를 들어, 당업계에 공지된 표준 서열 정렬 알고리즘, 예를 들어 BLAST[Altschul S.F. 외., J. Mol. Biol., 1990년 10월 5일; 215(3):403-10] 단백질 내의 아미노산 서열이 특정 도메인 또는 단백질 2차 구조를 형성하거나 유지하는지 여부를 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 단백질의 원자 좌표가 X-선 결정학 또는 단백질 NMR과 같은 숙련자에게 잘 알려진 방법에 따라 얻어지면, 생물정보학 도구 DSSPcont(Carter, Andersen, & Rost, 2003) 및 STRIDE(Heinig & Frishman, 2004)와 같은 단백질의 2차 구조를 결정하는 방법을 포함한다.

[0152] 루프 영역 AB의 서열번호 62에 있는 동족 루프 영역은 서열번호 1을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC의 서열번호 62 내의 동족 루프 영역은 서열번호 2를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD의 서열번호 62에 있는 동족 루프 영역은 서열번호 3을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 DE의 서열번호 62에 있는 동족 루프 영역은 서열번호 4를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 5를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 6을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 62의 아미노산 149 내지 150을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 HI의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 7을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 8을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK의 서열번호 62에서 동족 루프 영역은 서열번호 9를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다.

[0153] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역은 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 변이체이다.

[0154] 본원에 사용된 표현 "루프 영역 변이체"는 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역을 지칭하며 이는 서열번호 62의 그의 동족 루프 영역의 서열과 관련하여 하나 이상의 아미노산의 변형, 삽입 및/또는 결실을 그 서열에 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드로부터의 상기 루프 영역은 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI,

IJ 및 JK로 이루어진 루프 영역의 군으로부터 뽑힌다.

- [0155] 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 중 적어도 하나의 변이체는 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 서열에서 적어도 하나의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가에 의한 돌연변이의 결과이다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 변이체는 서열번호: 62에서 그의 동족 루프 영역의 서열과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성 정도를 가진다. 2개의 서열 사이의 서열 동일성 정도를 결정하는 방법은 위에서 제공되었다.
- [0157] 특정 실시양태에서, 루프 영역 AB는 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC는 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD는 서열번호: 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특별한 실시양태에서, 루프 영역 DE는 서열번호 62의 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF는 서열번호: 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG는 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH는 서열번호: 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 HI는 서열번호 62의 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ는 서열번호 62에서 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK는 서열번호 62의 그의 동족 루프 영역의 루프 영역 변이체이다.
- [0158] 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 변이체 니도젠 G2 도메인 내의 AB 루프 영역의 서열은 서열번호: 1의 변이체인 반면, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프 영역 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 또는 모두의 서열은 서열번호 62의 그들의 동족 루프 영역의 서열과 동일하다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 AB의 서열은 서열번호: 1의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 중 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 AB의 서열은 서열번호 1의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 동일하다.
- [0159] 특정 실시양태에서, 서열번호 1의 루프 영역 AB 변이체는 서열번호 1과 적어도 30%, 적어도 35% 이상, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.
- [0160] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 AB의 서열은 서열번호 1이다.
- [0161] 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC의 서열은 서열번호 2의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC의 서열은 서열번호: 2의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 AB, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프 영역 중 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7개, 적어도 8개, 또는 모두의 서열은 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC의 서열은 서열번호: 2의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 중 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7개, 적어도 8개, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 BC의 서열은 서열번호 2의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0162] 특정 실시양태에서, 서열번호: 2의 루프 영역 BC 변이체는 서열번호 2와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 가진다.
- [0163] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 BC의 서열은 서열번호 2이다.
- [0164] 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD의 서열은 서열번호 3의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD의 서열은 서열번호: 3의 변이체이고, 및 본 발명의 제1 측면의 AB, BC, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모든 서열은 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루

프 영역 CD의 서열은 서열번호: 3의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD의 서열은 서열번호 3의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0165] 특정 실시양태에서, 서열번호 3의 루프 영역 CD 변이체는 서열번호 3과의 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 가진다.

[0166] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 CD의 서열은 서열번호 3이다.

[0167] 특정 실시양태에서, 루프 영역 CD의 서열은 서열이 알파-나선 구조를 나타내지 않는 루프 영역의 동족 영역에 대해 변형된 서열번호 62의 동족 도메인의 변이체이다. Hopf 외.(supra.)에서 나타난 바와 같이, 천연의 G2 도메인의 CD 루프 영역은 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 및 $\alpha 3$ 으로 알려진 알파 나선 구조를 가진 3개의 영역을 포함한다. 이들 영역은 각각 서열번호 21, 22 및 23으로 정의된다. 이 영역은 CD 루프 영역을 4개의 루프 영역으로 분리하며 이는 각각 베타 가닥 C와 $\alpha 1$ 사이의 영역(이하 C α 영역), $\alpha 1$ 과 $\alpha 2$ 사이, $\alpha 2$ 와 $\alpha 3$ 사이, $\alpha 3$ 과 베타 가닥 D(이하 αD 영역)에 해당한다. 한 실시양태에서, C α 영역은 서열번호 24를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 한 실시양태에서, αD 영역은 아미노산 GG를 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다. 한 실시양태에서, 루프 영역의 서열은 서열번호 3의 동족 영역의 변이체이며 서열번호 21, 22 및 23의 서열은 상기 동족 영역에 대하여 보존되었다. 서열 21, 22 및 23의 서열이 동족 영역에 대해 보존된 동족 영역 서열 3의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, 루프 영역의 서열은 C α 영역에 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 서열번호 3의 동족 영역의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, 루프 영역의 서열은 αD 영역에 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 서열번호 3의 동족 영역의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, 루프 영역의 서열은 C α 영역 및 αD 영역에 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 서열번호 3의 동족 영역의 변이체이다.

[0168] 특정 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드에서 C α 영역은 서열번호 24와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다,

[0169] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 C α 의 서열은 서열번호 24이다.

[0170] 특정 실시양태에서, 루프 영역 αD 변이체는 아미노산 GG로 이루어지는 서열과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0171] 특정 실시양태에서, 루프 영역 DE의 서열은 서열번호 4의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 DE의 서열은 서열번호: 4의 변이체이고, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드의 AB, BC, CD, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두의 서열은 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열을 함유한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 DE의 서열은 서열번호: 4의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 DE의 서열은 서열번호 4의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열은 나머지는 서열 62의 나머지 서열과 같다.

[0172] 특정 실시양태에서, 서열번호 4의 루프 영역 DE 변이체는 서열번호 4와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0173] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 DE의 서열은 서열번호 4이다.

[0174] 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF의 서열은 서열번호 5의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF의 서열은 서열번호: 5의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 AB, BC, CD, DE, FG, GH, HI, IJ 및 JK 루프 영역 중 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9, 또는 모두는 위에 표시된 서열번호 62에서 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF의 서열은 서열번호: 5의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도

도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두는 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 EF의 서열은 서열번호 5의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0175] 특정 실시양태에서, 서열번호: 5의 루프 영역 EF 변이체는 서열번호 5와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0176] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 EF의 서열은 서열번호 5이다.

[0177] 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG의 서열은 서열 6의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG의 서열은 서열 6의 변이체이고, AB, BC, CD, DE, EF, GH, HI, IJ 및 JK의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두는 상기 표시된 서열번호 62의 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG의 서열은 서열번호: 6의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두는 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 FG의 서열은 서열번호 6의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0178] 특정 실시양태에서, 서열번호: 6의 루프 영역 FG 변이체는 서열번호 6과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98 %, SEQ ID NO:6과의 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0179] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 FG의 서열은 서열번호 6이다.

[0180] 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH의 서열은 서열 TS의 변이체이고, 서열번호 62의 아미노산 149 내지 150(또는 서열번호 63의 아미노산 147 내지 148)에 상응한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH의 서열은 서열번호: 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 서열의 변이체이고, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드의 AB, BC, CD, DE, EF, FG, HI, IJ 및 JK의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두의 서열은 상기 표시된 서열번호 62의 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH의 서열은 서열번호 62의 아미노산 149 내지 150에 해당하는 서열의 변이체이고, 본 발명의 제 1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 GH의 서열은 서열번호: 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 서열의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지 부분은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0181] 특정 실시양태에서, 서열번호 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 서열의 루프 영역 GH 변이체는 서열 번호 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 서열과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0182] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 GH의 서열은 서열번호 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 서열이다.

[0183] 특정 실시양태에서, 루프 영역 H1의 서열은 서열 7의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 H1의 서열은 서열번호: 7의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, IJ 및 JK의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모든 서열은 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 H1의 서열은 서열번호: 7의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 H1의 서열은 서열 7의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0184] 특정 실시양태에서, 서열번호 7의 루프 영역 H1 변이체는 서열번호 7과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0185] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 H1의 서열은 서열번호 7이다.

[0186] 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ의 서열은 서열 8의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ의 서열은 서열번호: 8의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, 및 JK 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두의 서열은 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ의 서열은 서열번호: 8의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7개, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 IJ의 서열은 서열 8의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열 62의 나머지 서열과 같다. .

[0187] 특정 실시양태에서, 서열번호 8의 루프 영역 IJ 변이체는 서열번호 8과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0188] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 IJ의 서열은 서열번호 8이다.

[0189] 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK의 서열은 서열 9의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK의 서열은 서열번호 9의 변이체이고, 본 발명의 첫 번째 측면의 폴리펩티드의 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, 및 IJ의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두는 위에 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK의 서열은 서열 9의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두의 서열은 서열번호 62에서 이들의 동족 루프 영역의 서열이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 루프 영역 JK의 서열은 서열 9의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열 62의 나머지 서열과 같다.

[0190] 특정 실시양태에서, 서열번호 9의 루프 영역 JK 변이체는 서열번호 10과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.

[0191] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 JK의 서열은 서열번호 9이다.

[0192] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서 변이체 루프 영역의 상류, 바로 상류, 하류 또는 바로 하류에 위치한 서열 중 적어도 하나는 서열번호 62의 상기 서열(그의 참조 서열이라고 칭함)에 관련하여 하나 이상의 아미노산의 변형, 삽입 및/또는 결실을 포함하며, 상기 루프 영역 변이체의 동족 루프 영역에 관하여 동일한 위치에 배치된다. 그러나, 상기 적어도 하나의 서열은 서열번호 62를 갖는 폴리펩티드에서 그의 참조 서열로서 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에서, 상기 정의된 바와 같은, 동일한 단백질 도메인 또는 2차 구조를 코딩한다. 루프 영역, α -나선 세그먼트 또는 α -나선과 같은 두 개의 아미노산 서열이 동일한 단백질 도메인 또는 이차 구조를 형성하는지 확인하는 방법은, 두 개의 아미노산 서열이 동일한 단백질 구조를 형성하는지 확인하기 위해 위에서 제공된 방법이다.

[0193] 특정 실시양태에서, 그의 참조 서열과 관련하여 하나 이상의 아미노산의 변형, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 하나 이상의 서열은, 서열번호 62의 그의 참조 서열과 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다. 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성의 정도를 결정하는 방법은 위에서 제공되었다.

[0194] 본원에 사용된 표현 "서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인"은 상기 서열과 동일한 루프 영역 또는 단백질 2차 구조를 코딩하는 서열번호 62를 갖는 단백질의 아미노산 서열 사이에 위치한 서열 62의 베타 가닥 도메인을 의미하고 그 사이에 상기 베타 가닥 도메인 변이체가 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드에 위치한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 제1 폴리펩티드의 각 베타 가닥 도메인은 서열번호 62에 동족 베타 가닥 도메인을 갖는다.

[0195] 변이체 니도겐 G2 도메인의 베타 가닥 도메인 각각은 서열 번호 62의 동족 베타 가닥과 동일하거나 하나 이상의 아미노산이 다를 수 있고 변이체 니도겐 G2 도메인의 베타 가닥과 서열 62의 동족 베타 가닥 도메인 사이의 전

체 서열 동일성은 적어도 50%일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 변이체 니도젠 G2 도메인의 베타 가닥과 서열 번호 62의 동족 베타 가닥 도메인 사이의 서열 동일성은 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다.

[0196] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 A는 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 B는 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 C는 서열번호 62의 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 D는 서열번호: 62에서 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 E는 서열번호 62의 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 F는 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 G는 서열번호: 62에서 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 H는 서열번호 62의 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 I는 서열번호 62의 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 J는 서열번호 62의 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 K는 서열번호: 62에서 그의 동족 베타 가닥 도메인의 베타 가닥 도메인 변이체이다.

[0197] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인은 서열 번호 62에서 그의 동족 베타 가닥의 변이체이다.

[0198] 본원에 사용된 표현 "베타 가닥 도메인 변이체"는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드로부터의 베타 가닥 도메인을 지칭하며 이는 서열번호 62에서 그의 동족 베타 가닥 도메인의 서열과 관련하여 하나 이상의 아미노산의 변형, 삽입 및/또는 결실을 그 서열에 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드로부터의 상기 베타 가닥 도메인은 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 또는 K로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0199] 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 변이체는 서열번호 62에서 그의 동족 베타 가닥 도메인의 서열과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다. 서열 동일성의 정도를 결정하는 방법은 위에서 제공되었다.

[0200] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 A에 대한 서열번호: 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 10을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 B에 대한 서열번호: 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호: 11을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 C에 대한 서열번호: 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 12를 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 D에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 13을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 E에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 14를 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 F에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 15를 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 G에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 16을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 H에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 17을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 I에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 18을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 J에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 19를 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 K에 대한 서열번호 62의 동족 베타 가닥 도메인은 서열번호 20을 갖는다.

[0201] 따라서, 특정 실시양태에서, 베타 가닥 A의 서열은 서열번호 10의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 A의 서열은 서열번호 10의 변이체이며, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 B-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 A의 서열은 서열번호: 10의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 A의 서열은 서열번호 10의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다. .

- [0202] 특정 실시양태에서, 서열번호 10의 베타 가닥 도메인 A 변이체는 서열번호 11과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0203] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 A의 서열은 서열번호 10이다.
- [0204] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 B의 서열은 서열번호 11의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 B의 서열은 서열번호 11의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A, C-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시한 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다.
- [0205] 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 B의 서열은 서열번호 11의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 B의 서열은 서열번호: 11의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0206] 특정 실시양태에서, 서열번호 11의 베타 가닥 도메인 B 변이체는 서열번호 12와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 가진다.
- [0207] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 B의 서열은 서열번호 11이다.
- [0208] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 C의 서열은 서열번호 12의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 C의 서열은 서열번호 12의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A, B, D-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 C의 서열은 서열번호 12의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 C의 서열은 서열번호 12의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0209] 특정 실시양태에서, 서열번호 12의 베타 가닥 도메인 C 변이체는 서열번호 12와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.
- [0210] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 C의 서열은 서열번호 12이다.
- [0211] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 D의 서열은 서열번호 13의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 D의 서열은 서열번호 13의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-C, E-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 D의 서열은 서열 13의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 D의 서열은 서열번호 13의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0212] 특정 실시양태에서, 서열번호 13의 베타 가닥 도메인 D 변이체는 서열번호 13과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.
- [0213] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 D의 서열은 서열번호

13이다.

- [0214] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 E의 서열은 서열번호 14의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 E의 서열은 서열번호 14의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-D, F-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시한 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 E의 서열은 서열번호: 14의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 E의 서열은 서열번호 14의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0215] 특정 실시양태에서, 서열번호 14의 베타 가닥 도메인 E 변이체는 서열번호 14와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.
- [0216] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 E의 서열은 서열번호 14이다.
- [0217] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 F의 서열은 서열번호 15의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 F의 서열은 서열번호 15의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-E, G-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 F의 서열은 서열번호 15의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 F의 서열은 서열번호 15의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0218] 특정 실시양태에서, 서열번호 15의 베타 가닥 도메인 F 변이체는 서열번호 15와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다.
- [0219] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 F의 서열은 서열번호 15이다.
- [0220] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 G의 서열은 서열번호 16의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 G의 서열은 서열번호 16의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-F 및 H-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 G의 서열은 서열번호 16의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 G의 서열은 서열번호 16의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.
- [0221] 특정 실시양태에서, 서열번호 16의 베타 가닥 도메인 G 변이체는 서열번호 16과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 가진다.
- [0222] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 G의 서열은 서열번호 16이다.
- [0223] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 H의 서열은 서열번호 17의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 H의 서열은 서열번호 18의 변이체이고, 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-G, I-K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정

실시양태에서, 베타 가닥 H의 서열은 서열번호 17의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 H의 서열은 서열번호 17의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드 서열의 나머지는 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0224] 특정 실시양태에서, 서열번호 17의 베타 가닥 도메인 H 변이체는 서열번호 17과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0225] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 H의 서열은 서열번호 17이다.

[0226] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 I의 서열은 서열번호 18의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 I의 서열은 서열번호 18의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-H, J, K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 I의 서열은 서열번호 18의 변이체이고, 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 I의 서열은 서열번호 18의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호 62의 나머지 서열과 같다.

[0227] 특정 실시양태에서, 서열번호 18의 베타 가닥 도메인 I 변이체는 서열번호 19와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0228] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 I의 서열은 서열번호 18이다.

[0229] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 J의 서열은 서열 19의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 J의 서열은 서열번호 19의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-I, K 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 상기 나타난 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 J의 서열은 서열번호 19의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 J의 서열은 서열번호 19의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열번호: 62에서 나머지 서열과 같다.

[0230] 특정 실시양태에서, 서열번호 19의 베타 가닥 도메인 J 변이체는 서열번호 19와 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0231] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 J의 서열은 서열번호 19이다.

[0232] 특정 실시양태에서, 베타 가닥 K의 서열은 서열번호 20의 변이체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 도메인 K의 서열은 서열번호 20의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 A-J 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 위에서 표시된 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 K의 서열은 서열번호 20의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 모두는 서열번호 62에서 그들의 동족 베타 가닥 도메인의 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 베타 가닥 K의 서

열은 서열번호 20의 변이체이고, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 나머지 서열은 서열식별번호 62의 나머지 서열과 같다.

- [0233] 특정 실시양태에서, 서열번호 20의 베타 가닥 도메인 K 변이체는 서열번호 20과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0234] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 도메인 K의 서열은 서열번호 20이다.
- [0235] 한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드는 서열번호 62에서 동족 루프 영역과 관련하여 루프 영역 중 적어도 하나의 변이체를 함유하며, 이는 동족 루프 영역의 서열과 관련하여 적어도 하나의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가에 의한 돌연변이의 결과이다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 AB 루프 영역 서열번호 1에 대해 루프 영역 AB에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 BC 루프 영역 서열번호 2에 대해 루프 영역 BC에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 CD 루프 영역 서열번호 3에 대해 루프 영역 CD에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 DE 루프 영역 서열번호 4에 대해 루프 영역 DE에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 EF 루프 영역 서열번호 5에 대해 루프 영역 EF에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 FG 루프 영역 서열번호 6에 대한 루프 영역 FG에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 서열 62의 아미노산 149 내지 150에 상응하는 동족 GH 루프 영역에 대한 루프 영역 GH에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 HI 루프 영역 서열번호 7에 대해 루프 영역 HI에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 IJ 루프 영역 서열번호 8에 대해 루프 영역 IJ에 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인은 동족 JK 루프 영역 서열번호 9에 대한 루프 영역 JK에 돌연변이를 함유한다.
- [0236] 변이체 니도겐 G2 도메인의 α -나선 세그먼트 CaD는 서열번호 62의 동족 α -나선 세그먼트와 동일하거나, 하나 이상의 아미노산이 상이할 수 있으며 변이체 니도겐 G2 도메인에서 α -나선 세그먼트와 서열번호 26을 갖는 서열번호 62에서 동족 α -나선 세그먼트 사이의 전체 서열 동일성은 50% 이상일 수 있다.
- [0237] 바람직한 실시양태에서, 변이체 니도겐 G2 도메인의 α -나선형 세그먼트 CaD와 서열번호 24를 갖는 서열번호 62의 동족 α -나선형 세그먼트 사이의 서열 동일성은 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%이다.
- [0238] 서열 동일성의 정도를 결정하는 방법은 위에서 제공되었다. 특정 실시양태에서, 바로 위에 표시된 바와 같이 하나 이상의 아미노산이 상이한 상기 α -나선 세그먼트 CaD는 서열번호 62에서 동족 α -나선 세그먼트의 α -나선 세그먼트 변이체로 지칭된다.
- [0239] 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드는 베타 배럴 구조를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 이는 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인의 베타 배럴 구조를 갖는다. 특정 실시양태에서, 이는 서열번호 62를 갖는 서열의 베타 배럴 구조를 갖는다.
- [0240] 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인 및 서열번호 62의 서열의 베타 배럴 구조는 11가닥의 베타 배럴로 이루어진다. 상기 베타 배럴의 베타 가닥은 본원에서 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI로 지칭된다. 이들은 제1 측면의 폴리펩티드의 베타 가닥 A-K의 서열번호 62에서 동족 베타 가닥에 상응한다. 베타 배럴의 내부는 가닥 III 및 IV를 연결하는 소수성, 대부분 알파 나선 세그먼트에 의해 횡단된다(traversed). 배럴의 N 말단 절반은 물론 알파-나선 세그먼트에 의해 연결된 두개의 베타 미앤더(meanders)(가닥 I-III 및 IV-VI)로 구성된다. 그런 다음 폴리펩티드 사슬은 배럴의 바닥을 가로질러 도메인의 C-말단 절반에서 5가닥의 그리스 키 모티프를 형성한다.
- [0241] 본원에 사용된 "베타-미앤더"라는 표현은 헤어핀 루프에 의해 함께 연결된 2개 이상의 연속적인 역평행 β -가닥을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "헤어핀 루프"는, 2개 내지 5개 잔기의 짧은 루프에 의해 연결된 2개의 역평행 가닥을 말하며, 그 중 하나는 종종 글리신 또는 프롤린이며, 둘 다 단단한 회전 또는 β -팽창 루프에 필요한 2면각(dihedral-angle) 형태를 가정할 수 있다.
- [0242] 본원에 사용된 "그리스 키"라는 표현은 4개의 인접한 역평행 가닥 및 이들의 연결 루프로 이루어지는 2차 단백

질 구조를 의미한다. 이 구조에서 3개의 역평행 가닥은 헤어핀으로 연결되고, 네번째 가닥은 첫 번째 가닥에 인접하고 세 번째 가닥에 더 긴 루프에 의해 연결된다.

[0243] 따라서, 특정 실시양태에서, 도메인 G2의 변이체의 베타 가닥 A-C 및 베타 가닥 D-F는 베타 미앤더를 형성한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 베타 미앤더는 도메인 G2의 변이체의 α -나선 세그먼트 CαD에 의해 연결된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 도메인 G2의 변이체의 베타 가닥 G-K는 5개 가닥 그리스 키 모티프를 형성한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 도메인 G2의 변이체의 베타 가닥은, 베타 가닥 A 및 F를 제외하고 역평행 방식으로 배열된다.

[0244] 폴리펩티드의 2차 구조, 또는 2개의 아미노산 서열이 동일한 도메인 또는 2차 단백질 구조를 코딩하는지 여부를 결정하는 방법이 위에서 제공되었다.

[0245] II - 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리

[0246] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 복수의 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리에 관한 것으로, 여기서 복수의 폴리펩티드는 하나 이상의 루프 영역의 서열이 상이한 폴리펩티드에 의해 형성된다.

[0247] 본원에 사용된 "폴리펩티드 디스플레이 라이브러리"라는 표현은 상이한 아미노산 서열을 갖는 복수의 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드의 라이브러리 또는 풀을 지칭한다. 라이브러리의 각 폴리펩티드는 본 발명의 제1 측면에서 정의된 바와 같고 하나 이상의 루프 영역의 서열에서 상기 라이브러리의 적어도 또 다른 폴리펩티드와 상이하다.

[0248] 본원에 사용된 "하나 이상의 루프 영역의 서열이 상이한 폴리펩티드"라는 표현은 라이브러리의 각 폴리펩티드는 라이브러리의 적어도 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열과 관련하여 그의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 차이를 나타내고, 여기서 상기 적어도 하나의 차이는 상기 폴리펩티드의 루프 영역의 아미노산 서열에 포함된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 라이브러리의 폴리펩티드는 제1 측면에서 정의된 바와 같은 적어도 하나의 루프 영역 변이체를 포함하는 제1 측면의 폴리펩티드이고, 이는 상기 라이브러리의 다른 폴리펩티드의 해당 루프 영역과 상이하다. 특정 실시양태에서, 상기 루프 영역 변이체는 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 또는 K로 이루어진 군으로부터 선택되고 본 발명의 제1 측면의 "루프 영역 변이체"의 정의 및 실시양태에서 기재된 바와 같다.

[0249] 본원에서 사용된 바와 같이 "라이브러리의 적어도 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열과 관련하여 그것의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 차이를 보여주며, 여기서 상기 서열은 상기 폴리펩티드의 루프 영역의 아미노산 서열에 포함됨"이라는 표현은, 상기 정의된 바와 같이, 라이브러리의 제1 폴리펩티드는 라이브러리의 제2 폴리펩티드에서 상응하는 루프 영역의 아미노산 서열과 관련하여 이의 서열에서 적어도 하나의 아미노산의 적어도 하나의 삽입, 결실 또는 변형을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 AB인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 AB이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 BC인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 BC이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 CD인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 CD이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 DE인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 DE이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 EF인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 EF이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 FG인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 FG이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 GH인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 GH이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 HI인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 HI이다. 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 IJ인 경우, 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제2 폴리펩티드의 루프 영역 IJ이다. 제 1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체가 루프 영역 JK인 경우, 제 2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역은 또한 제 2 폴리펩티드의 루프 영역 JK이다.

[0250] 특정 실시양태에서, 라이브러리의 제1 폴리펩티드의 상기 루프 영역 변이체는 라이브러리의 상기 제2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역과 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%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성 정도를 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 폴리

펩티드의 전체 서열은 제2 폴리펩티드의 전체 서열과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.75%, 적어도 99.9%, 적어도 99.95%, 적어도 99.975%, 적어도 99.98%, 적어도 99.99%, 적어도 99.999% 의 서열 동일성의 정도를 나타낸다. 서열 동일성의 백분율을 결정하는 방법은 본 발명의 제1 측면에서 제공되었다. 특정 실시양태에서, 라이브러리의 제1 폴리펩티드는 라이브러리의 적어도 다른 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역과 관련하여 적어도 2개의 루프 영역, 적어도 3개의 루프 영역, 적어도 4개의 루프 영역, 적어도 5개의 루프 영역, 적어도 6개의 루프 영역, 적어도 7개의 루프 영역, 적어도 8개의 루프 영역, 적어도 9개의 루프 영역, 적어도 10개의 루프 영역, 적어도 11개의 루프 영역의 아미노산 서열의 차이를 나타내며, 라이브러리의 제 2 폴리펩티드라고 칭한다. 제 2 폴리펩티드에서 해당 루프 영역이라는 용어는 제 1 폴리펩티드의 각 루프 영역에 대해 위에 표시된 바와 같다. 아미노산 서열의 차이 역시 위에서 정의한 바와 같다. 추가로, 각각의 상기 아미노산 서열은 또한 상기 표시된 제 2 폴리펩티드의 상응하는 루프 영역의 서열 동일성 정도를 나타낸다.

[0251] 특정 실시양태에서, 라이브러리의 폴리펩티드는 예를 들어, 샘플 내에 근접하여 존재하는 다른 분자, 바람직하게는 펩티드 또는 단백질에 그들의 루프 영역 중 적어도 하나에 의해 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 그들의 상응하는 루프 영역에서 아미노산 서열의 차이를 나타내는 라이브러리의 폴리펩티드는 예를 들어 샘플 내에, 근접하여 존재하는 상이한 분자, 바람직하게는 펩티드 또는 단백질에 특이적으로 결합한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 그들의 결합 능력의 상기 차이는 단순히 하나의 폴리펩티드가 하나의 분자, 바람직하게는 샘플의 펩티드 또는 단백질, 및 하나 이상의 차이가 있는 라이브러리의 다른 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있다는 것으로 구성될 수 있고, 하나 이상의 루프 영역에서 차이가 있는 라이브러리의 다른 폴리펩티드는 그렇지 않다. 대안적으로, 이는 하나의 폴리펩티드는 하나 이상의 분자, 바람직하게는 펩티드 또는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 구성될 수 있고, 반면 하나 이상의 루프 영역에 차이가 있는 라이브러리의 다른 폴리펩티드는 상기 하나 이상의 분자에 특이적으로 결합할 수 없지만, 다른 하나 이상의 분자, 바람직하게는 샘플에 존재하는 펩티드에는 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 라이브러리의 제1 폴리펩티드는 관심 표적 분자, 바람직하게는 관심 펩티드 또는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고, 라이브러리의 제 2 펩티드의 상응하는 루프 영역과 관련하여 그의 서열에서 차이를 나타내는 적어도 하나의 루프 영역 변이체에 의해, 반면 라이브러리의 제 2 폴리펩티드는 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 없다.

[0252] 또 다른 특정 실시양태에서, 라이브러리의 제1 폴리펩티드의 루프 영역 변이체는 표적 펩티드에 특이적으로 결합하는 반면, 서열번호 62의 동족 루프 영역은 상기 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 없다.

[0253] 또 다른 특정 실시양태에서, AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ, JK로부터 선택된 루프 영역 중 하나에서 동일한 루프 영역 변이체를 갖는 폴리펩티드 라이브러리의 폴리펩티드는 상기 루프 영역 변이체를 통해 특정 표적에 펩티드에 특이적으로 결합하는 반면, 상기 특정 루프 영역 변이체를 갖지 않는 라이브러리의 폴리펩티드는 그렇지 않다.

[0254] 용어 "결합하다", "결합하는", "특이적으로 결합하다", "특이적으로 결합하는", "특이적으로 상호작용하다"는 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합, 뿐만 아니라 이러한 결합의 K를 결정하는 방법도 상기 정의에 제공되어 있다.

[0255] 특정 실시양태에서, 표적 분자에 대한 라이브러리의 폴리펩티드의 결합은, 상기 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합이 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수(Kd)를 갖는 경우 특이적인 것으로 간주된다. 유사하게, 루프 영역, 바람직하게는 루프 영역 변이체와 특정 표적 분자 사이의 결합은 상기 루프 영역과 표적 분자 사이의 결합이 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수(KD)를 갖는 경우 특이적인 것으로 간주된다.

[0256] 특정 실시양태에서, 표현형으로서 본 발명의 제 2 측면의 라이브러리의 각 폴리펩티드는, 상기 표현형에 상응하는 유전자형으로서 핵산에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다.

[0257] 본 발명에서 사용될 때 용어 "유전자형"은 하나 이상의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하거나 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 그룹은 상기 유전자형에 상응하는 표현형을 따른다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자형은 단일 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을

코딩하는 단일 핵산 분자에 의해 형성될 수 있다. 이 경우, 상기 표현형은 상기 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질에 의해 일치된다. 상기 핵산은 아래 핵산의 정의에 명시된 임의의 핵산일 수 있다.

- [0258] 특정 실시양태에서, 상기 유전자형은 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 단일 폴리펩티드를 코딩하는 단일 핵산 분자에 의해 형성된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 유전자형은 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 여러 핵산 분자에 의해 형성된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 핵산 분자는 동일한 핵산 서열을 갖는다.
- [0259] 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질이라는 용어의 정의는 본 발명의 제 1 측면에서 제공되었다.
- [0260] 용어 "핵산", "뉴클레오타이드 서열" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의, 리보뉴클레오타이드 포스페이트 에스테르(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시 리보뉴클레오타이드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시시미딘 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자") 또는 이들의 임의의 포스포에스테르 유사체, 예컨대 포스포로티오에이트 및 티오에스테르의 중합체 형태를 지칭하기 위해 본 발명에서 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 이 용어는 단일 가닥 DNA 또는 RNA 분자를 포함한다. 그것은 또한 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 가닥으로 형성된 이중 가닥 분자를 포함한다. 용어 "핵산 서열", 및 특히 DNA 또는 RNA 분자는, 분자의 1차 또는 2차 구조만을 지칭하며 특정 유형의 3차 구조를 제한하지 않는다. 따라서, 이 용어는 선형 또는 원형 DNA 분자, 초나선 DNA 플라스미드 및 염색체에 포함된 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 실시양태에서, 핵산은 DNA 분자이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 RNA 분자이다.
- [0261] 본 발명에서 사용될 때 용어 "표현형"은 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 군을 의미한다. 핵산(들)을 암호화하거나 이를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산(들)은 상기 표현형에 상응하는 유전자형이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 맥락에서, 표현형은 단일 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 구성될 수 있다. 상기 표현형과 관련된 유전자형은 핵산 분자, 또는 이를 암호화하는 핵산 분자 군이다.
- [0262] 특정 실시양태에서, 표현형은 본 발명의 제1 측면 및 본 발명의 이러한 측면에서 상기 정의된 바와 같은 폴리펩티드 라이브러리의 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 이는 상기 정의된 바와 같은 라이브러리의 제1 폴리펩티드이다.
- [0263] 본 발명에서 사용될 때 표현 "상기 표현형에 상응하는 유전자형으로서 핵산에 직접 또는 간접적으로 연결된 표현형"은 이를 코딩하는 핵산(즉, 상기 정의된 유전자형)에 연결된 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 폴리펩티드(즉, 상기 정의된 표현형)로 이해된다. 상기 연결은 상기 라이브러리의 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 핵산(들)에 의해 형성된 복합체를 유도한다. 특정 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 상기 복합체의 외부 표면에 노출된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리는 이를 코딩하는 핵산에 직접 또는 간접적으로 연결된 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 복합체에 의해 형성된다. 상기 폴리펩티드는 표현형으로 간주되고, 상기 핵산은 표현형에 상응하는 유전자형으로 간주된다.
- [0264] 특정 실시양태에서, 라이브러리의 폴리펩티드는 이를 코딩하는 임의의 핵산에 연결되지 않는다.
- [0265] 라이브러리의 각 폴리펩티드는 위에 기재된 복합체의 일부인지 아닌지 간에 "라이브러리의 구성원"으로 지칭된다. 따라서, 본원에 사용된 상기 용어는 라이브러리의 임의의 폴리펩티드를 지칭하며, 여기서 상기 폴리펩티드는 핵산에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있고, 여기서 핵산은 상기 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 코딩하거나 포함하거나, 또는 단순히 그것을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산에 어떤 수단에 의해서도 연결되지 않은 라이브러리의 폴리펩티드일 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 라이브러리의 구성원은 상기 정의된 바와 같은 라이브러리의 폴리펩티드이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 이를 코딩하는 핵산에 직접 또는 간접적으로 연결된 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 복합체이다.
- [0266] 직접 연결은 라이브러리의 폴리펩티드와 이를 코딩하는 핵산 간의 직접적인 상호작용으로 구성되어, 폴리펩티드가 이를 코딩하는 핵산에 결합하거나 공유적으로 부착된 폴리펩티드-핵산 복합체를 생성하며, 여기서 상기 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드-핵산 복합체의 외부 표면에 포함된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 복합체는 또한 추가의 단백질 및/또는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0267] 특정 실시양태에서, 핵산에 대한 복합체의 폴리펩티드의 결합은 직접적이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 간접적이고, 폴리펩티드는 상기 핵산에 결합하는 또 다른 펩티드, 단백질, 단백질 복합체 또는 분자에 의해 이를 코딩하는 핵산에 공유적으로 결합하거나 공유적으로 있도록 한다.

- [0268] 본원에 사용된 용어 "공유 부착된", "공유 부착" 또는 "공유 결합된"은 2개의 분자 사이의 상호작용을 지칭하고, 서로에 대한 화학적 공유 결합을 통해 직접 공유 결합되거나 링커, 브리지 또는 스페이서와 같은 사이에 있는 모이어티 또는 모이어티들을 통해 서로 간접적으로 공유 결합된다.
- [0269] 또 다른 특정 구체예에서, 라이브러리의 폴리펩티드와 이를 암호화하는 핵산 사이의 공유 부착은 직접적이어서, 폴리펩티드는 이를 코딩하는 핵산(들)에 공유 결합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 간접적이고, 폴리펩티드가 링커, 브릿지 또는 스페이서와 같은 사이에 있는 모이어티 또는 모이어티들을 통해 이를 코딩하는 핵산/들에 연결된다. 바람직한 실시양태에서, 이는 링커를 통해 연결된다.
- [0270] 본원에 사용된 용어 "링커 모이어티" 또는 "링커"는 2개의 분자 또는 화합물을 연결하는 분자를 지칭한다. 또한 연결 모이어티는 화학적 성질 및/또는 구조가 제한되지 않으며; 따라서, 연결 모이어티는 그중에서도 특히 다당류, 폴리펩티드, 지방산, 인지질, 또는 이들의 화학적 유도체일 수 있다.
- [0271] 링커를 통해 다른 분자에 공유적으로 부착된 분자 중 적어도 하나, 또는 심지어 상기 분자 둘 모두는 펩티드 결합, 이소펩티드 결합, 아마이드 결합, 이민 결합 등과 같은 임의의 화학 결합을 통해 상기 링커에 결합되는 것으로 추가로 의도된다.
- [0272] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 직접적으로 연결된 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 복합체에 의해 형성되고, 여기서 상기 폴리펩티드-핵산 복합체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0273] - 그를 암호화하는 핵산에 결합하는 라이브러리의 폴리펩티드로 구성된 복합체
 - [0274] - 그를 암호화하는 핵산에 결합하는 라이브러리의 폴리펩티드 및 추가 단백질, 펩티드 및/또는 핵산으로 구성된 복합체,
 - [0275] - 폴리펩티드-핵산 접합체,
 - [0276] - 리보솜, 또는 리보솜의 일부,
- [0277] 본원에 사용된 용어 "접합체"는 2개 이상의 개별 화합물 또는 분자의 공유 부착으로부터 생성되는 임의의 화합물을 지칭하며, 상기 정의된 바와 같은 공유 부착이다. 정의에 따라 상기 접합체는 자연에서 그 자체로 발견되지 않는다.
- [0278] 본 발명의 두 번째 측면의 접합체에 공유적으로 부착된 개별 화합물은 이를 코딩하는 상기 라이브러리 및 핵산의 폴리펩티드이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명의 제2 측면의 접합체는 화학적 공유 결합을 통해 이를 코딩하는 핵산에 직접 부착된 라이브러리의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제2 측면의 접합체는 링커, 브릿지, 스페이서, 모이어티 또는 모이어티들과 같은 사이에 존재하는 모이어티 또는 모이어티들을 통해 이를 코딩하는 핵산에 부착된 라이브러리의 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이들은 링커를 통해 부착된다.
- [0279] 본원에서 사용되는 용어 "리보솜"은 단백질 합성에 필수적인 고도로 복잡한 세포 기계를 의미한다. 리보솜은 메신저 RNA(mRNA) 분자가 지정한 순서대로 아미노산을 연결한다. 이것은 리보솜 RNA(rRNA)로 알려진 특수 RNA와 수십개의 별개 단백질로 구성된다(정확한 수는 종마다 다름). 리보솜 단백질과 rRNAs 는 일반적으로 리보솜의 크고 작은 소단위로 알려진 크기가 다른 두개의 뚜렷한 리보솜 조각으로 배열된다.
- [0280] 본원에 사용된 표현 "리보솜 부분"은 예를 들어 리보솜의 분리된 크기나 작은 서브유닛으로 구성될 수 있는 리보솜의 분리된 부분을 의미한다. 이는 또한 오직 그의 리보솜 단백질의 일부 또는 그의 rRNA의 일부만 포함하는 리보솜을 나타낸다.
- [0281] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제2 측면의 폴리펩티드-핵산 복합체는 그의 외부 표면에 라이브러리의 단 하나의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 그것은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 150, 적어도 250, 적어도 500, 적어도 1×10^3 개의 상기 라이브러리의 폴리펩티드의 카피를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 카피는 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 복합체는 라이브러리의 임의의 다른 폴리펩티드를 포함하지 않는다.

- [0282] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제2 측면의 폴리펩티드-핵산 복합체는 복합체에 포함된 라이브러리의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 단 하나의 핵산을 포함한다. 상기 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드 서열은 상기 실시양태에 명시된 것이다.
- [0283] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제2 측면의 복합체는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90개, 적어도 100개의 상기 복합체에 포함된 상기 라이브러리의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산의 카피를 포함한다. 상기 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드 서열은 상기 실시양태에 명시된 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 핵산은 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는다
- [0284] 간접 연결은 라이브러리의 상기 폴리펩티드와 상기 폴리펩티드와 핵산을 모두 포함하는 미생물에 의해 상기 폴리펩티드와 상기 핵산 사이의 유전적 융합으로 구성된다. 상기 라이브러리의 폴리펩티드는 미생물의 외부 표면에 포함된다. 핵산은 바람직하게는 미생물의 내부 부분에 포함된다
- [0285] 특정 실시양태에서, 상기 미생물은 그의 외부 표면에 상기 라이브러리의 단 하나의 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이는 그의 외부 표면에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 라이브러리의 폴리펩티드의 적어도 100, 적어도 150, 적어도 250, 적어도 500, 적어도 1×10^3 개의 상기 라이브러리의 폴리펩티드의 카피를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 카피는 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 미생물은 라이브러리의 임의의 다른 폴리펩티드를 포함하지 않는다.
- [0286] 또 다른 특정 실시양태에서, 미생물은 상기 미생물에 포함된 라이브러리의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 단 하나의 핵산을 포함한다. 상기 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드 서열은 위의 실시양태에 명시된 것이다.
- [0287] 또 다른 특정 구체예에서, 미생물은 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개 의 미생물에 포함된 라이브러리의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산의 카피를 포함한다. 상기 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드 서열은 상기 실시양태에 명시된 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 핵산은 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는다.
- [0288] 특정 실시양태에서, 미생물은 복제할 수 있다. 특정 실시양태에서, 복제된 미생물은 그것이 유래하는 미생물의 정확한 카피이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 미생물의 복제는 동일한 라이브러리의 폴리펩티드 및 그것이 유래하는 미생물에 포함된 이를 코딩하는 동일한 핵산을 갖는 미생물을 유도한다. 따라서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 미생물의 복제는 라이브러리의 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 핵산의 증폭을 가능하게 한다.
- [0289] 특정 실시양태에서, 미생물은 파지, 박테리오파지, 바이러스, 박테리아 및 효모로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 이는 파지이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이는 박테리오파지이다.
- [0290] 특정 실시양태에서, 박테리오파지는 엔테로박테리아 파지 M13, T4 박테리오파지, T7 박테리오파지, 또는 에스케리키아 람다 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0291] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면에 기재된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 이러한 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [0292] III - 폴리뉴클레오티드, 벡터 및 숙주 세포
- [0293] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 제2 측면에 따른 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0294] 폴리뉴클레오티드라는 용어는 본 발명의 두 번째 측면에서 정의되었다.
- [0295] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이전 측면 중 임의의 것에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제3 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [0296] 제4 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제3 측면에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

- [0297] 본원에 사용된 용어 "백터"는 폴리뉴클레오티드 또는 DNA 분자가 조작되거나 세포 내로 도입될 수 있는 비히클을 의미한다. 백터는 선형 또는 원형 폴리뉴클레오타이드일 수 있거나 더 큰 폴리뉴클레오타이드 또는 바이러스 게놈의 DNA 또는 RNA, 비리온 또는 DNA의 조각 또는 이의 도입을 허용하는 기타 생물학적 구성과 같은 다른 유형의 구조물일 수 있다. 세포, "제조합 백터", "제조합 시스템"이라는 용어는 백터라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0298] 상기 백터는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 정제하기에 적합한 상이한 이중 유기체 내의 폴리뉴클레오타이드 또는 적합한 유전자 구성물 또는 발현 백터의 번식 및 획득에 적합한 클로닝 백터일 수 있기 때문에 당업자는 사용될 수 있는 백터의 유형과 관련하여 제한이 없음을 이해할 것이다.
- [0299] 따라서, 본 발명에 따른 적합한 백터는 pET(예: pET14b)와 같은 원핵생물의 발현 백터, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, pSA3 및 pAT28과 같은 파지 및 서플로미드 백터, 2 마이크로 플라스미드 유형의 백터와 같은 효모에서의 발현 백터, 통합 플라스미드, YEP 백터, 중심체 플라스미드 등, pAC 시리즈 및 pVL 시리즈 백터와 같은 곤충 세포의 발현 백터, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCambia, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 시리즈 백터 등과 같은 식물에서의 발현 백터 및 바이러스 백터 (아데노바이러스, 아데노바이러스 뿐만 아니라 레트로바이러스 및 렌티바이러스) 뿐만 아니라 pSilencer 4.1-CMV(Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/와 같은 비바이러스 백터 HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, p UB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL 및 pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1와 같은 비-바이러스 백터를 포함한다.
- [0300] 본 발명의 백터는 상기 백터에 의해 형질전환, 형질감염 또는 감염될 수 있는 세포를 형질전환, 형질감염 또는 감염시키는 데 사용될 수 있다. 상기 세포는 원핵생물 또는 진핵생물일 수 있다. 예를 들어, 상기 DNA 서열이 도입된 백터는 플라스미드 또는 숙주 세포에 도입될 때, 상기 세포의 게놈에 통합되고 그것이 통합된 염색체(또는 염색체)와 함께 복제되는 백터일 수 있다. 상기 백터는 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 수득될 수 있다(Sambrook 외., 2001, "Molecular cloning, to Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1-3 a)
- [0301] 따라서, 제5 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제3 측면에 따른 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 제4 측면에 따른 백터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0302] 형질전환, 형질감염 또는 감염된 세포는 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 수득될 수 있다(Sambrook 외., 2001, 상기 언급됨). 특정 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 적합한 백터로 형질감염되거나 감염된 동물 세포이다.
- [0303] 본 발명의 제3 측면의 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 제4 측면의 백터를 포함하기에 적합한 숙주 세포는, 제한 없이, 포유동물, 식물, 곤충, 진균 및 박테리아 세포를 포함하며, 이에 한정되지 않는다. 박테리아 세포는 바실러스, 스트렙토마이세스, 리스테리아 및 스태필로코커스 속의 종과 같은 그람-양성 박테리아 세포 및 에스케리키아, 살모넬라 및 슈도모나스 속의 세포와 같은 그람-음성 박테리아 세포를 포함하며, 이에 제한되지는 않는다. 진균 세포는 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시애, 피치아 파스토리스 및 한세울라 폴리모르파와 같은 효모의 세포를 포함한다. 곤충 세포는, 제한 없이 드로소필라 및 Sf9 세포를 포함하며 이에 제한되지는 않는다. 식물 세포에는 곡물, 약용, 관상용 또는 구근 식물과 같은 작물의 세포가 포함된다.
- [0304] 본 발명에서 적합한 포유동물 세포는 상피 세포주(인간, 양, 돼지 등), 골육종 세포주(인간 등), 신경모세포종 세포주(인간 등), 상피 암종(인간 등), 신경교 세포(뮤린 등), 간 세포주(원숭이 등), CHO(중국 햄스터 난소) 세포, COS 세포, BHK 세포, HeLa 세포, 911, AT1080, A549, 293 또는 PER.C6, NTERA-2 인간 ECC 세포, D3 mESC 라인의 세포, HS293와 같은 인간 배아 줄기 세포, BGV01, SHEF1, SHEF2, HS181, NIH3T3 세포, 293T, REH 및 MCF-7 및 hMSC 세포를 포함한다.
- [0305] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1 및 제2 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제3 측면에 동일하게 적용가능하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제1, 제2 및 제3 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제4 측면에 동일하게 적용가능하다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1, 제2, 제3 및 제4 측면의 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제5 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [0306] IV - 본 발명의 집합체
- [0307] 추가 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 집합체에 관한 것이다.

- [0308] (i) 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 폴리펩티드 및
- [0309] (ii) 관심 제제.
- [0310] 접합체의 일부를 형성하고 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체(위의 (i)에 명시된 바와 같음)를 포함하는 폴리펩티드는 또한 "본 발명의 제 6 측면의 접합체의 폴리펩티드", "본 발명의 접합체의 폴리펩티드", 또는 "접합체의 폴리펩티드"로도 지칭된다.
- [0311] 본 발명의 제 6 측면의 접합체의 폴리펩티드에 포함된 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 동등한 변이체는 또한 "접합체의 제1 폴리펩티드", "접합체의 제1 폴리펩티드 영역", "제1 폴리펩티드 영역", 또는 "접합체의 폴리펩티드에 포함된 제1 폴리펩티드 영역" 으로도 지칭된다.
- [0312] 용어 "접합체"는 본 발명의 제 2 측면에서 정의되었다. 본 발명의 제6 측면의 접합체에 공유적으로 부착된 2개의 성분은 접합체의 폴리펩티드 및 관심 제제이다. 이제부터, 본 발명의 제6 측면의 접합체를 "발명의 접합체"라고도 한다.
- [0313] 용어 "폴리펩티드"는 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 용어 "아미노산 잔기"에 대해 본 발명의 제1 측면에서 나타난 정의 및 실시양태는 또한 본 발명의 본 측면에 적용된다.
- [0314] 본원에 사용된 "관심 제제"라는 표현은 접합체의 폴리펩티드에 공유적으로 부착될 수 있는 한, 화학 구조 제한 없이 임의의 화합물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 상기 제제는 치료제이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 영상화제이다. "치료제" 및 "영상화제"라는 용어는 아래 섹션 IV-E.1 및 IV-E.2에 정의되어 있다.
- [0315] *IV.A- 접합체의 제1 폴리펩티드*
- [0316] 본 발명의 접합체는 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 함유한다.
- [0317] 본원에 사용된 용어 "니도겐-1"은 변이체 니도겐 G2 도메인의 맥락에서 위에서 정의되었으며 본 발명의 접합체에 동일하게 적용된다.
- [0318] 본원에 사용된 용어 "니도겐-1의 G2 도메인"은 상기 정의된 바와 같은 단백질 니도겐 1의 도메인 G2를 지칭한다. 천연 니도겐-1 서열에서, G2 도메인은 짧은 EGF-유사 도메인에 의해 측면에 위치한다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해, 니도겐-1 G2 도메인은 Uniprot 데이터베이스(2009년 7월 7일자 버전) (서열번호 62)의 식별 번호 P14543-1을 가지는, 니도겐-1 단백질의 아미노산 서열의 아미노산 번호 430 및 667에 의해 형성되며, N-또는 C-말단에서 EGF-유사 도메인이 결여되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 니도겐 1의 도메인 G2는 서열번호 62(서열번호 63)의 처음 2개의 아미노산이 결핍되어 있고, 따라서, Uniprot 데이터베이스(2009년 7월 7일자 버전)의 식별 번호 P14543-1(서열 번호: 72)를 가지는 니도겐-1 단백질의 아미노산 서열의 아미노산 번호 432 및 667로 구성된 영역에 상응한다.
- [0319] 본원에 사용된 "기능적으로 동등한 변이체"라는 표현은 니도겐-1 G2 도메인의 서열, 바람직하게는 서열번호 63, 보다 바람직하게는 서열번호 62의 서열과 특정 정도의 서열 동일성을 나타내는 모든 펩티드를 지칭하며, 니도겐-1의 G2 도메인의 기능을 실질적으로 유지한다. 본 발명의 제6 측면의 접합체에서 유지되는 도메인 G2의 기능은, 바람직하게는 접합체의 일부가 아닐 때, 상기 도메인의 3차 구조로 간주된다. 따라서, 도메인 G2의 상기 기능적으로 동등한 변이체는 바람직하게는 그것이 접합체의 일부가 아닐 때, 니도겐-1의 도메인 G2의 3차 구조를 실질적으로 유지한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 유지될 G2 도메인의 3차 구조는 바람직하게는 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인의 3차 구조이다. 상기 구조는 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다.
- [0320] 본원에 사용된 "실질적으로 유지되는"이라는 표현은, 니도겐-1의 도메인 G2의 구조가, 바람직하게는 니도겐-1의 G2의 베타 배럴 도메인의 구조는, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 적어도 99.9%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 99%, 훨씬 더 바람직하게는 100%로 유지되는 것으로 이해된다.
- [0321] 백분율로 표시될 때, 단백질 도메인의 3차 구조의 유지는 상기 도메인의 3차 구조 내에서 도메인의 나머지 아미노산에 대해 그들의 상대적인 위치를 유지하는 도메인으로부터 아미노산의 백분율로 이해된다. 단백질의 원자 좌표를 결정할 수 있는 단백질의 3차 구조를 결정하는 방법은 해당 분야의 전문가에게 잘 알려져 있으며, 원편

광 이색성(circular dichroism), X선 결정학 또는 단백질 NMR을 포함한다.

- [0322] 특정 실시양태에서, 도메인 G2의 기능적으로 등가인 변이체는, 일단 본 발명의 제6 측면의 접합체에 혼입되면, 상기 표시된 니도겐-1의 도메인 G2 구조의 백분율을 실질적으로 유지한다. 바람직한 실시양태에서, 이는 접합체의 일부가 아닐 때 실질적으로 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 실질적으로 유지되는 도메인 G2의 구조는 본 발명의 제1 측면에 기재된 니도겐-1의 도메인 G2의 베타 배럴 도메인의 구조이다. 특정 실시양태에서, 접합체의 제1 폴리펩티드인 경우 니도겐-1 도메인 G2의 베타 배럴 도메인의 구조이다.
- [0323] 특정 실시양태에서, 서열번호 62를 갖는 니도겐 1의 G2 도메인과 기능적으로 등가인 변이체 사이의 서열 동일성의 정도는 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9% 이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 서열번호 63을 갖는 니도겐 1의 G2 도메인과 기능적으로 동등한 변이체 사이의 서열 동일성 정도는 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8%, 또는 적어도 99.9% 이다. 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성의 정도를 결정하는 방법이 본 발명의 제1 측면에서 제공되었다.
- [0324] 접합체 내로 일단 혼입되더라도, 접합체의 제1 폴리펩티드 영역은 니도겐의 도메인 G2의 세포적 또는 생리학적 기능을 유지할 필요가 없다. 따라서, 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체이며, 일단 이것이 본 발명의 융합 단백질에 혼입되면 생리학적 기능이 감소된다.
- [0325] 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체이며, 이는 G2 니도겐-1 도메인 또는 접합체 외부의 G2 니도겐-1 도메인의 베타 배럴 도메인의 생리학적 기능을 갖지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 생리학적 기능이 이미 감소된 니도겐의 G2 도메인의 기능적으로 동등한 변이체이고, 니도겐-1의 야생형 G2 도메인, 또는 니도겐-1의 G2 도메인의 야생형 베타 배럴 도메인과 비교하여, 이미 본 발명의 접합체에 통합되기 전이다. 보다 바람직하게는, 제1 폴리펩티드 영역은 니도겐-1의 G2 도메인 또는 니도겐-1의 G2 도메인의 야생형 베타 배럴 도메인의 생리학적 기능 중 어느 것도 갖지 않는 단백질이고, 불활성화 돌연변이의 존재로 인해 이미 본 발명의 접합체에 통합되기 전이다.
- [0326] 본원에 사용된 "생리학적 기능" 또는 "세포 기능"이라는 표현은 세포 또는 유기체 내의 펩티드의 기능을 지칭한다. 따라서, 니도겐-1의 도메인 G2의 생리학적 기능, 또는 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인의 생리학적 기능을 언급할 때, 니도겐-1 단백질의 일부일 때 상기 도메인의 기능으로 이해된다. 따라서 이것은 단백질 니도겐-1이 세포에 참여하는 생화학적 경로 또는 분자 메커니즘에서 도메인의 역할을 나타낸다. 따라서 이는 세포, 세포 외부 또는 다른 세포의 외부 표면에서 세포의 특정 펩티드 또는 단백질과 상호작용하는 도메인의 능력과 직접적으로 관련이 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 이는 그의 통상적인 단백질 결합 파트너와 상호작용하는 G2 도메인 또는 G2 도메인의 베타 배럴 도메인의 능력을 지칭한다. 그러한 결합 파트너의 비제한적인 예는 콜라겐 IV 및 펠레칸을 포함한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 접합체의 제1 폴리펩티드는 니도겐-1의 G2 도메인과의, 또는 니도겐 -1의 G2 도메인의 일반적 결합 파트너와 함께 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인과의, 또는 바람직하게는 콜라겐 IV 및/또는 펠레칸과 함께 니도겐-1의 G2 도메인의 베타 배럴 도메인과의 상호작용을 억제하는 돌연변이를 포함하는 니도겐-1의 도메인 G2의 기능적으로 동등한 변이체이다.
- [0327] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 접합체의 제1 폴리펩티드는 불활성인 니도겐-1의 G2 도메인의 기능적으로 등가인 변이체이다. 특정 실시양태에서, 이는 접합체에 일단 혼입되면 불활성이다. 또 다른 구체적으로, 이는 접합체에 혼입되기 전에 이미 불활성이다.
- [0328] 본원에 사용된 용어 "비활성"은 폴리펩티드, 단백질, 단백질의 단편 또는 도메인으로 언급될 때, 생리학적 또는 생물학적 활성이 없거나 생물학적 기능을 위한 다른 거대분자 및 알려진 치료 활성(예: 항종양 활성)이 없는 단백질의 단편 또는 도메인과 함께 특이적으로 상호작용하는 능력이 없는 폴리펩티드, 단백질, 단백질의 단편 또는 도메인으로 이해된다. 접합체의 불활성 폴리펩티드 부분은 비반응성이며 관심 제제의 결합을 위한 물리적 구조로서 기능한다. 불활성 폴리펩티드는 자체적으로 고유의 효소적, 생리학적 또는 생물학적 활성을 갖는 모티프를 포함하지 않으며, 그들은 면역 반응성을 나타내지 않으며, 이는 적응성 또는 선천성 면역 반응을 자극하지 않음을 의미한다.
- [0329] 일반적으로, 접합체의 제1 폴리펩티드의 임의의 고유 활성은 본 발명의 목적과 무관하고 관심 제제의 생물학적

활성에 기여하지도 방해하지도 않는 것으로 의도된다.

- [0330] 특정 실시양태에서, 접합체의 제1 폴리펩티드는 본 발명의 제1 측면에 기재된 임의의 폴리펩티드와 같은 니도겐-1의 G2 도메인의 기능적으로 동등한 변이체이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드는 본 발명의 제1 측면에 기재된 폴리펩티드 중 임의의 것과 같은 니도겐-1의 G2 도메인의 기능적으로 동등한 변이체이다.
- [0331] 또 다른 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 Uniprot 데이터베이스에 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)로 정의된 인간 니도겐-1의 서열과 관련하여 아미노산 430 내지 667에 상응하는 서열을 가지며, 즉 이는 서열번호 62를 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)로 Uniprot 데이터베이스에 정의된 인간 니도겐-1의 서열과 관련하여 아미노산 432 내지 667에 상응하는 서열을 가지며, 즉 이는 서열번호 63을 갖는다.
- [0332] 또 다른 특정 실시양태에서, 접합체의 제1 폴리펩티드는 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)을 사용하여 UniProt 데이터베이스 하에서 정의된 인간 니도겐-1의 서열의 넘버링과 관련하여, 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469 및 518에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함하는 니도겐-1의 도메인 G2의 기능적으로 동등한 변이체이다. 따라서, 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드는 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)을 사용하여 UniProt 데이터베이스에 정의된 인간 니도겐-1의 서열 넘버링과 관련하여 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469, 518 에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 돌연변이를 포함하는 니도겐-1의 도메인 G2의 기능적으로 동등한 변이체이다.
- [0333] 본원에 사용된 용어 "돌연변이"는 아미노산 서열에서 아미노산의 임의의 변형 또는 결실, 또는 아미노산 서열에서 아미노산 앞 또는 뒤에 적어도 하나의 아미노산의 삽입을 지칭한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 아미노산의 변형 또는 결실의 위치는 상기 돌연변이 이전의 아미노산 서열에서 변형 또는 결실된 아미노산의 위치에 의해 지칭된다. 특정 실시양태에서, 돌연변이가 삽입인 경우, 상기 돌연변이의 위치는 삽입된 아미노산(들)의 N-말단에 있는 아미노산을 참조하여 정의된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 돌연변이가 삽입인 경우, 상기 돌연변이의 위치는 삽입된 아미노산(들)의 C-말단에 있는 아미노산을 참조하여 정의된다. 따라서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 상기 표시된 단백질 서열의 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469 및 518에서 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 수탁 번호 P14543-1(2009년 7월 7일자 버전)의 UniProt 데이터베이스 하에 정의된 인간 니도겐-1의 아미노산 서열에서 상기 위치에 있는 아미노산의 변형 또는 결실을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 이는 하나 이상의 상기 아미노산의 C-말단에서 하나 이상의 아미노산의 삽입을 지칭한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 하나 이상의 상기 아미노산의 N-말단에서 하나 이상의 아미노산의 삽입을 지칭한다.
- [0334] 바람직한 실시양태에서, 돌연변이는 아미노산 변형이다. 특정 실시양태에서, 상기 표시된 위치 459에서의 돌연변이는 H459A 돌연변이이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 표시된 위치 468에서의 돌연변이는 R468N 돌연변이이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 표시된 위치 639에서의 돌연변이는 F639S 돌연변이이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 표시된 위치 650에서의 돌연변이는 R650A 돌연변이이다.
- [0335] 따라서, 특정 실시양태에서, 상기 접합체의 제1 폴리펩티드에서 상기 표시된 위치 459, 468, 639 또는 650에서의 하나 이상의 돌연변이는 H459A 돌연변이, R468N 돌연변이, F639S 돌연변이 또는 R650A 돌연변이이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드에서 상기 표시된 위치 459, 468, 639 또는 650에서의 하나 이상의 돌연변이는 H459A 돌연변이, R468N 돌연변이, F639S 돌연변이 또는 R650A 돌연변이이다.
- [0336] 접합체의 제1 폴리펩티드 영역에 포함될 수 있는 적합한 니도겐 G2 도메인 변이체는 NIDOm2, NIDOm3, NIDOm3-V45T, NIDOm3_V121Q, NIDOm3-F157E, the NIDOm3-V215T, NIDOm4, NIDOm4_T215V, NIDOm5, NIDOm3-V176T, NIDOm3-I200T, NIDOm3-V236Y, NIDOm3-L237T, NIDOm3-S65I, NIDOm3-R114I, NIDOm3-C214S, NIDOm3-S65I_R114I, NIDOm5-S65I_R114I, NIDOm3-S65I_R114I 및 NIDOm5-S65I_R114I 를 운반하는 변이체를 포함하여 본 발명의 제1 측면의 맥락에서 상기 정의된 임의의 니도겐 G2 도메인 변이체를 포함하며 이에 제한되지 않으며, 각각 서열번호 64, 65 및 87 내지 104로 정의된 바와 같다.
- [0337]
- [0338] *IV-B. 접합체의 제 2 폴리펩티드 영역*
- [0339] 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드는 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역을

임의로 포함한다.

[0340] 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제 2 폴리펩티드 영역은 또한 "접합체의 두번째 폴리펩티드", "접합체의 두번째 폴리펩티드 영역", "두번째 폴리펩티드 영역" 또는 "접합체의 폴리펩티드에 포함된 두번째 폴리펩티드 영역"으로도 지칭됩니다.

[0341] "특이적으로 결합하는" 이라는 표현은 본 발명의 두번째 측면에서 정의되었다. 특정 실시양태에서, 접합체의 제 2 폴리펩티드는 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수(KD)로 상기 표적에 결합하는 경우, 관심 표적에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 폴리펩티드가 표적 분자에 결합할 수 있는지 여부를 결정하는 방법 및 상기 결합의 해리 상수를 결정하는 방법은 본 발명의 제 2 측면에서 "특이적으로 결합하는"의 정의에 제공된다.

[0342] 특정 실시양태에서, 본 발명의 접합체 내의 제2 폴리펩티드 영역은 세포 수용체에 대한 리간드이다. 용어 "세포 수용체", 또는 "세포 표면의 수용체"는 "리간드"에 결합하는 세포 관련 단백질을 의미한다. 세포 수용체 및 특이적 수용체에 대한 특이적 리간드인 관심 제제의 비제한적 실시예 또는 그들이 결합하는 세포 유형은 아래 표 2에 표시된 것과 같다.

리간드	세포 수용체 /세포 유형 또는 미생물
메토트렉세이트 또는 아미노프테린을 포함한 엽산 또는 엽산 표적 리간드	백혈구 내 엽산 수용체
히알루론산 (HA)	CD44
링갈립틴을 포함하는 크산틴 스캐폴드	상처섬유아세포의 섬유아세포활성화 단백질(FAP)
IgG Fc	<i>S.aureus</i> 의 단백질 A
Her 2 의 리간드는 당엽계에 잘 알려져 있으며, 하기에서 설명된 것 중 하나일 수 있다; Wikman M et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Orlova A et al. Cancer Res 66: 4339-8 (2006); Ahlgren S et al., Bioconjug Chem 19: 235-43 (2008); Feldwisch J et al., J Mol Biol 398: 232-47 (2010); 다음의 특허번호의 US 특허: 5,578,482; 5,856,110; 5,869,445; 5,985,553; 6,333,169; 6,987,088; 7,019,017; 7,282,365; 7,306,801; 7,435,797; 7,446,185; 7,449,480; 7,560,111; 7,674,460; 7,815,906; 7,879,325; 7,884,194; 7,993,650; 8,241,630; 8,349,585; 8,389,227; 8,501,909; 8,512,967; 8,652,474; 및 U.S. 특허출원 US20110059090A1)	HER2
CRPPR 펩티드	심장 내피 세포
안지오텐신	안지오텐신 II 유형 1 (AT1) 수용체
다음과 같은 인터루킨-6(IL-6)에 대한 리간드: -Su JL et al. (Cancer Res. 2019 Jul 15;79(14):3791) 에 설명된 서열번호 74 (LSLITRL)를 가지는 S7 펩티드, -Weiergräber O et al. (FEBS Lett. 1996 Jan 29;379(2):122-6 에 설명된 IL6 리간드 서열번호:75 를가짐(WQDPHSWNSSFYRLRFELRYAERSKTFITW), 인터루킨-6 수용체 (IL-6R); PDGF; 안지오프이오텐틴; 안지오프이오텐틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 av 베타 3, av 베타 5, 및 a5 베타 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리스로포이오텐틴; 보체 인자 D; TNFa; HtrA1; a VEGF 수용체; ST-2 수용체; 및 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, C3a, HtrA1, ARMS2, TIMP3, HLA, 인터루킨-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1, 및 TNFRSF10A 와 같은 노화-관련된 황반변성(AMD) 위험과 유전적으로 연결된 단백질	망막 색소 상피의 세포와 같은 눈의 세포.

[0343]

비트로넥틴, 피브로넥틴, C1q 와 같은 보체 성분(이의 구성요소 폴리펩타이드 사슬 A, B 및 C 중 임의의 것을 포함), C3d, C3b 및 C4b 와 같은 보체 단편, 만노스 결합 단백질, 컨글루티닌, 계면활성제 단백질 A 및 D, C-반응성 단백질(CRP), 알파 2-마크로글로불린을 포함하는 오피온, 및 면역글로불린, 예를 들어 면역글로불린의 Fc 부분	미생물(바이러스, 박테리아 세포, 곰팡이 세포, 원생동물)
만노스-결합 렉틴 (MBL)	미생물(바이러스, 박테리아 세포, 곰팡이 세포, 원생동물)

[0344]

[0345]

표 2. 본 발명에서 사용하기에 적합한 리간드 및 상기 리간드가 결합하는 수용체, 세포 또는 미생물. 왼쪽 칼럼에는 특정 수용체에 결합하는 특정 리간드가 제공된다. 왼쪽 칼럼의 특정 행에 제공된 각 리간드가 결합하는 수용체는 오른쪽 칼럼의 동일한 행에 표시된다. 대안적으로, 상기 수용체를 포함하는 세포, 또는 상기 수용체를 포함하는 미생물이 표시된다.

[0346]

특정 실시양태에서, 접합체의 제2 폴리펩티드는 표 2에 제공된 리간드의 군으로부터 선택된다.

[0347]

특정 실시양태에서, 관심 표적은 세포 표면의 수용체이고 접합체의 제2 폴리펩티드는 상기 세포에서 접합체의 내재화를 촉진할 수 있다. 접합체의 두 번째 폴리펩티드를 언급할 때 "상기 세포에서 접합된 접합체의 내재화 촉진"이라는 표현은 상기 폴리펩티드의 결합에 반응하여 세포내이입(endocytosis)을 겪는 세포 표면의 수용체에 결합하는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 결합 특이성은 접합체의 제2 폴리펩티드 및 이를 포함하는 접합체의 나머지를 상기 수용체를 발현하는 세포, 조직 또는 기관으로 전달할 수 있게 한다. 이러한 방식으로, 상기 폴리펩티드 영역을 포함하는 접합체는 동물에게 투여되거나 시험관내에서 상이한 유형의 세포 집단과 접촉될 때 상기 세포에 특이적으로 지시될 것이다.

[0348]

본 명세서에서 "내재화"는 분자 또는 분자를 포함하는 구조물이 세포막의 외부 표면 상의 표적 요소에 결합하여 생성된 복합체가 세포에 의해 내재화되는 과정을 의미한다. 내재화는 세포질 내에서 생성된 복합체의 해리로 이어질 수 있다. 표적 요소는 분자 또는 구조물과 함께, 특정 세포 구획에 국한될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 접합체의 제 2 폴리펩티드는 내재화를 촉진하는 것 외에도 접합체의 엔도솜 탈출을 촉진할 것이다.

[0349]

본원에 사용된 표현 "엔도솜 탈출을 촉진한다"는 수용체-매개 세포내이입에 의한 내재화 후 엔도솜 구획으로부터 접합체의 방출을 유도하는 접합체의 제2 폴리펩티드의 능력을 지칭한다.

[0350]

접합체의 제2 폴리펩티드가 결합하는 수용체를 발현하는 세포에 의해 내재화되는 본 발명의 접합체의 능력은, 접합체의 폴리펩티드가 GFP와 같은 형광 단백질을 포함하는 경우 형광 방법에 의해 편리하게 측정될 수 있다. 이러한 융합 단백질은 접합체의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 형광 단백질이 프레임 내 융합되고 적절한 숙주 세포 또는 유기체에서 발현되는 재조합 핵산을 제조함으로써 얻을 수 있다. 그런 다음 융합 단백질을 전술한 수용체를 발현하는 세포의 배양물과 적절한 시간 동안 또는 생체내에서 상기 수용체를 발현하는 조직과 접촉시킨 후 형광 현미경을 사용하여 구조물이 세포에 침투했는지 여부를 결정할 수 있다. 세포질에서 형광의 존재는 형광 단백질에서 얻은 형광 현미경 이미지를 알려진 세포질 염색으로 얻은 것과 비교하여 추가로 조사할 수 있다.

[0351]

훨씬 더 많은 수의 수용체-특이적 리간드를 갖는 광범위한 흡수 수용체 및 캐리어가 당업계에 공지되어 있다.

[0352]

제2 폴리펩티드에 의해 표적화될 수 있는 수용체의 비제한적인 예는 상기에 제공되었다.

[0353]

특정 실시양태에서, 접합체의 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이다.

[0354]

"다중양이온성 펩티드", 또는 본원에 사용된 "다중양이온성 영역"은 다중의 양전하 아미노산을 함유하는 폴리펩티드 서열에 해당한다. 다중양이온성 펩티드는 양전하아미노산에 의해서만 형성될 수 있거나 pH 7에서 영역의 전체 순전하가 양전하인 경우 다른 아미노산을 함유할 수 있다.

[0355]

아미노산 및 이들의 상응하는 아미노산 잔기는 측쇄에 따라 상이한 성질을 가지며, 이러한 성질에 따라 분류될 수 있다는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 생리학적 pH에서 5개의 아미노산은 전하를 나타낸다: 아르기닌, 히스티딘, 라이신은 양으로 하전되고 아스파라긴산과 글루탐산은 음으로 하전된다. 당업자는 본 발명의 다중양이온성 펩티드가 생리학적 pH 조건에서 하나 이상의 양전하의 순 전하를 갖는 폴리펩티드에 상응한다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 2개 이상의 순 양전하를 초래하기에 항상 충분한

양으로 하전된 아미노산 잔기가 존재하는 한, 하나 이상의 음전하를 띤 아미노산 잔기의 존재에 의해 제한되지 않는다.

[0356] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0357] (i) 세포 표면 상의 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있고 상기 세포 상의 접합체의 내재화를 촉진할 수 있는 서열,

[0358] (ii) 아르기닌-풍부 서열,

[0359] (iii) GW-H1 펩티드,

[0360] (iv) CD44 리간드,

[0361] (v) 혈뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드,

[0362] (vi) 세포 투과 펩티드 및

[0363] (vii) 뉴클레올린-결합 펩티드.

[0364] (i) 세포 표면의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고 상기 세포에서 접합체의 내재화를 촉진할 수 있는 서열

[0365] 본원에 사용된 용어 "세포 표면 상의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고 상기 세포 상의 접합체 내재화를 촉진할 수 있는 서열"은 상기 정의된 바와 같이, 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 서열을 지칭하며, 여기서 상기 표적은 상기 정의된 바와 같은 세포 표면 상의 수용체이고, 상기 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드는 상기 정의된 바와 같은 상기 세포 상의 접합체의 내재화를 촉진한다.

[0366] 접합체의 제 2 폴리펩티드에 대해 상기 제공된 실시양태는 또한 상기 다중양이온성 펩티드에 적용된다.

[0367] 본 발명의 다중양이온성 펩티드에 의해 표적화될 수 있는 수용체의 비제한적 예, 바람직하게는 상기 언급된 세포 표면 상의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 서열은 상기 제공된 임의의 세포 수용체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 수용체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: CXCR4 수용체, 안지오텐신 수용체, 붐베신 수용체, 브래디키닌 수용체, 칼시토닌 수용체, 케모카인 수용체, 콜레시스토키닌 수용체, 코르티코트로핀-방출 인자 수용체, 엔도텔린 수용체, 에프린 수용체, 포르밀펩티드 수용체, 프리즐드 수용체, 갈라닌 수용체, 성장 호르몬 분비 촉진수용체 (Ghrelin) 수용체, 키스펩틴 수용체, 멜라노코르틴 수용체, 뉴로펩티드 FF/뉴로펩티드 AF 수용체, 뉴로펩티드 S 수용체, 뉴로펩티드 W/뉴로펩티드 B 수용체, 뉴로펩티드 Y 수용체, 뉴로텐신 수용체, 오렉신 수용체, 펩티드 P518 수용체, 소마토스타틴 수용체, 타키키닌 수용체, 톨(Toll)-유사 수용체, 바소프레신 및 옥시토신 수용체 및 VEGF 수용체.

[0368] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 세포 표면 상의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고 상기 세포 상의 접합체의 내재화를 촉진할 수 있는 서열을 포함하는 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이다.

[0369] 본원에 사용된 용어 "CXCR4"는 G 단백질-결합된 7개 막횡단 케모카인 수용체를 지칭한다. 다른 케모카인 수용체와 마찬가지로, CXCR4는 방향 이주를 중재함으로써 면역 및 염증 반응에서 중요한 역할을 하며, 백혈구 CXCR4의 활성화는 유방, 전립선, 폐, 난소, 결장, 결장직장, 췌장, 신장 및 뇌뿐만 아니라 비-호지킨(Hodgkin's) 림프종 및 만성 림프구성 백혈병을 비롯한 다양한 암 세포주 및 조직에서 발현되거나 과발현된다. CXCR4에 대해 알려진 유일한 리간드는 간질 세포-유래 인자-1(SDF-1 또는 CXCL12)이다. CXCR4와 SDF-1 사이의 상호작용은 종양 성장, 침습, 혈관 신생 및 전이를 포함한 종양 형성의 여러 단계에서 중요한 역할을 한다.

[0370] "특이적으로 결합하는"이라는 표현은 본 발명의 두 번째 측면에서 정의되었다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 사용된 "CXCR4에 특이적으로 결합하는"이라는 표현은 다른 분자에 실질적으로 결합하지 않고 대체 수용체 또는 세포에서 수행하는 것보다 더 긴 기간 및/또는 더 큰 친화도로 CXCR4 또는 이를 발현하는 세포에 대해 보다 빈번하게, 보다 신속하게 결합하는 본 발명의 접합체의 능력을 지칭한다.

[0371] 결합 친화도는 예를 들어, 본 발명의 두 번째 측면에서 "특이적으로 결합하는"의 정의에 제공된 임의의 방법에 의해 측정되며, 바람직하게는, Tamamura et al. 오일 쿠션 방법[Hesseltgess et al, 1998, J.Immunol., 160:877-883 참조] 측정된다. 상기 방법은 펩티드를 CXCR4-형질감염된 세포주(예를 들어, CHO 세포) 및 표지된 CXCR4 리간드(예를 들어, ¹²⁵I-SDF-1 α)와 접촉시키고 표지된 CXCR4 리간드의 결합에 대한 표적 펩티드의 억제 백분율을 측정하는 것을 포함한다.

- [0372] 특이적 결합은 예를 들어 적어도 약 10^{-4} M의 Kd를 갖는 저친화도 표적화제에 의해 나타날 수 있고, 예를 들어, CXCR4가 리간드에 대해 하나 이상의 결합 부위를 갖는 경우, 저 친화도를 갖는 리간드가 표적화에 유용할 수 있다. 특이적 결합은 또한 고친화성 리간드에 의해 나타날 수 있고, 적어도 약 10^{-7} M, 적어도 약 10^{-8} M, 적어도 약 10^{-9} M, 적어도 약 10^{-10} M의 Kd를 가지는 리간드, 또는 적어도 약 10^{-11} M 또는 10^{-12} M 이상의 Kd를 가질 수 있다. 낮은 친화도 표적 리간드와 높은 친화도 표적 리간드는 모두 본 발명의 접합체에서 통합에 유용하다.
- [0373] CXCR4를 발현하는 세포에 의해 내재화되는 본 발명의 접합체의 능력은 접합체가 임의의 세포 수용체에 결합하는 접합체의 임의의 제2 폴리펩티드에 대해 상기 나타낸 바와 같이 GFP와 같은 형광 단백질을 포함하는 형광 방법에 의해 결정될 수 있다. 보다 구체적으로, CXCR4를 발현하는 세포에 의해 내재화되는 접합체는 다중양이온성 펩티드 및 형광 단백질을 코딩하는 핵산이 프레임 내 융합되고 적절한 숙주 세포 또는 유기체에서 발현되는 재조합 핵산을 제조함으로써 수득될 수 있다. 그런 다음 융합 단백질을 적절한 시간 동안 CXCR4를 발현하는 세포의 배양물과 또는 생체내에서 CXCR4를 발현하는 조직과 접촉시킨 후 형광 현미경을 사용하여 구조물이 세포를 침투했는지 여부를 결정할 수 있다. 세포질에서 형광의 존재는 형광 단백질에서 얻은 형광 현미경 이미지를 알려진 세포질 염색으로 얻은 것과 비교하여 추가로 조사할 수 있다.
- [0374] 본 발명의 보다 더 바람직한 실시양태에서, CXCR4 리간드는 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12 펩티드(서열번호 27), vCCL2 펩티드(서열번호 28), EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 기능적으로 등가인 이의 변이체, 예를 들어, 서열번호 132의 펩티드를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0375] 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25)은 T22 펩티드의 아미노산 서열이다. 상기 펩티드는 단백질 폴리페무신 II(*Lyulmus polyphemus*로부터 혈구 파편에서 추출된)에서 유래된 펩티드에 해당한다. vCCL2는 인간 헤르페스바이러스 8에 의해 코딩된 인간 케모카인 CCL2의 상동체인 바이러스 대식세포 염증성 단백질-II에 해당한다. V1 펩티드는 vCCL2의 N-말단의 잔기 1-21에 해당한다. CXCL12, C-X-C 모티프 케모카인 12(기질 세포 유래 인자 1(SDF1)라고도 함)는 전-염증 매개체 역할을 하는 케모카인 계열의 구성원이다. 4가지 펩티드 모두 Liang, X. 2008. Chem. Biol. Drug. Des. 72:91-110에 나타난 바와 같이 CXCR4 수용체와 상호작용하는 것으로 알려져 있다.
- [0376] EPI-X4는 인간 혈청 알부민(HSA)의 잔기 408-423에 해당한다. 또한 CXCR4 수용체에 결합하는 것으로 설명되었다(Zirafi 외., 2015, Cell reports, 11:1-11). 한 실시양태에서, 더 높은 수용체 친화도 및 혈청 안정성을 가지는 최적화된 EPI-X4 탠덤 버전(서열 번호 132)이 사용된다.
- [0377] 한 실시양태에서, 다중양이온성 펩티드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다:
- [0378] - 서열 $RRX_1CYRKX_2PYRX_3CR$ (서열번호 41)을 갖는 T140 펩티드, 여기서 X_1 은 L-3-(2-나프틸)알라닌이고, X_2 는 D-Lys이고, X_3 은 L-시트룰린이고,
- [0379] - 서열 $RRX_1CYX_2KX_3PYRX_4CR$ (서열번호 42)을 갖는 TN14003 펩티드, 여기서 X_1 은 L-3-(2-나프틸)알라닌이고, X_2 는 L-시트룰린이고, X_3 은 dLys이고, X_4 는 L-시트룰린이고,
- [0380] - 서열 $RRX_1CYEKX_2PYRX_3CR$ (서열번호 43)을 갖는 TC14012 펩티드, 여기서 X_1 은 L-3-(2-나프틸)알라닌이고, X_2 는 D-시트룰린이고, X_3 은 L-시트룰린이고,
- [0381] - 서열 $RRX_1CYX_2KX_3PYRX_4CR$ (서열번호 44)을 갖는 TE14011 펩티드, 여기서 X_1 은 L-3-(2-나프틸)알라닌이고, X_2 는 L-시트룰린이고, X_3 은 D-Glu이고, X_4 는 L-시트룰린이고,
- [0382] - 서열 $RRX_1CYX_2KX_3PYRX_4CR$ (서열번호 45)을 갖는 TZ14011 펩티드, 여기서 X_1 이 L-3-(2-나프틸)알라닌이고, X_2 가 L-시트룰린이고, X_3 이 D-Lys이고, X_4 가 L-시트룰린인 또는 그들의 변이체이고 여기서 N-말단 아르기닌 잔기는 아세틸화됨(Ac-TZ14011로 알려짐),
- [0383] 용어 "기능적 변이체" 및 "기능적으로 등가인 변이체"는 상호교환가능하며, 변형, 삽입, 및/또는 하나 이상의 아미노산의 결실에 의해 T22, V1, CXCL12, vCCL2 및/또는 EPI-X4 펩티드로부터 유래된 모든 펩티드로서 본원에서 이해되며 단, CXCR4에 대한 결합 및 접합체 내재화 기능이 실질적으로 유지된다.
- [0384] 한 실시양태에서, 양이온성 폴리펩티드의 기능적으로 등가인 변이체는 인간 T22, V1, CXCL12 vCCL2 및/또는

EPI-X4 펩티드에 대해 동일성 정도를 나타내는 변이체이고, 그들 각각의 서열번호에 따르면, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 이상이다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 정도를 결정하는 방법이 본 발명의 제1 측면에서 제공되었다. 본 발명의 양이온성 폴리펩티드는 글리코실화, 아세틸화, 이소프레닐화, 미리스토일화, 단백질 프로세싱 등과 같은 번역후 변형을 포함할 수 있다.

[0385] 대안적으로, 양이온성 폴리펩티드의 적합한 기능적 변이체는 하나 이상의 위치가 상기 언급된 T22, V1, CXCL12, vCCL2 및/또는 EPI-X4 펩티드에 존재하는 아미노산의 보존적 치환인 아미노산을 함유하는 것들이다. "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체함으로써 발생한다. 예를 들어, 다음 6개 군은 각각 서로에 대한 보존적 치환인 아미노산을 포함한다: 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신(K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W). 이러한 보존적 아미노산 치환의 선택은 당업자의 기술 범위 내에 있으며, 예를 들어 Dordo 외. [J. Mol. Biol., 1999, 217:721-739] 및 Taylor 외., [J. Theor. Biol., 1986, 119:205-218]에 의한다.

[0386] 주어진 펩티드가 그의 기능적으로 동등한 변이체로 보일 수 있는지 여부를 결정하기 위한 적합한 분석법은 예를 들어 다음 분석법이다: 추정 T22, V1, CXCL12, vCCL2 또는 EPI-X4 펩티드 변이체가 마커 폴리펩티드(예: 형광 단백질)와 프레임 내에서 융합된다. 이러한 융합 단백질은 펩티드 및 형광 단백질을 코딩하는 핵산이 프레임 내에서 융합되고 적절한 숙주 세포 또는 유기체에서 발현되는 재조합 핵산을 재조합함으로써 얻을 수 있다. 그런 다음 상기 융합 단백질을 적절한 시간 동안 세포 CXCR4(예: HeLa 세포)의 배양물과 접촉시킨 후 형광 현미경을 사용하여 구조물이 세포에 침투했는지 여부를 결정할 수 있다. 상기 펩티드가 상응하는 펩티드의 기능적으로 동등한 변이체인 경우, 마커 단백질은 내재화되고 상기 세포의 세포질에서 형광의 존재가 보일 것이다. 또한, 기능적으로 등가인 변이체의 성능은 형광 단백질에서 얻은 형광 현미경 이미지를 알려진 세포질 염색(예: DAPI)으로 얻은 형광 현미경 이미지와 비교하여 분석할 수 있다.

[0387] (ii) 아르기닌-풍부 서열

[0388] 전술한 바와 같이, 아르기닌 아미노산 및 그 잔기는 생리학적 pH에서 양전하를 나타낸다. "아르기닌-풍부 서열"은 다중 아르기닌 잔기를 함유하는 폴리펩티드 서열을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 폴리펩티드 서열은 33%, 바람직하게는 40%, 바람직하게는 45%, 바람직하게는 50%, 바람직하게는 55%, 바람직하게는 60%, 바람직하게는 65%, 바람직하게는 70%, 바람직하게는 75%, 바람직하게는 80%, 바람직하게는 85%, 더욱 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95%, 훨씬 더 바람직하게는 99%, 훨씬 더 바람직하게는 100%의 아르기닌 잔기로서 그의 완전한 서열의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 아르기닌-풍부 서열의 서열이 아르기닌 잔기로서 서열의 100% 미만을 포함할 때마다, 이들 잔기는 서로에 대해 모두 인접하거나 인접할 필요가 없다는 것이 이해될 것이다.

[0389] 당업자는 생리학적 pH에서 폴리펩티드의 총 양전하가 2 이상인 한, 하나 이상의 아르기닌 잔기를 갖는 폴리펩티드가 다중양이온성 펩티드임을 인식할 것이며, 이는 아르기닌 잔기의 양전하 뿐만 아니라 다른 양전하를 띤 아미노산에서도 유래한다.

[0390] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 아르기닌-풍부 서열이다.

[0391] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드의 아르기닌-풍부 서열은 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32 및 서열번호 33으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0392] (iii) GW-H1 펩티드

[0393] GW-H1 펩티드는 이전에 Chen과 동료들에 의해 기술되었다[Chen, Y-L.S. 외. 2012. 펩티드, 36:257-265]. GW-H1 펩티드는 항균 펩티드로 처음 선택되었지만 세포막에 결합하고 자신을 세포질로 내부화하고 진핵 세포의 핵으로 이동하는 능력을 또한 특징으로 한다. 일단 세포 내부에 들어가면, GW-H1은 세포자멸사를 유도할 수 있다. GW-H1은 양친매성 나선으로 접힘으로써 세포용해 활성을 발휘하는 것으로 제안되었다[Chen 및 colleagues, supra]. 따라서 이 펩티드는 세포막에 결합한 후 투과화되는 두 가지 순차적인 이벤트에 의해 그의 세포 용해 효과를 발휘하는 것으로 추정된다.

[0394] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 서열 46을 갖는 GW-H1 펩티드이다.

[0395] (iv) A CD44 리간드

- [0396] CD44는 세포-세포 및 세포-기질 상호작용, 세포 부착 및 이동에 관여하는 세포-표면 막형단 당단백질이다. CD44는 염증 및 암과 같은 질병에 연루되어 있다[Bajorath, J. 2000. Proteins. 39:103-111]. 세포 특이적 방식으로 발현되고 또한 차등적으로 글리코실화된 많은 동형(isoforms)이 알려져 있다.
- [0397] 따라서, "CD44 리간드"는 CD44에 결합할 수 있는 분자일 것이다. CD44는 세포의 기질의 성분인 히알루론산에 대한 주요 표면 수용체이지만 콘드로이틴 설페이트, 피브로넥틴, 오스테오펀틴, 세르글리신, 콜라겐 및 라미닌의 헤파린 결합 도메인과 같은 다른 리간드를 가지고 있다. 게다가, CD44는 메탈로프로티나제 및 셀렉틴과도 또한 상호작용할 수 있다.
- [0398] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 CD44 리간드이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, CD44 리간드는 A5G27(서열번호 34) 및 FNI/II/V(서열번호 35)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0399] 펩티드 FNI/II/V는 피브로넥틴의 HBFN-단편 V에 해당한다. 펩티드 A5G27은 라미닌의 $\alpha 5$ 사슬의 펩티드에 해당한다[Pesarrodona, M.외. 2014. Int. J. of Pharmaceutics. 473:286-295].
- [0400] (v) 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드
- [0401] 뇌 병리학에 대한 치료적 접근의 개발에 대한 하나의 주요 장애물은 혈액-뇌 장벽(BBB)이라는 것은 당업계에 잘 알려져 있다. 뇌는 혈액뇌 장벽(BBB)과 혈액뇌척수액 장벽(BCSFB)의 두 가지 장벽 시스템의 존재에 의해 잠재적인 독성 물질로부터 보호된다. BBB는 그의 표면적이 BCSFB보다 약 5000배 더 크기 때문에 혈청 리간드의 흡수를 위한 주요 경로로 간주된다. BBB를 구성하는 뇌 내피는, CNS의 많은 장애에 대한 잠재적인 약물의 사용에 대한 주요 장애물을 나타낸다. 일반적으로 작은 친유성 분자만 BBB를 통과할 수 있다. 즉, 순환하는 전신 혈액에서 뇌로 이동할 수 있다. 더 큰 크기 또는 더 높은 소수성을 갖는 많은 약물이 CNS 장애를 치료하기 위한 동물 연구에서 유망한 결과를 보여준다.
- [0402] 따라서 "혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드"는 혈액 급류에서 CNS로 자신과 결합된 분자, 바람직하게는 단백질 수송할 수 있는 펩티드가 될 것이다.
- [0403] 1983년에 펩티드인 β -카소모르핀-5가 BBB를 극복할 수 있다는 보고가 있었다[Ermisch, A. 외. 1983. J. of Neurochemistry. 41:1229-1233]. 그 이후로 BBB 투과 특성을 가진 많은 다른 펩티드가 확인되고, 특성화 및 목록화되었으며 Van Dorpe 외. [Van Dorpe, S. 외. 2012. 뇌 구조. 기능. 217:687-718]에 의해 보고된 바와 같이 2012년에 포괄적인 데이터베이스가 구축되었다. 전술한 데이터베이스에 나열된 대부분의 펩티드는 본 발명의 접합체에 적합하다.
- [0404] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드는 Seq-1-7(서열번호 36), Seq-1-8(서열번호 37), 및 안지오펀-2-7(서열번호 38)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0405] (vi) 세포 투과 펩티드(CPP)
- [0406] 용어 "세포 투과 펩티드"(CPP)는 분자 화물, 특히 이들이 일부인 단백질의 세포 흡수를 촉진할 수 있는, 일반적으로 길이가 약 5-60개 아미노산 잔기인 펩티드를 지칭한다. 단백질은 하나 이상의 CPPs를 나타낼 수 있다. CPP는 또한 지질 이중층, 세포막, 세포 소기관 막, 소포막 또는 세포벽 중 하나 이상을 가로질러/통과하는 분자 화물의 이동 또는 횡단을 촉진할 수 있는 것으로 특징지어질 수 있다. 여기서 CPP는 다중양이온성일 것이다.
- [0407] 본원에서 유용한 CPPs의 실시예 및 일반적으로 CPPs에 대한 추가 설명은 Schmidt 외. [2010. FEBS Lett. 584:1806-1813], Holm 외. [2006. Nature Protocols 1:1001-1005], Yandek 외. [2007. Biophys. J. 92:2434-2444], Morris 외. [2001. Nat. Biotechnol. 19:1173-1176]. 및 미국 특허 출원 공개 번호 2014/0068797에 기재되어 있다. CPP는 수송체나 수용체에 의존하지 않으며, 임의의 다른 세포 성분에 의한 참여필요 없이 지질 이중층을 통해 직접적으로 일부인 단백질의 이동을 촉진한다.
- [0408] (vii) 뉴클레올린-결합 펩티드
- [0409] 따라서, "뉴클레올린-결합 펩티드"는 세포 내의 뉴클레올린 단백질, 바람직하게는 뉴클레올린의 세포 표면 발현 분획에 결합할 수 있는 펩티드이다.
- [0410] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 다중양이온성 펩티드는 뉴클레올린-결합 펩티드이다.
- [0411] 번호 WO 2011/031477 A2의 국제 특허 출원 공개는 본 발명의 접합체에 사용하기에 적합한 뉴클레올린-결합 펩티

드의 수많은 예를 제공한다.

- [0412] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 뉴클레올린-결합 펩티드는 서열번호 47의 서열의 펩티드 또는 서열번호 48의 서열의 펩티드이다.
- [0413] IV- C. 접합체의 제 3 폴리펩티드 영역
- [0414] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드는 양으로 하전된 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역을 추가로 포함한다.
- [0415] 양으로 하전된 아미노산-풍부 영역이고 접합체의 폴리펩티드에 포함되는 제3 폴리펩티드 영역은 또한 "접합체의 제3 폴리펩티드", "접합체의 제3 폴리펩티드 영역", "제3 폴리펩티드 영역" 또는 "접합체의 폴리펩티드에 포함된 제3 폴리펩티드 영역"으로도 지칭된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, "접합체의 제3 폴리펩티드", "접합체의 제3 폴리펩티드 영역" 또는 "접합체의 폴리펩티드에 포함된 제3 폴리펩티드 영역"이라는 표현은 "양으로 하전된 아미노산-풍부 영역"과 상호교환가능하다.
- [0416] 본원에 사용된 용어 "양으로 하전된 아미노산", "양으로 하전된 아미노산-풍부 영역" 또는 "양으로 하전된 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역"은 접합체의 제 3 폴리펩티드의 폴리펩티드 서열을 말하며, 제2 폴리펩티드와 상이하고, 접합체 영역으로서, 다중의 양으로 하전된 아미노산을 함유하는 것을 특징으로 한다. 또한, 양으로 하전된 아미노산-풍부 영역은 양으로 하전된 아미노산에 의해 독점적으로 형성될 수 있거나 pH 7에서 영역의 전체 순전하가 양인 경우 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 따라서, 양으로 하전된 아미노산이 풍부한 영역 서열은 33%, 바람직하게는 40%, 바람직하게는 45%, 바람직하게는 50%, 바람직하게는 55%, 바람직하게는 60%, 바람직하게는 65%, 바람직하게는 70%, 바람직하게는 75%, 바람직하게는 80%, 바람직하게는 85%, 더 바람직하게는 90%, 더 바람직하게는 95%, 보다 더 바람직하게는 99%, 보다 더 바람직하게는 100%의 양으로 하전된 아미노산 잔기로서 그의 완전한 서열의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0417] 양으로 하전된 아미노산이 풍부한 영역은 한 가지 유형의 양전하 아미노산만을 포함할 수도 있고, 한 가지 이상의 양전하 아미노산을 포함할 수도 있다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리히스티딘 영역이다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리아르기닌 영역이다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 라이신 및 아르기닌 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 라이신 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부한 영역은 아르기닌 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부한 영역은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0418] 일부 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 또는 적어도 15개의 양전하 아미노산 잔기를 포함하며, 여기서 양전하 아미노산은 히스티딘, 라이신, 아르기닌 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0419] 일부 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 100 미만, 90 미만, 80 미만, 70 미만, 60 미만, 50 미만, 40 미만, 30 미만, 29 미만, 28 미만, 27 미만, 26 미만, 25 미만, 24 미만, 23 미만, 22 미만, 21 미만, 20 미만, 19 미만, 18 미만, 17 미만, 16 미만, 15 미만, 14 미만, 13 미만, 12 미만, 11 미만, 10 미만 또는 10 미만의 양전하 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 양전하 아미노산은 히스티딘, 라이신, 아르기닌 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0420] 일부 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 2 내지 50개의 아미노산, 2 내지 40개의 아미노산, 2 내지 30개의 아미노산, 2 내지 25개의 아미노산, 2 내지 20개의 아미노산, 2 내지 10개의 아미노산 또는 2 내지 8개의 아미노산을 포함한다.
- [0421] 일부 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 3 내지 50개의 아미노산, 3 내지 40개의 아미노산, 3 내지 30개의 아미노산, 3 내지 25개의 아미노산, 3 내지 20개의 아미노산, 3 내지 10개의 아미노산 또는 3 내지 8개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양으로 하전된 아미노산-풍부 영역은 4 내지 50개의 아미노산, 4 내지 40개의 아미노산, 4 내지 30개의 아미노산, 4 내지 25개의 아미노산, 4 내지 20개의 아미노산, 4 내지 10개의 아미노산 또는 4 내지 8개 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양전하 아미노산-풍부 영역은 5 내지 50개 아미노산, 5 내지 40개 아미노산, 5 내지 30개 아미노산, 5 내지 25개 아미노산, 5 내지 20개 아미노산, 5개 내지 10개의 아미노산 또는 5 내지 8개의 아미노산을 포함한다.

- [0422] 본 발명의 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리히스티딘 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리히스티딘 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의, 인접한 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0423] 본 발명의 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 양으로 하전된 아미노산-풍부 영역은 폴리아르기닌 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리아르기닌 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 인접 아르기닌 잔기를 포함한다.
- [0424] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리로신 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리로신 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 연속적인 폴리로신 잔기를 포함한다.
- [0425] 특정 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 RKRKRK(서열번호 77), RRRRRR(서열번호 78), KKKKKK(서열번호 79), HHHHHH(서열번호 80), RHRHRH(서열번호 80), RHRHRH(서열번호 81), RKRKRKRK(서열번호 82), RKRHRK(서열번호 83), RKRHRH(서열번호 84), RHRHRH(서열번호 85) 또는 RKRKRKRK(서열번호 86)이다.
- [0426] *IV-D. 접합체의 폴리펩티드 요소 및 연결 요소의 상대적 위치*
- [0427] 본 발명의 접합체의 폴리펩티드의 상이한 요소(접합체의 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드)는 제 2 폴리펩티드가 제공되는 경우 임의의 상대적인 순서로 배치될 수 있으며, 여기서 상기 폴리펩티드는 바람직하게는 다중양이온성 펩티드이고, 제 3 폴리펩티드(또는 양전하 아미노산-풍부 영역)는 접합체의 임의의 위치에서 기능적이고 또한 제1 폴리펩티드는 전체적으로 또는 부분적으로 기능적으로 유지된다(즉, 니도젠-1의 G2 도메인의 구조를 실질적으로 유지함).
- [0428] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 폴리펩티드의 "N-말단", "N-말단", 및 "아미노-말단" 폴리펩티드의 용어는 불분명하다. 마찬가지로, 용어 "C-말단", "C-말단" 및 "카르복시-말단"은 동등한 것으로 간주된다. 이 용어는 단백질에 포함된 폴리펩티드 사슬의 말단에 있는 아미노산의 자유 모이어티와 관련하여 당업자에게 일반적으로 사용된다.
- [0429] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 접합체의 제 2 폴리펩티드는 접합체의 폴리펩티드의 N-말단 말단에 위치하는 반면, 양전하 아미노산-풍부 영역(즉, 접합체의 제 3 폴리펩티드)은 폴리펩티드는 폴리펩티드의 C-말단에 위치한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드의 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리펩티드의 N-말단 말단에 위치하는 반면, 제2 폴리펩티드 영역은 폴리펩티드의 C-말단 말단에 위치한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 접합체의 폴리펩티드의 C-말단 또는 N-말단에 위치할 수 있는 반면, 제2 폴리펩티드는 폴리펩티드의 중간 위치에 있고 양전하 아미노산-풍부한 영역은 제1 폴리펩티드 영역 반대편에 있는 폴리펩티드의 끝에 있거나, 양전하 아미노산-풍부한 영역은 폴리펩티드의 중간 위치에 있고 제 2 폴리펩티드는 제 1 폴리펩티드 영역의 반대쪽에 있는 폴리펩티드의 끝에 위치한다.
- [0430] 따라서, 본 발명에 따른 접합체의 폴리펩티드 요소의 상대적인 순서는 다음과 같을 수 있다:
- [0431] • N-두번째 폴리펩티드 영역-첫번째 폴리펩티드 영역 - 양전하 아미노산-풍부 영역-C;
- [0432] • N-양전하 아미노산-풍부한 영역-첫번째 폴리펩티드 영역-두번째 폴리펩티드 영역-C;
- [0433] • N-두번째 폴리펩티드 영역 - 양전하 아미노산-풍부 영역-첫번째 폴리펩티드 영역 -C;
- [0434] • N-양전하 아미노산-풍부한 영역- 번째 폴리펩티드 영역-첫번째 폴리펩티드 영역-C;
- [0435] • N-첫번째 폴리펩티드 영역 - 두번째 폴리펩티드 영역 - 양전하 아미노산-풍부 영역-C; 또는
- [0436] • N-첫번째 폴리펩티드 영역 - 두번째 폴리펩티드 영역 - 양전하 아미노산-풍부 영역-C; 또는
- [0437] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드에서 요소의 순서는 상기 지시된 것들 중 임의의 것이다.
- [0438] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드에서 요소의 순서는 N-제 2 폴리펩티드 영역 - 제 1 폴리펩티드 영역 - 양전하 아미노산-풍부한 영역 -C이다.
- [0439] "N-말단 끝" 및 "C-말단 끝"이라는 용어는 구성 요소가 말단에서 말단으로 직접 접합되어야 함을 의미하지 않지만, 그러나 링커/스페이서와 같이 구성 요소의 말단에 또는 구성 요소 사이에 삽입된 추가 요소의 존재 여부에

관계없이 위치의 상대적 순서를 유지한다.

- [0440] 따라서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드는 전술한 요소((1) 제2 폴리펩티드 영역, (2) 제1 폴리펩티드 영역 및 (3) 양전하 아미노산 풍부한 영역)를 포함하고, 이들은 말단-대-말단 접합될 수 있을 뿐만 아니라 또한 바람직하게는 펩티드 결합에 의해 연결된, 그들 사이에 삽입된 하나 이상의 선택적 펩티드 또는 폴리펩티드 "링커" 또는 "스페이스"를 포함할 수 있다.
- [0441] 본 발명에 따르면, 스페이스 또는 링커 아미노산 서열은 성분 (1) 및 (2), 및 (2) 및 (3) 사이의 힌지 영역으로 작용하여, 개별 도메인의 3차원 형태를 유지하면서 서로 독립적으로 이동할 수 있게 하며, 펩티드 스페이스 또는 링커의 존재가 성분 (1), (2) 및 (3)의 어느 것의 기능성을 변경시키지 않는다.
- [0442] 이러한 의미에서, 본 발명에 따른 바람직한 중간체 아미노산 서열은 이러한 이동을 허용하는 구조적 연성을 특징으로 하는 힌지 영역일 것이다. 특정 실시양태에서, 상기체 중간 아미노산 서열은 유연성 링커이다. 링커 영역의 효과는 성분 (1) 및 (2), 및 (2) 및 (3) 사이에 공간을 제공하는 것이다. 따라서 성분 (1), (2) 또는 (3)의 2차 및 3차 구조는 다른 성분의 존재에 의해 영향을 받지 않는다. 스페이스는 폴리펩티드 성질을 가진다. 링커 펩티드는 바람직하게는 적어도 2개의 아미노산, 적어도 3개의 아미노산, 적어도 5개의 아미노산, 적어도 10개의 아미노산, 적어도 15개의 아미노산, 적어도 20개의 아미노산, 적어도 30개의 아미노산, 적어도 40개의 아미노산, 적어도 50개 아미노산, 적어도 60개 아미노산, 적어도 70개 아미노산, 적어도 80개 아미노산, 적어도 90개 아미노산 또는 대략 100개 아미노산을 포함한다.
- [0443] 스페이스 또는 링커는 공유 결합에 의해, 바람직하게는 펩티드 결합에 의해 본 발명의 접합체의 폴리펩티드의 2개의 성분을 플랭킹하는 성분에 결합될 수 있고; 그리고 또한 바람직하게는 스페이스는 본질적으로 비작용성이고, 및/또는 단백질 분해 절단을 일으키지 않고/또는 임의의 시스템인 잔기를 포함하지 않는다. 유사하게, 스페이스의 3차원 구조는 바람직하게는 선형 또는 실질적으로 선형이다.
- [0444] 스페이스 또는 링커 펩티드의 바람직한 예는 결합된 펩티드의 기능을 실질적으로 악화시키지 않고 또는 적어도 결합된 펩티드 중 하나의 기능을 실질적으로 악화시키지 않으면서 단백질을 결합하는 데 사용된 것을 포함한다. 보다 바람직하게는 펩티드 결합에 사용되는 스페이스 또는 링커는 코일형 코일 구조를 포함한다.
- [0445] 링커 펩티드의 바람직한 예는 글리신, 세린, 알라닌 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 아미노산을 포함한다. 유연성 링커의 바람직한 예는 폴리글리신 링커이다. 링커/스페이스 서열의 가능한 예는 GGSSRSS(서열번호 39), GGSSRSSS(서열번호 76), SGGTSGSTSGTGST(서열번호 49), AGSSTGSSTGPGSTT(서열번호 50) 또는 GGSGGAP(서열번호 51)을 포함한다. 이들 서열은 설계된 코일형 코일을 다른 단백질 도메인에 결합하는 데 사용되어 왔다[Muller, K.M., Arndt, K.M. 및 Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328: 261-281]. 적합한 링커의 추가의 비제한적 예는 아미노산 서열 GGGVEGGG(서열번호 52)를 포함하고, 뮤린 IgG3의 상부 힌지 영역의 10개 아미노산 잔기의 서열(PKPSTPPGSS, 서열번호 53)을 포함하고, 이는 코일형 코일(Pack, P. and Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584), 서열 APAETKAEPMT의 펩티드(서열번호 54), 서열 GAP의 펩티드, 서열 AAA의 펩티드 및 서열 AAAL의 펩티드(서열번호 55)에 의해 이량화된 항체의 생산에 사용되어왔다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 링커는 GGSSRSS(서열번호 39)이다.
- [0446] 대안적으로, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드의 성분은 프로테아제에 대한 절단 표적을 함유하는 서열의 펩티드에 의해 연결될 수 있고, 따라서 임의의 성분의 분리를 허용한다. 본 발명의 접합체의 폴리펩티드로의 혼입에 적합한 프로테아제 절단 부위는 엔테로키나제(절단 부위 DDDDK, 서열번호 56), 인자 Xa(절단 부위 IEDGR, 서열번호 57), 트롬빈(절단 부위 LVPRGS, 서열번호 58), TEV 프로테아제(절단 부위 ENLYFQG, 서열번호 59), PreScission 프로테아제(절단 부위 LEVLFQGP, 서열번호 60), 인테인 등을 포함한다.
- [0447] 바람직한 실시양태에서, N-말단 위치의 폴리펩티드는 링커, 바람직하게는 상기 제공된 링커의 임의의 예로부터 선택된 링커에 의해 접합체의 폴리펩티드의 중간 위치에 있는 폴리펩티드와 연결된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 중간 위치에 있는 폴리펩티드는 링커, 바람직하게는 상기 제공된 링커의 예 중 임의의 것 중에서 선택된 링커에 의해 접합체의 폴리펩티드의 C-말단 위치에 있는 폴리펩티드와 연결된다.
- [0448] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 링커를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 링커를 통해 양전하 아미노산- 풍부한 영역에 연결된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 링커를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결되고, 제1 폴리펩티드 영역은 또한 링커를 통해 양전하 아미노산-풍부한 영역에 결합된다.
- [0449] 따라서 특정 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 영역은 제1 펩티드 링커를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결되고 및

/또는 제1 폴리펩티드 영역은 제2 펩티드 링커를 통해 제3 폴리펩티드 영역에 연결된다.

- [0450] 특정 실시양태에서, 제1 펩티드 링커는 GGSSRSS 서열(서열번호 39) 서열, GGSSRSSS(서열번호 76), 또는 GGGNS 서열(서열번호 40)을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이는 GGSSRSS 서열(서열번호 39)을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이는 GGSSRSS(서열번호 39)를 포함한다.
- [0451] 당업자가 인지하는 바와 같이, 제2 폴리펩티드를 제1 폴리펩티드 영역에 연결하고 제1 폴리펩티드 영역을 양전하 아미노산-풍부한 영역에 연결하는 링커는 전술한 제한을 갖는 동일한 서열 또는 상이한 서열을 포함할 수 있으며, 링커의 존재 및/또는 서열이 제 2 폴리펩티드, 제 1 폴리펩티드 영역 및/또는 양전하 아미노산-풍부한 영역의 기능적 변경을 일으키지 않는다(예를 들어, 접합체의 폴리펩티드의 2차 또는 3차 구조 변형 또는 이황화 결합의 형성으로 인한 것이지만 이에 국한되지 않음).
- [0452] 접합체의 폴리펩티드 요소의 N-말단에서 C-말단까지의 상대적 위치에 관한 전술한 고려 사항은 그들의 수 또는 그 사이에 어떤 요소가 배치되는지에 관계없이 그들 사이에 링커가 있는 경우에도 적용된다. 따라서 요소의 가능한 조합 및 상대적 순서는 다음과 같다(여기서 요소에 대해 위에서 언급한 넘버링은 유지됨: (1) 제 2 폴리펩티드, (2) 제 1 폴리펩티드, (3) 양전하 아미노산-풍부한 영역):
- [0453] • N-(1)-(2)-(3)-C
 - [0454] • N-(1)-링커-(2)-(3)-C
 - [0455] • N-(1)-(2)-링커-(3)-C
 - [0456] • N-(1)-링커-(2)-링커-(3)-C
 - [0457] • N-(3)-(2)-(1)-C
 - [0458] • N-(3)-링커-(2)-(1)-C
 - [0459] • N-(3)-(2)-링커-(1)-C
 - [0460] • N-(3)-링커-(2)-링커-(1)-C
 - [0461] • N-(2)-(1)-(3)-C
 - [0462] • N-(2)-링커-(1)-(3)-C
 - [0463] • N-(2)-(1)-링커-(3)-C
 - [0464] • N-(2)-링커-(1)-링커-(3)-C
 - [0465] • N-(2)-(3)-(1)-C
 - [0466] • N-(2)-링커-(3)-(1)-C
 - [0467] • N-(2)-(3)-링커-(1)-C
 - [0468] • N-(2)-링커-(3)-링커-(1)-C
 - [0469] • N-(1)-(3)-(2)-C
 - [0470] • N-(1)-(3)-링커-(2)-C
 - [0471] • N-(1)-링커-(3)-(2)-C
 - [0472] • N-(1)-링커-(3)-링커-(2)-C
 - [0473] • N-(3)-(1)-(2)-C
 - [0474] • N-(3)-링커-(1)-(2)-C
 - [0475] • N-(3)-(1)-링커-(2)-C
 - [0476] • N-(3)-링커-(1)-링커-(2)-C
 - [0477] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드의 링커는 서열 GGSSRSS(서열번호 39) 또는 GGGNS 서열(서열번호 40)을 포함한다.

- [0478] 바람직한 실시양태에서, N-말단 위치의 폴리펩티드는 프로테아제 절단 부위를 통해, 바람직하게는 위에서 제공된 프로테아제 절단 부위의 임의의 예로부터 선택된 프로테아제 절단 부위를 통해 접합체의 폴리펩티드의 중간 위치에 있는 폴리펩티드와 연결된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 중간 위치의 폴리펩티드는 프로테아제 절단 부위를 통해, 바람직하게는 상기 제공된 절단 부위의 임의의 예로부터의 프로테아제 절단 부위를 통해 접합체의 C-말단 위치에 있는 폴리펩티드와 연결된다.
- [0479] 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 프로테아제 절단 부위를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역은 프로테아제 절단 부위를 통해 양전하 아미노산-풍부한 영역에 연결된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 프로테아제 절단 부위를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결되고, 제1 폴리펩티드 영역은 또한 프로테아제 절단 부위를 통해 양전하 아미노산-풍부한 영역에 결합된다.
- [0480] 당업자가 인지하는 바와 같이, 제2 폴리펩티드를 제1 폴리펩티드 영역에 연결하고 제1 폴리펩티드 영역을 양전하 아미노산-풍부한 영역에 연결하는 프로테아제 절단 부위는 전술한 제한을 갖는 동일한 서열 또는 상이한 서열을 포함할 수 있으며 따라서 프로테아제 절단 부위의 존재 및/또는 서열이 제 2 폴리펩티드, 첫 번째 폴리펩티드 영역 및/또는 양전하 아미노산-풍부한 영역의 기능적 변경을 초래하지 않는다.(예를 들어, 접합체의 폴리펩티드의 2차 또는 3차 구조 변형 또는 이황화 결합의 형성).
- [0481] 접합체의 폴리펩티드 요소의 N-말단에서 C-말단까지의 상대적 위치에 관한 앞서 언급한 고려 사항은 이들 사이에 프로테아제 절단 부위가 있는 경우에도 그것들의 수 또는 그 사이에 어떤 요소가 배치되는지에 관계없이 적용된다. 따라서 요소의 가능한 조합 및 상대적 순서는 다음과 같다(여기서 요소에 대해 위에서 언급한 넘버링은 유지됨: (1) 제 2 폴리펩티드, (2) 첫 번째 폴리펩티드, (3) 양전하 아미노산-풍부한 영역):
- [0482] • N-(1)-(2)-(3)-C
 - [0483] • N-(1)-프로테아제 절단 부위-(2)-(3)-C
 - [0484] • N-(1)-(2)-프로테아제 절단 부위-(3)-C
 - [0485] • N-(1)-프로테아제 절단 부위-(2)-프로테아제 절단 부위-(3)-C
 - [0486] • N-(3)-(2)-(1)-C
 - [0487] • N-(3)-프로테아제 절단 부위(2)-(1)-C
 - [0488] • N-(3)-(2)-프로테아제 절단 부위-(1)-C
 - [0489] • N-(3)-프로테아제 절단 부위-(2)-프로테아제 절단 부위-(1)-C
 - [0490] • N-(2)-(1)-(3)-C
 - [0491] • N-(2)-프로테아제 절단 부위-(1)-(3)-C
 - [0492] • N-(2)-(1)-프로테아제 절단 부위-(3)-C
 - [0493] • N-(2)-프로테아제 절단 부위-(1)-프로테아제 절단 부위-(3)-C
 - [0494] • N-(2)-(3)-(1)-C
 - [0495] • N-(2)-프로테아제 절단 부위-(3)-(1)-C
 - [0496] • N-(2)-(3)-프로테아제 절단 부위-(1)-C
 - [0497] • N-(2)-프로테아제 절단 부위-(3)- 프로테아제 절단 부위 -(1)-C
 - [0498] • N-(1)-(3)-(2)-C
 - [0499] • N-(1)-(3)-프로테아제 절단 부위-(2)-C
 - [0500] • N-(1)-프로테아제 절단 부위-(3)-(2)-C
 - [0501] • N-(1)-프로테아제 절단 부위-(3)-프로테아제 절단 부위-(2)-C
 - [0502] • N-(3)-(1)-(2)-C

- [0503] · N-(3)-프로테아제 절단 부위-(1)-(2)-C
- [0504] · N-(3)-(1)-프로테아제 절단 부위-(2)-C
- [0505] · N-(3)-프로테아제 절단 부위-(1)-프로테아제 절단 부위-(2)-C
- [0506] 특정 실시양태에서, 접합체는 접합체의 2개의 폴리펩티드를 연결하는 링커, 및 접합체의 다른 2개의 폴리펩티드를 연결하는 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 이 경우, 접합체 요소의 N-말단에서 C-말단까지의 상대적 위치에 관한 전술한 고려사항은 링커 및 이들 사이의 프로테아제 절단 부위의 존재하에서도 이들의 수 또는 그들 사이에 어떤 요소가 배치되는지에 관계없이 또한 적용된다. 따라서 요소의 가능한 조합 및 상대적 순서는 다음과 같다(여기서 요소에 대해 위에서 언급한 넘버링은 유지됨: (1) 제 2 폴리펩티드, (2) 제 1 폴리펩티드, (3) 양전하 아미노산-풍부한 영역):
- [0507] · N-(1)-링커 -(2)- 프로테아제 절단 부위 -(3)-C
- [0508] · N-(1)-프로테아제 절단 부위 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0509] · N-(1)- 링커 -(2)- 프로테아제 절단 부위 -(3)-C
- [0510] · N-(1)- 프로테아제 절단 부위 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0511] · N-(2)- 링커 -(1)- 프로테아제 절단 부위 -(3)-C
- [0512] · N-(2)- 프로테아제 절단 부위 -(1)- 링커 -(3)-C
- [0513] · N-(2)- 링커 -(3)- 프로테아제 절단 부위 -(1)-C
- [0514] · N-(2)- 프로테아제 절단 부위 -(3)- 링커 -(1)-C
- [0515] · N-(1)- 링커 -(3)- 프로테아제 절단 부위 -(2)-C
- [0516] · N-(1)- 프로테아제 절단 부위 -(3)- 링커 -(2)-C
- [0517] · N-(3)- 링커 -(1)- 프로테아제 절단 부위 -(2)-C
- [0518] · N-(3)- 프로테아제 절단 부위 -(1)- 링커 -(2)-C
- [0519] 바람직한 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드에서 요소의 조합 및 상대적 순서는 N-(1)-링커 -(2)-프로테아제 절단 부위 -(3)-C이다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 링커를 통해 제1 폴리펩티드 영역에 연결되고, 제1 폴리펩티드는 프로테아제 절단 부위를 통해 제3 폴리펩티드 영역에 연결된다.
- [0520] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 링커는 서열 GGSSRSS(서열번호 39), GGSSRSSS(서열번호 76), 또는 GGGNS 서열(서열번호 40), 바람직하게는 서열 GGSSRSS(서열번호 39)를 포함한다.

[0521] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제 6 측면의 집합체는 하기 요소를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다:

제 2 폴리펩티드	제 1 펩티드 링커	제 1 폴리펩티드	제 3 폴리펩티드
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	Nid (238 아미노산) (서열번호 62)	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	Nid (236 아미노산) 서열번호 63	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	서열번호 6 에 정의된 Nidomut2(238 아미노산)	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	서열번호 65 에 정의된 NidoMut2(236 아미노산)	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut3 또는 서열번호 88-91 또는 95-102 중 하나	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut4	헥사히스티딘 (서열번호 73)
T22 (서열번호 27)	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut5 또는 서열번호 102-105 중 하나	헥사히스티딘 (서열번호 73)
최적화된 EPI-X4 (서열번호. 29)	GGSSRSS (서열번호:39)	서열번호 64 에 정의된 Nidomut2(238 아미노산)	헥사히스티딘 (서열번호 73)
서열 RKRKRK (서열번호 133)의 양전하 영역에 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	서열번호 65 에 정의된 NidoMut2(236 아미노산)	헥사히스티딘 (서열번호 73)
서열 RKRKRK (서열번호 133)의 양전하 영역에 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut3 또는 서열번호 88-91 또는 95-102 중 하나	헥사히스티딘 (서열번호 73)

[0522]

서열 RKRKRK (서열번호:133) 의 양전하 영역에 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut4	헥사히스티딘 (서열번호 73)
서열 RKRKRK (서열번호:133) 의 양전하 영역에 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	NidoMut5 또는 서열번호 102-105 중 하나	헥사히스티딘 (서열번호 73)

[0523]

[0524] 표 3: 본 발명의 집합체의 일부를 형성하는 바람직한 폴리펩티드

[0525] 또 다른 특정 실시양태에서, 양전하 아미노산, 바람직하게는 아르기닌 또는 라이신, 보다 바람직하게는 라이신은 제6 측면의 집합체의 제1 폴리펩티드 영역과 제3 폴리펩티드 영역 사이에 포함된다.

[0526] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 집합체의 일부를 형성하는 폴리펩티드는, 아미노 말단에 임의로 메

티오닌을 함유하는 아미노산 서열 61을 포함하거나 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다.

[0527] 일부 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 일부를 형성하는 폴리펩티드는 임의로 아미노 말단에 메티오닌을 함유하는, 서열번호 61 또는 106-124 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 포함하거나 이로 이루어진다.

[0528] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 관심 제제는 치료제 또는 영상화제이다.

[0529] *IV-E. 관심 제제*

[0530] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 관심 제제는 치료제 또는 영상화제이다.

[0531] *IV-E.1 치료제*

[0532] 본원에 사용된 용어 "치료제"는 화학적 구조 제한 없이 상태, 장애 또는 질병의 치료 및/또는 치료에 적합한 임의의 화합물을 의미한다.

[0533] 치료제의 성질은 그것이 접합체에서 활성을 유지하거나 일단 세포 내부로 전달되면 활성화될 수 있는 한 본 발명에 대해 특별히 제한되지 않는다. 따라서, 일단 비접합 치료제의 활성의 적어도 100%, 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 적어도 50% 이하의 세포 내부로 전달되면 그것이 활성을 나타내거나 활성화에 도달할 수 있는 한 모든 치료제를 접합체에 사용할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 목적은 그의 선택성을 증가시키고 그의 표적을 벗어난 효과를 감소시킴으로써 치료제의 작용을 촉진하는 것이기 때문에, 접합체의 폴리펩티드에 접합된 치료제의 효과는 상승적일 수 있고 특정 치료제에 대해 이미 알려진 매개변수화된 값을 초과할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드에 접합된 치료제의 일부 실시양태는 또한 적어도 101%, 적어도 105%, 적어도 110%, 적어도 115%, 적어도 120%, 적어도 125%, 적어도 130%, 적어도 135%, 적어도 140%, 적어도 145%, 적어도 150%, 적어도 175%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 1000%, 또는 그 이상의 치료제 단독의 기능성으로 의도된다.

[0534] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드에 접합된 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0535] (i) 화학요법제,

[0536] (ii) 세포독성 폴리펩티드,

[0537] (ii) 항혈관신생 폴리펩티드,

[0538] (iii) 종양 억제 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드,

[0539] (iv) 세포자멸사 유도(pro-apoptotic) 폴리펩티드,

[0540] (v) 항전이 활성을 갖는 폴리펩티드.

[0541] (vi) 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드,

[0542] (vii) 항혈관신생 분자, 및

[0543] (viii) 독소.

[0544] 특정 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드는 복수의 치료제에 접합되고, 여기서 상기 복수의 치료제는 동일하거나 상이하다.

[0545] *(i) 화학요법제*

[0546] 특정 실시양태에서, 치료제는 화학요법제이다.

[0547] 용어 "화학요법제"는 항암제를 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

[0548] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 항암제는 단기간일지라도 암과 관련된 증상을 전체적으로 또는 부분적으로 억제하는 것을 포함하여 암의 발달 또는 진행을 적어도 부분적으로 억제하는 제제이다.

[0549] 여러 항암제는 DNA 손상제로 분류할 수 있으며, 여기에는 토포이소머라제 억제제(예: 에토포사이드, 람토테신, 토포테칸, 테니포사이드, 미토산트론), DNA 알킬화제(예: 시스플라틴, 메클로레타민, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 멜팔란, 코람부실, 부셀판, 티오테파, 카무스틴, 로무스틴, 카보플라틴, 다카바진, 프로카바진), DNA

가닥 절단 유도제(예: 블레오마이신, 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 미토마이신 C), 항미세소관제(예: 빈크리스틴, 빈블라스틴), 항대사제(예: 시타라빈, 메토틱렉세이트, 5-플루오로우라실, 6-티오구아닌, 6-메르캅토피린, 플루다라빈, 펜토스타틴, 클로로데옥시아테노신), 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드 또는 에피도필로톡신을 포함한다.

[0550] 항암제의 추가 예는 제한 없이 아시비신; 아클라루비신; 아코다줄 염산염; 아크로닌; 아도젤레신; 알테스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스퍼린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조테파; 비칼루타미드; 비산트렌 염산염; 비스나파이드 디메실레이트; 비젤신; 블레오마이신 설페이트; 보르테조밐(VELCADE); 브레퀴나르 나트륨; 브로피리딘; 부셀판; 캅티노마이신; 칼로스테론; 카라세미드; 카베타이머; 카르보플라틴(백금 함유 요법); 카르무스틴; 카루비신 염산염; 카르젤레신; 세테핑골; 클로람부실; 시클레마이신; 시스플라틴(백금 함유 요법); 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 테자구아닌; 디아지쿠온; 도세탁셀(TAXOTERE); 독소루비신; 드롤록시펜; 드로모스타놀론; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로르니딘; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신; 에르블로졸; 에를로티닙(TARCEVA), 에소루비신; 에스트라무스틴; 에타니다졸; 에토포사이드; 에토프린; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 플록수리딘; 플루다라빈; 5-플루오로우라실; 플루오로시타빈; 포스키돈; 포스트리에신; 제피티닙(IRESSA), 쟈시타빈; 수산화요소; 이다루비신; 이포스파미드; 일모포신; 이마티닙 메실레이트(GLEEVEC); 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-I; 인터페론 감마-I b; 이프로플라틴; 이리노테칸; 란레오티드; 레날리도마이드(REVLIMID, REVIMID); 레트로졸; 류프로라이드; 리아로졸; 로메트렉솔; 로무스틴; 로속산트론; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로레타민; 메게스트롤; 펠렝게스트롤; 펠팔란; 메노가틸; 머캅토피린; 메토틱렉세이트; 메토프린; 메투레테파; 미틴도마이드; 미토카신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스파; 미토탄; 미톡산트론; 미코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페메트렉세이드(ALIMTA), 페가스파가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 펜토몬; 페플로마이신; 퍼포스파미드; 피포브로만; 피포솔판; 피리트렉심 이세티오네이트; 피로산트론; 폴리카마이신; 플로메스탄; 포르피머; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진; 퓨로마이신; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핑골; 세무스틴; 심트라젠; 시토글루시드; 스파포세이트; 스파소마이신; 스피로게르마늄; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 솔로페누르; 탈리소마이신; 탐솔로신; 탁솔; 탁소테레; 테코갈란; 테가푸르; 텔록산트론; 테모포르핀; 테모졸로마이드(TEMODAR); 테니포사이드; 테록시론; 테스토락톤; 탈리도마이드(THALOMID) 및 이의 유도제; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토포테칸; 토레미펜; 트레스톨론; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토텔린; 튜블로졸; 우라실; 머스타드; 우레테파; 바프레타이드; 베르테포르핀; 빈블라스틴; 빈크리스틴; 빈데신; 비네펜딘; 빈글리시네이트; 빈류로신; 비노렐빈; 빈로시딘; 빈줄리딘; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신을 포함한다.

[0551] 한 실시양태에서, 항암제는 항암 분자의 여러 단위를 함유하는 올리고머로서 제공된다. 한 실시양태에서, 항암제는 여러 플록수리딘 분자를 포함하는 플록수리딘 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드이다. 플록수리딘 폴리- 또는 올리고뉴클레오티드는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 플록수리딘 분자를 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 플록수리딘 폴리뉴클레오티드는 플록수리딘 펜타뉴클레오티드, 즉 5개의 플록수리딘 분자를 함유하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0552] 항암제는 티로신 키나제 억제제, CDK 억제제, MAP 키나제 억제제, 또는 EGFR 억제제를 비제한적으로 포함하는 효소 억제제일 수 있다. 티로신 키나제 억제제는 제한없이 제니스테인(4', 5, 7-트리히드록시이소플라본), 티르포스틴 25(3, 4, 5-트리히드록시페닐), 메틸렌]-프로판디니트릴, 허비마이신 A, 다이드제인(4', 7-디히드록시이소플라본), AG-126, 트랜스-1-(3'-카르복시-4'-히드록시페닐)-2-(2", 5"-디히드록시-페닐)에탄, 또는 HDBA(2-히드록시5-(2,5-디히드록시벤질아미노)- 2-하이드록시벤조산일 수 있다.

[0553] CDK 억제제는 제한 없이 p21, p27, p57, p15, p16, p18 또는 p19일 수 있다. MAP 키나제 억제제는 제한 없이 KY12420(C23H24O8), CNI-1493, PD98059, 또는 4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술폰페닐)-5-(4-피리딜)1H-이미다졸일 수 있다. EGFR 억제제는 제한 없이 에를로티닙(TARCEVA), 제피티닙(IRESSA), WHI-P97(퀴나졸린 유도체), LFM-A12(레플루노미드 대사산물 유사체), ABX-EGF, 라파티닙, 카네르티닙, ZD-6474(ZACTIMA), AEE788 및 AG1458 일 수 있다.

[0554] 항암제는 제한없이 베바시주맵(AVASTIN), 라니비주맵(LUCENTIS), 폐갑타닙(MACUGEN), 소라페닙, 수니티닙(SUTENT), 바탈라닙, ZD-6474(ZACTIMA), 아네코르타브(RETAANE), 스쿠알라민 락테이트, 및 세마포린을 포함하

는 EGF 억제제일 수 있다. 항암제는 베바시주맵(AVASTIN), 트라스투주맵(HERCEPTIN), 알렘투주맵(CAMPATH, B 세포 만성 림프구성 백혈병에 대해 표시됨), 켄투주맵(MYLOTARG, hP67.6, 항-CD33, 급성 골수성 백혈병과 같은 백혈병에 대해 표시됨), 리툭시맵(RITUXAN), 토시투모맵(BEXXAR, 항-CD20, B 세포 악성 종양에 대해 표시됨), MDX-210(HER-2/neu 종양유전자 단백질 산물 및 면역글로불린 G(IgG)(Fc 감마 RI)에 대한 I형 Fc 수용체에 동시에 결합하는 이중특이성 항체), 오레고보맵(OVAREX, 난소암용), 에드레콜로맵(PANOREX), 다클리주맵(ZENAPAX), 팔리비주맵(SYNAGIS, RSV 감염과 같은 호흡기 질환에 사용), 이브리투모맵 티옥세탄(ZEVALIN, 비호지킨 림프종에 사용), 세투시맵(ERBITUX), MDX-447, MDX-22, MDX-220(항-TAG-72), IOR-C5, IOR-T6(항-CD 1), IOR EGF/R3, 셀로그렙(ONCOSCINT OV 103), 에프라투주맵(LYMPHOCIDE), 켄투모맵(THERAGYN) 및 글리오맵-H(뇌암, 흑색종에 대해 나타남)를 포함하나 이에 제한되지 않는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항체 또는 항체일 수 있다.

[0555] 본 발명의 특정 실시양태에서 혈관신생 억제제로서 작용하는 단백질이 종양을 표적으로 하는 것으로 고려된다. 이러한 제제는 위에서 언급한 항-혈관신생 폴리펩티드 외에, Marimastat; AG3340; COL-3, BMS-275291, 탈리도마이드, 엔도스타틴, SU5416, SU6668, EMD121974, 2-메톡시에스트라디올, 카르복시아미도트리아졸, CM101, 펜토산 폴리설페이트, 안지오포이에틴 2(Regeneron), 허비마이신 A, PNU145156E, 16K 프로락틴 단편, 리노마이드, 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNP470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아큐틴, 안지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린을 포함한다.

[0556] 다른 적합한 활성제는 DNA 절단제이다. 상기 방법을 실행하는 데 사용되는 접합체에 세포 독소로 포함하기에 적합한 DNA 절단제의 예에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다: 안트라퀴논-올리고피롤-카르복사미드, 벤즈이미다졸, 레이어나마이신; 다이네마이신 A; 엔디인; 뿐만 아니라 생물학적 활성 유사체 또는 이의 유도체(즉, 실질적으로 동등한 생물학적 활성을 갖는 것). 공지된 유사체 및 유도체는 예를 들어 문헌[Isamic 외., J. Med. 화학 34 2954-61, 1991; Skibo 외., J. Med. 화학 37:78-92, 1994; Behroozi 외., Biochemistry 35:1568-74, 1996; Helissey 외., Anticancer Drug Res. 11:527-51, 1996; Unno 외., Chem. Pharm. Bull. 45:125-33, 1997; Unno 외., Bioorg. Med. Chem., 5:903-19, 1997; Unno 외., Bioorg. Med. Chem., 5: 883-901, 1997; 및 Xu 외., Biochemistry 37:1890-7, 1998]. 다른 실시예에는 엔디인 쿼논 이민(미국 특허 번호 5,622,958); 2,2r-비스(2-아미노에틸)-4-4'-비티아졸[Lee 외., Biochem. 물. 바이올. 국제 40:151-7, 1996]; 에필리티신-살렌.구리 접합체[Routier 외., Bioconjug. Chem., 8: 789-92, 1997]를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0557] 앞서 언급한 화학요법제 중 일부는 대사물질이라는 공통 범주로 함께 분류될 수 있다. 본원에 사용된 "대사길항물질"은 정상적인 대사의 일부인 대사물질의 사용을 억제하는 화합물을 의미한다. 대사길항물질은 염산 사용을 방해하는 항염산과 같이 그들이 방해하는 대사물질과 구조가 유사하다. 대사길항물질의 비제한적 예에는 다음 화합물이 포함된다: 블레오마이신, 부설판, 카페시타빈, 카무스틴, 카보플라틴, 클로로테옥시아테노신, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다카바진, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 에토포사이드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 젬시타빈, 이포스포아미드레미토마이신, 메테로마이신, 미티타빈, 메테로마이신, 메테로마이드푸르, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 프로카바진, SN-38, 티오구아닌, 티오테파, 테니포사이드, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈.

[0558] 특정 실시양태에서, 항암제는 대사길항물질이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 대사길항물질은 피리미딘 유사체, 또는 그의 올리고머 형태이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 피리미딘 유사체는 플록수리딘 또는 그의 오량체 형태이다.

[0559] 본원에 사용된 용어 "피리미딘 유사체"는 피리미딘의 구조를 모방하는 뉴클레오시드 유사체 항대사물질을 지칭한다. 피리미딘 유사체는 핵산 합성을 방해한다. 그들의 항증식 효과는 DNA로의 통합을 통해 달성되어, 사슬 종결 및 DNA 합성 억제를 유발한다. 또한 DNA 중합효소 및 리보뉴클레오티드 환원효소와 같은 핵산 합성에 관여하는 효소를 방해할 수 있다. 피리미딘 유사체의 비제한적 예는 아자시티딘, 6-아자우라실, 시타라빈, 데시타빈, 젬시타빈, 트록사시타빈, 플록수리딘, 플루오로우라실, 카페시타빈, 테가푸르-우라실을 포함한다.

[0560] 본 명세서에서 용어 "플록수리딘"은 디옥시우리딘으로 분류되는 피리미딘 유사체인 대사물질로 분류되는 항암제를 의미한다. 상기 항암제의 IUPAC 명칭은 5-플루오로-1-[4-히드록시-5-(히드록시메틸)테트라히드로푸란-2-일]-1H-피리미딘-2,4-디온이다.

[0561] 본원에 사용된 "그의 올리고머 형태"라는 표현은 특정 수의 단위에 제한되지 않는 중합체와 대조적으로, 소수의 반복 단위에 의해 형성된 분자를 지칭하며, 여기서 각 단위는 단량체로 지칭된다. 일반적으로 올리고머의 단량

체 수는 5~100 이다. 따라서, 피리미딘 유사체의 올리고머 형태는, 본원에서 소수의 피리미딘 유사체의 서열에 의해 형성된 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 피리미딘 유사체의 올리고머 또는 중합체 형태는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 피리미딘 유사체의 서열을 포함하는 분자를 지칭한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 그 이상의 피리미딘 유사체의 서열로 이루어진 분자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 피리미딘 유사체의 올리고머 또는 중합체 형태는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 플록수리딘의 서열을 포함하는 분자이다.

[0562] 또 다른 특정 실시양태에서, 피리미딘 유사체의 올리고머 형태는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 플록수리딘의 서열로 이루어진 분자이다.

[0563] 플록수리딘 유사체를 언급할 때 표현 "그의 오랑체 형태"는 5개의 플록수리딘 서열을 포함하거나 이로 구성된 분자로 이해된다.

[0564] (ii) 세포독성 폴리펩티드

[0565] 본원에 사용된 용어 "세포독성 폴리펩티드"는 세포 기능을 억제할 수 있는 제제를 의미한다. 제제는 증식을 억제하거나 세포에 독성을 나타낼 수 있다. 세포에 의해 내재화될 때 세포 대사를 방해하거나 유해하게 변경하거나 어떤 방식으로든 세포 성장 또는 증식을 억제하는 모든 폴리펩티드는 이 용어의 범위에 포함되며, 세포 내로 수송될 때 독성 효과가 매개되는 제제 및 또한 독성 효과가 세포 표면에서 매개되는 제제를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 유용한 세포독성 폴리펩티드는 박테리아 독소와 같은 단백질성 독소를 포함한다.

[0566] 본 발명에 따른 접합체로의 혼입에 유용한 단백질성 세포 독소의 예는 유형 1 및 유형 2 리보솜 불활성화 단백질(RIP)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 유용한 유형 1 식물 RIP는 디안틴 30, 디안틴 32, 리키닌, 사포린 1-9, 포켓워드 활성화 단백질(PAP), PAP II, PAP-R, PAP-S, PAP-C, 마팔민, 도테칸드린, 브리오딘-L, 브리오딘, 콜리신 1 및 2, 루핀-A, 루핀-B, 루핀-S, 19K-단백질 합성 억제 단백질(PSI), 15K-PSI, 9K-PSI, 알파-키로윈, 베타-키로윈, 겔로닌, 모모르딘, 모모르딘-II, 모모르딘-Ic, MAP-30, 알파-모모르카린, 베타-모모르카린, 트리코산틴, TAP-29, 트리코키린; 보리 RIP; 아마 RIP, 트리틴, 옥수수 RIP, 아스파린 1 및 2 [Stirpe 외., 1992. Bio/Technology 10:405-12]. 유용한 유형 2 RIP에는 볼켄신, 리신, 니그린-b, CIP-29, 아브린, 모데신, 에블리틴-[알파], 에블리틴-[베타], 에블린-[감마], 비르쿠민, 포렉틴, 뿐만 아니라 이의 생물학적 활성 효소 서브유닛[Stirpe 외., 1992. Bio/Technology 10:405-12; Pastan 외., 1992. Annu.Rev Biochem. 61:331-54; Brinkmann과 Pastan, 1994. Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45,; 및 Sandvig 및 Van Deurs, 1996. Physiol. Rev 76:949-66].

[0567] 세포 독소로서 유용한 박테리아 독소의 예는 시가 독소 및 시가-유사 독소(즉, 동일한 활성 또는 구조를 갖는 독소), 뿐만 아니라 촉매 서브유닛 및 이의 생물학적 기능적 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 박테리아 독소는 유형 2 RIP 이기도 하다[Sandvig and Van Deurs, 1996. Physiol. Rev. 76:949-66; Armstrong, 1995. J. Infect. Dis., 171:1042-5; Kim et al., 1997. Microbiol. Immunol. 41:805-8; and Skinner et al., 1998. Microb. Pathog. 24:117-22]. 유용한 박테리아 독소의 추가 예는 슈도모나스 외독소 및 디프테리아 독소를 포함하나 이에 제한되지는 않는다[Pastan et al., 1992. Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; and Brinkmann and Pastan, 1994. Biochim. et Biophys. Acta 1198:27-45]. 독소 효소 서브유닛의 절단된 형태 및 돌연변이체는 또한 세포 독소 모이어티로서 사용될 수 있다(Pastan et al., Annu. Rev. Biochem. 61:331-54; Brinkmann and Pastan, Biochim. et Biophys. Acta 1198:27- 45, 1994; Mesri et al., J. Biol. Chem. 268:4852-62, 1993; Skinner et al., Microb. Pathog. 24:117-22, 1998; 및 미국 특허 번호 5,082,927). 다른 표적 제제는 콜리신 A, B, D, E1-9, 클로아신 DF13 및 진균 RNase, [알파]-사르신을 포함하는 RNase 독소의 34개 이상의 설명된 콜리신 패밀리를 포함하지만 이에 제한되지 않는다[Ogawa et al. 1999. Science 283: 2097-100,; Smarda et al., 1998. Folia Microbiol(Praha) 43:563-82; Wool et al., 1992. Trends Biochem. Sci., 17: 266-69].

[0568] (iii) 항혈관신생 폴리펩티드

[0569] 종양 세포의 증식은 암 진행을 수반하는 광범위한 종양 혈관화에 크게 의존한다. 따라서, 항혈관신생제로 새로운 혈관 형성을 억제하고 기존 혈관을 표적으로 파괴하는 것이 종양 치료에 효과적이고 비교적 무독성인 접근법으로 도입되었다.

[0570] 본원에 사용된 용어 "항-혈관신생 폴리펩티드"는 혈관신생을 억제할 수 있는 폴리펩티드를 나타낸다. 적합한 항혈관신생 폴리펩티드는 W02007115376에 기재된 바와 같은 안지오테틴, 엔도스테틴, 항-혈관신생 항-트롬빈

III, sFRP-4, 및 항-VEGF 항체, 예컨대 아니비주맙, 베바시주맙(아바스틴), Fab IMC 1121 및 F200 Fab를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0571] (iv) 종양 억제제 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드

[0572] 본원에 사용된 "종양 억제제"는 세포의 조절되지 않은 성장을 억제하는 정상적인 생물학적 역할을 하는 유전자 또는 유전자 생성물이다. 종양 억제제의 기능적 대응물은 종양유전자(oncogene)이다. 정상 세포 성장을 촉진하는 유전자는 "원-종양유전자(proto-oncogenes)"로 알려져 있을 수 있다. 이러한 유전자 또는 유전자 산물을 활성화하는 돌연변이는 이를 "종양 유전자(oncogene)"로 추가로 전환시켜 세포 성장을 계속한다. 활성이 조절되지 않는 방식으로 종양 억제 유전자 및 유전자 산물의 예는 문헌에 잘 알려져 있으며 PTC, BRCA1, BRCA2, p16, APC, RB, WT1, EXT1, p53, NF1, TSC2, NF2, VHL, ST7, ST14, PTEN, APC, CD95 또는 SPARC 를 포함한 수 있다.

[0573] (v) 세포자멸사 유도(pro-apoptotic) 폴리펩티드

[0574] 본원에 사용된 용어 "세포자멸사 유도(pro-apoptotic) 폴리펩티드"는 세포 또는 세포 집단에서 세포 사멸을 유도할 수 있는 단백질을 지칭한다. 세포자멸사에 관여하는 이들 단백질의 과발현은 세포자멸 결과를 향한 항-세포자멸과 세포자멸사 유도 인자 사이의 신중한 균형을 대체한다. 적합한 세포자멸사 유도 폴리펩티드는 BAX, BAK, BOK/MTD, BID, BAD, BIK/NBK, BLK, HRK, BIM/BOD, BNIP3, NIX, NOXA, PUMA, BMF, EGL-I 및 바이러스 동족체, 카스파제, 예를 들어 카스파제-8, 아데노바이러스 E4orf4 유전자, p53 경로 유전자, TNF, FasL, TRAIL 및/또는 이들의 수용체와 같은 세포자멸사 유도 리간드 TNFR, Fas, TRAIL-R1 및 TRAIL-R2와 같은 단백질의 BCL-2 패밀리의 세포자멸사 유도 인자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0575] (vi) 항전이 활성을 갖는 폴리펩티드

[0576] 본원에 사용된 용어 "전이 억제제"는 전이(이차 종양)가 암에 걸린 유기체의 체내로 퍼지는 것으로부터 전이를 늦추거나 예방하는 역할을 하는 단백질을 지칭한다. 적합한 전이 억제제는 BRMS1, CRSP3, DRG1, KAI1, KISS-1, NM23, TIMP-패밀리 단백질 및 우테로글로빈과 같은 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0577] (vii) 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드

[0578] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 면역자극성 폴리펩티드 제제는 단독으로 또는 다른 제제와 조합하여 투여되는 대상체에서 면역 반응(이미 존재하는 면역 반응을 향상시키는 것을 포함함)을 활성화 또는 자극할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드이다. 면역자극성 펩티드의 적합한 비제한적 예는 플라젤린, 무라밀 디펩티드, 인터류킨을 포함하는 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15(또는 이들 사이토카인의 초작용제/돌연변이 형태), IL-12, IFN-감마, IFN-알파, GM-CSF, FLT3-리간드 등), 면역자극 항체(예: 항-CTLA-4, 항-CD28, 항-CD3, 또는 이들 분자) 등을 포함한다.

[0579] (viii) 항-혈관신생 분자

[0580] 특정 실시양태에서 본 발명의 융합 단백질의 사이에 있는 영역은 종양을 표적으로 하는 혈관신생 억제제로서 작용하는 단백질에 상응하는 것으로 또한 고려된다. 이러한 제제에는 위에서 언급한 항-혈관신생 폴리펩티드 외에 마리마스타트; AG3340; COL-3, BMS-275291, 탈리도마이드, 엔도스타틴, SU5416, SU6668, EMD121974, 2-메톡시 에스트라디올, 카르복시아미도트리아졸, CM101, 펜토산 폴리설페이트, 안지오프로이데틴 2(레체네론), 5, 허비마 이신 A, PNU145156E, 16K 프로락틴 단편, 리노마이드, 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNF470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아큐틴, 안지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린을 포함한다. 또한 베바시주맙(AVASTIN), 라니비주맙(LUCENTIS), 폐갑타닙(MACUGEN), 소라페닙, 수니티닙(SUTENT), 바탈라닙, ZD-6474(ZACTIMA), 아네코르타브(RETAANE), 스쿠알라민 젯산염, 및 세마포린을 포함하나 이에 제한되지 않는 VEGF 억제제가 포함된다.

[0581] (ix) 독소

[0582] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "독소"는 상이한 유기체로부터 수득된 비-단백질성/비-폴리펩티드 세포독성 화합물, 뿐만 아니라 이들 동일한 화합물의 화학적으로 변형된 유도체 및 화학적 합성을 통해 수득된 화합물을 지칭한다. 생물학적 기원을 가진 이 범주의 화합물은 미생물(박테리아, 고세균, 원생동물 또는 단세포 진균) 또는 다세포 유기체(다세포 진균, 식물 또는 연체동물과 같은 동물)에서 얻을 수 있다. 이러한 독소의 화학적 조성 및 구조는 그들의 비-폴리펩티드 성질을 넘어서는 어떤 방식으로든 제한되지 않으며, 따라서 하나 이상의 아미노산은 상기 구조에 참여하는 모든 아미노산이 펩티드 결합에 의해 함께 결합되지 않는 한 그들의 기본 구

성의 일부로든 화학적 유도의 결과로든 그들의 구조의 일부일 수 있다.

[0583] 본 발명에 적합한 독소의 예는 칼리케아마이신 γ 1, 돌라스타틴 10, 메이탄시노이드(DM1) 및 피롤로벤조디아제핀 이량체(PBD)이다.

[0584] (x) 추가 치료제

[0585] 본 발명의 접합체의 특정 실시양태에서, 치료제는 하기 표 4의 세 번째 칼럼에 표시된 치료제로부터 선택된다.

리간드	세포수용체/ 세포 유형 또는 미생물	치료제	질병 또는 장애
메토트렉세이트 또는 아미노프테린을 포함하는 엽산 또는 엽산 표적 리간드.	백혈구의 엽산 수용체	세포독성제	백혈병
히알루론산 (HA)	CD44		
링갈립틴을 포함하는 크산틴 스캐폴드	상처 섬유아세포의 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)	성장인자	상처
IgG Fc	<i>S.aureus</i> 의 단백질 A	항균제(항 균, 항진균, 항원충제 또는 항바이러스 제)	감염/패혈증
Her 2 의 리간드는 당업계에서 잘 알려져 있으며, 하기에서 설명된 것 중 하나일 수 있다; Wikman M et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Orlova A et al. Cancer Res 66: 4339-8 (2006); Ahlgren S et al., Bioconjug Chem 19: 235-43 (2008); Feldwisch J et al., JMol Biol 398: 232-47 (2010); 다음의 특허번호의 US 특허: 5,578,482; 5,856,110; 5,869,445; 5,985,553; 6,333, 169; 6,987,088; 7,019,017; 7,282,365; 7,306,801; 7,435,797; 7,446,185; 7,449,480; 7,560,111; 7,674,460; 7,815,906; 7,879,325; 7,884,194; 7,993,650; 8,241,630; 8,349,585; 8,389,227; 8,501,909; 8,512,967; 8,652,474; and U.S. 특허출원 US20110059090A1)	HER2	세포독성제	유방암

[0586]

CRPPR 펩티드	심장 내피세포	NAP -2, TGF- α , ErBb3, VEGF, IGF-1, FGF-2, PDGF, IL-2, CD 19, CD20, 및/또는 CD 80/86, 프로스타글란딘(PGE2, PGI2)	심장병
안지오텐신	안지오텐신 II 유형 1 (AT1) 수용체	NAP -2, TGF- α , ErBb3, VEGF, IGF-1, FGF-2, PDGF, IL-2, CD 19, CD20, 및/또는 CD 80/86, 프로스타글란딘 (PGE2, PGI2)	심장병

[0587]

다음과 같은 인터루킨-6(IL-6)에 대한 리간드: - Su JL et al. (Cancer Res. 2019 Jul 15;79(14):3791)에 설명된 서열번호 66 (LSLITRL)를 가지는 S7 펩티드, - Weiergräber O et al. (FEBS Lett. 1996 Jan 29;379(2):122-6에 설명된 IL6 리간드 서열번호:75가짐(WQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTW), - 인터루킨-6 수용체 (IL-6R); PDGF; 안지오프로테틴; 안지오프로테틴; Tie2; S1P; 인테그린 av 베타 3, av 베타 5, 및 a5 베타 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리스로포이에틴; 보체 인자 D; TNFα; HtrA1; a VEGF 수용체; ST-2 수용체; 및 보체 경로 구성요소 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a, C3a, HtrA1, ARMS2, TIMP3, HLA, 인터루킨-8 (IL-8), CX3CR1, TLR3, TLR4, CETP, LIPC, COL10A1, 및 TNFRSF10A와 같은 노화-관련된 황반변성(AMD) 위험과 유전적으로 연결된 단백질	눈 세포, 바람직하게는 망막 색소 상피의 세포	항-VEGF (폐갑타닙 라니비주맙 베바시주맙 애플리버셉트 또는 콘베르셉트)	증식성망막병증, 맥락막신생혈관(CNV), 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨병 및 기타 허혈관련망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 병적 근시, 폰히펠 린다우병, 눈의 히스토플라스마 증, 망막 정맥폐색(RVO), 중심 망막정맥 폐색(CRVO) 및 분지형 망막 정맥폐색(BRVO), 각막신생혈관, 망막 신생혈관 및 미숙아 망막병증(ROP)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 안내 신생혈관 질환
비트로넥틴, 피브로넥틴, C1q와 같은 보체 성분(이의 구성요소 폴리펩타이드 사슬 A, B 및 C 중 임의의 것을 포함함), C3d, C3b 및 C4b와 같은 보체 단편, 만노스 결합 단백질, 컨글루티닌, 계면활성제 단백질 A 및 D, C-반응성 단백질(CRP), 알파 2-마크로글로불린 및 면역글로불린(예: 면역글로불린의 Fc 부분)을 포함하는 오피소닌	미생물(바이러스, 박테리아 세포, 곰팡이 세포, 원생동물)	항균제(항 박테리아, 항진균제, 항원충제 또는 항바이러스제)	감염/패혈증

만노스-결합 렉틴(MBL)	미생물(바이러스, 박테리아 세포, 곰팡이 세포, 원생동물)	항균제(항 박테리아, 항진균제, 항원충제 또는 항바이러스제)	감염/패혈증
-----------------------	---	--	---------------

표 4 리간드, 및 상기 리간드가 결합하는 수용체, 세포 또는 미생물은 상기 표 1에서와 같이 컬럼 1 및 2에 제공된다. 또한, 특정 질병 또는 장애의 치료를 위해 상기 리간드와 연관되는 치료제는 세 번째 컬럼에 제공되고 치료될 질병 또는 장애는 네 번째 컬럼에 제공된다. 특정 리간드 또는 리간드 군에 결합될 제제는 상기 리간드 또는 리간드 군과 동일한 원료로 제공된다. 리간드, 또는 리간드 군, 및 치료제 또는 치료제 군의 회합에 의해 치료될 질환 또는 장애는 상기 리간드(들) 및 치료제(들)와 동일한 원료로 제공된다.

본 발명의 접합체의 특정 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 영역은 표 4에 제공된 리간드로부터 선택된 리간드이고, 관심 제제는 표 4에서 상기 리간드와 동일한 행에 제공된 치료제로부터 선택된다. 또 다른 특정 실시양태는 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 이 섹션의 이전 실시양태에서 정의된 바와 같은 본 발명의 접합체를 지칭하며, 여기서 상기 질환 또는 장애는 표 4에 제공된 것들로부터 선택된다. 또 다른 특정 실시양태는 표 4의 행에 제공된 것들로부터 선택된 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 이 섹션의 이전 실시양태에서 정의된 바와 같은 본 발명의 접합체를 지칭하며, 여기서 접합체의 제 2 폴리펩티드 영역은 가공되지 않은

것에 상응한다.

[0592] *IV-E.2 영상화제*

[0593] "영상화제"라는 용어는 본 명세서에서 생체적합성 화합물을 지칭하기 위해 사용되며, 이 화합물을 사용하면 영상의 상이한 영역들 사이의 대비를 증가시킴으로써 영상의 상이한 부분의 구별을 용이하게 한다. 따라서 용어 "영상화제"는 를 포함하지만, 그럼에도 불구하고 그러한 제제가 없을 때(예를 들어 MRI에서와 같이) 생성될 수 있는 이미지의 품질을 향상시키는 데 사용되는 제제, 뿐만 아니라 이미지 생성을 위한 전제 조건인 제제(예: 핵 이미징에서와 같이)를 포함한다. 적합한 영상화제는 제한 없이, 방사성핵종 영상화, 컴퓨터 단층촬영, 라만 분광법, 자기공명영상(MRI) 및 광학 영상화를 위한 영상화제를 포함한다.

[0594] 방사성핵 이미징을 위한 영상화제에는 요오드 123, 테크니슘 99, 인듐 111, 레늄 188, 레늄 186, 구리 67, 요오드 131, 이트륨 90, 요오드 125, 아스타틴 211, 갈륨 67, 이리듐 192, 코발트 60, 라듐 226, 금 198, 세슘 137 및 인 32 이온을 포함한다. 형광 제제의 예는 가돌리늄 및 레노그라핀을 포함한다. 상자성 이온의 예는 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(H) 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀라늄(III) 및 에르븀(III) 이온을 포함한다.

[0595] 광학 이미징을 위한 영상화제는 예를 들어, 플루오레세인, 플루오레세인 유도체, 인도시아닌 그린, 오레곤 그린, 오레곤 그린 유도체의 유도체, 로다민 그린, 로다민 그린의 유도체, 에오신, 에리트로신, 텍사스 레드, 텍사스 레드의 유도체, 말라카이트 그린, 나노골드 설포숙신이미딜 에스테르, 캐스케이드 블루, 쿠마린 유도체, 나프탈렌, 피리딜록사졸 유도체, 캐스케이드 옐로우 염료, 다폭실 염료를 포함한다. 이것은 또한 형광성 단백질을 포함하며, 이는 원자 구조가 형광성을 나타내도록 하는 본원에서 단백질을 지칭하며, 이는 당업계에 잘 알려진 현상이다. 본 발명의 접합체에 적합한 일반적으로 사용되는 형광 단백질의 비제한적 예는. 녹색 형광 단백질(GFP, *Aequorea victoria*에서 처음 발견됨), 적색 형광 단백질(RFP), 황색 형광 단백질(YFP), 청색 형광 단백질(BFP), 시안 형광 단백질 또는 기타 변이체이고, 그 실시예들은 Kremers 외. [Kremers, G-J-et al. 2011. J.Cell Sci. 124:157-160]에서 발견될 수 있다.

[0596] 본 발명의 접합체에 적합한 형광 단백질의 추가의 비제한적인 예는, 강화 녹색 형광 단백질(eGFP), 강화 시안 형광 단백질 CFP(ECFP), 강화 YFP(EYFP), GFPS65T, 에메랄드, 토파즈(TYFP), 비너스, 시트린, m시트린, GFPuv, 불안정한 EGFP(dEGFP), 불안정한 ECFP(dECFP), 불안정한 EYFP(dEYFP), mCFPm, 세룰리언, T-사파이어, CyPet, YPet, mKO, HcRed, t-HcRed, DsRed - 단량체, J-Red, 다이머2, t-다이머2(12), mRPI, 포실로포르린(pocilloporin), 레닐라 GFP, 몬스터 GFP, paGFP, Kaede 단백질 및 킨링(kindling) 단백질, 피코빌리프로틴 및 B-피코에리트린, R-피코에리트린 및 알로피코시아닌을 포함한 피코빌리프로틴이다. 다른 실시양태에서, 영상화제는 mHoneydew, mBanana, mOrange, dTomato, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mGrapel, mRaspberry, mGrape2, mPlum[SShaner 외. (2005) Nat. Methods 2:905-909] 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 형광 단백질이다.

[0597] 자기 공명 영상 장치용 영상화제 가돌리늄 킬레이트, 망간 킬레이트, 크롬 킬레이트, 19F 및 철 입자.

[0598] MRI 영상화제는 크롬(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 및 에르븀(III)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 금속의 복합체를 포함한다.

[0599] *IV-E.3 접합체의 폴리펩티드에 대한 관심 제제의 연결*

[0600] 접합체의 폴리펩티드는 단일 관심 제제 또는 복수의 제제에 접합될 수 있다. 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합되는 경우, 상기 제제는 동일하거나 상이할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 복수의 관심 제제는 치료제이고, 이들은 상기 정의된 바와 같은 동일하거나 상이한 치료제이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 복수의 관심 제제는 영상화제이고, 이들은 상기 정의된 바와 같이 동일하거나 상이한 영상화제이다.

[0601] 다음은 임의의 관심 제제, 즉 치료제, 영상화제, 복수의 치료제, 및 방금 정의된 복수의 영상화제에 적용된다. 따라서 특정 실시양태에서, 제제에 대해 언급된 하기 실시양태 중 임의의 것은 용어 "제제"를 "치료제"로 대체함으로써 치료제에 적용된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 제제에 대해 언급된 하기 실시양태 중 임의의 것은 용어 "제제"를 "영상화제"로 대체함으로써 이미징 에이전트에 적용된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 하기 실시양태 중 임의의 것은 "복수의 제제"라는 표현을 "복수의 치료제"로 대체함으로써 복수의 치료제에 적용되며, 여기서 상기 복수의 치료제는 상기 정의된 바와 같다. 또 다른 특정 실시양태에서, 하기 실시양태 중 임의의 것은

"복수의 제제"라는 표현을 "복수의 영상화제"로 대체함으로써 복수의 영상화제에 적용되며, 여기서 상기 복수의 영상화제는 위에서 정의된 바와 같다.

[0602] 제제 또는 관심 제제는 상기 집합체의 폴리펩티드의 임의의 서열에 접합될 수 있다.

[0603] 따라서, 특정 실시양태에서, 관심 제제는 제1 폴리펩티드 영역에 접합된다. 특정 실시양태에서, 이는 집합체의 제2 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 집합체의 제3 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제1 및 제2 폴리펩티드 사이의 임의의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제1 및 제2 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제1 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다.

[0604] 특정 실시양태에서, 복수의 관심 제제는 집합체의 동일한 폴리펩티드 영역에 접합된다. 바람직한 실시양태에서, 이들은 제1 폴리펩티드 영역에 접합된다. 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 제2 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 제3 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 폴리펩티드의 3개 폴리펩티드 영역 모두에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 폴리펩티드의 제1 및 제2 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 제1 및 제3 폴리펩티드 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 제2 및 제3 폴리펩티드 영역에 접합된다.

[0605] 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 폴리펩티드의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제2 및 제1 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제1 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 집합체의 폴리펩티드의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제2 및 제1 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제1 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 폴리펩티드의 모든 프로테아제 절단 부위에 접합된다.

[0606] 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 집합체의 폴리펩티드의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 제2 및 제1 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 제1 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 연결 영역에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 표시된 폴리펩티드의 임의의 폴리펩티드 영역 및 폴리펩티드의 모든 연결 영역에 접합된다.

[0607] 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 집합체의 폴리펩티드의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 나타난 임의의 폴리펩티드 영역 및 제1 폴리펩티드 영역과 제2 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 폴리펩티드의 임의의 폴리펩티드 영역 및 제1 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 폴리펩티드의 임의의 폴리펩티드 영역 및 제2 및 제3 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 표시된 폴리펩티드 영역 및 폴리펩티드의 모든 절단 부위에 접합된다.

[0608] 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 폴리펩티드의 연결 영역 및 폴리펩티드의 프로테아제 절단 부위에 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이들은 상기 표시된 임의의 폴리펩티드 영역, 연결 영역 및 집합체의 폴리펩티드의 프로테아제 절단 부위에 접합된다.

[0609] 전술한 바와 같이 관심 제제는, 그의 N-말단 및 C-말단과 관련하여 폴리펩티드 내부의 접합 위치에 제한 없이, 집합체의 폴리펩티드에 접합되는 것으로 의도된다. 따라서, 관심 제제는 N-말단 및 C-말단 말단에 대해 등거리 위치에서 집합체의 폴리펩티드에 접합될 수 있거나 이들 중 어느 하나에 더 가까울 수 있다. 따라서, 관심 제제는 상기 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 말단으로부터 500, 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 236, 230,

220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 100, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 30, 25, 20, 15, 20, 10, 5, 또는 그 이하의 아미노산 잔기의 거리에서 또는 상기 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 말단의 동일한 잔기에서 폴리펩티드 영역에 접합될 수 있다. 이 단락은 폴리펩티드에 접합된 각 작용제에 적용되며, 여기서 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합된다.

[0610] 관심 제제(들)의 접합 위치(들)에 대한 유일한 의도된 제한은 제제(들) 및 폴리펩티드의 요소가 기능적이며 제제(들)의 접합이 두 제제, 폴리펩티드 또는 접합체 중 하나의 활성을 방해하지 않는다는 것이다.

[0611] 따라서, 관심 제제, 제2 폴리펩티드, 제1 폴리펩티드 영역 및 양전하 아미노산-풍부 영역은 그들의 비접합 형태에 대한 그들의 기능성을 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 99%, 더욱 더 바람직하게는 100% 보존한다. 이것은 또한 접합체의 폴리펩티드에서 접합의 위치에 관계없이 적용된다. 이 단락은 또한 다수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합된 폴리펩티드에 접합된 각각의 제제에 적용된다. 제제는 접합체의 폴리펩티드 잔기에 직접 접합되거나 연결 모이어티를 통해 간접적으로 접합될 수 있는 것으로 의도된다.

[0612] 따라서, 특정 실시양태에서, 관심 제제는 접합체의 폴리펩티드에 직접 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 관심 제제는 연결 모이어티를 통해 접합체의 폴리펩티드에 접합된다.

[0613] 또 다른 특정 실시양태에서, 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합되는 경우, 이들 모두는 폴리펩티드의 잔기에 직접 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합되는 경우, 이들의 일부는 폴리펩티드의 잔기에 직접 접합되고 나머지는 연결 모이어티를 통해 간접적으로 접합된다. 또 다른 특정 실시양태에서, 모든 제제는 연결 모이어티를 통해 접합된다.

[0614] "연결 모이어티" 또는 "링커"라는 표현은 본 발명의 두 번째 측면에서 이미 정의되었다.

[0615] 당업자는 커플러가 관심 제제와 접합체의 폴리펩티드 사이의 접합을 매개할 때마다 접합체 및 제제의 폴리펩티드 요소의 기능에 관한 이전 조항도 적용된다는 것을 인정할 것이다. 따라서, 관심 제제가 연결 모이어티를 통해 접합체의 폴리펩티드에 접합될 때마다, 상기 관심 제제, 제2 폴리펩티드 영역, 제1 폴리펩티드 영역 및 양전하 아미노산-풍부한 영역은 그들의 접합되지 않은 형태와 관련하여 접합체의 폴리펩티드에서 접합의 위치, 연결 모이어티의 화학적 조성 또는 구조, 및 연결 모이어티와 제제 사이 및 연결 모이어티 및 접합체의 폴리펩티드 사이의 결합(들)의 화학적 성질에 관계없이, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 99%, 더욱 더 바람직하게는 100%의 그들의 기능성을 보존한다. 이것은 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합될 때 모든 관심 제제에 적용된다.

[0616] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 상기 제제와 접합체의 폴리펩티드 사이의 부착을 매개하는 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 또는 4-말레이미도 헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 복수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합되는 경우, 접합체의 폴리펩티드에 대한 제제(들)의 부착을 매개하는 모든 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 또는 4-말레이미도 헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 또 다른 실시양태에서 다수의 제제가 접합체의 폴리펩티드에 접합된 경우, 접합체의 폴리펩티드에 대한 제제(들)의 부착을 매개하는 연결 모이어티의 일부는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 또는 4-말레이미도 헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다.

[0617] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 접합체의 제제와 폴리펩티드 사이의 부착을 매개하는 연결 모이어티는 폴리펩티드의 측쇄에 존재하는 설프히드릴기와 관심 제제의 활성기와 반응할 수 있는 모이어티이다. 폴리펩티드의 측쇄에 존재하는 설프히드릴기와 반응할 수 있는 적합한 연결기는 말레이미도 시약, 할로아세틸, 아지리딘, 아크릴로일, 아릴화제, 비닐술폰, 피리딜 이황화물, TNB-티올 및 이황화물 환원제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이들 기의 대부분은 알킬화(보통 티오에테르 결합의 형성) 또는 이황화 교환(이황화 결합의 형성)에 의해 설프히드릴에 접합된다.

[0618] 일부 실시양태에서, 상기 연결 모이어티는 접합체의 일부 및 관심 제제에 연결된 연결 모이어티의 일부를 형성하는 폴리펩티드에 연결된 연결 모이어티의 일부를 연결하는 스페이스 영역을 함유한다. 일부 실시양태에서, 연결 모이어티는 스페이스에 의해 관심 제제와 연결되고 연결 모이어티는 관심 스페이스-제제를 폴리펩티드와 연결한다. 한 실시양태에서, 상기 연결 모이어티는 폴리펩티드와 연결되고 연결 모이어티는 스페이스-폴리펩티드를 관심 제제와 연결한다.

- [0619] 본원에 사용된 용어 "스페이서"는 적어도 2개의 다른 모이어티를 서로 연결하는 모이어티를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 중합체이다.
- [0620] 본원에 사용된 용어 "중합체"는 합성 또는 생물학적 기원 또는 둘 다의 조합일 수 있는 선형, 원형, 분지형, 가교결합 또는 덴드리머 방식 또는 이들의 조합으로 화학 결합에 의해 연결된, 반복 구조 단위, 즉 단량체를 포함하는 분자를 의미한다. 단량체는 중합체가 동일중합체인 경우 동일할 수 있거나, 중합체가 이종중합체인 경우 상이할 수 있다.
- [0621] 이종중합체는 또한 "공중합체"로 지칭될 수 있으며, 예를 들어, 상이한 유형의 단량체가 교대하는 교대 공중합체, 주기적 공중합체, 여기서 상이한 유형의 단량체가 반복되는 서열로 배열됨; 통계적 공중합체, 여기서 상이한 유형의 단량체가 무작위로 배열됨; 블록 공중합체, 여기서 한 종류의 단량체로만 구성된 서로 다른 동중합체의 블록이 공유 결합으로 연결됨; 및 구배 공중합체, 여기서 상이한 단량체의 조성이 중합체 사슬을 따라 점진적으로 변화함;을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 특정 실시양태에서 C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐, C₂₋₅₀ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3-원 내지 10-원 헤테로시클릴, 8-원 헤테로시클릴, 11-원 헤테로비시클릴, 페닐, 나프틸, 인데닐, 인다닐 및 테트라리닐로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 다른 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 PEG 기반 스페이서이다.
- [0622] 스페이서와 관련하여 본원에 사용된 용어 "PEG-기반"은 상기 스페이서가 PEG를 포함함을 의미한다. 이러한 PEG 기반 모이어티 또는 제제는 적어도 10%(w/w) PEG, 예컨대 적어도 20%(w/w) PEG, 예컨대 적어도 30%(w/w) PEG, 예컨대 적어도 40% (w/w) PEG, 예컨대 적어도 50%(w/w), 예컨대 적어도 60(w/w) PEG, 예컨대 적어도 70%(w/w) PEG, 예컨대 적어도 80%(w/w) PEG, 예컨대 적어도 90%(w/w) PEG, 또는 적어도 95%(w/w) PEG를 포함한다. PEG 기반 모이어티 또는 제제의 나머지 중량 백분율은 다음으로 이루어진 군에서 선택된 것과 같은 다른 모이어티일 수 있다: C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐, C₂₋₅₀ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3~10원 헤테로시클릴, 8~11원 헤테로바이시클릴, 페닐, 나프틸, 인데닐, 인다닐 및 테트라리닐; -CR<, >C< 또는 -N<과 같은 분기점; 및 로 이루어진 군으로부터 선택되는 연결을 포함하며, 여기서 점선은 모이어티 또는 제제의 나머지 부분에 대한 부착을 나타내고, -R 및 -R^a는 -H 및 C₁₋₆알킬로 이루어진 군으로부터 서로 독립적으로 선택되고; 모이어티 및 연결은 임의로 추가로 치환된다.
- [0623] 본 발명의 일부 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드에 대한 연결 모이어티 결합체/드는 세포질에 존재하는 효소에 의해 처리되기 쉽고, 일단 융합 단백질에 접합된 치료제가 세포에 내재화되면 융합 단백질로부터 치료제 방출한다.
- [0624] 게다가, 일부 제제는 동일한 분자의 다중 카피가 함께 결합되어 중합체의 각 단량체가 상기 분자 중 하나인 중합체를 형성할 수 있는 방식으로 중합될 수 있다. 이러한 중합체의 비제한적 예는 올리고-FdU를 생성하는 5-플루오로-2'-데옥시우리딘(FdU)이다. 본 발명의 일부 실시양태는 이러한 중합체를 포함할 수 있는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명의 일부 다른 실시양태는 제제가 서로의 생리학적 또는 생물학적 효과를 방해하지 않는 한 제제의 2개 이상의 상이한 분자의 중합체를 포함할 수 있는 것으로 의도된다. 당업자는 관심 제제의 중합체를 특징으로 하는 본 발명의 실시양태가 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 또는 그 이상의 비율로 1개 이상의 서로 다른 관심 제제와 함께 중합된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50개 이상의 분자를 특징으로 할 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- [0625] IV-F. 리포터 단백질
- [0626] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드는 리포터 단백질을 추가로 포함한다.
- [0627] 당업자는 용어 "리포터 단백질"이 "리포터 유전자"의 발현으로부터 생성된 단백질을 지칭하는 것으로 인식할 것이다. 리포터 단백질은 조직, 세포 또는 세포하 위치에서 리포터 유전자의 발현 위치, 단백질-단백질 상호작용, 원형질막 또는 내막을 통한 수송, 소포 교통, 리간드-수용체 상호작용, 등에서의 리포터 유전자의 발현의 위치와 같은 다중의 목적에 적합한 마커로서 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용된다.
- [0628] 본 발명의 맥락에서 유용한 리포터 단백질은 *Photinus pyralis*로부터의 루시페라제-4-모노옥시지나제, β-갈락토시다제, 티미딘 키나제 등을 포함한다. 리포터 단백질에는 이미 논의된 형광 단백질도 포함된다.
- [0629] 본 발명의 접합체의 폴리펩티드에 의해 포함된 리포터 단백질은 양전하 아미노산-풍부한 영역에 직접 인접하거나 링커에 의해 분리된다. 양전하 아미노산-풍부한 영역의 상대적 위치는, 그러나 융합 단백질 요소의 상대적

위치에 대한 전술한 고려 사항에 따라 유지된다. 따라서 융합 단백질에서 양전하 아미노산-풍부한 영역의 위치와 독립적으로 형광 단백질은 직접적으로 또는 링커에 의해 분리되어 항상 그것에 인접한다.

[0630] 따라서, 형광 단백질을 포함하는 본 발명의 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 폴리펩티드 요소의 가능한 상대 위치는 다음 반응식에 적합할 것이다(여기서 RP는 리포터 단백질을 나타내고 요소에 대해 위에서 언급한 넘버링은 유지된다: (1) 제 2 폴리펩티드 영역, (2) 제 1 폴리펩티드 영역, (3) 양전하 아미노산 영역):

- [0631] · N-(1)-(2)-RP-(3)-C
- [0632] · N-(1)-링커-(2)-RP-(3)-C
- [0633] · N-(1)-단백질 절단 부위-(2)-RP-(3)-C
- [0634] · N-(1)-(2)-링커-RP-(3)-C
- [0635] · N-(1)-(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0636] · N-(1)-링커-(2)-링커-RP-(3)-C
- [0637] · N-(1)- 단백질 절단 부위-(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0638] · N-(1)- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0639] · N-(1)- 단백질 절단 부위-(2)- 링커 -RP-(3)-C
- [0640] · N-(3)-RP-(2)-(1)-C
- [0641] · N-(3)-RP-링커-(2)-(1)-C
- [0642] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)-(1)-C
- [0643] · N-(3)-RP-(2)-링커-(1)-C
- [0644] · N-(3)-RP-(2)-링커-(1)-C
- [0645] · N-(3)-RP-링커-(2)-링커-(3)-C
- [0646] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0647] · N-(3)-RP- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0648] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0649] · N-(1)-(2)-RP-링커-(3)-C
- [0650] · N-(1)-(2)-RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0651] · N-(1)-링커-(2)-RP-링커-(3)-C
- [0652] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0653] · N-(1)- 링커 -(2)-RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0654] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-RP- 링커 -(3)-C
- [0655] · N-(1)-(2)-링커-RP-링커-(3)-C
- [0656] · N-(1)-(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0657] · N-(1)-(2)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0658] · N-(1)-(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(3)-C
- [0659] · N-(1)-링커-(2)-링커-RP-링커-(3)-C
- [0660] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0661] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0662] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(3)-C

- [0663] · N-(1)- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0664] · N-(1)- 링커 -(2)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0665] · N-(1)- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(3)-C
- [0666] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)- 링커 -RP- 링커 -(3)-C
- [0667] · N-(3)-링커-RP-(2)-(1)-C
- [0668] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP-(2)-(1)-C
- [0669] · N-(3)-링커-RP-링커-(2)-(1)-C
- [0670] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)-(1)-C
- [0671] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(2)-(1)-C
- [0672] · N-(3)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)-(1)-C
- [0673] · N-(3)-링커-RP-(2)-링커-(1)-C
- [0674] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP-(2)- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0675] · N-(3)- 링커 -RP-(2)- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0676] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP-(2)- 링커 -(1)-C
- [0677] · N-(3)-링커-RP-링커-(2)-링커-(3)-C
- [0678] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0679] · N-(3)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0680] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0681] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0682] · N-(3)- 링커 -RP- 링커 -(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-C
- [0683] · N-(3)- 링커 -RP- 단백질 절단 부위 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0684] · N-(3)- 단백질 절단 부위 -RP- 링커 -(2)- 링커 -(3)-C
- [0685] · N-(2)-(1)-RP-(3)-C
- [0686] · N-(2)-링커-(1)-RP-(3)-C
- [0687] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(1)-RP-(3)-C
- [0688] · N-(2)-(1)-링커-RP-(3)-C
- [0689] · N-(2)-(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0690] · N-(2)-링커-(1)-링커-RP-(3)-C
- [0691] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0692] · N-(2)- 링커 -(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-C
- [0693] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(1)- 링커 -RP-(3)-C
- [0694] · N-(2)-RP-(3)-(1)-C
- [0695] · N-(2)-(3)-RP-(1)-C
- [0696] · N-(2)-링커-RP-(3)-(1)-C
- [0697] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-(1)-C
- [0698] · N-(2)-링커-(3)-RP-(1)-C

- [0699] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(3)-RP-(1)-C
- [0700] · N-(2)-RP-(3)-링커-(1)-C
- [0701] · N-(2)-RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0702] · N-(2)-(3)-RP-링커-(1)-C
- [0703] · N-(2)-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0704] · N-(2)-링커-RP-(3)-링커-(1)-C
- [0705] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0706] · N-(2)- 링커 -RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0707] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)- 링커 -(1)-C
- [0708] · N-(2)-링커-(3)RP--링커-(1)-C
- [0709] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(3)RP-단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0710] · N-(2)- 링커 -(3)RP-단백질 절단 부위 -(1)-C
- [0711] · N-(2)- 단백질 절단 부위 -(3)RP-링커 -(1)-C
- [0712] · N-(1)-RP-(3)-(2)-C
- [0713] · N-(1)-(3)-RP-(2)-C
- [0714] · N-(1)-RP-(3)-링커-(2)-C
- [0715] · N-(1)-RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0716] · N-(1)-(3)-RP-링커-(2)-C
- [0717] · N-(1)-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0718] · N-(1)-링커-RP-(3)-(2)-C
- [0719] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)-(2)-C
- [0720] · N-(1)-링커-(3)-RP-(2)-C
- [0721] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(3)-RP-(2)-C
- [0722] · N-(1)-링커-RP-(3)-링커-(2)-C
- [0723] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0724] · N-(1)- 링커 -RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0725] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -RP-(3)- 링커 -(2)-C
- [0726] · N-(1)-링커-(3)-RP-링커-(2)-C
- [0727] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0728] · N-(1)- 링커 -(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(2)-C
- [0729] · N-(1)- 단백질 절단 부위 -(3)-RP- 링커 -(2)-C
- [0730] · N-RP-(3)-(1)-(2)-C
- [0731] · N-(3)-RP-(1)-(2)-C
- [0732] · N-RP-(3)-링커-(1)-(2)-C
- [0733] · N-RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)-(2)-C
- [0734] · N-(3)-RP-링커-(1)-(2)-C

[0735] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(1)-(2)-C

[0736] · N-RP-(3)-(1)-링커-(2)-C

[0737] · N-RP-(3)-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0738] · N-(3)-RP-(1)-링커-(2)-C

[0739] · N-(3)-RP-(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0740] · N-RP-(3)-링커-(1)-링커-(2)-C

[0741] · N-RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0742] · N-RP-(3)- 링커 -(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0743] · N-RP-(3)- 단백질 절단 부위 -(1)- 링커 -(2)-C

[0744] · N-(3)-RP-링커-(1)-링커-(2)-C

[0745] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0746] · N-(3)-RP- 링커 -(1)- 단백질 절단 부위 -(2)-C

[0747] · N-(3)-RP- 단백질 절단 부위 -(1)- 링커 -(2)-C

[0748] IV-G. 본 발명의 바람직한 집합체

[0749] 본 발명의 바람직한 실시양태는 성분들이 상기 표 3에 정의된 바와 같고 관심 제제가 플록수리딘 또는 플록수리딘 펜타뉴클레오타이드의 하나 이상의 카피인 집합체이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 상기 정의된 집합체는 집합체를 형성하는 폴리펩티드의 제1 영역의 측쇄에 있는 아미노기 또는 티올기와, 2 내지 35개의 원자 연결 모이 어티에 의해 연결되거나 연결되지 않은 치료제에서 티올 또는 히드록시 또는 포스페이트기 또는 아미노 또는 카 르복시 사이의 연결로부터 생성된다.

[0750] IV-H 본 발명의 집합체의 화학량론

[0751] 본 발명의 융합 단백질에 접합되는 관심 제제의 수는, 특별히 제한적이지 않지만, 관심 제제와의 화학적 접합에 이용가능한 본 발명의 폴리펩티드 내의 이용가능한 잔기의 수에 의존할 것이다. 대부분의 집합체는 집합체의 폴 리펩티드의 일부를 형성하는 아미노산의 측쇄에 존재하는 아미노- 또는 설프히드릴 기를 통해 발생하기 때문에 접합체의 폴리펩티드에 접합된 제제의 수는 라이신 및 아르기닌 잔기의 수(측쇄의 아미노기를 통한 접합의 경우) 또는 시스테인 잔기의 수(측쇄의 설프히드릴기를 통한 접합의 경우)에 뿐만 아니라 접합 반응의 수율에 의존할 것이다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명의 집합체의 폴리펩티드는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30개의 관심 제제에 접합된다.

[0752] 제제가 중합체로 제공되는 특정한 경우에, 제제의 수는 또한 중합체 내의 단량체의 수에 의존할 것이라는 것이 이해될 것이다. FdU 올리고머의 특정한 경우에, 주어진 집합체에서 관심 제제의 수는 집합체의 폴리펩티드에 부 착된 올리고머의 수를 단량체의 수로 곱한 결과일 것이다. FdU 올리고머의 바람직한 경우에, 바람직한 실시양태는 본 발명의 폴리펩티드당 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 85, 100, 125, 150개 이상의 치료제를 포함하는 집합체를 포함하며, 분자당 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25 또 는 30개의 FdU 펜타머에 각각 상응한다.

[0753] 또한, 본 발명에 따른 나노입자는 본 발명의 집합체의 다중 카피의 조립으로부터 생성된다. 바람직한 실시양태 에서, 나노입자는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 25, 보다 바람직하게는 적어도 15개의 본 발명의 집합체의 단량체를 포함한다.

[0754] 따라서, 각 나노입자에 부착된 관심 제제의 총 수는 다음에 의존한다. (i) 집합체의 각 폴리펩티드에 접합된 제 제의 수, (ii) 제제의 올리고머화 상태 및 (iii) 나노입자를 형성하는 집합체의 수.

[0755] 바람직한 실시양태에서, 나노입자는 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 개의 관심 제제에 접합된다, 추가의 바람직한 실시양태에서, 나노입자는 적 어도 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100개, 보다 바람직하게는 적어도 60개의 FdU 올 리고머의 분자에 접합된다.

- [0756] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1, 제2, 제3, 제4 및 제5 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제6 측면에 동일하게 적용 가능하다.
- [0757] V- 본 발명의 접합체의 제조 방법
- [0758] 일곱 번째 측면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 본 발명의 제6 측면의 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다:
- [0759] (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가의 변이체를 포함하는 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계, 및
- [0760] (ii) 상기 폴리펩티드를, 폴리펩티드 내의 적어도 하나의 기와 반응할 수 있는 본 발명의 제6 측면에 따른 접합체의 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 관심 제제의 반응성 기와 폴리펩티드 기 사이의 결합 형성에 적합한 조건 하에 수행됨
- [0761] 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 본 발명의 제6 측면의 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다:
- [0762] (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드를 제공하는 단계로, 여기서 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 및
- [0763] (ii) 상기 폴리펩티드를 폴리펩티드 내의 반응성 기와 반응할 수 있는 관심 제제와 접촉시키는 단계로, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합 형성에 적합한 조건 하에 수행됨.
- [0764] 당업자는 본원에 사용된 "반응기"가 두 분자를 함께 결합시키는 방식으로, 일반적으로 하나 이상의 추가 분자의 방출과 함께 다른 분자로부터 다른 모이머티와 화학적으로 반응할 수 있는 분자의 임의의 모이머티를 의미한다는 것을 인식할 것이다. 많은 이러한 반응은 다음과 같이 당업계에 알려져 있으며 카복실과 아민 기 사이의 펩티드 결합의 형성은 이들 중 하나의 비제한적인 예이다.
- [0765] 분자를 언급할 때 본원에 사용된 "활성화된"은, 분자가 이전에 분자에 존재하지 않았던 방식으로(예를 들어, 활성화는 이전에 존재하지 않는 반응성 기를 추가하여 이전에는 불가능했던 결합을 허용함) 또는 증가된 반응성으로(분자와 다른 분자의 반응이 비활성화된 상태에서보다 더 낮은 활성화 에너지를 필요로 함을 의미함) 화학적으로 반응할 수 있는 화학적 변형을 포함하는 분자의 변형된 버전을 칭한다. 본 발명은 접합체의 관심 제제를 활성화한 다음 활성화된 제제를 접합체의 폴리펩티드와 접촉시키거나 또는 접합체의 폴리펩티드를 활성화한 다음 활성화된 폴리펩티드를 관심 제제와 접촉시키는 가능성을 고려한다. 두 경우 모두, 폴리펩티드 또는 관심 제제의 활성화는 일반적으로 활성화될 분자를 활성화될 분자 내에 반응성 기를 도입하는 제제와 반응시킴으로써 수행된다. 접합체의 관심 제제 또는 접합체의 폴리펩티드가 활성화되도록 하는 반응성 기의 예는 당업자에게 일반적으로 알려진 많은 다른 것들 중에서 카복실, 아민, 이민, 티올, 술폰, 히드록실, 술페이트 및 포스페이트 모이머티를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 접합체의 관심 제제의 활성화된 형태는 또한 본원에서 "활성화된 관심 제제"로 지칭된다. 접합체의 폴리펩티드의 활성화된 형태는 또한 본원에서 "활성화된 폴리펩티드"로 지칭된다. 활성화된 폴리펩티드 내의 반응성 기 또는 기는 본 발명의 제6 측면에 기재된 바와 같이, 관심 제제(들)가 접합될 폴리펩티드 영역이거나 그 영역에 위치한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 반응기는 다음과 같이 위치한다: 제1 폴리펩티드 영역, 제2 폴리펩티드 영역, 제3 폴리펩티드 영역, 임의의 상기 폴리펩티드 영역 사이의 링커/들 또는 접합체의 상기 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위. 또 다른 특정 실시양태에서, 반응성 기는 제1 폴리펩티드 영역, 및/또는 제2 폴리펩티드 영역, 및/또는 제3 폴리펩티드 영역, 및/또는 임의의 상기 폴리펩티드 영역 사이의 링커에 위치하며, 및/또는 또는 접합체의 상기 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위에 존재한다.
- [0766] 바람직한 실시양태에서, 이는 접합체의 폴리펩티드에 포함된 제1 폴리펩티드 영역에 위치한다. 특정 실시양태에서 반응성 기는 접합체의 제1 폴리펩티드 영역 및 또한 방금 언급한 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드에 포함된 다른 영역에 위치한다.
- [0767] 연결 모이머티가 폴리펩티드와 접합체의 관심 제제 사이의 결합을 매개하는 본 발명의 실시양태에서, 연결 모이머티는 관심 제제 및 접합체의 폴리펩티드 내 기와 반응하는 이관능성 가교제, 및 보다 바람직하게는 이형이관능성 가교제이며, 순차적으로(활성화된 제제와 먼저 반응한 다음 폴리펩티드와 반응하거나, 먼저 폴리펩티드와 반응한 다음 활성화된 제제와 반응) 또는 동시에, 다른 연결 중에서 티오에테르, 아마이드 결합, 탄소-질소 이중결합 또는 Kalia J 외. *Advances in bioconjugation*. *Curr Org Chem* 2010 January, 14(2):138-147)에 개시된

시클로추가에 의해 생성된 연결들을 사용한다. 실시예로서 전형적인 티올-반응성 작용기는 요오도아세트아미드, 말레이미드 및 이황화물을 포함한다. 또한, 단백질은 라이신 측쇄 및 N 말단의 아미노기와 아미드 결합을 형성하기 위해 활성화된 에스테르(예: N-히드록시숙신이미드 에스테르)를 나타내는 표면 또는 소분자로 처리될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 티올기 및 아미노기와 반응할 수 있는 반응성 기를 함유하는 이중작용성 가교결합제이다. 한 실시양태에서, 이중작용성 가교제는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다.

[0768] 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 제 1 단계에서 관심 활성화된 제제와 반응하고 제 2 단계에서 접합체의 폴리펩티드와 반응한다. 또 다른 실시양태에서, 연결 모이어티는 제1 단계에서 접합체의 폴리펩티드와 반응하고, 제2 단계에서 관심 제제와 반응한다.

[0769] 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드를 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계는 이들 사이의 결합을 확립하는 반응을 선호하는 매질에서 수행되는 것으로 의도된다. 상기 반응에 적합한 매질은 수성 버퍼 및 비수성 버퍼를 포함하는 통상의 기술자에게 일반적으로 공지되어 있다. 또한, 고체 지지체는 활성화된 제제의 합성 및 접합체의 폴리펩티드, 및 관심 제제의 접합, 뿐만 아니라 하나를 포함하는 실시양태에서 연결 모이어티를 유도하는 임의의 반응 단계를 위한 배지와 함께 사용될 수 있음을 의도한다. 또한, 폴리펩티드와 치료제 사이의 접합체의 제조 방법은 폴리펩티드, 관심 활성화 제제, 및 연결 모이어티를 포함하는 것으로 제한되지 않고, 그러나 일부 실시양태는 또한 반응에서 하나 이상의 촉매 및 보조인자의 사용을 포함한다.

[0770] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 관심 제제의 활성화된 형태는 접합체의 폴리펩티드, 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드에 포함된 제1 폴리펩티드 영역에서 측쇄 중 적어도 하나와 반응하는 기를 함유한다. 당업자가 이해하는 바와 같이 "폴리펩티드의 측쇄"는 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기에 있는 측쇄를 의미한다.

[0771] 또 다른 바람직한 실시양태에서 상기 잔기는 외부 라이신이다. 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드에서 측쇄 중 적어도 하나와 반응하는 관심 활성화제, 바람직하게는 화학요법제의 기는 티올기이다.

[0772] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 활성화된 치료제는 활성화된 화학요법제, 보다 바람직하게는 티올-작용화된 올리고-플록수리딘이다.

[0773] 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고, 이 섹션의 이전 실시양태에서 나타난 접합체의 폴리펩티드의 측쇄와 활성화제 사이의 결합을 매개한다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 관심 제제, 바람직하게는 활성화된 FdU, 더욱 더 바람직하게는 술프히드릴로 관능화된 FdU에 결합되고, 제2 단계에서는 접합체의 폴리펩티드의 측쇄, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 라이신, 더욱 더 바람직하게는 본 발명의 접합체의 제1 폴리펩티드 영역의 외부 라이신에 결합된다,

[0774] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 활성화된 치료제는 활성화된 화학요법제, 보다 바람직하게는 아미노-작용화된 올리고-플록수리딘이다.

[0775] 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고, 이 섹션의 이전 실시양태에서 나타난 접합체의 폴리펩티드의 측쇄와 활성화제 사이의 결합을 매개한다.

[0776] 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 관심 제제, 바람직하게는 활성화된 FdU, 더욱 더 바람직하게는 아미노로 관능화된 FdU에 결합되며, 그리고 제2 단계에서 접합체의 폴리펩티드의 측쇄, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 시스템, 더욱 더 바람직하게는 본 발명의 접합체의 제1 폴리펩티드 영역의 외부 시스템에 대한 것이다.

[0777] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 활성화된 치료제는 활성화된 화학요법제, 보다 바람직하게는 카르복시-작용화된 올리고-플록수리딘이다.

[0778] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 FdU, 더욱 더 바람직하게는 활성화된 형태의 카르복실산으로 작용화된 FdU는 관심 제제의 카르복실기와 폴리펩티드의 반응성 기(예: 관심 제제의 카르복실기와 아미드 기를 형성할 수 있는 아미노기)를 접합체의 폴리펩티드 네 측쇄와, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 라이신, 더욱 더 바람직하게는 본 발명의 접합체의 제1 폴리펩티드 영역의 외부 라이신과 반응시킨다.

[0779] 추가의 바람직한 실시양태에서, 관심 제제, 더욱 바람직하게는, FdU 또는 그의 올량체 형태는 아미노기로 관능화되고 연결 모이어티는 관심 제제의 아미노기와 폴리펩티드의 반응성과 반응하는 이관능성 제제이다. 일부

실시양태에서, 이관능성 제제는 아미노기와 반응하는 모이어티(예: 관심 제제의 아미노기와 아미드기를 형성할 수 있는 카르복실레이트기) 및 단백질의 측쇄에 있는 설프히드릴기와 반응하는 모이어티(예를 들어, 폴리펩티드의 측쇄에서 설프히드릴기와 티오에테르를 형성할 수 있는 말레이미드기)를 함유한다.

[0780] 추가의 바람직한 실시양태에서, 관심 제제, 보다 바람직하게는, FdU 또는 이의 5량체 형태는 카르복실기로 관능화되고, 연결 모이어티는 관심 제제의 카르복실기 및 폴리펩티드의 반응성기와 반응하는 이관능성 제제이다. 일부 실시양태에서, 이관능성 제제는 카르복실기와 반응하는 모이어티(예를 들어, 관심 제제에서 카르복실기와 아미드기를 형성할 수 있는 아미노기) 및 단백질의 측쇄에서 설프히드릴기와 (예를 들어, 폴리펩티드의 측쇄에서 설프히드릴기와 티오에테르를 형성할 수 있는 말레이미드기) 또는 단백질에서 아미노기와 반응하는 반응하는 모이어티를 함유한다.

[0781] 본 발명의 맥락에서 관심 제제와 폴리펩티드 사이에 사용될 수 있는 추가 링커는 항체-약물 접합체 제조에 일반적으로 사용되는 것을 포함하며 예로써 Leung 외. (Antibodies 2020, 9, 2; doi:10.3390/antib9010002) (도 6 참조) 개시된 것과 Bargh 외. (Chem. Soc. Rev., 2019, DOI: 10.1039/c8cs00676h)에 개시된 것으로, 여기서 이들의 내용은 참조로서 포함된다.

[0782] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 접합체의 폴리펩티드의 활성화된 형태는 관심 제제에서 적어도 하나의 모이어티와 반응하는 기를 함유한다. 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 접합체의 활성화된 폴리펩티드와 반응하는 관심 제제, 바람직하게는 화학요법제의 기는 티올기이다.

[0783] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 접합체의 활성화된 폴리펩티드는 폴리펩티드의 측쇄에 있는 하나 이상의 아미노기를 N-히드록시숙신이미드기와 같은 활성화된 카르복실기를 포함하는 이관능성 제제와 반응시켜 수득된다. 한 실시양태에서, 이관능성 제제는 관심 있는 경우 제제 내에서 아미노, 티올 또는 히드록실기와 반응할 수 있는 제2 활성화된 카르복실기를 함유한다.

[0784] 추가의 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고 접합체의 폴리펩티드 내의 아미노기와 관심 제제 내의 티올기 사이의 접합을 매개한다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 접합체의 폴리펩티드에, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 라이신에 결합되고 제2 단계에서 제제의 측쇄, 바람직하게는 활성화제의 티올기에 연결된다.

[0785] 추가의 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고 접합체의 폴리펩티드 내의 티올기와 관심 제제 내의 아미노기 사이의 접합을 매개한다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 접합체의 폴리펩티드에, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 시스테인에 결합되고 제2 단계에서 관심 제제 바람직하게는 관심 제제의 아미노기에 결합한다.

[0786] 추가의 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고 접합체의 폴리펩티드 내의 티올기와 관심 제제 내의 아미노기 사이의 접합을 매개한다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 접합체의 폴리펩티드에, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 시스테인에 결합되고 제2 단계에서 관심 제제, 바람직하게는 관심 제제의 아미노기에 결합한다.

[0787] 추가의 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티는 6-말레이미도 헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이고 접합체의 폴리펩티드 내의 티올기와 관심 제제 내의 아미노기 사이의 접합을 매개한다. 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 연결 모이어티 6-말레이미도 헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 제1 단계에서 관심 제제, 바람직하게는 관심 제제 내의 아미노기에 결합된다. 그리고 제2 단계에서 접합체의 폴리펩티드, 보다 바람직하게는 접합체의 폴리펩티드의 외부 시스테인의 티올기에 결합한다.

[0788] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제7 측면에 동일하게 적용 가능하다.

[0789] VI - 길항 CXCR4 리간드를 함유하는 본 발명의 폴리펩티드

[0790] 본 발명의 발명자들은 길항적 CXCR4 리간드 및 니도젠-1의 G2 도메인 또는 이의 변이체 형태를 포함하는 융합 단백질이 CXCR4-발현 세포를 표적으로 하고 침투할 수 있음을 관찰하였다. 더욱이, 이 융합 단백질이 다중양이온성 영역의 존재에 의해 추가로 변형될 때, 융합 단백질은 또한 CXCR4-발현 세포를 표적화 및 침투할 수 있고

CXCR4-발현 세포에서 세포자멸사를 유도할 수 있는 나노입자로 자발적으로 조립된다.

[0791] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다(본 발명의 제2 폴리펩티, 본 발명의 융합 단백질, 본 발명의 CXCR4-길항 폴리펩티드로도 알려짐)

[0792] (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 제1 영역 및

[0793] (ii) 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 제2 영역.

[0794] 제1 영역은 본 발명의 제1 폴리펩티드와 관련하여 그리고 본 발명의 접합체의 일부를 형성하는 폴리펩티드의 제1 영역과 관련하여 위에서 정의되었으며, 본 발명의 제2 폴리펩티드에도 동일하게 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 니도젠-1의 G2 도메인의 기능적으로 등가인 변이체이고, 여기서 니도젠-1의 G2 도메인의 기능적으로 등가의 변이체는 본 발명의 제1 폴리펩티드에서 상기 정의된 임의의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 제53항 또는 제54항에 있어서, 제1 영역이 UniProt 데이터베이스에 수탁번호 P14543-1로 정의된 인간 니도젠-1의 서열과 관련하여 아미노산 430 내지 667을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 제1 영역의 일부를 형성하는 니도젠-1의 도메인 G2의 기능적으로 등가의 변이체는 수탁 번호 P14543-1로 UniProt 데이터베이스에 정의된(2009년 7월 7일자 버전) 인간 니도젠-1의 서열의 넘버링에 대해 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469 및 518에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함한다. 따라서, 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드는 니도젠-1의 도메인 G2의 기능적으로 등가인 변이체로서 이는 수탁 번호 P14543-1로 UniProt 데이터베이스에 정의된(2009년 7월 7일자 버전) 인간 니도젠-1의 서열 넘버링에 대해 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469 및 518에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 영역에 포함될 수 있는 니도젠 G2 도메인 변이체는 제한 없이 본 발명의 제1 측면의 맥락에서 상기 정의된 임의의 니도젠 G2 도메인 변이체를 포함하며, 이는 서열번호 64, 65 및 87 내지 104 로 각각 정의된 NID0mut2, NID0mut3, NID0mut3-V45T, the NID0mut3_V121Q, NID0mut3-F157E, NID0mut3-V215T, NID0mut4, NID0mut4_T215V, NID0mut5, NID0mut3-V176T, NID0mut3-I200T, NID0mut3-V236Y, NID0mut3-L237T, NID0mut3-S65I, NID0mut3-R114I, NID0mut3-C214S, NID0mut3-S65I_R114I, NID0mut5-S65I_R114I, NID0mut3-S65I_R114I 및 NID0mut5-S65I_R114I 를 운반하는 변이체를 포함한다.

[0795] 본 발명의 제2 폴리펩티드의 제2 영역은 길항 CXCR4 리간드를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "길항적 CXCR4 리간드"는 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있고 작용제와의 상호작용에 대한 반응으로 상기 분자의 생물학적 활성을 감소, 억제 또는 방지하는 임의의 폴리펩티드, 펩티드 또는 펩티드 모방체를 지칭한다. 한 실시양태에서, CXCR4 길항제 리간드는 경쟁적 길항제, 즉 수용체를 반드시 활성화시키지 않으면서 내인성 리간드 또는 작용제와 동일한 결합 부위(활성 부위)에서 CXCR4에 가역적으로 결합하는 길항제이다.

[0796] 주어진 펩티드가 CXCR4에 결합할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 적절한 방법은 본 발명의 접합체와 관련하여 위에서 정의되었으며, 인스턴트 폴리펩티드에 동등하게 적용 가능하다. 일부 실시양태에서, 제2 영역은 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 해리 상수(KD)를 가지고 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있다. 폴리펩티드가 표적 분자에 결합할 수 있는지 여부를 결정하는 방법 및 상기 결합의 해리 상수를 결정하는 방법은, 본 발명의 제 2 측면에서 "특이적으로 결합하는"의 정의에서 제공된다.

[0797] 본 발명에 따라 사용하기에 적합한 길항제는 최대한 0.1 μ M, 최대한 0.2 μ M, 최대한 0.3 μ M, 최대한 0.4 μ M, 최대한 0.5 μ M, 최대한 0.6 μ M, 최대한 0.7 μ M, 최대한 0.8 μ M, 최대한 0.9 μ M, 최대한 1 μ M, 최대한 2 μ M, 최대한 3 μ M, 최대한 4 μ M, 최대한 5 μ M, 최대한 6 μ M, 최대한 7 μ M, 최대한 8 μ M, 최대한 9 μ M, 최대한 10 μ M, 최대한 15 μ M, 최대한 20 μ M, 최대한 30 μ M, 최대한 40 μ M, 최대한 50 μ M, 최대한 60 μ M, 최대한 70 μ M, 최대한 80 μ M, 최대한 90 μ M 또는 최대한 100 μ M의 IC50을 갖는 그의 천연 리간드 CXCL12에 의해 CXCR4에 결합하기 위해 경쟁하는 것을 특징으로 한다.

[0798] 분자가 길항성 CXCR4 리간드인지 여부를 결정하기 위한 적합한 방법은 예를 들어 문헌[Zirafi et al. (Cell Rep. 2015, 11, 737)에 나타난 방법이며, 그 내용은 여기에 참조로 포함된다. 이러한 방법은 CXCL12와 CXCR4의 결합을 억제하는 길항제의 능력 검출에 기반한 분석을 포함하며(분자가 리간드인지 여부를 결정하기 위해) 뿐만 아니라, HEX293 세포와 같은 CXCR4-발현 세포로부터 Ca^{2+} 방출을 차단하는 분자의 능력 검출에 기반하여, Jurkat T 세포의 CXCL12-유도 트랜스웰 이동을 차단하는 분자의 능력에 기반하여 및/또는 분자가 인간 CD34+ 줄

기 세포의 CXCL12-유도 이동을 차단하는 능력의 검출을 기반으로 (분자가 길항제로 작용하는지 여부를 결정하기 위해) 하는 방법들을 포함한다.

- [0799] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 길항 CXCR4 리간드를 운반하는 폴리펩티드의 제2 영역은 양전하 아미노산 영역을 추가로 포함한다.
- [0800] 양전하 펩티드 서열은 한가지 유형의 양으로 하전된 아미노산만을 함유할 수 있거나 또는 하나 이상의 유형의 양전하 아미노산을 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 폴리아르기닌 영역이다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 폴리리신 영역이다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 폴리히스티딘 영역이다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 라이신 및 아르기닌 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 라이신 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 아르기닌 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0801] 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 적어도 2개, 적어도 3개 이상, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 이상, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 또는 적어도 15개의 양전하 아미노산 잔기, 여기서 양전하 아미노산은 아르기닌, 라이신, 히스티딘, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0802] 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 100개 미만, 90개 미만, 80개 미만, 70개 미만, 60개 미만, 50개 미만, 40개 미만, 30개 미만, 29개 미만, 28개 미만, 27개 미만, 26개 미만, 25개 미만, 24개 미만, 23개 미만, 22개 미만, 21개 미만, 20개 미만, 19개 미만, 18개 미만, 17개 미만, 16개 미만, 15개 미만, 14개 미만, 13개 미만, 12개 미만, 11개 미만, 10개 미만, 9개 미만, 8개 미만, 7개 미만, 6개 미만, 5개 미만, 4개 미만, 3개 미만 또는 덜 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하며, 여기서 양전하 아미노산은 아르기닌, 라이신, 히스티딘 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0803] 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 2 내지 50개 아미노산, 2 내지 40개 아미노산, 2 내지 30개 아미노산, 2 내지 25개 아미노산, 2 내지 20개 아미노산, 2 내지 10개 아미노산, 2 내지 8개 아미노산, 3 내지 7개 아미노산, 4 내지 7개 아미노산, 또는 5 내지 7개 아미노산을 포함한다.
- [0804] 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은, 3 내지 50개 아미노산, 3 내지 40개 아미노산, 3 내지 30개 아미노산, 3 내지 25개 아미노산, 3 내지 20개 아미노산, 3 내지 10개 아미노산, 또는 3~8개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 4 내지 50개 아미노산, 4 내지 40개 아미노산, 4 내지 30개 아미노산, 4 내지 25개 아미노산, 4 내지 20개 아미노산, 4 내지 10개 아미노산, 또는 4 내지 8개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 5 내지 50개 아미노산, 5 내지 40개 아미노산, 5 내지 30개 아미노산, 5 내지 25개 아미노산, 5 내지 20개 아미노산, 5 내지 10개 아미노산 또는 5 내지 8개의 아미노산을 포함한다.
- [0805] 또 다른 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 아미노산, 바람직하게는 6개의 아미노산을 포함한다.
- [0806] 본 발명의 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 아르기닌 및 라이신 잔기를 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 1 내지 5개의 아르기닌, 바람직하게는 3개의 아르기닌, 및 1 내지 5개의 라이신, 바람직하게는 3개의 라이신을 포함한다.
- [0807] 본 발명의 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 아르기닌 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 1 내지 5개의 아르기닌, 바람직하게는 3개의 아르기닌, 및 1 내지 5개의 히스티딘, 바람직하게는 3개의 히스티딘을 포함한다.
- [0808] 본 발명의 한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 라이신 및 히스티딘 잔기를 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 1 내지 5개의 라이신, 바람직하게는 3개의 라이신, 및 1 내지 5개의 히스티딘, 바람직하게는 3개의 히스티딘을 포함한다.
- [0809] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 양전하 펩티드 서열은 폴리아르기닌 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리아르기닌 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 인접한 아르기닌 잔기를 포함한다.
- [0810] 본 발명의 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 양전하 아미노산-풍부 영역은 폴리라이신 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리리신 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 연속 라이신 잔기를 포함한다.

- [0811] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질의 양으로 하전하 아미노산-풍부 영역은 폴리히스티딘 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리히스티딘 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 연속 폴리히스티딘 잔기를 포함한다.
- [0812] 특정 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 RKRKRK(서열번호 77), RRRRRR(서열번호 78), KKKKKK(서열번호 79), HHHHHH(서열번호 80), RHRHRH(서열번호 81), RKRKRKRK(서열번호 82), RKRHRK(서열번호 83), RKRHRH(서열번호 84) 또는 RHRHRH(서열번호 85)이다.
- [0813] 바람직한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 최적화된 EPI-X4(서열번호 29)의 서열의 N-말단 또는 C-말단에, 바람직하게는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29)의 C-말단에 부착된다. 바람직한 실시양태에서, 양전하 펩티드 서열은 EPI-X4 의 서열(서열 번호 132)의 N-말단 또는 C-말단에 부착되며, 바람직하게는 서열 EPI-X4(서열번호 132)의 C-말단에 부착된다.
- [0814] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제2 폴리펩티드는 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역을 추가로 포함한다. 본 발명의 제2 폴리펩티드의 제3 영역으로서 작용할 수 있는 적합한 양전하 아미노산-풍부 영역은 본 발명에 따른 접합체의 제3 폴리펩티드 영역과 관련하여 상기 정의된 바와 같다. 바람직한 실시양태에서, 양으로 하전된 아미노산이 풍부한 영역은 폴리히스티딘 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리히스티딘 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 연속 히스티딘 잔기를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 양전하 아미노산이 풍부한 영역은 폴리아르기닌 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리아르기닌 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 인접한 아르기닌 잔기를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 양전하 아미노산-풍부한 영역은 폴리리신 영역이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 폴리아르기닌 영역은 2 내지 10개, 바람직하게는 6개의 연속 라이신 잔기를 포함한다.
- [0815] 바람직한 실시양태에서, 양으로 하전된 아미노산-풍부한 영역은 서열 RKRKRK(서열번호 77), RRRRRR(서열번호 78), KKKKKK(서열번호 79), HHHHHH(서열번호 80), RHRHRH(서열번호 81), RKRKRKRKRK(서열번호 82), RKRHRK(서열번호 83), RKRHRH(서열번호 84) 또는 RHRHRH(서열번호 85)를 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0816] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제2 폴리펩티드의 제1, 제2 및 제3 영역은 하기 순서로 본 발명의 제2 폴리펩티드 내에 위치한다:
- [0817] N - 제1 폴리펩티드 영역 - 제2 폴리펩티드 영역 - 제3 폴리펩티드 영역 -C;
- [0818] N - 제1 폴리펩티드 영역 - 제3 폴리펩티드 영역- 제2 폴리펩티드 영역 -C;
- [0819] N - 제2 폴리펩티드 영역 - 제1 폴리펩티드 영역 - 제3 폴리펩티드 영역 -C;
- [0820] N - 제2 폴리펩티드 영역 - 제3 폴리펩티드 영역 - 제1 폴리펩티드 영역 -C
- [0821] N - 제3 폴리펩티드 영역 - 제1 폴리펩티드 영역 - 제2 폴리펩티드 영역 -C;
- [0822] N - 제3 폴리펩티드 영역 - 제2 폴리펩티드 영역 - 제1 폴리펩티드 영역 -C.
- [0823] 따라서, 본 발명의 제2 폴리펩티드의 요소는 말단에서 말단으로 연결될 수 있지만, 바람직하게는 펩티드 결합에 의해 연결된, 이들 사이에 삽입된 하나 이상의 선택적 펩티드 또는 폴리펩티드 "링커" 또는 "스페이서"를 포함할 수도 있다.
- [0824] 링커 펩티드 또는 펩티드들은 바람직하게는 적어도 2개의 아미노산, 적어도 3개의 아미노산, 적어도 5개의 아미노산, 적어도 10개의 아미노산, 적어도 15개의 아미노산, 적어도 20개의 아미노산, 적어도 30개의 아미노산, 적어도 40개의 아미노산, 적어도 50개의 아미노산, 적어도 60개의 아미노산, 적어도 70개의 아미노산, 적어도 80개의 아미노산, 적어도 90개의 아미노산 또는 대략 100개의 아미노산을 포함한다. 링커 펩티드의 바람직한 예는 글리신, 세린, 알라닌 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 아미노산을 포함한다
- [0825] 유연성 링커의 바람직한 예는 폴리글리신 링커이다. 링커/스페이서 서열의 가능한 예는 GGSSRSS(서열번호:39), GGSSRSS(서열번호:76), SGGTSGSTSGTGST(서열 번호:49), AGSSTGSSTGPGSTT(서열번호:50) 또는 GGSGGAP(서열번호:51)를 포함한다. 이들 서열은 설계된 코일형 코일을 다른 단백질 도메인에 결합하는데 사용되어 왔다[Muller, K.M., Arndt, K.M. 및 Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328: 261-281].
- [0826] 적합한 링커의 추가의 비제한적인 예는 아미노산 서열 GGGVEGGG(서열번호 52), 류린 IgG3의 상부 힌지 영역의 10개 아미노산 잔기의 서열(PKPSTPPGSS, 서열 번호 53)을 포함하며, 이는 코일형 코일[Pack, P. and

Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584], APAETKAEPMT 서열의 펩티드(서열번호:54), 서열 GAP의 펩티드, 서열 AAA의 펩티드 및 서열 AAAL의 펩티드(서열번호 55)에 의한 이량체화된 항체의 생산에 사용되어 왔다. 바람직한 실시양태에서, 링커는 GGSSRSS(서열번호 39)이다.

[0827] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제2 폴리펩티드의 상이한 영역을 연결하는 링커의 존재 및 본 발명의 제2 폴리펩티드를 형성하는 요소의 순서에 따라서, 본 발명의 제2 폴리펩티드는 다음과 같은 요소 배열을 가질 수 있다(여기서 요소에 대해 위에서 언급한 넘버링은 다음과 같다: (1) 제 1 영역 폴리펩티드, (2) 제 2 폴리펩티드 영역, (3) 제 3 폴리펩티드 영역:

[0828] • N-(1)-(2)-(3)-C

[0829] • N-(1)-링커-(2)-(3)-C

[0830] • N-(1)-(2)-링커-(3)-C

[0831] • N-(1)-링커-(2)-링커-(3)-C

[0832] • N-(3)-(2)-(1)-C

[0833] • N-(3)-링커-(2)-(1)-C

[0834] • N-(3)-(2)-링커-(1)-C

[0835] • N-(3)-링커-(2)-링커-(1)-C

[0836] • N-(2)-(1)-(3)-C

[0837] • N-(2)-링커-(1)-(3)-C

[0838] • N-(2)-(1)-링커-(3)-C

[0839] • N-(2)-링커-(1)-링커-(3)-C

[0840] • N-(2)-(3)-(1)-C

[0841] • N-(2)-링커-(3)-(1)-C

[0842] • N-(2)-(3)-링커-(1)-C

[0843] • N-(2)-링커-(3)-링커-(1)-C

[0844] • N-(1)-(3)-(2)-C

[0845] • N-(1)-(3)-링커-(2)-C

[0846] • N-(1)-링커-(3)-(2)-C

[0847] • N-(1)-링커-(3)-링커-(2)-C

[0848] • N-(3)-(1)-(2)-C

[0849] • N-(3)-링커-(1)-(2)-C

[0850] • N-(3)-(1)-링커-(2)-C

[0851] • N-(3)-링커-(1)-링커-(2)-C

[0852] 길항적 CXCR4 리간드를 갖는 바람직한 융합 단백질은 하기 표에 정의된 바와 같다.

제 1 영역	제 1 펩티드 링커	제 2 영역	제 3 영역
최적화된 EPI-X4 (서열번호 29)	GGSSRSS (서열번호 39)	GFP	헥사히스티딘 (서열번호 73)
서열 RKRKRK (서열번호 131)의 양전하 영역에 결합된 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	GFP	헥사히스티딘 (서열번호 73)
최적화된 EPI-X4 (서열번호 29)	GGSSRSS (서열번호 39)	NIDOm2, NIDOm3, NIDOm3-V45T, NIDOm3_V121Q, NIDOm3-F157E, NIDOm3-V215T, NIDOm4, NIDOm4_T215V, NIDOm5, NIDOm3- V176T, NIDOm3- I200T, NIDOm3- V236Y, NIDOm3- L237T, NIDOm3- S65I, NIDOm3-R114I, NIDOm3-C214S, NIDOm3-S65I_R114I, NIDOm5-S65I_R114I, NIDOm3-S65I_R114I 및 NIDOm5-S65I_R114I	헥사히스티딘 (서열번호 73)
서열 RKRKRK (서열번호 131)의 양전하 영역에 결합된 최적화된 EPI-X4	GGSSRSS (서열번호 39)	NIDOm2, NIDOm3, NIDOm3-V45T, NIDOm3_V121Q, NIDOm3-F157E, NIDOm3-V215T, NIDOm4, NIDOm4_T215V, NIDOm5, NIDOm3- V176T, NIDOm3- I200T, NIDOm3- V236Y, NIDOm3- L237T, NIDOm3- S65I, NIDOm3-R114I, NIDOm3-C214S, NIDOm3-S65I_R114I, NIDOm5-S65I_R114I, NIDOm3-S65I_R114I 및 NIDOm5-S65I_R114I	헥사히스티딘 (서열번호 73)

[0853]

[0854] 표 5: 길항적 CXCR4 리간드를 갖는 바람직한 융합 단백질

[0855] VII - 본 발명의 나노입자 및 그의 제조 방법

[0856] 추가의 측면에서, 본 발명은 접합체의 복수 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건하에 상기 접합체의 제조물을 두는 것을 포함하는, 본 발명의 제6 측면에 따른 접합체의 다중 카피를 포함하는 나노입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0857] 용어 "접합체"는 본 발명에 따른 접합체의 맥락에서 위에서 정의되었고 본 방법에 동등하게 적용가능하다.

[0858] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 본 발명의 제6 측면에 따른 접합체의 다중 카피를 포함하는 나노입자의 제조방법에 관한 것이다:

[0859] (i) 각각 다음을 포함하는 복수의 폴리펩티드를 배치하는 단계

[0860] 1. 니도겐-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가의 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,

[0861] 2. 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고, 및

[0862] 3. 양전하 아미노산-풍부 영역인 제3 폴리펩티드 영역,

- [0863] 여기서 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고, 상기 폴리펩티드가 활성화된 형태로 제공되고, 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태가 반응성 기를 함유하고, 여기서 상기 배치가 복수의 폴리펩티드 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행되고 그리고
- [0864] (ii) 단계 (i)에서 수득된 나노입자를 폴리펩티드 내의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드 내의 반응성 기와 관심 제제의 기 사이의 결합의 형성에 적합한 조건 하에 수행됨.
- [0865] 용어 "제1 폴리펩티드 영역", "제2 폴리펩티드 영역" 및 "제3 폴리펩티드 영역"은 본 발명의 접합체를 형성하는 폴리펩티드의 맥락에서 위에서 정의되었고 상기 접합체의 다중 카피를 포함하는 나노입자를 수득하는 방법에 동일하게 적용가능하다.
- [0866] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드의 복수의 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건"은, 샘플 내의 상당한 백분율의 폴리펩티드를 나노입자로 혼입하기에 적합한 임의의 조건을 지칭한다. 한 실시양태에서, 상기 조건은 저염 버퍼 내로 조립될 접합체 또는 폴리펩티드를 배양하는 것을 포함한다. 당업자가 인식하는 바와 같이, "나노입자"는 크기가 나노미터로 측정되는 미세한 입자이다. 본 발명의 나노입자는 이전 섹션에서 정의된 바와 같은 본 발명의 제 6 측면의 접합체 또는 접합체의 폴리펩티드의 다중 카피의 응집으로부터 생성된 나노입자를 포함한다. 상기 방법 (i) 및 (ii)에서, 나노입자의 제조에 사용되는 본 발명의 제6 측면의 접합체 또는 접합체의 폴리펩티드는 열역학적으로 유리한 비공유 정전기적 결합을 형성하고 저염 버퍼 조건에서 자발적으로 응집한다. 특정 실시예에서, 본 발명의 제6 측면의 접합체의 열역학적으로 유리한 접합체 또는 접합체의 폴리펩티드는 본 발명의 제6 측면의 접합체의 폴리펩티드 내에포함된 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 폴리펩티드, 또는 상기 접합체에 포함된 폴리펩티드는 본 발명의 제6 측면에서 정의된 폴리펩티드와 같으며, 여기서 제2 폴리펩티드 영역은 제1 폴리펩티드 영역의 N-말단에 위치한 다중양이온성 펩티드이고, 제 3 폴리펩티드 영역은 접합체의 제 1 폴리펩티드 영역의 C 말단에 위치한다.
- [0867] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제 8 측면의 방법 (i)에서 접합체의 복수 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건은 저염 버퍼에서의 배양을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)에서 복수의 폴리펩티드 카피의 나노입자로의 조립에 적절한 조건은 저염 버퍼에서의 배양을 포함한다.
- [0868] "저염 버퍼"라는 표현은 pH의 변화를 조절하는 능력을 갖는 물에 하나 이상의 염의 용해로부터 생성된 염의 버퍼 용액을 포함하는 것으로 이해될 것이며, 여기서 용해된 염 또는 염들의 양은 예를 들어 세포질 또는 세포 외 배지와 같은 생리학적 체액의 삼투압 농도보다 낮거나 동일한 삼투압 농도를 초래한다. 따라서 저염 버퍼는 pH 및 삼투압 농도를 생리학적 값 범위 내로 유지하는 것으로 이해되며 생리학적 온도 범위 내에서 사용된다.
- [0869] 당업자는 생리학적 온도의 범위가 15 내지 45℃, 보다 바람직하게는 20 내지 40℃, 더욱 더 바람직하게는 25 내지 39℃, 더욱 더 바람직하게는 30 내지 37℃로 왔다갔다 할 수 있음을 인식할 것이다. 당업자는 또한 저염 버퍼의 삼투압 농도가 100 내지 400 밀리삼투압/L(mOsm/L), 바람직하게는 150 내지 350 mOsm/L, 보다 바람직하게는 200 내지 300 mOsm/L, 더욱 더 바람직하게는 225 내지 275 mOsm/L 범위일 것임을 인지할 것이다.
- [0870] 일부 실시양태에서, 저염 버퍼는 pH 4 내지 pH 7, 바람직하게는 pH 5 내지 pH 6, 보다 바람직하게는 약 PH 5.3, PH 6.5 또는 PH 7.2이다.
- [0871] 일부 실시양태에서, 저염 버퍼는 탄산염 버퍼, 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 트리스 버퍼 및 인산염 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명에 적합한 저염 버퍼는 예를 들어, 트리스-텍스트로스 버퍼(20mM 트리스+5% 텍스트로스, pH 7.4), 트리스-NaCl 버퍼(20mM Tris, 500 NaCl, pH 7.4), PBS- 글리세롤 버퍼(인산염 완충된 식염수, PBS, pH 7.4, 이는 당업계에 잘 알려져 있음, +10% 글리세롤), 트리스 완충된 식염수(TBS)-텍스트로스(20mM Tris-HCl 버퍼 pH 7.5, 당업계에 잘 알려져 있음), 200NaCl, +5% 포도당), 트리스 완충된 Saline-Tween 20(TBST) 버퍼(10mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl, +0.01% Tween 20), 또는 pH가 6 이상인 당업계에 공지된 임의의 생리학적 버퍼이다.
- [0872] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80 및/또는 수크로스를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 저염 버퍼 중 수크로스는 20 mg/ml 내지 100 mg/ml, 보다 바람직하게는 50 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 70 mg/ml의 농도에서 발견된다.
- [0873] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80(0.4 mg/ml), 수크로스(80 mg/ml), 시트르산나트륨 2-수화물(2.7 mg/ml) 및 시트르산 무수물(0.146 mg/ml)을 포함하고 약 6.5의 pH를 가지는 시트레이트 버퍼이다.

- [0874] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 수크로스(70 mg/ml), 빙초산(0.12 mg/ml), 아세트산나트륨 3-수화물(2.45 mg/ml)을 포함하고 약 5.3의 pH를 갖는 아세테이트 버퍼이다.
- [0875] 또 다른 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80(0.05 mg/ml), 수크로스(50 mg/ml), 인산나트륨 일염기성 1-수화물(0.22 mg/ml), 인산 나트륨 이염기성 무수물(0.49 mg/ml)을 포함하고 약 7.2의 pH를 갖는 인산염 버퍼이다.
- [0876] 일부 실시양태에서, 나노입자를 수득하기 위한 방법을 수행하기에 적합한 저염 버퍼는 하기를 포함하는 A9 버퍼이다:
- [0877] o 40 mg/ml 내지 100 mg/ml, 바람직하게는 80 mg/ml 농도의 수크로스,
- [0878] o 0.01 mg/ml 내지 10 mg/ml, 바람직하게는 4 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 80,
- [0879] o 2.7 mg/ml 농도의 시트르산나트륨 2-수화물,
- [0880] o 0.146 mg/ml 농도의 무수 시트르산
- [0881] 그리고 여기서 버퍼의 pH는 pH 5 내지 pH 9, 바람직하게는 pH 7 내지 pH 8, 더욱 바람직하게는 pH 6.5이다.
- [0882] 일부 실시양태에서, 나노입자를 수득하기 위한 방법을 수행하기에 적합한 저염 버퍼는 하기를 포함하는 B6 버퍼이다:
- [0883] - 50 내지 90, 바람직하게는 70 mg/ml 농도의 수크로스
- [0884] - 0.05 mg/ml 내지 25 mg/ml, 바람직하게는 0.12 mg/ml 농도의 빙초산,
- [0885] - 1mg/ml 내지 4mg/ml, 바람직하게는 2.45mg/ml 농도의 아세트산나트륨 3-수화물,
- [0886] 여기서 B6 버퍼의 pH는 pH 4 내지 pH 7, 바람직하게는 pH 5 내지 pH 6, 더욱 바람직하게는 pH 5.3이다.
- [0887] 일부 실시양태에서, 나노입자를 수득하기 위한 방법을 수행하기에 적합한 저염 버퍼는 하기를 포함하는 D1 버퍼이다:
- [0888] - 40 mg/ml 내지 60 mg/ml, 바람직하게는 50 mg/ml 농도의 수크로스,
- [0889] - 0.01 mg/ml 내지 1 mg/ml, 바람직하게는 0.05 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 80,
- [0890] - 0.1 mg/ml 내지 0.5 mg/ml, 바람직하게는 0.22 mg/ml 농도의 인산 나트륨 일염기성 1-수화물
- [0891] - 0.2 mg/ml 내지 1 mg/ml, 바람직하게는 0.49 mg/ml 농도의 인산 나트륨이염기성 무수물,
- [0892] 여기서 수크로스 버퍼 D1의 pH는 pH 5 내지 pH 9, 바람직하게는 pH 7 내지 pH 8, 보다 바람직하게는 pH 7.2이다.
- [0893] 본 발명자들은 T22 CXCR4 리간드 및 스캐폴드 단백질을 포함하는 제1 유형의 융합 단백질 및 EPI-X4 길항제 CXCR4 리간드 및 동일한 스캐폴드 단백질을 포함하는 제 2 유형의 융합 단백질의 두 가지 유형의 융합 단백질의 올리고머화를 허용함으로써 바이파라토픽 나노입자를 추가로 생산하였다. 이러한 바이파라토픽 나노입자는 T22 CXCR4 리간드를 포함하는 융합 단백질 또는 EPI-X4 CXCR4 리간드만을 포함하는 융합 단백질인 단일 유형의 융합 단백질에 의해 형성된 나노입자보다 시험관 내 CXCR4+ 세포에서 더 높은 수준의 내재화를 나타냈다. 마우스 모델에 투여시, 바이파라토픽 나노입자는 단일 유형의 융합 단백질을 포함하는 2가지 유형의 단일 파라토프 나노입자 중 어느 것보다 종양 세포에서 더 높은 수준의 내재화 및 종양 세포에서 더 많은 수의 세포자멸사체를 나타내었다.
- [0894] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제6 측면에 따른 2개의 상이한 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자를 제조하는 방법에 관한 것으로, 여기서 제1 유형의 접합체의 제2 폴리펩티드의 서열은 제2 유형의 접합체의 제2 폴리펩티드의 서열과 상이하고, 상기 방법은 저염 버퍼에 상기 2가지 유형의 접합체의 조제물을 배치하는 단계를 포함한다.
- [0895] 제 9 측면에서, 본 발명은 제1 유형의 접합체의 다중 카피 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에 관한 것이고, 여기서 본 발명의 제1 및 제2 유형의 접합체 및 제1 및 제2 유형의 접합체는 다중양이온성 펩티드의 서열이 상이하고, 상기 방법은 상기 제1 유형의 접합체의 조제물을, 상기 2개의 유형의 접합체의 복수의 카피를 나노입자로 조립하기에 적합한 조건 하에, 상기 제2 유형의 접합체의 조

제물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

- [0896] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 제1 유형의 접합체의 다중 카피 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에 관한 것이고, 여기서 제1 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드의 서열은 제2 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하고, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0897] i. 제1 폴리펩티드 제조물을 제2 폴리펩티드 제조물과 접촉시키는 단계로 여기서 제1 유형 및 제2 폴리펩티드는 다음을 포함함
- [0898] (i) 니도젠-1의 G2 도메인 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체인 제1 폴리펩티드 영역,
- [0899] (ii) 관심 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 폴리펩티드 영역으로서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이고 한 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열은 다른 폴리펩티드의 다중양이온성 펩티드의 서열과 상이하고,
- [0900] (iii) 양전하 아미노산-풍부한 영역인 제3 폴리펩티드 영역,
- [0901] 다중양이온성 펩티드 및 양전하 아미노산-풍부한 영역이 폴리펩티드의 말단에 위치하고,
- [0902] 폴리펩티드는 활성화된 형태로 제공되고, 폴리펩티드의 상기 활성화된 형태는 반응성 기를 함유하고, 여기서 상기 기 배치는 복수의 폴리펩티드 카피를 함유하는 나노입자의 형성에 적합한 조건 하에 수행되고, 및
- [0903] ii. 단계 I에서 얻은 나노입자를 각 폴리펩티드 내의 반응성 기와 반응할 수 있는 기를 함유하는 관심 제제의 활성화된 형태와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 접촉은 폴리펩티드 내의 반응성 기와 관심 제제 내의 기 사이의 결합 형성에 적합한 조건 하에 수행된다.
- [0904] 본원에 사용된 용어 "바이파라토픽 나노입자"는 적어도 2가지 유형의 접합체에 의해 형성되는 나노입자를 지칭하며, 여기서 2가지 유형의 접합체는 관심 표적에 특이적으로 결합하는 서열의 성질이 상이한 폴리펩티드를 함유하며, 이들 서열은 상이한 수용체에 대한 리간드 또는, 보다 바람직하게는, 동일한 수용체에 대한 2개의 상이한 리간드이다.
- [0905] 상기 방법에서 제1 유형 또는 제2 유형의 접합체로서 사용될 수 있는 적합한 접합체는 본 발명에 따른 접합체의 맥락에서 상기 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 접합체를 형성하는 폴리펩티드의 제1 영역은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: NID0mut2, NID0mut3, NID0mut3-V45T, NID0mut3_V121Q, NID0mut3-F157E, NID0mut3-V215T, NID0mut4, NID0mut4_T215V, NID0mut5, NID0mut3-V176T, NID0mut3-I200T, NID0mut3-V236Y, NID0mut3-L237T, NID0mut3-S65I, NID0mut3-R114I, NID0mut3-C214S, NID0mut3-S65I_R114I, NID0mut5-S65I_R114I, NID0mut3-S65I_R114I 및 NID0mut5-S65I_R114I, 각각, 서열번호 64, 65 및 87 내지 104로 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 접합체를 형성하는 폴리펩티드의 제2 영역은 CXCR4 리간드, 보다 바람직하게는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25)를 갖는 T22 펩티드, V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12 펩티드(서열번호 27), vCCL2 펩티드(서열번호 28) 및 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 EPI-X4 서열(서열번호 132)이고, 여기서 EPI-X4 서열 또는 최적화된 EPI-X4 서열은 다중양이온성 펩티드, 바람직하게는 서열 RKRRKK(서열번호 77)를 갖는 펩티드와의 융합으로서 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체의 일부를 형성하는 폴리펩티드의 제3 영역은 RKRRKK(서열 번호 77), RRRRRR(서열 번호 78), KKKKKK(서열번호 79), HHHHHH(서열번호 80), RHRHRH(서열번호 81), RKRRKKRK(서열번호 82), RKRHRK(서열번호 83), RKRHRH(서열번호 84) 또는 RHRHRH(서열번호 85)로 이루어진 군으로부터 선택되는 양으로 하전된 아미노산-풍부한 영역이다.
- [0906] 일부 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에 사용되는 제1 유형 및 제2 유형의 접합체 둘 모두는 CXCR4 리간드를 함유하고, 상기 리간드는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25) 및 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 EPI-X4 서열(서열번호 132)을 갖는 T22 펩티드이고, 여기서 최적화된 EPI-X4 서열 또는 EPI-X4 서열은 다중양이온성 펩티드, 바람직하게는 서열 RKRRKK(서열번호 77)를 갖는 펩티드와의 융합으로서 제공될 수 있다.
- [0907] 상술한 바이파라토픽 나노입자의 제조방법에서, 나노입자의 제조에 사용된 두 가지 유형의 접합체의 접합체 또는 폴리펩티드는 저염 버퍼 조건에서 비공유 정전기적 결합을 형성하고 자발적으로 응집하기 위해 열역학적으로 유리하다. 바이파라토픽 나노입자의 제조 방법에서 2개의 접합체의 복수의 카피의 바이파라토픽 나노입자로의 조립에 적합한 조건은, 본 발명의 제8 측면에 따른 상기 방법에서 접합체의 복수 카피의 나노입자로의 조립에 적합한 조건과 유사하다

- [0908] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80 및/또는 수크로스를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 저염 버퍼 중 수크로스는 20 mg/ml 내지 100 mg/ml, 보다 바람직하게는 50 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 70 mg/ml의 농도에서 발견된다.
- [0909] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80(0.4 mg/ml), 수크로스(80 mg/ml), 시트르산나트륨 이수화물(2.7 mg/ml) 및 시트르산 무수물(0.146 mg/ml)을 포함하는 시트레이트 버퍼이고 pH는 약 6.5 이다.
- [0910] 한 실시양태에서, 저염 버퍼는 수크로스(70 mg/ml), 빙초산(0.12 mg/ml), 아세트산나트륨 3-수화물(2.45 mg/ml)을 포함하는 아세테이트 버퍼이고 약 5.3의 pH를 가진다.
- [0911] 또 다른 실시양태에서, 저염 버퍼는 폴리소르베이트 80(0.05 mg/ml), 수크로스(50 mg/ml), 인산나트륨 1-수화물(0.22 mg/ml), 인산나트륨 이염기 무수물(0.49 mg/ml)을 포함하는 인산염 버퍼이고 약 7.2의 pH를 갖는다.
- [0912] 바람직한 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자를 수득하기 위한 방법에 사용되는 버퍼는 A9 버퍼, B6 버퍼 및 D1 버퍼를 포함하는 군으로부터 선택되며, 이들의 조성은 상기 기재되어 있다.
- [0913] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)에서 접합체의 폴리펩티드의 복수 카피를 나노입자로 조립하기에 적절한 저염 버퍼는 탄산염 버퍼, 트리스 버퍼 및 인산염 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0914] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)의 저염 버퍼는 100 내지 300 nM 농도의 중탄산나트륨을 포함하는 탄산염 버퍼이다. 본 발명의 다른 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)의 저염 버퍼는 10 내지 30 nM의 농도로 트리스를 포함하는 트리스 버퍼이다. 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)의 다른 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 저염 버퍼는 5 mM 내지 20 mM의 총 농도로 Na_2HPO_4 및 NaH_2PO_4 를 포함하는 인산염 버퍼이다.
- [0915] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)의 저염 버퍼는 텍스트로스 및/또는 글리세롤을 추가로 포함한다.
- [0916] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제8 측면의 방법 (ii)의 저염 버퍼는 6.5 내지 8.5의 pH를 갖는다.
- [0917] 제 10 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체의 다중 카피 또는 본 발명에 따른 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 폴리펩티드의 다중 카피 또는 상기 설명된 임의의 방법에 의해 수득된 나노입자를 포함하는 나노입자에 관한 것이다. 이러한 나노입자는 단일 유형의 접합체 또는 단일 유형의 폴리펩티드에 의해 형성되고 따라서, 이들은 단일특이성(즉, 나노입자를 형성하는 모든 접합체 또는 폴리펩티드가 단일 유형의 표적 분자에 결합함) 및 모노파라토픽(즉, 나노입자를 형성하는 모든 접합체 또는 폴리펩티드가 표적 분자의 동일한 영역에 결합함)이다.
- [0918] 따라서, 본 발명의 나노입자는 본 발명의 제6 측면의 접합체의 다중 카피의 응집체를 포함하며, 이는 생리학적 조건에서 그들의 비공유 결합 및 커플링을 선호하는 구조 내의 영역 사이의 정전기적 상호작용으로부터 발생한다. 나노입자의 제조를 위한 본 발명의 방법은 본 발명의 여섯 번째 측면의 접합체 또는 접합체의 폴리펩티드의 제조물을 저염 버퍼에 두는 것을 포함하기 때문에, 이렇게 형성된 나노입자는 또한 본 발명의 제6 측면의 접합체의 다중 카피의 응집체를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0919] 특정 실시양태에서, 접합체는 본 발명의 제6 측면에서 정의된 접합체와 같고, 상기 접합체의 제 2 폴리펩티드 영역은 접합체의 제 1 폴리펩티드 영역의 N-말단에 위치한 다중양이온성 펩티드이고, 접합체의 제 3 폴리펩티드 영역은 접합체의 제 1 폴리펩티드 영역의 C 말단에 위치한다.
- [0920] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 나노입자는 상기 나노입자를 형성하는 접합체의 다중양이온성 펩티드가 CXCR4 리간드인 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 접합체 또는 나노입자를 형성하는 폴리펩티드의 다중 양이온성 영역은 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12(서열번호 27) 펩티드, vCCL2(서열번호 28) 및 이의 기능적으로 등가인 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 나노입자는 본 발명에 따른 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 폴리펩티드의 다중 카피의 조립으로부터 생성되며, 길항 CXCR4 리간드는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29), EPI-X4 서열(서열번호 132) 또는 이의 기능적으로 등가인 변이체이다. 일부 실시양태에서, EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 최적화된 EPI-X4 서열은 RKRKRK(서열번호 77) 서열에 연결된다.

- [0921] 제 11 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 제1 유형의 접합체 및 제2 유형의 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자에 관한 것으로, 여기서 제1 및 제2 유형의 접합체는 다중양이온성 펩티드가 상이하다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 나노입자는 나노입자를 형성하는 제1 유형의 접합체 및 제2 유형의 접합체의 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드인 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 접합체 또는 나노입자를 형성하는 폴리펩티드의 다중양이온성 영역은 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12(서열번호 27) 펩티드, vCCL2(서열번호 28) 및 이들의 기능적으로 등가인 변이체 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 나노입자는 본 발명에 따른 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 폴리펩티드의 다중 카피의 조립으로부터 생성되며, 길항 CXCR4 리간드는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29), EPI-X4 서열(서열번호 132) 또는 이들의 기능적으로 등가인 변이체이다. 일부 실시양태에서, 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29) 또는 EPI-X4 서열 I(서열번호 132)은 RKRKRK(서열번호 77) 서열에 연결된다.
- [0922] 제 12 측면에서, 본 발명은 다중양이온성 영역이 CXCR4 리간드 및 본 발명에 따른 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 폴리펩티드의 다중 카피인 본 발명에 따른 접합체의 다중 카피를 포함하는 바이파라토픽 나노입자에 관한 것이다. 길항 CXCR4 리간드를 포함하는 접합체 및 폴리펩티드는 CXCR4 내의 상이한 영역에 결합하고 따라서 단일 특이적임에도 불구하고, 그들은 바이파라토픽 것으로 이해될 것이다.
- [0923] 일부 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 접합체에 포함된 CXCR4 리간드는 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR (서열번호 25), V1 펩티드 (서열번호 26), CXCL12 펩티드(서열번호 27), vCCL2 펩티드 (서열번호 28), 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29), EPI-X4 서열 (서열번호 132) 및 이의 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0924] 일부 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자를 형성하는 폴리펩티드에 포함된 CXCR4 길항 리간드는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29) 및 그의 기능적으로 등가인 변이체이다. 일부 실시양태에서, 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29)은 RKRKRK(서열번호 77) 서열에 대한 EPI-X4 서열의 융합으로부터 생성된 다중양이온성 영역의 일부를 형성하여 제공된다.
- [0925] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 바이파라토픽 나노입자는 다중양이온성 펩티드가 서열 RRWCYRKCYKGYCYRKCR을 포함하는 본 발명에 따른 접합체, 및 CXCR4 길항제 리간드가 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29)인 CXCR4 길항제 리간드를 포함하는 폴리펩티드에 의해 형성되며, 선택적으로 다중양이온성 서열, 바람직하게는 RKRKRK(서열번호 77) 서열과 융합 펩티드의 일부를 형성한다.
- [0926] 본 발명에 따른 바이파라토픽 나노입자의 바람직한 형태는 표 3에 정의된 임의의 바람직한 접합체 및 표 5에 정의된 길항 리간드를 포함하는 임의의 바람직한 융합 단백질에 의해 형성된다. 일부 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자(표 3에 예시된 것)의 일부를 형성하는 접합체의 제1 유형은 상기 정의된 바와 같은 관심 체제를 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 일부를 형성하는 접합체의 제1 유형은 관심 체제를 함유하고, 이는 바람직하게는 본 발명의 접합체와 관련하여 상기 정의된 임의의 것, 보다 바람직하게는 플록수리딘 및 더욱 더 바람직하게는 플록수리딘 오랑체이다.
- [0927] 특정 실시양태에서, 표현 "나노입자의 폴리펩티드", "나노입자의 제1 폴리펩티드", "나노입자의 제2 폴리펩티드", "나노입자의 다중양이온성 펩티드", "나노입자의 CXCR4 리간드", "나노입자의 제3의 폴리펩티드", "나노입자의 폴리펩티드 영역", "나노입자의 관심 체제", "관심 체제와 나노입자 사이의 연결 모이어티", 또는 "양전하 펩티드 서열"은 나노입자의 해당하는 성분을 나타내며, 이는 본 발명의 나노입자에 조립된 접합체의 일부이다. 따라서, 상기 성분들은 본 발명의 접합체와 관련하여 위에서 정의된 바와 같으며, 따라서 본 발명의 접합체의 상응하는 부분들과 같다.
- [0928] 당업자는 본 발명의 바이파라토픽 나노입자를 포함하는, 본 발명의 나노입자의 크기가 1 내지 1000 nm, 보다 바람직하게는 2.5 내지 500 nm, 더욱 더 바람직하게는 5 내지 250 nm, 더욱 더 바람직하게는 10 내지 100 nm 범위일 수 있음을 인지할 것이다.
- [0929] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 나노입자는 10 내지 100 nm의 직경을 갖는다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 바이파라토픽 나노입자는 10 내지 100 nm의 직경을 갖는다.
- [0930] 당업자가 인지할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 바이파라토픽 나노입자는 본 발명의 나노입자 중 하나로 간주된다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, "본 발명의 나노입자" 또는 "나노입자"를 언급할 때, 본원에 정의된 바와 같은 것은 바이파라토픽 나노입자이다.

- [0931] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제8 측면에 동일하게 적용가능하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및 제8 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제9 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [0932] *VIII - 본 발명의 접합체 및 나노입자의 의학적 용도*
- [0933] 제 12 측면에서, 본 발명은 의학에 사용하기 위한 본 발명에 따른 접합체 또는 나노입자에 관한 것이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 접합체의 일부를 형성하는 치료제에 반응하는 질환을 앓고 있는 환자의 치료를 위한 본 발명에 따른 접합체 또는 나노입자의 용도에 관한 것이다.
- [0934] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 상태, 장애 또는 질병의 진행, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소 또는 개선, 또는 상태, 장애 또는 질병의 하나 이상의 증상(바람직하게는, 하나 이상의 식별 가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 환자에 의해 반드시 식별할 수 없는 상태, 장애 또는 질병의 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 또한, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 물리적으로, 예를 들어 식별 가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, 예를 들어 물리적 매개변수의 안정화에 의해, 또는 둘 다에 의해 상태, 장애 또는 질병의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 상태, 장애 또는 질병의 감소 또는 안정화를 지칭할 수 있다.
- [0935] 당업자는 의학에서 용도로서 치료 반응을 유도하기 위해 본 발명의 접합체 또는 나노입자를 환자에게 투여할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0936] 치료 반응은 환자가 겪는 병리학적 상태 또는 질병의 원인의 억제, 감소 또는 정지를 포함하며; 상태 또는 질병의 증상의 제거, 감소, 정지; 또는 개선 또는 환자의 상태 또는 질병의 진행의 소멸, 정지 또는 감속을 포함한다.
- [0937] 당업자는 의학에 사용하기에 적합한 본 발명의 접합체 또는 나노입자가 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제공될 수 있음을 인지할 것이다. 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 무독성, 불활성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 임의 유형의 제형 보조제를 의미한다. Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 에는 약학 조성물을 제형화하는데 사용되는 다양한 담체 및 이의 제조를 위한 공지된 기술이 개시되어 있다.
- [0938] 따라서, 본 발명의 접합체 또는 나노입자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 약학 조성물이다.
- [0939] 본 발명의 약학 조성물은 경구 및 비경구 경로를 포함하는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물은 주사(예를 들어, 정맥내, 피하 또는 근육내, 복강내 주사), 직장, 질, 국소(분말, 크림, 연고 또는 점적제), 또는 흡입(스프레이에 의해)에 의해 투여될 수 있다.
- [0940] *VII.A-암 치료에서 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 용도*
- [0941] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명의 접합체 또는 나노입자, 또는 그의 상응하는 약학 조성물에 관한 것이고, 접합체의 폴리펩티드, 또는 적어도 나노입자의 폴리펩티드는, 세포 표면 상의 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있고 접합체 또는 나노입자의 세포 내로의 내재화를 촉진할 수 있는 서열을 포함한다. 여기서 수용체를 발현하는 상기 세포는 암 치료에 사용하기 위해 암에 존재하는 종양 세포이다.
- [0942] 특정 실시양태에서, 사용을 위한 상기 접합체, 또는 사용을 위한 상기 나노입자, 또는 사용을 위한 상응하는 약학 조성물의 접합체 또는 나노입자의 관심 제제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료제이다:
- [0943] (i) 화학요법제,
- [0944] (ii) 세포독성 폴리펩티드,
- [0945] (iii) 항혈관신생 폴리펩티드,
- [0946] (iv) 종양 억제제 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드,
- [0947] (v) 세포자멸사 유도 폴리펩티드,
- [0948] (vi) 항-전이 활성을 갖는 폴리펩티드,

- [0949] (vii) 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및
- [0950] (viii) 항혈관신생 분자,
- [0951] (ix) 독소.
- [0952] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"는 암의 진행, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소 또는 개선, 또는 암의 하나 이상의 증상(바람직하게는 하나 이상의 식별 가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 환자에 의해 반드시 식별할 수 있는 것은 아닌, 종양의 성장과 같은, 암의 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 또한, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 물리적으로, 예를 들어 식별 가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, 예를 들어 물리적 매개변수의 안정화, 또는 둘 모두에 의해 암 진행의 억제를 지칭한다. "치료하다", "치료하다" 및 "치료하는"은 또한 종양 크기 또는 암 세포 수의 감소 또는 안정화를 지칭할 수 있다.
- [0953] "암"이라는 용어는 다른 조직, 기관 또는 일반적으로 유기체의 먼 부분에 침입하거나 퍼질(전이) 가능성이 있는 비정상적이고 통제되지 않는 세포 성장 및 증식(신생물)을 포함하는 질병 군을 의미한다: 전이는 암 및 암성 종양의 악성 종양의 특징 중 하나이다. 암 세포의 비정상적인 성장 및/또는 증식은 정상적인 생리를 변화시키는 유전적 및 환경적 요인의 조합의 결과이다. 암 세포의 성장 및/또는 증식 이상은 영향을 받는 세포 유형, 조직 및 기관의 기능 장애 또는 기능 상실로 인해, 생리학적 장애 및 많은 경우에 개체의 사망을 초래한다.
- [0954] "암"이라는 용어는 다음의 암이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다:
- [0955] 유방, 전립선, 폐, 난소, 결장, 결장직장, 췌장, 신장, 뇌, 비호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 심장, 소장, 비장, 신장, 방광, 머리, 목, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 고환, 간담도계 및 간의 암; 또한 선종, 혈관육종(angiosarcoma), 성상세포종, 상피암, 생식세포종, 교모세포종, 신경교종, 혈관내피종, 혈관육종(hemangiosarcoma), 혈종, 간모세포종, 백혈병, 림프종, 수모세포종, 흑색종, 신경모세포종, 간담도암, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종 및 기형종과 같은 종양, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이 용어는 선암 흑색종, 광선각화증 선암종, 선양 양성 암종, 선종, 선육종, 선편평세포 암종, 성상세포 종양, 바르톨린선 암종, 기저 세포 암종, 기관지 암종, 모세관 유암종, 암종, 암혈관선암종, 담낭내암종, 부비동 종양, 자궁내막 증식증, 자궁내막 기질 육종, 자궁내막양 선암종, 뇌실막 육종, 유잉(Ewing) 육종, 국소 결절 증식증, 생식 세포 종양, 교모세포종, 글루카곤종, 혈관모세포종, 혈관내피종, 혈종, 간선종, 간선종증, 간세포암종, 간담도암, 인슐린종, 상피내 종양, 편평 세포 상피내 종양, 침습성 편평세포암종, 대세포암종, 평활근육종, 흑색종, 악성 흑색종, 악성 중피종양, 수모세포종, 수질상피종, 점막표피양암종, 신경모세포종, 신경상피 선암종, 결절 흑색종, 골육종, 유두상 장액 선암종, 뇌하수체 종양, 형질세포종, 가육종, 폐모세포종, 신세포암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 장액암종, 소세포암종, 연조직 암종, 소마토스타틴 분비 종양, 편평 상피 암종, 편평 세포 암종, 미분화 암종, 포도막 흑색종, 사마귀 암종, 비포마(vipoma), 빌름(Wilm) 종양, 뇌내암, 두경부암, 직장암, 성상세포종, 교모세포종, 소세포성암 및 비-소구체암, 전이성 흑색종, 안드로겐-비의존성 전이성 전립선암, 안드로겐-의존성 전이성 전립선암 및 유방암을 포함한다.
- [0956] 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0957] (i) 화학요법제,
- [0958] (ii) 세포독성 폴리펩티드,
- [0959] (iii) 항혈관신생 폴리펩티드,
- [0960] (iv) 종양 억제제 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드,
- [0961] (v) 세포자멸사 유도 폴리펩티드,
- [0962] (vi) 항전이 활성을 갖는 폴리펩티드,
- [0963] (vii) 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 및
- [0964] (viii) 항혈관신생 분자.
- [0965] (ix) 독소
- [0966] 본 발명의 특정 실시양태에서, 치료제는 BAK, PUMA, GW-H1의 BH3 도메인, 및 디프테리아 독소 I의 활성 세그먼트

트, 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A로 이루어진 군으로부터 선택된 항종양 펩티드이다.

- [0967] 본원에서 사용된 "BAK"는 항-세포자멸사 단백질을 비활성화하고 미토콘드리아 막을 투과화하여 결과적으로 시토크롬 C 및 기타 미토콘드리아 세포 사멸 인자를 방출함을 통하여 카스파제-의존적 세포자멸사 경로에 의해 프로그램된 세포사를 유발하는 Bcl-2 단백질 패밀리에 속하는 잘 알려진 세포자멸사 유도 인자를 지칭한다. [Llambi, F. et al. 2011. Mol. Cell, 44:517-31 참조]. 한 실시양태에서, BAK는 전장 BAK(서열번호 67)를 지칭한다. 다른 실시양태에서, BAK는 기능적 BH3 도메인(서열번호 68)을 함유하는 그의 임의의 절단된 형태를 지칭한다.
- [0968] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "PUMA"는 서열번호 69에 상응하는 전체 서열을 특징으로 하는 단백질을 의미하며 이것은 Bcl-2 패밀리의 프로(pro) 및 항세포자멸 단백질과 상호 작용에 의해 세포 사멸을 유발하는 (Bcl-2 상동성 3) BH3 전용 단백질이다.
- [0969] 본원에 사용된 GW-H1은 양친매성 나선으로 접혀서 세포용해 활성을 발휘하는 서열번호 46의 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0970] 디프테리아 독소 I(*Corynebacterium diphtheriae* 종의 박테리아에 의해 생성됨)(서열번호 70) 및 *P. aeruginosa*의 외독소(서열번호 71)는 ADP-리보실화 독소의 패밀리에 속한다. 두 독소 모두 진핵생물 신장 인자(eEF-2)에 작용하는 단백질로, 기본적으로 이들을 포함하는 세포의 번역 활동을 억제하고 세포 자멸사를 유도한다. 두 독소의 구조는 수용체 결합 도메인(세포의 표면 수용체에 결합하여 세포내도입(endocytosis)을 유도함; 디프테리아 독소의 경우 해파린 결합 표피 성장 인자 전구체, 외독소 A의 경우 CD91), 전위(translocation) 도메인, 및 eEF-2에 대한 작용을 수행하는 촉매 도메인(개요는 Shapira, A. & Benhar, I., 2010, Toxins, 2:2519-2583에서 제공됨)을 나타낸다.
- [0971] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 나노입자의 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이고, 본 발명의 접합체 또는 나노입자로 치료될 표적화된 암은 CXCR4 수용체를 발현하는 세포를 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, CXCR4를 발현하거나 과발현하는 세포 암 세포는 전이성 줄기세포이다. 본원에 사용된 용어 "전이 줄기세포"는 전이 개시 및 전이 유지를 담당하는 세포를 지칭한다.
- [0972] 본 발명의 더욱 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 CXCR4 리간드는 T22 펩티드(서열번호 25), V1 펩티드(서열번호 26), CXCL12 펩티드(서열번호:27), vCCL2 펩티드(서열번호 28), 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29), EPI-X4 서열(서열번호 132) 또는 이와 기능적으로 등가인 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0973] 본 발명의 또 다른 보다 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체 또는 나노입자로 치료될 암은 췌장암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0974] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체 및 나노입자는 암성 종양의 치료에 사용되며, 여기서 암성 종양은 원발성 종양 또는 전이이다.
- [0975] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제12 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [0976] VII.B - 세균 감염의 치료에서 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 용도
- [0977] 본 발명의 또 다른 실시양태는 박테리아 감염에 의해 유발된 질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 접합체 또는 나노입자에 관한 것이다.
- [0978] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 세균 감염의 진행, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소 또는 개선, 또는 세균 감염의 하나 이상의 증상(바람직하게는 하나 이상의 더욱 식별 가능한 증상)을 지칭한다. 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 박테리아 독소의 존재와 같은 박테리아 감염의 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭하지만, 환자가 반드시 식별할 수 있는 것은 아니다. 또한, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 물리적으로, 예를 들어 식별 가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, 예를 들어 물리적 매개변수의 안정화에 의해, 또는 둘 모두에 의한 박테리아 감염의 진행의 억제를 의미한다. "치료하다", "치료하다" 및 "치료하는"은 또한 박테리아 세포 수의 감소 또는 안정화를 지칭할 수 있다.
- [0979] 본원에 사용된 "박테리아"는 도메인 박테리아의 원핵생물을 지칭한다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 박테리아 속의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*,

Borrelia, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Enterococcus*, *Eschericia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Ureaplasma*, *Vibrio* and *Yersinia*. 도메인 박테리아의 개별 원핵생물은 박테리아로 명명된다.

[0980] 본 발명은 특히, 제한없이 다음과 같은 박테리아의 감염의 치료를 위한 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포, 또는 나노입자의 적합성을 고려한다: *N. gonorrhea* 및 *N. meningitides*를 포함하는 *Neisseria* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*; *Haemophilus ducreyi*; *M. catarrhalis*를 포함하는 *Moraxella* spp., *B. pertussis*, *B. parapertussis* 및 *B. bronchiseptica*를 포함하는 *Branhamella catarrhalis*, *Bordetella* spp., 로도 알려져 있으며, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis* 를 포함하는 *Mycobacterium* spp.; *L. pneumophila* 를 포함하는 *Legionella* spp, enterotoxigenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli* 및 enteropathogenic *E. coli* 를 포함하는 *Escherichia* spp., *V. cholera* 를 포함하는 *Vibrio* spp, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*를 포함하는 *Shigella* spp.; *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*를 포함하는 *Yersinia* spp; *jejunii* 를 포함하는 *Campylobacter* spp. *S. typhi*, *S. enterica* 및 *S. bongori*를 포함하는 *Salmonella* spp.; *L. monocytogenes*를 포함하는 *Listeria* spp.; *H. pylori* 를 포함하는 *Helicobacter* spp., *P. aeruginosa*를 포함하는 *Pseudomonas* spp.; *S. aureus*, *S. epidermidis* 를 포함하는 *Staphylococcus* spp.; *E. faecalis*, *E. faecium*를 포함하는 *Enterococcus* spp.; *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile* 를 포함하는 *Clostridium* spp., *B. anthracis* 를 포함하는 *Bacillus* spp.; *C. diphtheria*를 포함하는 *Corynebacterium* spp., *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. hermsii* 를 포함하는 *Borrelia* spp.; *E. equi* 를 포함하는 *Ehrlichia* spp., 및 인간 과립구성 애를리키아증(Human Granulocytic Ehrlichiosis)의 제제; *R. rickettsii*를 포함하는 *Rickettsia* spp.; *C. trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci* 를 포함하는 *Chlamydia* spp.; *L. interrogans*를 포함하는 *Leptospira* spp.; *T. pallidum*, *T. denticola*, *T. hyodysenteriae* 를 포함하는 *Treponema* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *S. pneumoniae* 를 포함하는 *Streptococcus* spp., *H. influenzae* 유형 B, 및 non typeable *H. influenza* 를 포함하는 *Haemophilus* spp.,

[0981] VII.C - 바이러스 감염의 치료에서 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 용도

[0982] 본 발명의 또 다른 실시양태는, 본 발명의 접합체 또는 나노입자에 관한 것으로, 여기서 다중양이온성 펩티드가 감염을 유발하는 바이러스에 의해 감염된 세포 표면 상의 수용체와 특이적으로 상호작용할 수 있고; 개재되는 폴리펩티드 영역은 바이러스 감염에 의해 유발된 질병의 치료에 사용하기 위한 항바이러스제이다.

[0983] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 바이러스 감염의 진행, 중증도 및/또는 지속 기간의 감소 또는 개선, 또는 바이러스 감염의 하나 이상의 증상(바람직하게는 하나 이상의 바이러스 감염의 더 식별 가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"이라는 용어는 또한 환자가 반드시 식별할 수 있는 것은 아닌 바이러스 역가와 같은 박테리아 감염의 적어도 하나의 측정가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 또한, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 또한 물리적으로, 예를 들어 식별가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, 예를 들어 물리적 매개변수의 안정화에 의해, 또는 둘 모두에 의해 바이러스 감염의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. "치료하다", "치료하다" 및 "치료하는"은 또한 바이러스 역가의 감소 또는 안정화를 나타낼 수 있다.

[0984] 본 명세서에 사용된 용어 "바이러스"는 유기체의 살아있는 세포 내부에서만 복제할 수 있는 작은 감염원을 의미한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 바이러스 패밀리의 비제한적 예는, *Adenoviridae*, 아프리카 돼지열병 유사 바이러스, *Arenaviridae*, *Arteriviridae*, *Astroviridae*, *Baculoviridae*, *Birnaviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Deltavirus*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picomaviridae*, *Poxvoviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae* 및 *Rhabdoviridae* 를 포함한다.

[0985] 본 발명의 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포, 또는 나노입자가 치료하기에 적합한 바이러스 감염의 예는 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1), HSV1 또는 HSV2와 같은 인간 헤르페스 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 특히 인간, 엡스타인 바 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, B형 간염 바이러스와 같은 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스와 같은 파라믹소바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 풍진 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 인유두종 바이러스, 플라비바이러스(예를 들면, 황열 바이러스, 뎅기열

바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스), 인플루엔자 바이러스, 로타바이러스 등을 포함한다.

[0986] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 또는 나노입자의 항바이러스제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0987] (i) 세포독성 폴리펩티드,

[0988] (ii) 세포자멸사 유도 폴리펩티드,

[0989] (iii) 자살 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 및

[0990] (iv) 항레트로바이러스 폴리펩티드

[0991] 세포독성 폴리펩티드(i), 세포자멸사 유도 폴리펩티드(ii) 및 자살 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드는 융합 단백질에 해당하는 섹션에서 이미 논의되었다.

[0992] 항레트로바이러스제는 항바이러스 클래스의 항미생물제의 한 하위 유형이다. 항레트로바이러스제는 레트로바이러스로 인한 바이러스 감염을 치료하기 위해 특별히 사용된다. 레트로바이러스는 몇가지 들자면알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스 및 렌티바이러스와 같은 속을 포함하는 Retroviridae 패밀리의 바이러스로 구성된다. 그들은 단일 가닥의, 양성-감각 RNA 게놈 바이러스임을 특징으로 한다. 레트로바이러스는 자신의 역전사효소를 통해 그들의 숙주 세포의 게놈에 통합되는 그들의 게놈의 이중 가닥 DNA 카피를 생성한다. 당업자는 "항레트로바이러스제"가 임의의 단계에서 레트로바이러스의 정상적인 복제 주기를 방해할 수 있는 임의의 분자 또는 화합물을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 항레트로바이러스 폴리펩티드(iv)는 항레트로바이러스 특성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다.

[0993] 본 발명에 적합한 항레트로바이러스 폴리펩티드는, 예를 들어 "융합 억제제"로도 알려진 "진입 억제제", 레트로바이러스의 숙주 세포로의 결합, 융합 및 진입을 방해하는 펩티드이다. 이 그룹의 예로는 HIV-1의 융합 기계와 경쟁하는 생체 모방 펩티드인 efuvirtide와 케모카인 수용체 CCR2 및 CCR5를 차단하는 펩티드인 펩티드 T가 있다.

[0994] 또한 진입 억제제로는 레트로바이러스가 세포와 융합하기 위해 사용하는 수용체에 대해 특이적인 항체가 포함된다. 항체로 차단하기에 적합한 이러한 수용체의 비제한적 예는 CD4, CCR2, CCR5 및 CXCR4 이다.

[0995] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는, "항원"으로 지칭되는 특정 단백질에 대해 특이적 결합 활성을 나타내는 당단백질을 의미한다. 용어 "항체"는 전체 단일클론 항체 또는 다중클론 항체, 또는 이의 단편을 포함하고, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 및 비인간 기원의 항체를 포함한다. "단일클론 항체"는 단일 부위 또는 항원성 "결정기"에 대해 지시된 동질의 고도로 특이적인 항체 집단이다. "다중클론 항체"는 상이한 항원 결정기들에 대해 지시된 이중 항체 집단을 포함한다.

[0996] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명에 적합한 항체는 진장 항체(예를 들어, IgG) 뿐만 아니라 그의 항원-결합 단편, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 인간항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 비인간 기원의 항체, 재조합 항체 및 유전 공학 기술에 의해 생산된 면역글로불린으로부터 유래된 폴리펩티드, 예를 들어, 단일 체인 Fv(scFv), 디아바디, 헤비체인 또는 그의 단편, 라이트 체인 또는 그의 단편, VH 또는 그의 이량체, VL 또는 그의 이량체, 이황화 브릿지(dsFv)에 의해 안정화된 Fv 단편, 단일 체인 가변 영역 도메인(Abs)을 가진 분자, 미니바디, scFv-Fc, 및 항체를 포함하는 융합 단백질, 또는 원하는 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다. 본 발명의 항체는 또한 이중특이적 항체일 수 있다. 항체 단편은 항원 결합 단편을 의미할 수 있다. 항체는 임의의 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG(또는 이들의 서브-클래스), 및 IgM의 항체를 포함하고, 항체는 임의의 특정 클래스일 필요는 없다.

[0997] 따라서, 본 발명의 더욱 바람직한 실시양태는 본 발명의 HIV 감염 치료에 사용을 위한 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 또는 나노입자에 관한 것이며, 여기서 다중양이온성 펩티드가 CXCR4 리간드이고, 세포가 HIV-감염 세포이다.

[0998] 본 발명의 더욱 더 바람직한 실시양태는 본 발명의 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 숙주 세포 또는 나노입자에 관한 것으로, 여기서 CXCR4 리간드는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8 또는 그의 기능적으로 등가인 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0999] VII.D - 신경퇴행성 질환의 치료에서 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 용도

- [1000] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 신경 퇴행성 질환의 치료에 사용을 위한 본 발명의 접합체 또는 나노입자에 관한 것이고, 다중양이온성 펩티드가 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 펩티드이고, 개재 폴리펩티드 영역이 사페론 또는 단백질 응집 억제제이다.
- [1001] 단백질 응집은 세포내 또는 세포외에 관계없이 잘못 접힌 단백질의 축적으로 인해 발생하는 생물학적 현상이다. 생성된 단백질 응집체는 질병을 유발할 수 있으며 실제로 아밀로이드증으로 알려진 광범위한 질병에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 아밀로이드증은 ALS, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 프리온병과 같이 잘 연구된 여러 신경퇴행성 질환을 포함한다.
- [1002] 적합한 사페론 또는 단백질 응집 억제제는 상기 정의된 바와 같다. 본 발명에 따른 융합 단백질, 나노입자, 벡터 또는 숙주 세포를 사용하여 치료될 수 있는 질병은 다음을 포함한다: 알츠하이머병, 픽병(Pick's disease), 알파1-항트립신 결핍증, 파킨슨병 및 기타 활막병증, 크로이츠펠트-야콥병, 녹내장에서 망막 신경절 세포 변성, 대뇌 베타-아밀로이드 혈관병증, 프리온병, 타우병증, 전측두엽 퇴행증, 제2형 당뇨병, 근위축성 척색경화증, 헌팅턴병 및 기타 트리뉴클레오티드 반복 장애, 가족성 테니쉬 치매(Familial Danish dementia), 가족성 잉글리쉬 치매(Familial English dementia), 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈, 알렉산더병, 세이피노병증, 가족성 아밀로이드성 신경병증, 노인성 전신 아밀로이드증, 리소자임 아밀로이드증, 피브리노겐 아밀로이드증, 투석 아밀로이드증, 봉입체 근염/근병증, 백내장, 로돕신 돌연변이를 동반한 색소성 망막염, 갑상선 수질암, 심방 아밀로이드증, 뇌하수체 프로락틴종, 유전성 격자 각막 이영양증, 피부 태선 아밀로이드증, 말로리 소체, 각막 락토펜 아밀로이드증, 폐 치조 단백질, 치아 형성 중양 아밀로이드, 정낭 아밀로이드, 아포지단백 C2 아밀로이드증, 아포지단백 C3 아밀로이드증, Lect2 아밀로이드증, 인슐린 아밀로이드증, 갈렉틴-7 아밀로이드증(일차 국소 피부 아밀로이드증), 코르네오데스모신 아밀로이드증, 엔푸비르티드 아밀로이드증, 낭포성 섬유증, 겸상적혈구병, 아밀로이드증을 동반한 유전성 뇌출혈, AL 아밀로이드증 AH 아밀로이드증, AA 아밀로이드증, 대동맥 내측 아밀로이드증, ApoAI 아밀로이드증, ApoAII 아밀로이드증, ApoAIV 아밀로이드증, 및 핀란드 유형의 가족성 아밀로이드증.
- [1003] 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태는 본 발명의 접합체 또는 나노입자에 관한 것이며, 여기서 신경변성 질환의 치료에 사용하기 위한, 개재 폴리펩티드 영역이 사페론 또는 단백질 응집 억제제이며, 여기서 혈뇌장벽을 통과할 수 있는 다중양이온성 펩티드는 Seq-1-7, Seq-1-8 및 Angiopep-2-7로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [1004] IX - 표적 세포의 영상화 방법
- [1005] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 접합체 또는 나노입자를 사용하여 세포 샘플 내에서 특정 세포 또는 세포군의 존재를 검출할 수 있게 하는 방법에 관한 것이다.
- [1006] 따라서, 제 13 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제6 측면에 따른 접합체 또는 제9 측면에 따른 나노입자의 하나 이상의 성분에 대한 특이적 결합 부위를 포함하는 표적 세포의 영상화 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 다음을 포함한다.
- [1007] (i) 상기 세포를 함유하는 샘플을 접합체 또는 나노입자의 세포에 결합에 적절한 조건 하에 본 발명의 제6 측면에 따른 접합체 또는 본 발명의 제10 또는 제11 측면에 따른 나노입자와 접촉시키는 단계 및 여기서 관심 제제는 영상화제이고,
- [1008] (ii) 영상화제에 의해 제공되는 신호를 감지하여 세포를 영상화하는 단계.
- [1009] 본 명세서에 사용된 표현 "영상화 방법"은 표적 세포/들을 포함하는 샘플의 이미지 부분과 상기 세포/들을 포함하지 않는 이미지 부분 사이에 대비를 증가시킴으로써, 세포 샘플 내에 표적세포를 시각화할 수 있게 하는 임의의 방법을 지칭한다. 이 대비의 증가는 일반적으로 위의 IV-E.2 섹션에서 정의된 것처럼 영상화제에 의해 조정된다. 특정 실시양태에서, 영상화제는 상기 섹션에 명시된 것들 중 임의의 것이다.
- [1010] 본원에 사용된 용어 "표적 세포"는 상기 표적 세포의 표면에 있는 특이적 결합 부위의 존재와 관련된 적어도 하나의 관심 특성을 나타내는 세포를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 본 발명의 제6 측면에 명시된 세포 수용체를 포함하는 임의의 세포이다.
- [1011] 바람직한 실시양태에서, 세포는 CXCR4 수용체를 발현하거나 과발현한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 표적 세포는 본 발명의 제6 측면에서 "암"의 정의에 명시된 임의의 암으로부터의 암 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포는 유방암, 전립선암, 폐암, 난소암, 결장암, 결장직장암, 췌장암, 신장암, 뇌암, 비-호지킨 림프종 및 만성 림프구성 백혈병으로부터의 세포이다.

- [1012] 본원에 사용된 용어 "결합 부위"는 결합 쌍의 임의의 쌍을 나타내며, 여기서 결합 쌍의 다른 부분은 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 성분 중 하나이고, 바람직하게는 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 제2 폴리펩티드이다. "결합 쌍"이라는 표현은 결합 복합체를 생성하는 다른 분자와 상호작용하고 결합할 수 있는 분자를 말하며, 여기서 제1 및 제2 성분은 수소 결합, 소수성 상호작용, 반 데르 발스 결합, 이온 결합 또는 이들의 조합과 같은 비공유 결합에 의해 서로 결합된다. 결합 쌍은 단백질/단백질 상호작용, 펩티드/단백질 상호작용, 단백질 영역/단백질 상호작용, 항원/항체, 항원/항체 단편 또는 합텐/항-합텐과 같은 임의의 유형의 상호작용의 일부일 수 있다. "결합" 또는 "결합된"이라는 용어는 본 발명의 제2 측면에서 정의되었다.
- [1013] 특정 실시양태에서, 결합 부위는 상기 섹션 IV-B에 명시된 임의의 관심 표적이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 세포 수용체이다. 특정 실시양태에서, 이는 상기 섹션 IV-B에 명시된 것들로부터 선택된 세포 수용체이다. 특정 실시양태에서, 이는 CXCR4 수용체이다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 상기 관심 표적 및 세포 수용체는 본 발명의 접합체의 제2 폴리펩티드 또는 본 발명의 나노입자의 결합에 대해 반드시 특이적이지는 않다. 상기 관심 표적은 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 임의의 성분의 결합, 또는 접합체 또는 나노입자의 하나 이상의 성분의 결합에 대해 특이적일 수 있다.
- [1014] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 1개 이상의 결합 부위를 포함하고, 여기서 결합 부위 중 일부는 접합체의 한 성분의 결합에 특이적이고, 나머지 결합 부위는 본 발명의 접합체, 또는 본 발명의 나노입자의 적어도 또다른 성분의 결합에 특이적이다.
- [1015] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 성분은 다음과 같을 수 있다: 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 나노입자의 제1, 제2 및 제3 폴리펩티드 영역, 상기 폴리펩티드 영역들 사이의 연결 모이어티, 상기 폴리펩티드 영역 사이의 프로테아제 절단 부위, 본 발명의 폴리펩티드 또는 나노입자의 관심 제제, 또는 관심 제제와 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 나노입자의 폴리펩티드 사이의 연결 모이어티.
- [1016] 특정 실시양태에서, 표적 세포의 결합 부위에 결합하는 접합체 또는 나노입자의 하나 이상의 성분은 본 발명의 접합체 나노입자의 제2 폴리펩티드이고, 여기서 상기 폴리펩티드는 본 발명의 제6 측면에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 폴리펩티드는 다중양이온성 펩티드이다. 바람직한 실시양태에서, 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 이는 섹션 IV-B.(i)에 명시된 CXCR4 리간드들의 군으로부터 선택된 CXCR4 리간드이다.
- [1017] 본 발명의 영상화 방법의 바람직한 실시양태에서, 표적 세포는 CXCR4를 발현하거나 과발현하고, 본 발명의 접합체 또는 나노입자의 하나 이상의 성분은 다중양이온성 펩티드이고 CXCR4의 리간드이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 리간드는 섹션 IV-B.(i)에 명시된 CXCR4 리간드로부터 선택된다.
- [1018] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 나노입자가 바이파라토픽 나노입자인 경우, 표적 세포의 결합 부위에 결합하는 나노입자의 2개의 상이한 접합체의 하나 이상의 성분은 본 발명의 바이파라토픽 나노입자를 형성하는 각각의 접합체의 제2 폴리펩티드이며, 여기서 상기 폴리펩티드는 바이파라토픽 나노입자의 상이한 접합체들과 본 발명의 제6 측면에서 정의된 것들로부터 선택된 형태 사이에서 상이하다.
- [1019] 특정 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 2개의 접합체 중 하나의 제2 폴리펩티드 영역은 다중양이온성 펩티드이다. 바람직한 실시양태에서, 다중양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 이는 섹션 IV-B.(i)에 명시된 CXCR4 리간드의 군으로부터 선택된 CXCR4 리간드이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 2중 파라토프 나노입자의 두 접합체의 제2 폴리펩티드 영역은 다가양이온성 펩티드이다. 바람직한 실시양태에서, 두 접합체의 다가양이온성 펩티드는 CXCR4 리간드이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 두 접합체의 다중양이온성 펩티드는 섹션 IV-B.(i)에 명시된 CXCR4 리간드의 군으로부터 선택되는 CXCR4 리간드이며, 여기서 각각의 다중양이온성 펩티드는 상이하다. 바람직한 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 접합체 중 하나의 다중양이온성 펩티드는 T22 펩티드(서열번호 25, RRWCYRKCYKGYCYRKCR)이다.
- [1020] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 접합체 중 하나의 다가양이온성 펩티드는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29)이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 바이파라토픽 나노입자의 접합체 중 하나의 다중양이온성 펩티드는 T22 펩티드(서열번호 25, RRWCYRKCYKGYCYRKCR)이고, 바이파라토픽 나노입자의 다른 접합체의 다중양이온성 펩티드는 최적화된 EPI-X4 서열(서열번호 29)이다.
- [1021] 본원에 사용된 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 유기체, 바람직하게는 대상체로부터 분리된 생물학적 물질을 지칭한다. 본 발명의 제13 측면의 생물학적 샘플은 샘플에 존재하는 표적 세포를 검출하기에 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유한다. 생물학적 샘플은 대상체의 세포 및/또는 비-세포 물질을 포함할 수 있다. 샘플은 다

음과 같은 적절한 조직 또는 생물학적 유체에서 분리할 수 있으며, 예를 들어 조직 생검, 고형 종양 생검, 혈액, 타액, 뇌척수액, 소변, 대변, 골수, 유두 흡인물, 고형 종양 생검, 혈장, 혈청, 뇌척수액(CSF), 대변, 협측 또는 협측-인두 면봉, 정액, 수술 표본, 생검에서 얻은 표본 및 파라핀에 묻힌 조직 샘플.

- [1022] 샘플은 접합체 또는 나노입자가 세포의 결합 부위에 결합하기에 적절한 조건 하에 본 발명의 접합체 또는 본 발명의 나노입자와 접촉된다. "결합에 적합한 조건 하에서"라는 표현은 조건이 바람직하게는 접합체 또는 나노접합체를 BSA 또는 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 세포에 독성이 없는 용액으로 희석하는 것을 포함함을 의미한다. 이러한 추가된 제제는 또한 비특이적 배경의 감소를 돕는 경향이 있다.
- [1023] "적절한" 또는 "적합한" 조건은 또한 배양이 효과적인 결합을 허용하기에 충분한 온도 또는 기간 동안 진행됨을 의미한다. 본 발명의 접합체 또는 나노입자는 임의의 적합한 시간, 예를 들어 적어도 5분, 적어도 15분, 적어도 30분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 4시간 동안 배양된다.
- [1024] 이들은 세포의 생존 및 결합 부위에 접합체 또는 나노입자의 결합을 허용하는 온도에서 수행된다. 바람직하게는, 상기 온도는 대략 15-45℃, 바람직하게는 25℃, 더욱 바람직하게는 37℃, 또는 실온이다.
- [1025] 상기 배양 후, 샘플 내의 과량의 접합체 및/또는 나노입자는 해당 분야의 전문가에게 잘 알려진 방법에 의해 제거되고 PBS와 같은 적합한 배지의 사용을 포함한다. 배지에는 Tween20과 같은 세제가 포함될 수 있다. 적절한 시간 동안, 예를 들어 각 세척에 대해 1~30분 또는 3~10분 동안 세척될 수 있다. 세척은 상기 세포의 담체를 부드럽게 흔드는 것 또는 진동을 포함할 수 있다.
- [1026] 세척 온도는 세포가 생존할 수 있고 결합이 중단되지 않는 온도이다. 예를 들어, 15-45℃, 바람직하게는 25℃, 더 바람직하게는 37℃ 또는 실온일 수 있다. 세포의 결합 부위에 결합된 폴리펩티드에 의해 형성된, 즉 표적 세포의 결합 부위에 결합된 본 발명의 접합체 또는 나노입자에 의해 형성된, 복합체를 세척하기 위한 적합한 프로토콜은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [1027] 샘플에서 세포를 영상화하는 것은 샘플에 존재하는 접합체 또는 나노접합체에 존재하는 영상화제에 의해 방출되는 신호를 검출하는 것을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 세척 단계 후, 상기 접합체 및 나노접합체는 주로 샘플에 존재하는 표적 세포의 결합 부위에 결합된 것이다. 따라서, 샘플에서 영상화제에 의해 방출된 신호를 검출하는 것은 샘플에 존재하는 표적 세포를 간접적으로 검출하는 것을 허용한다. 영상화제를 감지하는 데 사용되는 기술은 사용되는 영상화제에 따라 다르다. 상기 기술은 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있으며, 특정 영상화제를 검출할 수 있는 카메라에 결합된 현미경의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 영상화제가 형광제인 경우 형광 현미경의 사용을 포함할 수 있고, 영상화제가 방사성뉴클레오타이드인 경우 방사선발광 현미경 또는 단일 세포 방사선발광 현미경의 사용을 포함할 수 있다. 특정 유형의 영상화제를 감지하는 적절한 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 이 섹션에 지정된 각 영상화제 군에 대해 섹션 IV-B.1에 표시된 유형이다.
- [1028] 특정 실시양태에서, 영상화 방법은 샘플에 존재하는 표적 세포 및 또한 샘플에서 상기 표적 세포의 양을 결정할 수 있게 한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 샘플에 존재하는 표적 세포의 양을 대조군 샘플에 존재하는 세포의 양과 비교할 수 있다.
- [1029] 특정 실시예에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제13 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [1030] X - 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드를 확인하는 방법.
- [1031] 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드는 루프 영역 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 중 하나 이상에 삽입된 이중 펩티드를 제시할 수 있다. 이들 변이체 폴리펩티드는 상이한 폴리펩티드가 라이브러리의 상이한 구성원에 의해 제시되는 펩티드 라이브러리로서 제공될 수 있다. 이들 라이브러리는 표적 폴리펩티드에 결합하는 라이브러리의 구성원을 선택하고 결합을 담당하는 폴리펩티드 라이브러리의 구성원 내의 펩티드 서열을 결정함으로써 표적 폴리펩티드에 결합할 수 있는 펩티드의 식별에 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드의 확인 방법에 관한 것이다.
- [1032] 제14 측면에서, 본 발명은 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드를 확인하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [1033] i) 표적 펩티드를 폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 하는 조건 하에 본 발명의 제2 측면에 따른 폴리

펩티드 디스플레이 라이브러리와 접촉시키는 단계,

[1034] ii) 표적 펩티드와 특이적으로 상호작용한 라이브러리의 구성원을 회수하는 단계,

[1035] iii) 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 단계.

[1036] 본원에 사용된 용어 "표적 펩티드"는 기능, 서열 또는 구조 제한이 없는 임의의 관심 펩티드를 지칭한다.

[1037] "폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용할 수 있는 조건 하에서"라는 표현은 표적 펩티드 및 폴리펩티드 라이브러리의 구성원이 그들의 무결성을 유지하여, 라이브러리의 폴리펩티드의 적어도 3차 구조 및 표적 펩티드가 유지되어, 표적 펩티드에 대한 결합 친화력을 갖는 라이브러리의 폴리펩티드가 표적 펩티드에 특이적으로 결합한다. 상기 조건은 폴리펩티드가 그의 완전성을 유지하도록 하는 특정 버퍼에서 라이브러리의 구성원을 회수하는 것을 포함한다. 상기 버퍼는 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있으며 BSA, 소 감마 글로불린(BGG), 인산 완충 식염수(PBS) 또는 트리스 완충 식염수(TBS)를 포함할 수 있다. 상기 조건은 또한 폴리펩티드 및 표적 펩티드가 상기 특이적 결합이 효과적으로 일어나기에 적절한 시간 및 온도 동안 배양된다는 것을 의미한다. 상기 조건은 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있으며, 일반적으로 바람직하게는 15-45℃, 바람직하게는 25℃, 더 바람직하게는 37℃, 또는 실온에서 1-4시간의 배양을 포함하거나 또는 밤새 4℃ 정도의 온도일 수 있다.

[1038] 용어 "폴리펩티드 라이브러리의 구성원"은 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 따라서, 특정 실시양태에서, 라이브러리의 구성원은 본 발명의 제2 측면에서 정의된 바와 같은 라이브러리의 폴리펩티드이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 본 발명의 제2 측면에서 정의된 바와 같이, 이를 코딩하는 핵산에 직접 연결된, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 복합체이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 본 발명의 제2 측면에서 정의된 바와 같은 라이브러리의 폴리펩티드를 포함하는 미생물이다.

[1039] 용어 "결합" 및 "특이적으로 결합하는"은 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 특정 실시예에서, 본 양태의 문맥에서 용어 "결합하다" 및 "상호작용하다"는 상호교환가능하다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 방법은 표적 펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 확인하기 위해 다루어지며, 상기 폴리펩티드와 표적 펩티드 사이의 결합 친화도가 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만인 경우 폴리펩티드는 표적 펩티드에 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다.

[1040] 특정 실시양태에서, 표적 펩티드는 고체 지지체에 고정된 경우이다.

[1041] 비제한적인 예시적인 고체 지지체는 중합체(예: 아가로스, 세파로스, 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 알기네이트, 테플론, 라텍스, 아크릴아미드, 나일론, 플라스틱, 폴리스티렌, 실리콘 등), 유리, 실리카, 세라믹, 및 금속을 포함한다. 이러한 고체 지지체는 입자(미세입자 포함), 시트, 디스크, 겔, 필터, 멤브레인, 극세사 스트립, 튜브, 웰, 플레이트(예: 6웰 플레이트, 24웰 플레이트, 96웰 플레이트, 384웰 플레이트 등을 포함하는 마이크로플레이트), 섬유, 모세관, 콤스(combs), 피켓 팁, 마이크로어레이 칩 등과 같은 임의의 형태를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 비오틴-결합 모이어티는 고체 지지체의 표면과 회합된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체의 표면은 다공성, 미립자, 섬유질, 웹형 또는 소결된 표면과 같은 불규칙한 표면을 포함한다.

[1042] 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 마이크로플레이트, 마이크로어레이 칩, 및 마이크로입자로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 적어도 부분적으로 중합체로 구성된다. 일부 실시양태에서, 마이크로입자 고체 지지체는 단분산 또는 다분산 구형 비드를 포함한다. 단분산 마이크로입자는 크기가 실질적으로 크기가 단일형태이지만(즉, 직경 표준 편차가 5% 미만임) 다분산 마이크로입자는 크기가 다양하다. 일부 실시양태에서, 마이크로입자는 전체에 걸쳐 동일한 중합체로 구성되거나, 코어-셸 중합체이며, 여기서 마이크로입자의 코어는 하나의 중합체로 구성되고 외부 층(또는 "셸")은 다른 중합체로 구성된다. 일부 실시양태에서, 마이크로입자는 자성이다.

[1043] 일부 실시양태에서, 표적 펩티드는 링커 모이어티를 통해 고체 지지체에 부착된다. 특정 실시양태에서, 상기 링커는 프로테아제 절단 부위를 포함한다.

[1044] 상기 방법의 두 번째 단계에서, 표적 펩티드에 특이적으로 결합된 라이브러리의 구성원이 회수된다. 단계 (ii)에서 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 확인하기 위해, 별도의 결합 반응(이하 "음성 선택 단계"라 함)이 동시에 수행되어야 하는 것으로 이해될 것이며 표적 폴리펩티드는 라이브러리에서 발견되는 비-변이체 또는 자연적으로 발생하는 형태의 폴리펩티드와 접촉된다. 바람직하게는, 상기 비변이체 또는 자연적으로 발생하는 형태는 라이브러리의 구성원과 동일하지만 루프 영역이 이중성 펩티드 또는 폴리펩티드의 삽입에

의해 변형되지 않은 것이다. 표적 폴리펩티드가 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리의 구성원에 결합하지만 이의 비변이체 또는 자연 발생 형태에는 결합하지 않는 경우에만, 폴리펩티드 라이브러리의 구성원은 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 선택될 것이다. 따라서, 예로서, 폴리펩티드 라이브러리가 서열번호 62 또는 63에 정의된 바와 같은 인간 니도겐 G2 도메인의 다양한 형태에 의해 형성되는 경우, 여기서 루프 영역 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 중 하나 이상이 이중 펩티드의 삽입에 의해 변형된 다음, 이중 펩티드에 특이적으로 결합하지 않는 펩티드를 배제하기 위해 사용되는 음성 선택 단계는 각각 서열 번호 62 또는 63의 폴리펩티드를 사용하여 수행될 것이다. 폴리펩티드 라이브러리는 위치 459, 468, 639, 650, 543, 545, 449, 525, 561, 618, 619, 151, 604, 638, 641, 469 및 518에서 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 다양한 형태의 인간 니도겐 G2 도메인에 의해 형성될 수 있으며 여기서 넘버링은 수탁 번호 P14543-1로 UniProt 데이터베이스(2009년 7월 7일자 버전)하에 정의된 전장 인간 니도겐-1의 넘버링에 해당한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 라이브러리는 위에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 돌연변이 H459A, R468N, F639S, R650A, H543K, H545N, V449T, V525Q, V619T, F561E, C618S, S469I, R518I 를 포함하는 니도겐 G2 도메인의 다양한 형태에 의해 형성된다. 폴리펩티드 라이브러리에 사용될 수 있는 적합한 니도겐 G2 도메인 변이체는 제한 없이, 서열번호: 64, 65 및 87 내지 104 로 각각 정의된 바와 같은 NIDOm2, NIDOm3, NIDOm3-V45T, NIDOm3_V121Q, NIDOm3-F157E, NIDOm3-V215T, NIDOm4, NIDOm4_T215V, NIDOm5, NIDOm3-V176T, NIDOm3-I200T, NIDOm3-V236Y, NIDOm3-L237T, NIDOm3-S65I, NIDOm3-R114I, NIDOm3-C214S, NIDOm3-S65I_R114I, NIDOm5-S65I_R114I, NIDOm3-S65I_R114I 및 NIDOm5-S65I_R114I을 적재한 변이체를 포함하는 본 발명의 이전 측면의 맥락에서 상기 정의된 임의의 니도겐 G2 도메인 변이체를 포함하며, 그리고 여기서 루프 영역 AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HI, IJ 및 JK 중 하나 이상이 이중 펩티드의 삽입에 의해 변형되고, 이중 펩티드에 특이적으로 결합하지 않는 펩티드를 배제하기 위해 사용되는 음성 선택 단계는 상기 정의된 폴리펩티드를 사용하지만 이중 펩티드가 결합된 폴리펩티드를 사용하여 수행될 것이다.

- [1045] 이를 위해 먼저 표적 펩티드를 세척하여 표적 펩티드에 결합하지 않은 라이브러리 구성원을 제거한다. 세척 조건은 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있으며 PBS와 같은 적절한 매체의 사용을 포함한다. 배지에는 Tween20과 같은 세제가 포함될 수 있다. 적절한 시간 동안, 예를 들어 각 세척에 대해 1~30분 또는 3~10분 동안 세척될 수 있다. 세척은 상기 표적 펩티드의 담체를 부드럽게 흔드는 것 또는 진동을 포함할 수 있다. 세척 온도는 표적 펩티드와 라이브러리의 폴리펩티드 간의 결합이 파괴되지 않는 온도이다. 예를 들어, 15~45℃ 또는 30~40℃일 수 있다. 일반적으로 약 37℃ 또는 실온이다.
- [1046] 표적 펩티드가 세척되면 표적 펩티드에 결합된 라이브러리의 구성원이 회수된다. 상기 회수는 표적 펩티드에 결합된 라이브러리의 폴리펩티드를 용출하는 것으로 이루어질 수 있다. 상기 용출에 대해 상이한 기술이 사용될 수 있다. 예를 들어, 용리는 둘 사이의 결합을 방해하는 낮은 pH 조건, 예를 들어 pH 3과 6 사이, 바람직하게는 pH 4에서 복합 "라이브러리의 표적 펩티드 구성원"을 배양함으로써 수행될 수 있다. 용리는 DTT와 복합체를 배양하여 수행할 수도 있다. 대안적으로, 폴리펩티드 및 표적 펩티드의 전체 복합체가 회수될 수 있다. 예를 들어, 표적 펩티드가 표적 지지체에 고정될 때, 상기 고정은 전체 복합체로 회복되도록 절단되는 프로테아제 절단 부위를 포함하는 링커에 의해 매개될 수 있다. 상기 방법은 해당 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다.
- [1047] 특정 실시양태에서, 단계 i) 및 ii)는 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 10회, 바람직하게는 적어도 2회 반복된다. 상기 반복 각각에서, 단계 i)에서 사용된 폴리펩티드 라이브러리의 구성원은 단계 ii)에서 회수된 구성원에 상응한다.
- [1048] 따라서, 또 다른 특정 실시양태에서, 제14 측면의 방법의 단계 i) 및 ii)는 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 10회, 바람직하게는 적어도 2회 반복되며, 여기서 각 반복에서 단계 i)에서 사용된 폴리펩티드 라이브러리는 단계 (ii)에서 회수된 라이브러리의 구성원에 의해 형성된다.
- [1049] 제3 단계에서 라이브러리의 폴리펩티드가 확인된다. 폴리펩티드의 확인은 라이브러리의 폴리펩티드의 서열을 결정하는 것을 포함한다.
- [1050] 상기 결정은 여러 방법에 의해 중재될 수 있다. 예를 들어, 이는 질량 분석과 같은, 당업자에게 잘 알려진 임의의 기술에 의해 상기 폴리펩티드의 서열을 결정하는 것으로 간단하게 구성될 수 있다.
- [1051] 라이브러리의 구성원이 표현형으로서 라이브러리의 폴리펩티드인 경우, 본 발명의 제2 측면에서 정의된 바와 같이, 상기 표현형에 상응하는 유전자형으로서 핵산에 직간접적으로 연결되고, 라이브러리의 폴리펩티드 서열의 결정은 또한 상기 핵산의 시퀀싱으로 이루어질 수 있다. 본 발명의 제2 측면에서 언급된 "유전자형"의 정의에

나타낸 바와 같이, 상기 핵산은 이에 직접 또는 간접적으로 연결된 라이브러리의 폴리펩티드를 코딩하거나 코딩하는 서열을 포함한다. 폴리펩티드에 직접 또는 간접적으로 연결된 핵산의 서열을 결정하는 방법은 해당 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 이들은 단순히 PCR에 의해 또는 핵산이 RNA 분자인 경우 역전사효소에 이어 PCR(RT-PCR)에 의해 상기 핵산의 서열을 증폭하는 것을 포함할 수 있다. 증폭된 cDNA는 이후 숙련자에게 잘 알려진 기술에 의해 시퀀싱된다. 상기 시퀀싱 기술의 비제한적인 예는 잘 알려진 생거 방법, 파이로시퀀싱, 합성에 의한 시퀀싱 또는 결찰(ligation)에 의한 시퀀싱을 포함한다. 대안적으로, 핵산이 직접 또는 간접적으로 연결된 라이브러리의 폴리펩티드로부터 단리된 제1 단계를 포함할 수 있으며, 그런 다음, 이전에 설명된 바와 같이 핵산이 PCR 또는 RT-PCR에 의해 증폭되고 시퀀싱된다. 폴리펩티드로부터 핵산을 분리하는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상기 기술의 비제한적 예는 폴리펩티드와 다른 분자의 상호작용의 파괴, 또는 단순히 폴리펩티드의 분해를 허용하는 임의의 기술을 포함한다. 이러한 기술에는 디티오프레이톨(DTT), 나트륨 도데실 설페이트(SDS)와 같은 세제, 단백질을 분해하기 위한 프로테아제 K와 같은 프로테아제와의 배양, 또는 단백질을 변성시키기 위해 단순히 고온에서 배양하는 것을 포함하며 따라서 핵산에 대한 모든 폴리펩티드는 바람직하게는 40-95℃, 더욱 바람직하게는 60℃에서 파괴된다. 그런 다음 핵산이 RNA인 경우 페놀/클로로포름, 실리카 방법 또는 구아니디늄 티오시아네이트-페놀-클로로포름 추출과 같은 잘 알려진 기술에 의해 단백질로부터 핵산을 분리한다. 핵산이 폴리펩티드에 간접적으로 연결되고 미생물, 예를 들어 박테리아 또는 효모 세포로부터의 세포 내에 포함되는 경우, 핵산의 분리는 세포막을 분해하도록 하는 기술을 포함할 수 있다. 상기 기술은 또한 해당 분야의 전문가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 폴리펩티드와 다른 분자의 상호작용을 방해하기 위해 위에 표시된 기술 중 하나로 구성될 수 있다. 폴리펩티드에서 핵산을 분리하기 위해 위에서 언급한 방법 중 일부는 Kelly M. Elkins, 2013, Forensic DNA Biology에 더 자세히 설명되어 있다.

- [1052] 따라서, 특정 실시양태에서, 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 것은 상기 펩티드의 서열을 결정하는 것을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 이는 이에 직접 또는 간접적으로 연결된 핵산의 서열을 결정하고 이를 코딩하는 것을 포함한다.
- [1053] 특정 실시양태에서, 라이브러리의 여러 폴리펩티드는 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있다. 이 경우, 상기 방법은 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드를 확인하기 위한 것으로, 상기 방법의 iii) 단계는 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 것으로 이루어진다. 하나의 폴리펩티드의 서열을 확인하기 위해 위에 제공된 동일한 방법은 여러 폴리펩티드의 서열을 확인하는 데에도 적용할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드 서열의 확인은 이들 각각에 직접 또는 간접적으로 연결된 핵산에 대한 서열을 결정하는 것을 포함한다.
- [1054] 또 다른 특정 실시양태에서, 단계 ii) 후에, 방법은 라이브러리의 회수된 구성원이 증폭되는 추가 단계를 포함한다. 상기 증폭은 회수된 폴리펩티드 라이브러리의 구성원으로 숙주 유기체를 형질전환시키거나 단순히 회수된 라이브러리의 구성원을 증폭하는 것으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 라이브러리의 구성원이 본 발명의 제2 측면에 기술된 미생물이고 파지, 박테리오파지 또는 바이러스와 같은 유기체의 감염시 복제할 수 있는 경우 단계 ii)에서 회수된 라이브러리의 구성원은 라이브러리의 구성원에 의해 감염된 박테리아를 배양함으로써 증폭될 수 있다. 상기 구성원이 박테리아 또는 효모와 같이 복제할 수 있는 본 발명의 제2 측면에 기재된 바와 같은 미생물인 경우, 라이브러리 구성원의 증폭은 단순히 상기 미생물을 배양하는 것으로 이루어질 수 있다.
- [1055] 따라서, 특정 실시양태에서, 표적 펩티드에 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들을 확인하는 방법은 다음을 포함한다:
- [1056] i) 폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 하는 조건 하에, 본 발명의 제2 측면에 따른 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리와 표적 펩티드를 접촉시키는 단계,
- [1057] ii) 표적 펩티드와 상호작용한 라이브러리의 구성원을 회수하는 단계,
- [1058] iii) 단계 ii)에서 회수된 라이브러리의 구성원을 증폭하는 단계,
- [1059] iv) 표적 펩티드와 상호작용하는 폴리펩티드의 서열을 확인하는 단계.
- [1060] 특정 실시양태에서, 단계 i) - iii)이 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 10회 반복되며, 바람직하게는 적어도 2회, 여기서 각 반복에서 단계 i)에서 사용된 폴리펩티드 라이브러리는 단계 (ii)에서 회수되고 단계 iii)에서 증폭된 라이브러리의 구성원에 의해 형성된다.
- [1061] 특정 실시예에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시예는 본 발명의 제14 측면에 동일하게 적

용 가능하다.

[1062] XI - 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 용도

[1063] 본 발명의 제1 측면에 나타난 바와 같이, 이 측면의 폴리펩티드는 루프 영역에 삽입으로서 또는 루프 영역을 부분적으로 또는 완전히 대체함으로써, 루프 영역 중 하나 이상 내에 이중성 펩티드 또는 펩티드들을 혼입하는데 적합하다. 그런 다음, 이러한 변이체 폴리펩티드는 "관심 있는 펩티드"로 정의될 수 있는 이중성 펩티드 또는 펩티드를 제시하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 제15 측면에서, 본 발명은 펩티드를 제시하기 위한 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 폴리펩티드의 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 펩티드는 루프 영역 중 하나에서 발견된다.

[1064] 본원에 사용된 "제시하기 위한"이라는 표현은, 이중성 펩티드를 관심 요소에 근접하게 하는 폴리펩티드의 능력을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "관심있는 펩티드"는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 중 하나에서 발견될 수 있다는 사실 외에, 임의의 기능, 서열 또는 구조적 특징에 의해 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 이중 폴리펩티드는 루프 영역 중 하나 이상 내에 삽입되고, 즉 루프 영역은 서열번호 62 또는 서열번호 63의 동족 루프 도메인에서 발견되는 모든 아미노산을 보존하고, 그러나 이중 폴리펩티드는 2개의 연속적인 아미노산 사이에 삽입된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 영역 중 하나 이상 내의 이중 폴리펩티드는 루프 도메인의 서열을 부분적으로 또는 완전히 대체하는 루프 영역 내의 삽입으로서 발견된다. 하나 이상의 펩티드가 본 발명의 폴리펩티드의 상이한 루프에 제공되는 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 펩티드는 루프 영역에 삽입물로서 위치할 수 있고 하나 이상의 펩티드는 부분 또는 완전한 루프 영역을 대체하는 것으로 발견될 수 있다.

[1065] 제시될 이중 폴리펩티드 또는 펩티드들의 길이는 특별히 제한되지 않는다. 따라서, 이중 폴리펩티드는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 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 85개, 적어도 90개, 적어도 95개, 적어도 100개, 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[1066] 특정 실시양태에서, 관심 펩티드는 본 발명의 제6 측면에서 정의된 관심 제제 중 임의의 것이고, 바람직하게는 이는 섹션 IV-E.1에 정의된 바와 같은 치료제이고, 특히, 세포독성 폴리펩티드, 항혈관신생 폴리펩티드, 종양억제 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드, 세포자멸사 유도 폴리펩티드, 항전이 활성을 갖는 폴리펩티드, 종양에 대한 면역 반응을 활성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 폴리펩티드, 항혈관신생 분자 또는 독소이다.

[1067] "결합하다" 및 "특이적으로 결합하다"라는 용어는 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 결합 복합체의 KD 뿐만 아니라 폴리펩티드와 표적 분자 사이의 결합을 측정하는 방법은 본 발명의 첫 번째 측면에서 상기 정의에 제공되었다. 특정 실시양태에서, 관심 펩티드와 폴리펩티드의 마지막 하나의 루프 영역 사이의 특이적 결합은 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M, 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 Kd 를 갖는다.

[1068] 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드가 관심 펩티드를 제시하거나 제공하는 관심 요소는 세포이다. 바람직한 실시양태에서, 이는 샘플 내의 세포이다. 또 다른 특정 구체예에서, 이는 그것이 유래하는 조직 또는 유기체로부터 분리된 세포이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 관심 요소는 샘플 내의 또 다른 펩티드, 단백질, 또는 핵산이다.

[1069] "샘플"이라는 용어는 본 발명의 제13 측면에서 정의되었다. 본 측면에서 언급된 샘플은 관심 요소를 포함하며, 여기서 상기 요소는 바람직하게는 위에 명시된 바와 같다.

[1070] 특정 실시양태에서, 본 발명은 펩티드를 제시하기 위한 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드의 비치료적 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 펩티드는 루프 영역 중 하나에서 발견된다.

[1071] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시예는 본 발명의 제15 측면에 동일하게 적용 가능하다.

[1072] XII - 샘플에서 표적 펩티드의 존재를 결정하는 방법.

[1073] 이전 측면에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드는 표적 분자 또는 표적 펩티드에 특이적으

로 결합할 수 있다. 따라서 샘플에서 상기 펩티드의 존재를 결정하는 데 유용할 수 있다.

- [1074] 따라서 제 16 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 샘플에서 표적 펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다:
- [1075] (i) 샘플에 존재하는 단백질을 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드와 접촉시키는 단계로서, 폴리펩티드 내의 루프 영역 중 적어도 하나의 서열은 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 서열이며,
- [1076] (ii) 표적 펩티드와 폴리펩티드 사이에 상호작용이 있는지 여부를 결정하는 단계,
- [1077] 여기서 폴리펩티드와 표적 펩티드 사이에 상호작용이 있는 경우, 표적 펩티드는 샘플에 존재한다.
- [1078] "샘플"이라는 용어는 본 발명의 제13 측면에서 정의되었다. 본 발명의 제14 측면의 샘플은 샘플에 존재하는 펩티드를 검출하기에 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유한다.
- [1079] 본원에 사용된 표현 "표적 펩티드"는 본 발명의 제1 측면의 폴리펩티드의 루프 영역 중 적어도 하나의 서열에 특이적으로 결합한다는 사실 외에, 임의의 기능적, 서열 또는 구조적 특징에 의해 제한되지 않는다.
- [1080] 특정 실시양태에서, 표적 펩티드는 본 발명의 제13 측면의 것이고, 폴리펩티드는 상기 측면에서 상기 표적 펩티드에 특이적으로 결합하는 것으로 확인된 것이다.
- [1081] 적어도 하나의 루프 영역의 상기 서열과 표적 펩티드 사이의 특이적인 결합은 10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M, 10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만 또는 10^{-15} M 미만의 KD를 갖는다. "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 본 발명의 제1 측면에서 정의되었다. 폴리펩티드와 표적 펩티드 사이의 결합을 결정하는 방법이 또한 본 발명의 제1 측면에서 제공되었다.
- [1082] 샘플에 존재하는 단백질을 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 측면의 폴리펩티드와 접촉시키는 것은, 일반적으로 폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 허용하는 조건 하에, 폴리펩티드를 샘플과 단순히 혼합하는 문제이다. 따라서, 특정 실시양태에서, 방법의 단계 i)는 상기 조건 하에 수행된다. "폴리펩티드가 표적 펩티드와 상호작용하도록 하는 조건하에서"라는 표현은 본 발명의 제14 측면에서 정의되었다. 상기 정의는 "라이브러리의 구성원" 또는 "라이브러리의 폴리펩티드"라는 용어를 "제1 측면의 폴리펩티드"로 대체함으로써 본 발명의 현재 측면에 적용된다.
- [1083] 상호작용이 있는지, 즉 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체의 형성 여부를 결정하는 것은 여러 가지 방법으로 수행될 수 있다.
- [1084] 한 측면에서, 이것은 먼저 상기 지지체에 부착되고 상기 펩티드에 특이적인 특이적 항체, 또는 히스티딘 태그 또는 비오틴과 같은 상기 펩티드에 존재하는 태그에 특이적인 항체에 의해 표적 펩티드를 고체 지지체에 부착시키는 단계를 포함한다. 그런 다음, 제1 측면의 폴리펩티드를 첨가하고 과량의 시약을 씻어낸다. 이어서, 고체 지지체에서 제1 측면의 폴리펩티드의 존재가 결정된다. 당업계에 공지된 바와 같이 다양한 차단 및 세척 단계가 이용될 수 있다. 세척 조건은 본 발명의 제14 측면에 명시된 임의의 것일 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 세척 단계 후, 검출된 제1 측면의 폴리펩티드는 표적 펩티드에 결합된 것이다. 따라서, 제1 측면의 폴리펩티드의 검출은 표적 펩티드에 대한 폴리펩티드의 결합, 따라서 샘플에서 상기 펩티드의 존재의 간접적인 표시이다.
- [1085] 샘플에서 폴리펩티드 또는 펩티드의 존재를 검출하는 기술은, 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 라벨될 수 있고 상기 라벨은 검출될 수 있다. 상기 라벨은 임의의 방사성, 형광성, 생물학적 또는 효소적 태그일 수 있다. 상기 라벨을 검출하는 방법은 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려져 있다. 이러한 라벨의 사용에 관한 특허에는 미국 특허 제3,817,837호; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 및 4,366,241을 포함한다. 대안적으로, 당업계에 공지된 바와 같이, 제1 및 제2 항체 및/또는 비오틴/아비딘 리간드 결합 배열과 같은 2차 결합 리간드의 사용을 통해 추가적인 이점을 찾을 수 있다. 샘플에서 폴리펩티드를 검출하기 위한 2차 리간드의 사용을 기반으로 하는 기술의 비제한적인 예는 웨스턴 블롯 또는 면역블롯, ELISA(효소-결합 면역흡착 분석) 또는 RIA(방사면역분석)를 포함한다.
- [1086] 다른 측면에서, 상호작용이 있는지 여부를 결정하는 것은 먼저 상기 고체 지지체에 부착되고 상기 폴리펩티드에 특이적인 항체에 의해, 고체 지지체에 제1 측면의 폴리펩티드를 부착함으로써 수행될 수 있다. 그 다음, 표적 펩티드를 포함하는 것으로 의심되는 샘플을 첨가하고 과잉 시약을 세척한다. 마지막으로, 고체 지지체에서 관심

펩티드의 존재가 결정된다.

- [1087] 나머지 단계는 타겟 펩티드가 고체 지지체에 고정화되어 있는 경우, 위에서 설명한 것과 동일할 수 있으며, 본 경우에 검출된 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체의 일부가 표적 펩티드인 것을 제외하고, 표적 펩티드에 부착된 라벨(위에 표시된 것과 같음) 또는 표적 펩티드에 특이적인 2차 리간드(위에 표시된 것과 같음)에 의한다. 따라서, 이 경우에 표적 펩티드의 검출은 표적 펩티드에 대한 폴리펩티드의 결합, 따라서 샘플에서 상기 펩티드의 존재에 대한 간접적인 표시이다.
- [1088] 해당 분야의 전문가에 의해 잘 알려진 바와 같이, 샘플 내 또는 고체 지지체에 부착된 폴리펩티드 또는 펩티드의 존재를 결정하도록 하는 위에 명시된 임의의 기술은 또한 샘플 또는 상기 고체 지지체에 부착된 상기 폴리펩티드 또는 펩티드의 양을 결정할 수 있게 한다. 따라서, 샘플 내 표적 펩티드의 존재를 결정하는 방법은 표적 펩티드의 존재뿐만 아니라 형성된 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체의 양 및 이에 따른 샘플 내 표적 펩티드의 양을 결정할 수 있게 한다.
- [1089] 따라서, 특정 실시예에서, 본 발명은 또한 다음을 포함하는 샘플에서 표적 펩티드의 양을 결정하는 방법에 관한 것이다:
- [1090] i) 샘플에 존재하는 단백질을 본 발명의 제1 측면에 따른 폴리펩티드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 폴리펩티드 내의 루프 영역 중 적어도 하나의 서열은 표적 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 서열이고, 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서
- [1091] ii) 형성된 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체의 양을 결정하는 단계,
- [1092] 여기서 형성된 폴리펩티드-표적 펩티드 복합체의 양은 샘플 내의 표적 펩티드의 양을 나타낸다.
- [1093] 본원에 사용된 "폴리펩티드-표적 펩티드 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에서"라는 표현은 폴리펩티드가 상기 표시된 표적 펩티드와 상호작용하도록 허용하는 동일한 조건을 지칭한다.
- [1094] 제14 측면의 특정 실시양태에서, 제1 측면의 폴리펩티드는 고체 지지체에 고정된다. 특정 실시양태에서, 상기 고체 지지체는 본 발명의 제14 측면에 명시된 것들 중 임의의 것이다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 링커 모이어티를 통해 고체 지지체에 부착된다.
- [1095] 제14 측면의 또 다른 특정 실시양태에서, 표적 펩티드는 고체 지지체에 고정된다. 특정 실시양태에서, 상기 고체 지지체는 본 발명의 제14 측면에 명시된 것들 중 임의의 것이다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 링커 모이어티를 통해 고체 지지체에 부착된다.
- [1096] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이전 측면에서 설명된 모든 용어 및 실시양태는 본 발명의 제16 측면에 동일하게 적용가능하다.
- [1097] 다른 실시양태에서, 본 발명의 임의의 측면 및 실시양태에서 사용되는 용어 "이루어지다" 및 "포함하다", "이루어지는" 및 "포함하는"은 상호교환가능하다.

[1098]

서열 개요

서열번호	서열
1	루프 영역 AB (GSSQVP)
2	루프 영역 BC (MNHG)
3	루프 영역 CD (PETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSTGG)
4	루프 영역 DE (VGHPGN)
5	루프 영역 EF (GIDEHGH)
6	루프 영역 FG (PQIPFGS)
7	루프 영역 HI (EPERDGASP)
8	루프 영역 IJ (FQECVHDDSRPALPS)
9	루프 영역 JK (NQEEK)
10	베타 가닥 A (QRVNGKVKGRIFV)
11	베타 가닥 B (IVFENTDLHSYVV)
12	베타 가닥 C (RSYTAIS)
13	베타 가닥 D (EFTRQAEVTF)
14	베타 가닥 E (LVIKQRFSS)
15	베타 가닥 F (LTIDTELEGRV)
16	베타 가닥 G (SVHIEPYTELYHYS)
17	베타 가닥 H (VITSSSTREYTVT)
18	베타 가닥 I (SRIYTYQWRQTIT)
19	베타 가닥 J (TQQLSVDSVFLY)
20	베타 가닥 K (ILRYALSNSIG)
21	α 1 (TVGYSL)
22	α 2 (PVGGIIGWM)
23	α 3 (GFSIT)
24	CaD (TIPE)

[1099]

25	T22 (RRWCYRKCYKGYCYRKCR)
26	V1 펩티드 (LGASWHRPDKCCLGYQKRPLP)
27	CXCL12 (KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKI LNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE YLEKALN
28	vCCL2 LGASWHRPDKCCLGYQKRPLPQVLLSSWYPTSQLCSKPGVIFLTKRGRQVCADKDWVKKL MQQLPVT A)
29	최적화된 EPI-X4 IVRWSKKVPCVSIVRWSKKVPCVS
30	Arg-풍부 서열 (RRRRRRRRR)
31	Arg-풍부 서열 (RRRGRGRRR)
32	Arg-풍부 서열 (RARGRGRRR)
33	Arg-풍부 서열 (RARGRGGGA)
34	A5G27 (RLVSYNGIIFFLK)
35	FNI/II/V (WQPFRARITGYIIKYEKPGSPPREVVPRPRPGVTEATITGLEPGTEYTIYVIALKNNQKS EPLIGRKKT)
36	Seq-1-7 (KYLAYPDSVHIWRKRKRK)
37	Seq-1-8 (KYLAYPDSVHIWRKRKRKR)
38	안지오펙-2-7 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEYRKR)
39	링커 영역(GGSSRSS)
40	링커 영역 (GGGNS)
41	T140 (RRX ₁ CYRKX ₂ PYRX ₃ CR)
42	TN14003 (RRX ₁ CYX ₂ KX ₃ PYRX ₄ CR)
43	TC14012 (RRX ₁ CYEKX ₂ PYRX ₃ CR)
44	TE14011 (RRX ₁ CYX ₂ KX ₃ PYRX ₄ CR)

[1100]

45	TZ14011 (RRX ₁ CYX ₂ KX ₃ PYRX ₄ CR)
46	GW-H1 펩티드 (GYN YAKKLANLAKKFANALW)
47	뉴클레오타이드-결합 펩티드 1 (KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKKAPAKK)
48	뉴클레오타이드-결합 펩티드 2 (KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKKAPAKKRKRKRK)
49	링커 영역 (SGGTSGSTSGTGST)
50	링커 영역 (AGSSTGSSTGPGSTT)
51	링커 영역 (GGSGGAP)
52	링커 영역 (GGGVEGGG)
53	링커 영역 (PKPSTPPGSS)
54	링커 영역 (APAETKAEPMT)
55	절단 부위 (AAALE)
56	절단 부위 (DDDDK)
57	절단 부위 (IEDGR)
58	절단 부위 (LVPRGS)
59	절단 부위 (ENLYFQG)
60	절단 부위 (LEVLFQGP)
61	T22-NIDOm2-H6 RRWCYRKCYGYCYRCKRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVIKQRFSGIDEHG HLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIE PYTELYHYSTSVTSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVL YNQEEKILAYALSNSIGPVREGSPDAKHHHHHH
62	천연 인간 니도겐-1 G2 도메인

[1101]

	SPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNG FSITGGEFTRQAEVTFVGHHPGNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITS SSTREYT VTEPERDGPASPRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVFLYNQEEKILRYALSNSIGPVRE GSPDA
63	SP 디렘티드 결핍의 천연 인간 니도겐 -1 G2 도메인 QVRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNG FSITGGEFTRQAEVTFVGHHPGNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITS SSTREYT VTEPERDGPASPRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVFLYNQEEKILRYALSNSIGPVRE GSPDA
64	H459A., R468N, F639S 및 R650A 돌연변이들 (NIDOm2)을 적재한 인간 니도겐 -1 G2 도메인 SPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNG FSITGGEFTRQAEVTFVGHHPGNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITS SSTREYT VTEPERDGPASPRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALSNSIGPVRE GSPDA
65	H459A., R468N, F639S 및 R650A 돌연변이를 적재하고 SP 디렘티드 결핍의 인간 니도겐-1 G2 도메인 QVRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNG FSITGGEFTRQAEVTFVGHHPGNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITS SSTREYT VTEPERDGPASPRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALSNSIGPVRE GSPDA
66	T22-G2-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSS

[1102]

	SPQRVNGKVKGRIQVGVSSQVPIVFENTDLHSYWMNHGRSYTAISTIPETVGYSLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNQ FSITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEHGHILTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITS SSTREYT VTEPERDGPSPRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVFVLYNQEEKILRYALSNSIGPVRE GSPDA KHHHHHHH
67	BAK
68	BAK BH3 도메인
69	PUMA
70	디프테리아 독소 I
71	<i>P. aeruginosa</i> 의 외독소
72	Uniprot 데이터베이스의 P14543-1 (2009,7,7 일자 버전)
73	헥사히스티딘 (HHHHHH)
74	IL-6 리간드 (LSLITRL)
75	IL-6 리간드 (WQDPHSWNSSFYRLRFELRYAERSKTFTTW)
76	링커 영역 (GGSSRSSS)
77	양전하 펩티드 영역 (RKRKRK)
78	양전하 펩티드 영역 (RRRRRR)
79	양전하 펩티드 영역 (KKKKKK)
80	양전하 펩티드 영역 (HHHHHH)
81	양전하 펩티드 영역 (RHRHRH)
82	양전하 펩티드 영역 (RKRKRKRK)
83	양전하 펩티드 영역 (RKRHRK)
84	양전하 펩티드 영역 (RKRHRH)
85	양전하 펩티드 영역 (RHRHRH)

[1103]

86	양전하 펩티드 영역 (RKRKRKR)
87	NIDOmut3 SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
88	NIDOmut3_V45T SPQRVNGKVKGRIFFGSSQ T PIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
89	NIDOmut3_V121Q SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
90	NIDOmut3_F157E SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
91	NIDOmut3_V215T SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQEC TH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
92	NIDOmut4 SPQRVNGKVKGRIFFGSSQ T PIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQEC TH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
93	NIDOmut4_T215V SPQRVNGKVKGRIFFGSSQ T PIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVKQRFSGIDE KGNL TIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTEL

[1104]

	YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
94	NIDOmut5 SPQRVNGKVKGRIYVSSQTPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFQGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
95	NIDOmut3_V176T SPQRVNGKVKGRIYVSSQVPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
96	NIDOmut3_I200T SPQRVNGKVKGRIYVSSQVPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQ EEKILAYALSNSIGPVREGSPDA
97	NIDOmut3_V236Y SPQRVNGKVKGRIYVSSQVPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
98	NIDOmut3_L237T SPQRVNGKVKGRIYVSSQVPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
99	NIDOmut3_S65I SPQRVNGKVKGRIYVSSQVPIVFENTDLASYVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALSNSIGPVREGSPDA
100	NIDOmut3_R114I

[1105]

	SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDA
101	NIDOmut3_C214S SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDA
102	NIDOmut3_S65I_R114I SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDA
103	NIDOmut5_S65I_R114I SPQRVNGKVKGRIFFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVE QDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFQGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPEGSSVHIEPYTELY HYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEE KILAYALNSIGPVREGSPDA
104	NIDOmut5_S65I SPQRVNGKVKGRIFFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVE QDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFQGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPEGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDA
105	NIDOmut5_R114I SPQRVNGKVKGRIFFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFQGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPEGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDA
106	T22-NIDOmut3-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGSSRSS SPQRVNGKVKGRIFFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAV EQDGFKNFSGITGGFTTQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEKGNLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTEL YHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQE EKILAYALNSIGPVREGSPDAK

[1106]

	HHHHHH
107	T22-NIDOm3_V45T-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE K G N LTDIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHHHHHH
108	T22-NIDOm3_V121Q-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHG NSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVI KQRFSGIDE K GNLTDIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASP SRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDA KH HH HH HH
109	T22-NIDOm3_F157E-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHG NSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVI KQRFSGIDE K GNLTDIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASP SRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDA KH HH HH HH
110	T22-NIDOm3_V215T-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE K G N LTDIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQEC T HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKH HH HH HH
111	T22-NIDOm4-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVKQRFSGIDE K G N LTDIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQEC T HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKH HH HH HH
112	T22-NIDOm4_T215V-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHG NSYTAISTIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVI KQRFSGIDE K GNLTDIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASP SRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDA KH HH HH HH
113	T22-NIDOm5-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCGGSSRSPQRVNGKVKGRIFGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTF Q GHPGNLVKQRFSGIDE K G N LTDIDTELEGRVPQIP E GSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQEC T HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKH HH HH HH
114	T22-NIDOm3_V176T-H6

[1107]

	RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KG N LTIIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
115	T22-NIDOm3_J200T-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KG N LTIIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV VHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
116	T22-NIDOm3_V236Y-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KG N LTIIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
117	T22-NIDOm3_L237T-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KG N LTIIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
118	T22-NIDOm3_S65I-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI TIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGN LTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
119	T22-NIDOm3_R114I-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KGN LTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH
120	T22-NIDOm3_C214S-H6 RRWCYRKCYKGYCYRKCRCRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRIKRVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDE KG N LTIIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHIIHHHHH

[1108]

121	T22-NIDOm3_S65I_R114I-H6 RRWCYRCKYGYCYRCKRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNYTAIS TIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFVGH PGNLVIKQRFSGIDEKGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHHHHHHH
122	T22-NIDOm5_S65I_R114I-H6 RRWCYRCKYGYCYRCKRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRI FVGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNYTAIS TIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFQGH PGNLVIKQRFSGIDEKGNL TIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHHHHHHH
123	T22-NIDOm5_S65I-H6 RRWCYRCKYGYCYRCKRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRI FVGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNYTAIS TIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFQGH PGNLVIKQRFSGIDEKGNL LTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHHHHHHH
124	T22-NIDOm5_R114I-H6 RRWCYRCKYGYCYRCKRGSSSRSSSPQRVNGKVKGRI FVGSSQTPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFQGH PGNLVIKQRFSGIDEKGNL LTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQESTH DDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALNSIGPVREGSPDAKHHHHHHH
125	도 13A 에 나타낸 인간 니도겐 G2 도메인 HQQHPQVIDVDEVEETGVVFSYNTDSRQTCANNRHQCSVHAECDRYATGFCCSCVAGYTG NGRQCV AEGSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETV GYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFVGH PGNLVIKQRFSGI DEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGAS PSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILRYALNSIGPV REGSPDALQNPCYIGTHGCDTNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQPSV (human sequence in Fig. 13A)
126	도 13A 에 나타낸 마우스 니도겐 G2 도메인 PQHHPQVIDVDEVEETGVVFSYNTGSQQTCAANNRHQCSVHAECDRYATGFCCRCVANYTGNG RQCV AEGSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETVG YSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKN GFSITGGEFTQAEVTFVGH PGNLVIKQRFSGI DEHGHLTIDTELEGRVPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSVITSSSTREYTVMEPDQDGAAPS

[1109]

	HTHIYQWRQTITFQECAHDDARPALPSTQQLSVDSVFVLYNKEERILRYALSNSIGPVRD GSPDALQNPCYIGTHGCDNAACRPGPGTQFTCECSIGFRGDGQTCYDIDECSEQPSR (mouse sequence in Fig. 13A)
127	인간 니도겐 (UniProt P14534) MLASSSRIRAAWTRALLPLLAGPVGCLSRQELFPFGPGQGDLEEDGDDFVSPAELS GALRFYDRSDIDAVVVTNGIATSEPPAKESHPLFPPTFGAVAPFLADLDTTDLGKV YYREDLSPSITQRAAECVHRGFPEISFQPSSAVVVTWESVAPYQGSPSRDPDQKGRNTFQ AVLASSDSSSYAIFLYPEDGLQFHHTFSKKENNQPAVVAFSQGSVGLWKSNGAYNIFA NDRESVENLAKSSNSGQGVWVFEIGSPATTNGVVPADVILGTEDGAEYDDEDEDYDLAT TRLGLELDVGTTPFSYKALRRGGADTYSVPSVLSPRRAATERPLGPPTERTSRFQLAVETF HQQHPQVIDVDEEETGVFSYNTDSRQTCANNRHQCSVHAECRDYATGCCSCVAGYTG NGRQCVAEGSPQRVNGKVGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETV GYSLLPLAPVGIGIWMFAVEQDGFKNFSITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGI DEHGLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGAS PSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDSVFVLYNKEEKILRYALSNSIGPV REGSPDALQNPCYIGTHGCDTNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQPSV CGSHTICNNHPGTRFCECVGYQFSDEGTCAVVDQRPINYCETGLHNCIPQRAQCIYT GGSSYTCSCLPGFSGDGQACQDVEQCPSRCHPDACFNTGPSFTQCCKPGYQGDGFRCV PGEVEKTRCQHEREHILGAAGATDPQRPIPPGLFVPECDAGHYAPTQCHGSTGYCWCVD RDGREVEGTRTRPGMTPPCLSTVAPPIHQGPAPVPTAVIPLPPGTHLLFAQTGKIERLPLE GNTMRKTEAKAFLHVPKVIIGLAFDCVDKMVWVTDITEPSIGRASLHGGEPTTIIRQDL GSPEGIADVHLGRNIFWTDNSLDRIEVAKLDGTQRRVLFETDLVNPRGIVTDSVRGNLYW TDWNRDNPKIETSYMDGTNRRILVQDDLGLPNGLTFDAFSSQLCWVDAGTNRAECINPSQ PSRRKALEGLQYPFAVTSYGKNLYFTDWKMNSVVALDLAISKETDAFQPHKQTRLYGITT ALSQCPQGHNYCSVNNGGCTHLCLATPGSRTCRCPDNTLGVDCEQK (도 13B 의 서열)
128	T22-NIDOm2-H6 (도 13B 의 서열) RRWCYRKCYKGYCYRKCRRGGSSSRSPQRVNGKVGRIFVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAI

[1110]

	STIPETVGYSLLPLAPVGGIIGWMAVEQDGFKNFSITGGEFTRQAEVTFVGHGPNLVIKQRFSGIDEKG NLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGA SP SRIYTYQWRQTITFQECV HDDSRPALPSTQQLSVDSVSVLYNQEEKILAYALSNSIGPVREGSPDAKH HHHHHH
129	EPIX-4-(RK)-GFP-H6 IVRWSKKVPCVSIVRWSKKVPCVSRKRKRGSSRSSSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSV SGEGEGDATYTGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYV QERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVTADKQK NGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLF VTAAGITHGMDELYHHHHHH (Sequence in Fig. 20)
130	GFP SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYTGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSR YPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEY NNSHNVTADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPN EKRDMVLLFVTAAGITHGMDELY
131	RKRKRK 양전하 펩티드 영역에 결합된 최적화된 EPI-X4 IVRWSKKVPCVSIVRWSKKVPCVSRKRKRK
132	EPI-X4 ILVRYTKKVPQVSTPTL
133	RKRKRK 양전하 펩티드 영역에 결합된 EPI-X4 ILVRYTKKVPQVSTPTL RKRKRK

표 6: 서열 개요

본 발명은 단지 예시적이며 본 발명의 범위를 제한하지 않는 것으로 간주되어야 하며 하기 실시예에 의해 설명될 것이다.

실시예

단백질 나노입자의 생산 및 정제

서열번호 61을 가지는 T22-GFP-H6, T22-STM-H6 및 T22-NID0mut2-H6을 코딩하는 플라스미드 벡터, 모듈형 단백질은 대장균(E.coli) 발현 시스템에서 형질전환되었고 다양한 단백질이 초기 지수 성장 단계에서 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도시 Luria Broth(LB) 배지에서 밤새(O/N) 생성되었다. NID0mut2펩티드는 서열번호 61의 펩티드에 해당한다. 그런 다음 세포를 원심분리(5000g에서 5분)로 수확하고, 프로테아제 억제제(Complete EDTA-Free, Roche)가 있는 세척 버퍼(20mM Tris, 500mM NaCl, 10mM 이미다졸 pH=8)에 재현탁하고 프렌치 프레스(1100psi에서 2-3 라운드)에서 파괴되었다. 그런 다음 세포 가용성 분획을 원심분리(15.000g에서 45분)로 분리하고 가용성 단백질을 고정 금속 친화도 크로마토그래피(IMAC)로 정제하였다. 이를 위해, 가용성 분획은 HiTrap 킬레이트 HP 컬럼(GE Healthcare)을 포함하는 고정화된 니켈과 AKTA 순수 시스템(GE Healthcare)에서 용출 버퍼(20mM Tris, 500mM NaCl, 500mM 이미다졸 pH=8)의 선형 구배에 의해 용리된 단백질에 하전되었다. 정제된 단백질은 T22-STM-H6 및 T22-NID0mut2-H6에 대한 탄산나트륨 버퍼(166mM NaCO₃H pH=8) 또는 T22-GFP-H6에 대한 염을 가진 탄산나트륨 버퍼(166mM NaCO₃H, 333mM NaCl, pH=8)에 대해 최종적으로 투석되었다.

단백질 순도는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 및 모노클로날 항-His 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 사용한 웨스턴 블롯 면역염색에 의해 결정되었다. 단백질 무결성은 MALDI-TOF 질량 분석법, 브래드포드 분석에 의해 정량화된 단백질 양 및 동적 광산란에 의해 결정된 나노입자 크기에 의해 확인되었다.

나노접합체의 생산

단백질-FdU 나노접합체는 5'-(FdU)5-핵사에틸렌글리콜티올-3'(FdU)의 5개 유닛을 포함하는 올리고머와 단백질 나노입자의 공유 결합에 의해 6-말레이미도핵사노익산 N-하이드로숙신이미드 에스테르(EMCS) 이관능성 링커를 사용하여 단백질 라이신 아민을 통해 생성되었다. 티올 접합된 FdU 올리고머는 먼저 에스테르기를 추가하여 실온(RT)에서 10분 동안 1:1 몰 비율로, EMCS 이관능성 링커의 말레이미드기와 반응하였다. 이어서, FdU 분자를

함유하는 활성 에스테르 그룹을 단백질 나노입자 내의 외부 라이신-아민기와 1:5 몰 비율로 밤새 실온에서 반응시켰다. 마지막으로, 단백질-FdU 나노접합체를 그들의 각각의 저장 버퍼에 대해 투석하여 반응하지 않은 유리 올리고-FdU 분자를 제거하였다. 최종 접합된 제조물은 MALDI-TOF 질량 분석 및 동적 광산란으로 특성화되었으며 접합된 FdU/단백질 물비는 UV-가시광선 분광 광도계에서 260nm(FdU 올리고머가 $44500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 의 몰 흡광 계수로 빛을 흡수하는 과장)에서 UV 흡광도로 계산되었다. 모든 나노접합체는 단백질 유닛당 평균 2-10개의 올리고 FdU 분자를 포함하고 그들의 부모의 평균 나노입자 크기를 유지하였다.

[1121] **T22-NID0mut2-H6 NPs 형광 라벨링**

[1122] T22-NID0mut2-H6 분자는 세포내 추적에 위해 ATTO488 형광 분자로 공유적으로 라벨되었다. 이를 위해 에스테르 접합된 ATTO488 분자(Sigma)를 RT에서 1시간 동안 T22-NID0mut2-H6 분자의 외부 라이신-아민 기와 1:2(단백질:염료 분자)로 반응시켰다. 그런 다음 비접합 유리 ATTO488 분자를 제거하기 위해 라벨된 나노입자를 4°C 0/N에서 저장 버퍼(탄산나트륨 버퍼)에 대해 투석하였다. 라벨된 나노입자는 마지막으로 MALDI-TOF 질량 분석 및 동적 광 산란에 의해 특성화되었다.

[1123] **동적 광산란**

[1124] 모든 단백질 나노입자 및 나노접합체의 부피 크기 분포는 3중으로 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에서 633nm에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 결정되었다. 모든 나노입자 및 나노접합체는 나노미터 범위 내에 있었고 10 - 50 nm 사이의 평균 나노입자 크기를 나타냈다.

[1125] **나노입자 CXCR4 의존성 내재화**

[1126] CXCR4+ 인간 자궁경부 HeLa 세포에서 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자를 사용하여 CXCR4 수용체 특이적 내재화를 연구하였다. 이를 위해 ATCC(CCL-2)에서 획득한 HeLa 세포를 70% 합류에 도달할 때까지 37°C 및 5% CO₂의 습한 분위기에서 10% 우태아혈청(Gibco)이 보충된 MEM 알파 배지(Gibco)의 24웰 플레이트에서 배양하였다. 그런 다음 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자를 다양한 시간 및 농도에서 L-글루타민이 보충된 무혈청 OptiPRO 배지(Gibco)에서 HeLa 세포와 함께 배양했다. 그런 다음 488nm에서 아르곤 이온 레이저(ATTO488 분자 여기용) 및 D 검출기(530/30nm 필터)를 사용하여 세포에 외부적으로 부착된 단백질을 완전히 제거하도록 설계된 "가혹한" 트립신 소화 후 FACS-Canto 유세포 분석기(Becton Dickinson)에서 세포 형광을 분석하였다.

[1127] 경쟁 분석을 위해, 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자를 첨가하기 전에 세포를 CXCR4 특이적 길항제 AMD3100(옥타염산염 수화물-Sigma)과 함께 1시간 동안 사전 배양하였다.

[1128] **공초점 레이저 현미경**

[1129] 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자의 세포내 국소화도 공초점 레이저 현미경으로 HeLa 세포에서 연구되었다. 이를 위해, HeLa 세포는 70% 합류에 도달할 때까지 10% 우태아 혈청이 보충된 MEM 알파 배지에서 MatTek 배양 플레이트(MatTek Corp.)에서 배양되었다. 그런 다음 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자를 다양한 시간 및 농도에서 L-글루타민이 보충된 무혈청 OptiPRO 배지(Gibco)에서 HeLa 세포와 함께 배양하였다. 그런 다음 세포막과 핵을 PBS로 세척하기 전에 CellMask™ DeepRed 및 Hoescht(Molecular Probes)로 각각 10분 동안 염색하였다. 살아있는 세포는 Apo63x/1.4(오일 HC x PL APO 랍다 블루) 대물렌즈와 블루 다이오드(405nm), 아르곤 레이저(488nm) 및 HeNe 레이저(633nm)를 사용하여 Leica TCS-SP5 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Leica Microsystems)에서 최종적으로 기록되었고 세포 핵, 세포막 및 표지된 나노입자를 각각 시각화하였다.

[1130] **MTT**

[1131] 나노접합체(T22-GFP-H6-FdU, T22-STM-H6-FdU, T22-NID0mut2-H6-FdU)를 포함하는 FdU의 시험관 내 세포 독성을 발광 세포 생존능력 분석을 통해 CXCR4+ HeLa 세포에 대해 평가하였다. 이를 위해 HeLa 세포를 10% 소 태아 혈청이 보충된 90ul의 MEM 알파 배지에서 96웰 플레이트에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 10ul의 다른 농도의 FdU 함유 단백질 나노접합체를 첨가하고 추가 48시간 동안 배양한다. 마지막으로, 공급업체의 지시에 따라 CellTiter-Glo 발광 세포 생존능력 분석(Promega)로 세포 생존능력을 측정하였다.

[1132] **CXCR4+ 결장직장암 모델의 생성**

[1133] 모든 생체 내 절차는 Hospital de Sant Pau 동물 윤리 위원회의 승인을 받았으며 유럽 위원회 지침에 따라 수행되었다. 5주령 암컷 NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) 마우스 무게는 18~20g(Charles River, L-

Abresille, 프랑스)이며 무특이 병원체(SPF) 조건에서 유지되었고, 나노접합체의 항종양 효과를 연구하기 위해 CXCR4 과발현(CXCR4+) 피하(SC) 결장직장(CRC) 이종이식 마우스 모델을 생성하는 데 사용되었다. 이를 위해 우리는 기증자 동물에서 종양 라인으로 영속되는 환자 유래 M5 결장직장 종양 조직을 사용했다. 따라서, 이들 동물로부터 얻은 10 mg의 M5 SC CRC 종양 조직을 NSG 마우스의 피하 조직에 이식하였다.

[1134] M5 CXCR4+ SC CRC 모델에서 나노접합체의 항종양 효과

[1135] 일단 종양이 120-200 mm³ 범위 내의 부피에 도달하면, 마우스를 4개의 그룹, 즉 하나의 대조군(K, n=4) 및 3개의 실험: T22-STM-FdU(n=4); T22-NID0mut2-FdU(n=4) 및 T22-GFP-FdU(n=4)으로 할당하였다. 모든 실험군은 5회 투여당 3일마다 20 µg의 투여 요법에 따라 반복 투여 일정으로 반응하는 나노접합체의 정맥내 주사를 받았다. 대조군은 동일한 일정에 따라, 200 µl의 166mM NaHCO₃ pH8.0을 받았다. 항종양 효과는 3일마다 더 긴(D) 및 더 짧은(d) 종양 직경을 캘리퍼스로 등록하여 시간에 따른 종양 부피의 진화를 측정하여 종양 성장의 억제로 평가되었다. 종양 부피는 타원체 공식 부피 = 1/2(D x d²) 을 사용하여 계산되었다. 나노접합체 투여 개시 14일 후, 마우스를 안락사시키고, 세포자멸사 유도 평가를 위해 피하 종양을 채취한 반면, 조직학적 분석을 위해 간 및 신장 조직을 처리하였다. 마우스 체중은 일주일에 2번 실험 기간 동안 등록되었다.

[1136] 종양에서의 세포자멸사 유도 및 정상 조직의 조직학 평가

[1137] 종양, 간 및 신장 조직을 수집하고 인산염 완충 용액에서 4% 포름알데히드로 24시간 동안 고정된 다음 조직학적 분석을 위해 파라핀에 내장하였다. 세포자멸사 유도 분석은 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 위해 처리된 실험 종료 시(마지막 나노접합체 투여 2일 후) 종양의 4 µm 두께 섹션에서 수행되었다. 세포자멸사 유도는 2명의 독립적인 연구자가 평가한 맹검 샘플에서, 10개의 고배율 필드(배율 400배)당 H&E 염색된 종양 조각의 세포 사멸체 수를 계산하여 평가되었다. 조직병리학적 분석을 위해 간과 신장도 채취하였다. 대표적인 사진은 Cell[^]AB 소프트웨어(Olympus Soft Imaging v 3.3, 나가노, 일본)를 사용하여 촬영되었다.

[1138] 고유 형광의 결정

[1139] 형광 스펙트럼은 Cary Eclipse 분광형광계(Agilent Technologies, Mulgrave, Australia)에서 기록되었다. 경로 길이가 10mm인 석영 셀과 온도 조절식 홀더가 사용되었다. 여기 및 방출 슬릿은 5 nm로 설정되었다. 여기 파장(λ_{ex})은 295 nm로 설정하였다. 방출 스펙트럼은 310-450 nm 범위 내에서 획득되었다. 단백질 농도는 탄산염 버퍼(166mM NaCO₃H, pH 8)에서 0.2mg/mL였다. 가열에 대한 형태 안정성을 평가하기 위해 1°C/분 스캔 속도로 각 온도에서 형광 스펙트럼을 얻었고 각 스펙트럼에 대한 스펙트럼 질량 중심(CSM)을 계산하였다. CSM은 형광 스펙트럼 피크의 가중 평균이다. 또한 그것은 단백질 환경에 대한 Trp의 상대적 노출과 관련이 있다. Trp의 CSM에서 최대 적색-시프트는 큰 용매 접근성(Li, T. M.; 외., Biochemistry 1976, 15, 5571-80; Ruan, K and Weber, G, Biochemistry 1989, 28), 5), 2144-53 및 Mohana-Borges, R. 외., Proceedings of the National Academy of Sciences of America 1999, 96(14), 7888-93) 및 단백질 전개와 양립가능하다.

[1140] 스펙트럼 질량 중심(CSM)은 식 1(Lakowicz, J. R.; 외., 1991, Biophys Chem 39(1), 79-84)에 따라 형광 방출 각각에 대해 계산되었으며, 여기서 I_i 는 형광 강도이고, 파장 λ_i 에서 측정한다.

$$\lambda = \frac{\sum \lambda_i I_i}{\sum I_i} \quad (i)$$

[1142] 전개 온도 결정

[1143] 중간점 전개 온도(T_m)는 CSM 대 T° 곡선의 변곡점에 해당하는 온도 값으로 결정되었다. 또한 CSM 값이 증가하기 시작하는 온도로 T_{onset} 을 결정하였다.

[1145] 통계 분석

[1146] Mann-Whitney U 테스트는 그룹 간의 종양 부피 또는 세포 자멸사체 수의 차이를 쌍으로 비교하는 데 사용되었다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주되었다. 모든 통계 분석은 SPSS 버전 11.0 패키지(IBM, NY, USA)를 사용하여 수행되었으며, 값은 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다.

- [1147] 새로운 단백질 클론의 관찰 및 특성화: T22-NID0mut3-H6 및 모든 그의 추가 유도체들 T22-NID0mut3_V45T-H6, T22-NID0mut3_V121Q-H6, T22-NID0mut3_F157E-H6, T22-NID0mut3_V215T-H6, T22-NID0mut4_T215V-H6, T22-NID0mut4-H6, and T22-NID0mut5-H6
- [1148] 새로운 T22-NID0mut3-H6 및 모든 그의 추가 유도체들 T22-NID0mut3_V45T-H6, T22-NID0mut3_V121Q-H6, T22-NID0mut3_F157E-H6, T22-NID0mut3_V215T-H6, T22-NID0mut4_T215V-H6, T22-NID0mut4-H6, and T22-NID0mut5-H6 을 코딩하는 유전자는Genearth(Thermo Fisher)에 의해 제공되었고 pET26b 플라스미드(Novagen)에 서브클로닝되었다. 단백질-코딩 플라스미드를 대장균 BL21 DE3(Novagen) 균주로 형질전환하고 단백질을 0.1mM 이소프로필-β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)로 유도한 후 Luria Broth(LB) 배지에서 20℃에서 밤새(O/N) 생산하였다. 그런 다음 세포를 원심분리(5000g에서 15분)에 의해 수확하고 프로테아제 억제제(cOmplete™ EDTA-Free, Roche)의 존재 하에 세척 버퍼(20mM Tris, 500mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH 8)에 재현탁하였다. 그런 다음 세포를 8000psi에서 3라운드로 EmulsiFlex-C5 시스템(Avestin)에서 파괴하였다. 단백질을 포함하는 세포 용해물의 가용성 분획을 원심분리(15000g에서 45분)로 분리한 다음 AKTA 순수 시스템(GE 헬스케어)에서 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의한 정제를 위해 HisTrap HP 컬럼(GE 헬스케어)에 충전하였다. 용출 버퍼(20mM Tris, 500mM NaCl, 500mM 이미다졸, pH 8)의 선형 구배를 적용하여 단백질 용출을 달성하였다. 그런 다음 정제된 단백질 분획을 탄산나트륨(166mM NaCO₃H, pH 8)에 대해 투석하였다. 단백질 순도는 SDS-PAGE 겔 전기영동 및 항-His 단일클론 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하는 후속 웨스턴 블롯 면역검출에 의해 결정되었다. MALDI-TOF 질량 분석법으로 단백질 무결성도 측정하였다. 최종 단백질 농도는 브래드포드(Bradford)의 분석과 나노드롭(Nanodrop)에 의해 결정되었다.
- [1149] 다른 버퍼에서 안정성 연구를 위해, 정제된 단백질 분획을 선택된 FDA 승인 버퍼와 대조군으로서 탄산염에 대해 투석하였다. 단백질 농도는 탄산염 버퍼에서 처음에 2.0mg/ml로 설정되었고 각각의 새로운 버퍼 0.5ml에 투석되었다. 샘플을 15000g 동안 15분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고 나머지 가용성 단백질 농도를 브래드포드(Bradford)의 분석과 나노드롭(Nanodrop)으로 결정하였다.
- [1150] 단백질 T22-NID0mut3-H6 및 모든 그의 추가 유도체의 형태학적 특성화
- [1151] 단백질 나노입자의 부피 크기 분포는 633nm에서 3중으로 동적 광 산란(DLS)에 의해 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)에서 결정되었다.
- [1152] 단백질 T22-NID0mut3-H6 및 모든 추가 유도체 분석에 대한 실험들에서 사용된 단백질에 대한 올리고-FdU 접합
- [1153] T22-NID0mut3-H6 및 T22-NID0mut2-H6은 이중 관능 링커를 사용하는 2단계 반응에서 노출된 라이신의 아민기를 통해 올리고 5-플루오로-2'-테옥시우리딘(oligoFdU) 분자에 공유 연결되었다. 이를 위해 먼저 TCEP를 첨가하여 oligoFdU 분자의 티올기를 보호하는 S-S 결합을 절단하고 NAP-10 세파텍스 중력 컬럼(GE 헬스케어)을 사용하여 생성물을 불순물을 제거하였다. 그런 다음, 티올-올리고FdU 분자를 실온에서 30분 동안 1:1 몰비로 티올-말레이미드 반응에 의해 6-말레이미도헥산산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 이중관능성 링커(EMCS)에 반응시켰다. 생성된 하이드록시숙신이미드-관능화된 올리고FdU 분자는 R.T.에서 5시간 1:5 몰비로 최종적으로 외부 라이신의 아미노기와 반응하였고, 이후 Zeba™ Spin Desalting Columns(Thermo Scientific)를 사용하여 정제하고 비공유 결합된 oligoFdU 분자를 제거하기 위해 탄산염 버퍼에 대해 투석하였다. 반응 효율은 마지막으로 MALDI-TOF 질량 분광법으로 확인하고, 몰 흡광 계수($E: 43500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 사용하여 UV/가시광선 분광광도계에서 260 nm에서의 FdU 흡광도에 의해 결정된 접합된 올리고FdU 분자를 확인하였다. 흡광도 값은 동일한 농도에서 비접합 단백질의 기준선 260 nm 흡광도를 빼서 수정하였다.
- [1154] 새로운 단백질 T22-NID0mut3-H6 및 모든 그의 추가 유도체의 분석을 위해 수행된 시험관내 세포 생존력 분석:
- [1155] HeLa 세포(ATCC, CCL-2)는 37℃ 에서 가습된 분위기에서 10%의 태아 소 혈청(Gibco)과 5%의 CO₂ 를 포함하는 90 μl의 MEM 알파 배지(Gibco)에서 불투명한 96웰 플레이트에서 배양되었다. 그런 다음, 10μl의 T22-NID0mut3-H6-FdU 및 T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체를 대조군 T22-NID0mut3-H6과 함께 25nM 최종 농도로 첨가하고 추가 48 시간 동안 배양하였다. 세포 생존능력은 Victor 3 발광 플레이트 판독기(Perkin Elmer)에서 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(Promega)에 의해 최종적으로 테스트되었다. 모든 샘플은 삼중으로 분석되었고 데이터는 평균 %의 생존능력(대조군 세포와 관련됨) +/- 표준 오차로 표현되었다.
- [1156] EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및 T22-BFP-H6 단백질의 단백질 설계, 생산 및 정제.
- [1157] 모듈러 단백질을 코딩하는 합성 유전자는 사내에서 설계되었다. 사용된 EPIX-4 서열은 수용체 친화도가 더 높은

최적화된 이량체 버전이었다. EPIX4-(RK)-GFP-H6의 경우, 6개의 양이온성 아미노산 서열(RKKRKK)이 EPIX-4 리간드 뒤에 추가되어 단백질 자가 조립에 유리하다. 또한, EPIX-4와 단백질 스캐폴드 GFP 사이에 유연한 링커(GGSSRSS)가 추가되어 CXCR4 수용체에 결합하는 리간드 접근성을 부여하였다. 유전자 코돈 사용은 플라스미드 pET22b(Novagen)에 삽입된 E. coli에 대해 최적화되었으며 구조물은 Geneart(ThermoFisher)에 의해 제공되었다. 벡터의 재조합 버전은 E. coli BL21(DE3)(F-ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm DE3)(Novagen)에서 형질전환되었다. 암호화된 단백질은 0.1mM IPTG(이소프로필 β-d-1-티오갈락토피라노사이드)를 첨가한 후 20℃에서 밤새(0/N) 500mL 세포 삼각 플라스크의 Luria-Bertani(LB) 배지에서 생산되었다. 세포 배양의 OD550이 약 0.5에 도달하면 박테리아 세포를 수확하고 4℃에서 15분 동안 7000rpm에서 원심분리하였다. 세포 펠렛을 프로테아제 억제제 각테일 킴플리트 EDTA-Free(Roche)의 존재 하에 세척 버퍼(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 40mM 이미다졸 pH=8)에 재현탁시켰다. 1200 PSI에서 프렌치 프레스로 3라운드 동안 박테리아 세포를 파괴하고 원심분리(45분, 15000g, 4℃)하고 가용성 분획을 AKTA 정제기 FPLC(GE Healthcare)에서 HisTrap 킬레이트 HP 컬럼으로 친화성 크로마토그래피로 정제했었다. 샘플을 여과(0.22 μm)하여 컬럼에 주입한 후, 채취하고자 하는 분획을 대략 용출 버퍼(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 500mM imidazol pH 8)으로 용출하였다. 정제된 단백질 분획을 탄산염 완충액(166mM NaCO₃H, pH 8)에 대해 투석하였다. 또한, CXCR4 표적 단백질 T22-GFP-H6 및 T22-BFP-H6은 이전에 기술된 바와 같이 바이파라토픽 나노입자의 형성을 위해 생성 및 정제되었다(U. Unzueta et al., Nanotechnology 2017, 28, 505102). BFP는 수탁 번호 EF064258.1로 GenBank 데이터베이스에 제공된 단백질에 해당한다.

[1158] EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및/또는 T22-BFP-H6 단백질의 단백질 특성화

[1159] 재조합 단백질의 무결성은 질량분석기(MALDI-TOF), TGX(Tris-Glycine eXtended) Stain-Free 아크릴아미드 겔 전기영동(BioRad) 및 항-His 단일클론 항체(1:1000; Santa Cruz, 참조 57598)를 사용한 웨스턴블롯 분석으로 확인하였다. 단백질 농도는 알부민(Roche) 표준 곡선을 사용하여 브래드포드(Biorad) 분석에 의해 결정되었다. 450 nm의 여기 파장을 사용하여 Cary Eclipse 형광 분광 광도계(Agilent Technologies)로 정제된 단백질에서 GFP 형광 방출(510 nm)을 측정하였다. 나노입자의 부피 및 크기 분포는 석영 큐벳을 사용하여 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)를 통해 633 nm에서 동적 광산란(DLS)에 의해 측정되었다.

[1160]

[1161] EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및/또는 T22-BFP-H6 단백질로 생성된 나노입자의 초미세구조 특성화

[1162] 거의 상태(nearly state)에 있는 단백질 나노입자의 크기와 모양을 전계방사주사전자현미경(FESEM) Merlin(Zeiss)으로 평가하였다. 단백질 샘플을 실리콘 웨이퍼 위에 직접 증착하고, 과량의 액체를 와트만 여과지로 닦아내고, 공기 건조하고 FESEM Zeiss Merlin 작동 및 1kV에서 코팅 없이 관찰하고 고해상도 렌즈 내 2차 전자 검출기를 장착하였다. 나노입자의 대표적인 이미지는 고배율 범위(80.000 x ~ 300.000 x)에서 촬영되었다.

[1163] EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및/또는 T22-BFP-H6 단백질을 사용한 세포 배양, 유세포 분석 및 세포 독성 분석

[1164] 실험은 CXCR4+ 자궁경부 및 결장직장 세포주(각각 HeLa 및 SW1417)에서 수행되었다. HeLa 세포는 이글스 미니멀 에센셜 배지(Gibco)에서 배양되었고 SW1417은 돌베코 변형된 이글스 배지(Gibco)에서 배양되었다. 두 세포주에 10% 소태아혈청(Gibco)을 보충하고 37℃ 및 5%(HeLa) 또는 10%(SW1417) CO₂의 가습 분위기에서 배양하였다. 단백질 내재화를 테스트하기 위해, 세포를 24-웰 플레이트(Nunc)(30000개 세포 · 웰⁻¹)에 24시간 동안 접종하였다. 간단히 말해서, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척하였다. 그런 다음 단백질을 1 및 2 μM에서 배양하고 L-글루타민이 보충된 OptiPro 배지에 희석하고 적절한 세포주 조건에서 다른 시간에 배양하였다. 그런 다음, 가혹한 트립신 소화(15분 동안 1 mg ml⁻¹)(Gibco)를 수행하여 세포막의 외부 크기에 결합된 단백질 입자를 제거하였다. 세포내 녹색 형광은 488 nm 여기에서 15 mW 공냉식 아르곤 이온 레이저를 사용하여 FACS-Calibur 시스템(Becton Dickinson)에서 유세포 분석기에 의해 분석되었다. 형광 방출을 D 검출기(530/30 nm 대역 통과 필터)로 측정하고, 정제된 단백질의 특정 형광으로 수동 보정하여, 비교 목적을 위해 내재화된 단백질의 양을 나타내는 데이터를 얻었다. 경쟁 분석을 위해, 특정 CXCR4 길항제 AMD3100(옥타염산염 수화물, Sigma-Aldrich)을 1:10(단백질:AMD3100) 몰비로 나노입자를 첨가하기 1시간 전에 첨가하였다. 모든 실험은 삼중으로 수행되었다.

[1165] 바이파라토픽 나노입자의 생산 및 특성화

- [1166] T22-GFP-H6, T22-BFP-H6 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6 단백질 나노입자(1.5 mg ml^{-1} 에서)를 다른 방법으로 분해하였다. T22-GFP-H6 및 T22-BFP-H6 샘플에서, NaCl(500mM Na⁺ 최종 농도) 및 이미다졸(300mM 최종 농도)을 추가했으며 EPIX4-(RK)-GFP-H6에 0.2% SDS를 모두 추가하고, 그들 모두를 실온에서 2시간 동안 탄산염 버퍼(166mM NaCO₃H, pH 8)에 추가하였다.
- [1167] T22-GFP-H6/EPIX4-(RK)-GFP-H6 및 T22-BFP-H6/EPIX4-(RK)-GFP-H6 바이파라토픽 나노입자는 빌딩 블록을 각각 1:1 몰비로 혼합하여 생성되었으며, 이후 그들을 탄산염 버퍼(166mM NaCO₃H, pH 8)에 대해 투석한다.
- [1168] 우리는 철저한 투석을 수행하였다(RT에서 30분마다 4회 변경, 4°C에서 O/N 변경 1회, 마지막으로 30분마다 4회 변경). T22-BFP-H6/ EPIX4-(RK)-GFP-H6 바이파라토픽 나노입자는 FRET 및 공초점 현미경 실험에 사용되었고 T22-GFP-H6/ EPIX4-(RK)-GFP-H6은 FESEM, 세포 배양 및 생체 내 실험에 사용되었다.
- [1169] EPIX4-(RK)-GFP-H6이 EPIX4-(RK)-GFP-H6 및 T22-BFP-H6 단백질을 동시에 운반하면서 이중 나노입자를 형성할 수 있는지 확인하기 위해 FRET 분석을 수행하였다. 단백질 나노입자의 형광 방출은 387 nm에서 여기 시 Cary Eclipse 형광 분광 광도계(Agilent Technologies)에서 측정되었다. 방출은 400-600 nm에서 수집되었다.
- [1170] **EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및/또는 T22-BFP-H6 단백질의 사용을 포함하는 실험을 위한 공초점 분석**
- [1171] HeLa 세포는 37°C 및 5%에서 24시간 동안 10% 소 태아 혈청(Gibco)이 보충된 Eagle's 미니멈 에센셜 배지(Gibco)의 Mat-Tek 플레이트($25,000$ 개 세포 · 웰⁻¹)에서 성장하였다. 그런 다음, 2 μ M의 단백질 나노입자를 L-글루타민이 보충된 OptiPro 배지에 첨가하고 적절한 세포 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 단백질 노출시 세포 핵은 5 μ g ml⁻¹ Hoechst 33342(Thermo)로 표지되었고 원형질막은 2.5 μ g ml⁻¹ CellMask™ Deep Red(Thermo)로 실온에서 10분 동안 표지되었다.
- [1172] 63x(1.4NA) 유침 대물 렌즈를 사용하여 역 TCS SP5 Leica Spectral 공초점 현미경(Leica)에서 공초점 이미지를 수집하였다. 405 nm 블루 다이오드 레이저(핵산), 아르곤 이온 레이저(나노입자)의 488 nm 라인 및 HeNe 레이저(세포막)의 633 nm 라인을 통해 여기에 도달하였다. 공초점 핀홀은 1 Airy 단위로 설정되었고 Nyquist 샘플링 기준을 충족하기 위해 z-스택 수집 간격이 선택되었다. Imaris X64 v.7.2.1. 소프트웨어(비트플레이인)에서 서프레스(Surpass) 모듈을 사용하여 공초점 이미지를 처리하였다.
- [1173] **EPIX4-(RK)-GFP-H6, T22-GFP-H6 및/또는 T22-BFP-H6 단백질의 사용과 관련된 실험에 대한 통계 분석**
- [1174] 영향을 받는 기관에서 세포 내재화, 경쟁 분석 및 세포자멸 및 유사분열 초점의 수를 Tukey's 테스트로 쌍별 비교하였다. 모든 통계 테스트는 GraphPad Prism version 8.0 을 사용하여 수행되었다. 시험관 내 및 생체 내 실험 모두에서 모든 정량적 값은 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차($x \pm \text{SEM}$)로 표현되었다. 그룹 간의 차이는 $p < 0.05$ 에서 유의미한 것으로 간주되었다.
- [1175] 실시예 1: T22-NID0mut2-H6 단백질 나노입자의 특성화
- [1176] 인간 니도겐(P14543)은 136.4kDa의 기저막으로부터의 구조 단백질이고 콜라겐 IV, 펠레칸 및 라미닌에 높은 친화력으로 자연적으로 결합한다. 이 단백질은 아마도 콜라겐 IV와 라미닌 네트워크를 연결함으로써 발달 동안 세포외 기질 형성의 제어에 중요한 역할을 하는 3개의 구형 도메인으로 구성된다. G2 도메인은 중앙 α -나선이 있는 11-가닥 β -배럴을 포함하고(도 12A, B) *Aequorea victoria*로부터 녹색 형광 단백질과 동일한 접힘을 가진다(도 12C, D).
- [1177] 제1 단계에서는 GFP-유사 인간 단백질 지지체를 생성하기 위해, 마우스 니도겐 G2 결정 구조(1GL4)와 GFP β -배럴(1Q4A)의 중첩을 수행하여 구조가 완벽하게 중첩되는 정확한 G2 도메인 서열을 선택하고, 일치하지 않는 도메인 단편들을 버린다. 마우스 니도겐 서열은 현재 유일하게 이용가능한 분해된 구조이며 인간 니도겐 G2와 서열이 매우 상동한다(도 13A). 이러한 의미에서, 설계된 인간 니도겐 단백질은 두 구조(백본 rmsd = 1.67)의 첫 번째 중첩된 잔기이기 때문에 Ser430에서 시작하기로 결정했으며 매우 유연한 아미노산인 이전 Gly429는 이전 N-말단 리간드의 원치 않는 접힘 패턴을 생성할 수 있었다. 따라서, 설계된 단백질은 인간 니도겐의 Ser430-Ala667 아미노산(2009년 7월 7일자 Uniprot 데이터베이스 버전에서 수탁 번호 P14543)을 포함하고 서열번호 62를 갖는다.
- [1178] 제2 단계에서, 생물학적으로 중성인 단백질 스캐폴드를 생성하기 위해, 우리는 펠레칸과 같은 설명된 천연 리간드와의 니도겐 G2 도메인 상호작용에 관련된 다른 잔기를 선택적으로 돌연변이시키기로 결정하였다. 아미노산

His456, Arg650, R468 및 F639가 돌연변이되었다. 13B에 나타난 바와 같이, 선택된 잔기는 이 모델에 따라 G2 β -배럴과 상호작용할 때 펠레칸에 의해 완전히 묻혀 상호작용 핫스팟에서의 그들의 의미를 확인하였다(도 13B).

[1179] 마지막으로, 초분자 조직의 관점에서, GFP-기반 나노입자 모델에서 단백질-단백질 접촉에 연루된 것으로 제안된 잔기는 상대적인 니도젠 β -배럴 구조에서 매우 유사한(동일한 그룹) 것으로 밝혀졌으며, Nidogen 유래 빌딩 블록 올리고머화 시 상동 상호작용 지점이어야 하며, 니도젠-유래 빌딩 블록 올리고머화 시 상동의 상호작용 지점이 될 수도 있음을 시사한다. 이러한 의미에서, 돌연변이될 후보인 선택된 아미노산은, 제안된 단백질 상호작용 영역(특히 F639)과 약간 중첩되지만 도입된 돌연변이(F639S)는 이 단백질-단백질 접촉 점을 선호한다. 따라서, 미래의 올리고머화 능력에 대한 니도젠 G2 돌연변이의 모든 가능한 효과는 폐기되었다. 이러한 모든 분석을 고려할 때, 다음 돌연변이가 2009년 7월 7일자 Uniprot 데이터베이스 버전(서열번호 72)에서 수탁번호 P14543인 인간 니도젠의 Ser430-Ala667 서열에 통합되었다: H459A, R468N, F639S 및 R650A 및 NID0mut2 로 명명되었으며(도 13B) 서열번호 64로 제시된다.

[1180] 유전 공학은 모듈식 자가-조립 단백질의 합리적인 설계 및 재조합 생산을 가능하게 한다. 이 실시예에서, 1) N-말단 양이온성 CXCR4-특이적 리간드(T22), 2) 구조적으로 안정하고 생물학적으로 중성인 단백질 스캐폴드, 즉 돌연변이된 인간 니도젠-1 G2 도메인(NID0mut2, 서열번호 64), 스테핀 A 삼중 돌연변이 단백질(STM) 또는 녹색 형광 단백질(GFP) 및 3) C-말단 폴리히스티딘이 E.coli에서 재조합 방식으로 설계 및 생산되었다(서열번호 61의 T22-NID0mut2-H6, T22-STM-H6 및 T22-GFP-H6). 생성된 단백질은 IMAC 친화성 크로마토그래피에 의해 성공적으로 정제되었으며, MALDI-TOF 질량 분석 및 웨스턴 블롯 면역검출에 의해 결정된 바와 같이 전장(full-length) 및 순수한 단백질을 얻었다. 이들 모두는 동적 광 산란에 의해 결정된 바와 같이 T22-STM-H6의 경우 25nm, T22-NID0mut2-H6의 경우 12nm 및 T22-GFP-H6의 경우 11nm 범위에서 일정한 크기의 나노 입자로 자가 조립된다(도 2 및 도 3). 30,3kDa의 분자 질량을 나타내는 T22-NID0mut2-H6 단백질은 MALDI-.TOF 질량 분석기에 의해 결정된 세포 내 추적 목적을 위해 ATTO488 형광 염료 분자로 성공적으로 표지되었으며, 여기서 추가 피크(약 600Da의 분자 질량 추가 포함)가 감지되며, 각 피크는 추가 ATTO488 분자의 획득에 해당한다(도 4).

[1181] 실시예 2: 서열번호 61 CXCR4-의존적 내재화를 갖는 T22-NID0mut2-H6.

[1182] 표지된 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자는 유세포분석기에서 측정된 세포내 형광 측정에 의해 결정된 바와 같이 CXCR4 의존적 과정에서 HeLa 세포로 내재화될 수 있다(도 5). HeLa는 CXCR4 수용체를 고도로 과발현하는 종양 세포이다. CXCR4 매개 나노입자 흡수는 CXCR4-특이적 길항제 AMD3100 과 함께 HeLa 세포의 사전 배양이 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 내재화를 효율적으로 방지하는 경쟁 분석에 의해 입증되었다. 공초점 레이저 현미경 이미지는 CXCR4+ HeLa 세포 내 T22-NID0mut2-H6-ATTO488 나노입자의 중단된(punctuated) 세포내 핵주위 축적을 보여준다.

[1183] 실시예 3: T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체의 특성화.

[1184] T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체의 특성화는 추가 올리고-FdU 분자 혼입에 해당하는 30,3kDa 이상의 추가 피크(약 2kDa의 질량 증가)가 검출되는 MALDI-TOF 질량 분석에 의해 수행되었다. 도 6B에서, 최대 3-올리고FdU 분자 통합에 해당하는 피크가 감지될 수 있다. T22-NID0mut2-H6-FU 나노접합체는 동적 광 산란에 의해 결정된 나노미터 나노입자 크기 범위를 유지한다. T22-NID0mut2-H6-FdU는 MTT 세포 생존능력 분석에 의해 결정된 시험관 내 CXCR4+ HeLa 세포에 비해 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 나노접합체와 유사한 세포독성 활성을 나타낸다(도 7). 3가지 상이한 나노접합체의 서로 다른 농도(25nM 및 100nM)가 있는 상태에서 HeLa 세포를 배양하면 나노물 범위(IC50<25nM)에서 IC50을 가지는 매우 효율적인 세포 생존능력 억제제가 나타났으며, 이는 모든 경우에 유리 올리고-FdU의 등물 농도보다 훨씬 더 효율적이었다. (도 7).

[1185] 실시예 4: T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체는 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU보다 CXCR4+ M5 SC CRC 모델에서 더 높은 항종양 효과를 나타낸다.

[1186] CXCR4+ M5 CRC 모델이 3개의 비교된 나노접합체(T22-STM-H6-FdU, T22-NID0mut2-H6-FdU 및 T22-GFP-H6-FdU)의 상대적 효능을 평가하는데 사용되었고, 이는 높은 CXCR4-과발현을 나타내기 때문이다. 이 특징은 CXCR4+ 암 세포를 표적으로 할 수 있고 따라서 CXCR4+ CRC 줄기 세포를 선택적으로 제거할 수 있는 3개의 나노접합체의 효능을 구별하는 것과 매우 관련이 있다.

[1187] 20 μ g q3dx5 투여 요법에서 나노접합체의 반복된 정맥내 투여 후, 세 가지 나노접합체 모두는 비히클-처리된 동물과 비교하여 시간에 따른 종양 부피로 측정했을 때 종양 성장의 상당한 감소를 유도하였다. 종양 크기의 감

소는 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 처리 후보다 T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체 처리 후에 더 두드러졌다. 더욱이, 실험이 끝날 때 종양 부피(mm³)의 감소는 T22-STM-H6-FdU(699.2±144.6, p=0.027))에 대해 등록된 또는 T22-GFP-H6-FdU에 대해 등록된 (661.2±169.2, p=0.050)차이보다 대조군(1285.2±149.4)의 종양 부피와 비교하여 T22-NID0mut2-H6-FdU(456.5±134.9)에 대해 유의하게 더 높았다(p=0.018).(도 8).

[1188] 실시예 5: T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체는 CXCR4+ M5 SC CRC 모델에서 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 보다 세포자멸사의 유도자(inductor)로서 더 높은 효능을 나타낸다.

[1189] H&E 염색된 종양 조직 절편의 10개 고배율 필드에서 세포자멸사 유도의 평가는, 마지막 나노접합체 투여 2일 후 마우스 희생에서, 대조군 비히클 처리군(7.4±0.8)에서 등록된 세포자멸사 수 또는 T22-STM-H6-FdU 처리된(12.0±1.7, p=0.018) 또는 T22-GFP-H6-FdU 처리된(12.3±1.5, p=0.018) 종양에서 계수된 세포자멸사 수와 비교하여 T22-NID0mut2-H6-FdU (22.7±2.9, p<0.001)에 대해 상당히 더 많은 수의 세포자멸사 수를 산출하였다.(도 9 A-B). 대조적으로, T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 처리된 종양과 대조군 종양 사이에서 세포자멸사 유도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

[1190] 요약하면, T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체는 T22-STM-H6-FdU 또는 T22-GFP-H6-FdU 나노접합체보다 훨씬 더 강력한 항종양 효과를 유도한다. 이러한 발견과 다른 2개의 나노접합체보다 치료된 종양에서 유의하게 더 많은 수의 세포자멸사 수치를 유도한다는 사실은 상기 기술된 인간 니도겐 단백질의 돌연변이된 G2 도메인을 포함하는 나노접합체가, 이러한 나노접합체의 개발 및 임상 번역에 사용하기 위해 선택된 단백질이라는 것을 나타낸다. 중요하게는, T22-NID0mut2-H6-FdU 나노접합체에 의해 표시되는 강력한 항종양 활성이 치료 종료시 간 또는 신장의 조직학적 변경의 결여를 포함하여, 정상 기관에서 독성이 없는 상태에서 관찰되며(도 10), 이는 다른 2개의 나노접합체와 비교하여 상당히 높은 치료 지수를 결정한다.

[1191] 실시예 6: 서열번호 62의 니도겐의 단리된 천연 G2 도메인뿐만 아니라 서열번호 64를 갖는 H459A, R468N F639S 및 R650A 돌연변이를 함유하는 NID0mut2 변이체는 열안정성 폴리펩티드이다.

[1192] NidoWTH6 및 STMH6 샘플로부터 중간점 전개 온도(T_m)는 연구된 온도 범위에서 최대 전개 상태에 도달하지 않았기 때문에 결정할 수 없다. 이 거동은 매우 안정적인 단백질인 T22-GFP-H6(Sanchez, JM 외., Biomacromolecules, 2018, 19:3788-3797; doi:10.1021/acs.biomac.8b00924)에 대해서도 설명되었다. 반면에 Nidomut2H6에서 T_m=55°C를 얻었지만 이 경우 두 개의 열 전이가 관찰되었다. 다시 한 번 더 높은 T_m을 얻을 수 없었다(도 11). 대안적으로, 최대 CSM 값이 단백질의 펼쳐진 상태를 나타낸다고 가정하는 T_m 값(표 7, 이텔릭체의 숫자)을 제안한다.

단백질	T _m	T _{onset,1}	T _{onset,2}	공급원
STMH6	≅ 76°C*	70°C		
NidoWTH6	≅ 65°C*	60°C		
Nidomut2H6	55°C	50°C	70°C	
T22-GFP-H6		75°C		Sanchez 외, 2018 (ibid.)
인간 콜라겐 유형 I	40.3°C	38.2°C		Leikina 외, (PNAS, 2002, 31314-1318)
HSA	63°C			Picó, G (Int. J. Biol. Macromol. 1997, 20: 63-7)

[1193]

[1194] 표 7. 단백질 전개 매개변수(*최대 CSM 값이 단백질의 전체 전개 상태를 나타내는 것으로 가정한 T_m 값)

[1195] 분석된 모든 단백질은 열안정성(T_m > 65°C) 및 중간안정성(T_m < 65°C) 단백질⁴로 설명될 수 있다. 이들 모두는 인간 콜라겐 유형 I보다 더 안정적이며(Leikina 외, (PNAS, 2002, 31314-1318) 및 인간 혈청 알부민(HAS)에 필적하는 T_m 값을 가진다.(Pico G (Int. J. Biol. Macromol. 1997, 20: 63-7)

[1196] **실시예 7. 단백질 T22-NID0mut3-H6 및 모든 그의 추가 유도체의 발현 테스트**

[1197] T22-NID0mut5-H6을 제외하고 각각의 신규 돌연변이 단백질 T22-NID0mut3-H6, T22-NID0mut3_V45T-H6, T22-NID0mut3_V121Q-H6, T22-NID0mut3_F157E-H6, T22-NID0mut3_V215T-H6, T22-NID0mut4_T215V-H6, T22-NID0mut4-H6, and T22-NID0mut5-H6의 생존능력 및 품질을 평가하기 위한 첫 번째 접근법으로 발현 테스트를 수행하였고, 이는 직접 생산 및 정제되었다. 모든 배양물은 20mL의 LB 배양 배지에서 성장되었고 O/N 유도 후 3.3-4.5의 OD에 도달하였다. 각 단백질은 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 통해 성공적으로 검출되었다(도 14). 분자량은 예상된 마커 밴드 내에 있었고 포함된 돌연변이 F157E(T22NID0mut3_F157E-H6, T22-NID0mut4_V215T-H6 및 T22-NID0mut4)를 함유하는 단백질이 약간 더 높은 밴드를 나타냈다는 것이 주목되었다. T22-NID0mut3_V121Q-H6 및 T22-NID0mut3_F157E-H6에 대한 연구는 이러한 단백질의 주요 분획이 불용성 형태로 생산되었기 때문에 이 시점에서 중단되었다.

[1198] **실시예 8. T22-NID0mut3-H6 및 이의 모든 추가 유도체의 확장된 단백질 생산**

[1199] 이 테스트 후, 단백질 생산은 2L 삼각 플라스크에서 500mL의 LB 배지로 규모를 조정하고 금속 친화성 크로마토그래피를 통해 정제를 수행하였다. 수율은 표 8에 나와 있다. 단백질은 효율적으로 정제되었으며(>95% 순도) SDS-PAGE/웨스턴 블롯 및 MALDI-TOF를 통해 무결성이 다시 확인되었다(도 15). 모든 단백질은 133mM NaCO₃H 버퍼에서 투석 후 안정하였다.

돌연변이	배양 성장 (OD)	단백질 수율(mg/L)
T22-NID0mut3-H6	4.10-5.32	14-24
T22-NID0mut3_45-H6	3.52	9
T22-NID0mut3_121-H6	4.07	정제되지 않음
T22-NID0mut3_157-H6	4.13	정제되지 않음
T22-NID0mut3_215-H6	4.52	15
T22-NID0mut4_215-H6	3.28	26
T22-NID0mut4-H6	2.60-3.78	12-24
T22-NID0mut5-H6	3.17-3.54	20-28

[1200]

[1201] 표 8. T22-NID0mut2-H6에서 유래된 단백질 돌연변이체의 배양 성장(OD) 및 단백질 수율.

[1202] **실시예 9. 생성된 나노입자의 크기 분포**

[1203] T22-NID0mut3-H6, T22-NID0mut4_T215V-H6 및 T22-NID0mut5-H6은 그들의 최고의 생산 수율(각각 24, 26 및 28 mg/L)로 인해 특성화를 진행하기 위해 선택되었다. 이 지점에서 DLS를 통해 각 후보의 부피-크기 분포를 조사하였다(도 16). 세 후보 모두 ZnCl₂(0.04mM)를 사용하여 나노입자로 조립하기 전과 후에 원래의 T22-NID0mut2-H6 크기와 동일하였다. T22-NID0mut5-H6만이 더 큰 크기의 나노입자를 나타내었지만, 원하는 나노규모(10-100 nm 범위) 내에 잘 들어왔다. 바로 이 조립을 매개하기 위해 Zn이 사용되기 때문에, 새로운 단백질이 Zn-유도된 침전에 저항성이 있는지 여부를 테스트하기 위해 최대 0.16mM까지 증가하는 ZnCl₂ 농도에 대해 침전 분석을 수행하는 것이 적절하다고 판단되었다(도 17A). T22-NID0mut3-H6에서 파생된 모든 새로운 단백질은 초기 가용성 단백질의 최대 66% 손실을 나타내는 대조군 T22-NID0mut2-H6과 달리 Zn과 접촉할 때 가용성을 유지하는 능력을 물려받았다. 또한, 대부분의 이전 Zn 농도에서 수행된 나노입자 크기 평가(도 17B)는 T22-NID0mut3-H6 나노입자가 17 nm의 안정적인 크기에서 가장 낮은 분산으로 조립된 나노입자임을 나타내었다.

[1204] **실시예 10. 버퍼에서의 안정성 연구**

[1205] 생성된 단백질의 안정성은 3개의 FDA 승인 버퍼와 대조군 버퍼로 탄산염에서 연구되었다. 이를 위해 T22-NID0mut2-H6(대조군), T22-NID0mut3-H6 및 T22-NID0mut5-H6을 추가로 평가하여 보다 복잡한 버퍼에서 투석 후

전반적인 안정성과 용해도를 개선할 수 있는지 여부를 연구하였다. 선택된 세 가지 FDA 승인 버퍼의 구성은 표 9에 나와 있다.

코드	조성
A9	폴리소르베이트 80 (0.4 mg/ml), 수크로오스 (80 mg/ml), 시트르산나트륨 2 수화물 (2.7 mg/ml), 무수 시트르산 (0.146 mg/ml), pH 6.5.
B6	수크로오스 (70 mg/ml), 빙초산 (0.12 mg/ml), 아세트산나트륨 3 수화물 (2.45mg/ml), pH 5.3.
D1	폴리소르베이트 80 (0.05 mg/ml), 수크로오스 (50 mg/ml), 인산나트륨 일염기 1-수화물 (0.22 mg/ml), 인산나트륨 이염기성 무수 (0.49 mg/ml), pH 7.2.

표 9. 투석 버퍼 조성

전술한 버퍼로 투석한 후, 중탄산나트륨 대조군을 포함하는 대부분의 조건에서 침전이 명백하였다(표 10). 그러나, T22-NID0mut2-H6 및 T22-NID0mut3-H6은 버퍼 B6에서 높은 가용성을 유지한 반면, 버퍼 A9는 T22-NID0mut5-H6에 가장 적합한 것으로 입증되었다.

샘플	버퍼	% 침전 (브래드퍼드)	% 침전(나노드롭)
T22-NID0mut2-H6	탄산염	17.6	23.9
	A9	12.7	29.0
	B6	없음	없음
	D1	84.1	86.5
T22-NID0mut3-H6	탄산염	17.6	24.5
	A9	10.25	15.4
	B6	5.4	없음
	D1	83.6	84.3
T22-NID0mut5-H6	탄산염	60.4	24.2
	A9	없음	없음
	B6	15.4	26.6
	D1	50.1	62.4

표 10. FDA 승인 버퍼를 평가하는 침전으로 인한 가용성 단백질 손실.

각 단백질의 고유 형광을 사용하여 온도와 관련된 전개 매개변수를 평가하였다. CSM 프로파일(도 18 A-C)은 세 가지 FDA-승인된 버퍼 모두가 일반 탄산염 버퍼(133mM NaCO₃H, pH 8)보다 단백질의 더 나은 안정성에 기여했음을 시사하였다. 이러한 경향은 탄산염 버퍼(C)에 속하는 연속선이 대부분의 온도 지점 전체에서 나머지 버퍼보다 더 높은 CSM 값으로 유지되는 그래프 A-C에서 분명하다. 이러한 경향은 버퍼 A9, B6 및 D1이 단백질을 보다 컴팩트한 상태로 유지한다는 것을 나타낸다. 어떤 버퍼가 실제로 각 단백질에 더 나은 안정성을 제공하는지 평가하기 위해 각 CSM 그래프에서 주요 지표를 추출하고 도 18D에 표시하였다. 이상적인 후보는 세 가지 지수 T_m, Tonset 및 ΔT 모두에서 높은 값을 나타내야 한다. 3개의 단백질 후보를 비교하면 T22-NID0mut3-H6이 가장 높은 값을 보여준다. 첫째는 버퍼 A9이고 둘째는 B6이다. 침전 및 안정성 데이터를 함께 고려하면 이 단백질에 대한 최상의 선택은 버퍼 B6이며 안정성 지수가 양호하고 투석 중 침전이 거의 없음을 나타낸다. 더 나은 안정성 지수를 가진 두 번째 단백질은 T22-NID0mut5-H6으로, 안정성 및 침전 면에서 최상의 프로파일을 가진 버퍼 D1을 제공한다.

[1212] **실시예 11 - 약물 접합체**

[1213] T22-NID0mut3-H6 및 T22-NID0mut2-H6을 유사한 절차 및 동일한 물비를 사용하여 올리고FdU에 접합시켰다. 깨끗한 접합 샘플의 올리고FdU 및 단백질 정량화는 T22-NID0mut3-H6 및 T22-NID0mut2-H6에 대해 각각 1.79 및 0.96 FdU/단백질의 페이로드를 나타낸다. 페이로드 추정 및 접합 효율은 MALDI-TOF를 통해 확인되었다(도 19A-B). 두 나노접합체는 시험관 내에서 유사한 세포독성 효율을 가졌다(25nM 농도의 나노접합체 약물에서, CXCR4+ HeLa 세포주). 놀랍게도, 비접합 단백질 T22-NID0mut3-H6의 동일한 단백질 농도는 어떠한 세포독성도 일으키지 않았다(도 19C). T22-NID0mut3-H6-FdU 나노입자로의 조립은 2mM $ZnCl_2$ 가 포함된 탄산염 버퍼에서 달성되며; 나노입자 크기는 비접합된 버전의 단백질에서 볼 수 있는 바와 같이 17 nm에서 유지된다(도 19D).

[1214]

[1215] **실시예 12. 나노입자 EPIX4-RK-GFP-H6**

[1216] 인간 리간드 EPI-X4의 능력은 단백질-기반 자가-조립 나노입자에서 종양-유도(tumour-homing) 펩티드로 테스트되었으며, T22와 함께 CXCR4를 과발현하는 종양 세포를 표적으로 하고 내재화하기 위해 바이파라토픽 나노입자를 형성할 수 있는 가능성이 테스트되었다. 이 목적을 해결하기 위해, 우리는 암 치료에 적합한 크기의 자가 조립 단백질 비히클을 생성하는 것을 목표로, EPI-X4 펩티드 서열(도 20A)을 표시하는 합리적인 단백질 설계를 수행하였다.

[1217] 수용체 친화도와 혈청 안정성이 더 높은 최적화된 EPI-X4 랜덤 버전은 H6-태그된 GFP의 N-말단에 배치되었다. 아미노 말단의 양이온성 펩티드와 폴리히스티딘(H6) 카복시 말단의 조합은 2가 양이온 배위를 통해 크기가 약 10-80 nm인 나노입자에서 제어된 단백질 조립을 선호한다: 향상된 투과성 및 유지(EPR) 효과와 세포 흡수를 개선하기 위한, 뿐만 아니라 신장 여과(약 6-8 nm의 신장 차단)를 최소화하기 위한 이상적인 크기. 상기 EPI-X4 폴리펩티드 서열은 오직 25% 양이온성 잔기를 갖는다. 따라서 추가 양이온성 아미노산(RKRKRK)[21]이 EPI-X4에 통합되어 EPI-X4의 대체 표현에서 50%에 도달하였다(도 20A).

[1218] 두 가지 버전의 단백질(즉, EPIX4-GFP-H6 및 EPIX4-(RK)-GFP-H6)이 대장균에서 효율적으로 생산되었고 예상되는 분자량을 갖는 순수한 전장 폴리펩티드로 정제되었다(도 20B). 부모 버전(EPIX4-GFP-H6)이 다양한 크기(4.8-8 nm의 단량체 또는 이량체 형태에서 10 및 50 nm의 나노입자에 이르기까지)의 나노입자 실체 형태로 불안정한 올리고머화에 도달한 반면, 추가 양이온 서열을 운반하는 단백질 버전은 서열(EPIX4-(RK)-GFP-H6)은 약 40 nm($PDI=0.343$)의 규칙적인 나노입자로서 자발적으로 자가 조립된다(도 20C 및 D). 이에 동의하고 이러한 결과를 완전히 뒷받침하는 FESEM 검사는 미세구조 형태측정법(도 20E)이 있는 토로이드(고리 모양) 재료를 보여주었으며, 이는 동적 광산란(DLS) 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 얻은 측정값을 확인시켜준다.

[1219] 배양된 CXCR4+ HeLa 세포에 노출되었을 때, EPIX4-(RK)-GFP-H6만이 표적 세포에 효율적으로 침투하고 특정 수용체 진입에 의해 세포 내 축적되었으며, 이는 화학적 CXCR4 길항제 AMD3100에 의한 억제를 통해 확인되었다(도 20F). 또한, 공초점 이미지는 이러한 데이터를 완전히 뒷받침하여, 세포막에 단백질이 부착되지 않은 EPIX4-(RK)-GFP-H6의 세포내 위치를 보여준다(도 20G). EPIX-4 리간드는 이전에 CXCR4 두 번째 세포의 루프와의 상호작용에 의해 수용체 내재화 길항제로 기술되었다. EPIX-4 이후에 양이온 서열을 합리적으로 추가하면 단백질 자가 조립을 촉진하고, 천연 리간드(CXCL12)의 작용 메커니즘을 모방할 수도 있다. 아르기닌 잔기 세트와 CXCR4 N-말단 사이의 상호작용은 수용체에 대한 신속한 결합 및 효율적인 고정을 촉진하여 세포 내재화를 촉진한다.

[1220] **실시예 13. 바이파라토픽 나노입자들**

[1221] 동일한 구조물에서 서로 다른 세포-리간드의 조합은 암 치료에서 매력적인 접근 방식이며, 이는 세포 특이성을 극적으로 증가시키고 약물 내성의 발달을 피할 수 있다. EPIX4-(RK)-GFP-H6 단백질 나노입자는 순한 세제를 사용하여 8.7 nm의 빌딩 블록으로 분해될 수 있고 투석에 의해 부모 나노입자의 동일한 크기의 물질로 재조립될 수 있다(도 21B). 또한, 바이파라토픽 나노입자는 EPIX4-(RK)-GFP-H6의 분해된 실체를 CXCR4-표적화된 단백질인 T22-BFP-H6과 혼합함으로써 성공적으로 생성되었다(도 21A). 생성된 바이파라토픽 나노입자는 원래의 EPIX4-(RK)-GFP-H6(도 1E) 또는 T22-BFP-H6 (U. Unzueta 외., Nanotechnology 2017, 28, 505102)로부터 형태학적으로 구별할 수 없는(도 21C) 약 18 nm(도 21B)의 단분산 집단 ($PDI=0.179$)을 나타냈다. 또한, 387nm에서 여기시 바이파라토픽 나노입자에 대한 상이한 단백질 단량체의 형광 방출 스캔을 비교함으로써 결정된 바와 같이, 동일한 개체에 두 단백질의 존재가 Forster 공명 에너지 전달(FRET)(청색에서 녹색 형광으로)에 의해 입증되었다. 이 마지막 경우에, BFP가 387 nm에서 여기되면 BFP의 형광 방출 에너지는 510 nm에서 GFP 형광 방출만을 관찰하는

GFP 발색단으로 전달된다(도 21D).

[1222] 바이파라토픽 나노입자의 생물학적 특성을 평가하기 위해, CXCR4+ 세포주(자궁경부암 HeLa 및 인간 결장직장 SW1417 세포주)가 생성된 나노입자에 서로 다른 시간에 노출되었다. 바이파라토픽 나노입자는 수용체 특이성(도 21F)을 잃지 않으면서 세포 표적화 특성(도 21E)을 유지한다. 세포 흡수와 관련하여, T22-GFP-H6은 짧은 시간에 높은 흡수를 갖는 반면, EPIX4-(RK)-GFP-H6은 더 긴 시간; 바이파라토픽 나노입자는 둘 다의 흡수 거동을 결합하여, 짧은 시간에 세포 흡수가 훨씬 더 우수하다(도 21E). 공초점 현미경은 세포 내재화를 확인하고 녹색 및 청색 단백질 공동-국소화는 바이파라토픽 나노입자 형성의 발생을 지원한다.

[1223] 이 단계에서 표적 나노입자의 잠재력을 자세히 평가하기 위해 환자-유래 M5 결장직장암의 CXCR4+마우스 모델에서 생체 내 생체 분포 분석을 수행하였다. 전신 투여 시, 마우스에 200 μ g의 단일 용량을 상이한 시간(0.5 h, 2, 5 및 24시간)에 처리하였다. 바이파라토픽 나노입자는 시험관내 분석에 의해 예측된 바와 같이, 더 짧은 시간(0.5 내지 2시간)에 더 높은 수준의 세포내 물질에 도달하는 EPIX4-(RK)-GFP-H6 나노입자보다 훨씬 더 빠른 종양 축적을 유도하였다(도 21F). 한편, EPIX4-(RK)-GFP-H6은 점진적인 축적을 보여, 5시간에 피크에 달했고 적어도 24시간 동안 비교적 안정하게 유지되었다(도 22A). 정상 조직을 분석할 때, 모든 나노입자 버전에 대해 비-종양 조직에서 형광을 검출할 수 없었으며, 이는 CXCR4-표적화의 정교한 생체내 특이성을 나타낸다. 흥미롭게도, 장기간에 걸쳐 신장에서 형광의 부재는 이러한 이중성 올리고머성 플랫폼이 부모 버전과 같이 생체 내에서 나노입자 안정성을 유지한다는 지표이다. (표 11). 또한, 조직병리학적 분석은 CXCR4- 조직(신장 및 간) 또는 CXCR4+(비장) 모두에서 전신 독성의 결여를 확증한다(도 22D).

	30 분		1 h		2 h		5 h		24 h	
	간	신장	간	신장	간	신장	간	신장	간	신장
대조군	4.59 ± 0.9	3.24 ± 0.1	4.35 ± 0.0	3.62 ± 0.7	4.57 ± 0.2	3.73 ± 0.3	4.78 ± 0.3	4.3 ± 0.4	4.48 ± 1.3	4.48 ± 1.8
EPIX4-(RK)-GFP-H6	7.14 ± 0.6	7.14 ± 0.7	4.93 ± 0.3	4.93 ± 0.4	4.46 ± 0.1	4.46 ± 0.4	4.53 ± 0.2	4.53 ± 2.2	5.36 ± 0.2	5.36 ± 2.2
BIPARATOPIC NPs	7.02 ± 0.5	7.02 ± 0.8	4.73 ± 0.2	4.73 ± 1.1	4.64 ± 0.4	4.64 ± 0.5	3.93 ± 0.3	3.93 ± 1.9	4.38 ± 2.0	4.38 ± 2.2

[1224] 표 11. 전신투여 시 CXCR4 표적 단백질 나노입자의 생체내 분포. 각 나노입자 300 μ g의 분석시간에 투여 후 정상 장기에서 방출되는 형광, 복사효율의 평균 $\pm$ SE로 표시($\times 10^6$;[ps⁻¹ cm⁻² sr⁻¹])/ μ W cm⁻²

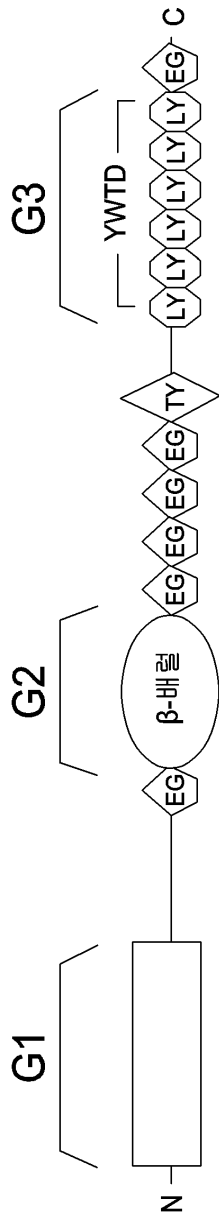
[1226] 또한, 시간이 지남에 따라, 종양 샘플에서 유사분열 세포 수의 감소와 함께, 세포자멸사 사건의 극적인 증가가 관찰되었으며, 둘다 5시간에 유의적이었다(도 22C). 바이파라토픽 나노입자의 빠른 흡수는 다른 물질 버전보다 더 높은 수준의 수용체 내재화를 유발하였다. 이 사실은 24시간에 상당히 더 많은 수의 세포자멸사체를 유도한다(도 22B). 이러한 나노입자를 더 오래 투여하면 지속적인 카스파제-3 활성화(M. V. Cespedes 외., Sci Rep 2016, 6, 35765.)에 의해 세포 사멸이 유발될 수 있으며, 이는 화학요법 접합(M. V. Cespedes, 외., EMBO Mol Med 2018, 10.) 또는 독성 단백질 융합에 의해 향상될 수 있다.(R.Diaz 외., Small 2018, 14, e1800665; L. Sanchez-Garcia 외., J Control Release 2018, 274, 81.).

[1227] 종합하면, 이러한 모든 관찰은 인간 종양 유도 펩티드로서 EPI-X4의 높은 잠재력을 강력하게 뒷받침한다. 적절한 단백질 공학은 생체 내에서 강력한 CXCR4를 표적으로 하는 규칙적이고 안정적인 단백질 나노입자를 생성하였다. 또한, 이 단백질 재료의 가소성은 구조적으로 강력한 바이파라토픽 나노입자 유형에서 또 다른 CXCR4 표적 단백질과 결합할 수 있게 해주며, 짧은 시간에 높은 침투성과 모체 특이성 및 생체 분포 패턴을 유지한다.

[1228] 바이파라토픽 나노입자의 항종양 활성과 관련하여, 결과는 리간드 EPI-X4 및 T22의 다가 디스플레이를 제안하며, 이들은 둘다 CXCR4 길항제이고, 다른 CXCR4 도메인과 상호작용할 가능성이 가장 높으며, 아마도 바이파라토픽 환경에서 더 빠른 내재화 속도와 세포자멸사 유도 강화에 대한 책임이 있을 것이다. 따라서, 치료 후 24시간에 도달한 피크는 400 x 배율 종양 필드당 약 30개의 세포자멸사 수치로, 플록스우리딘(Floxuridine) 또는 박테리아 독소의 촉매 도메인과 같은, 강력한 세포독성제를 통합하는 T22에 기반한 나노입자로 치료 이후 결장직장 종양 모델에서 이전 결과에서 볼 수 있듯이 세포 사멸 유도에 대해 유사한 크기이다.(L. Sanchez-Garcia 외., J Control Release 2018, 274, 81; M. V. Cespedes, 외., J Control Release 2020, 320, 96).

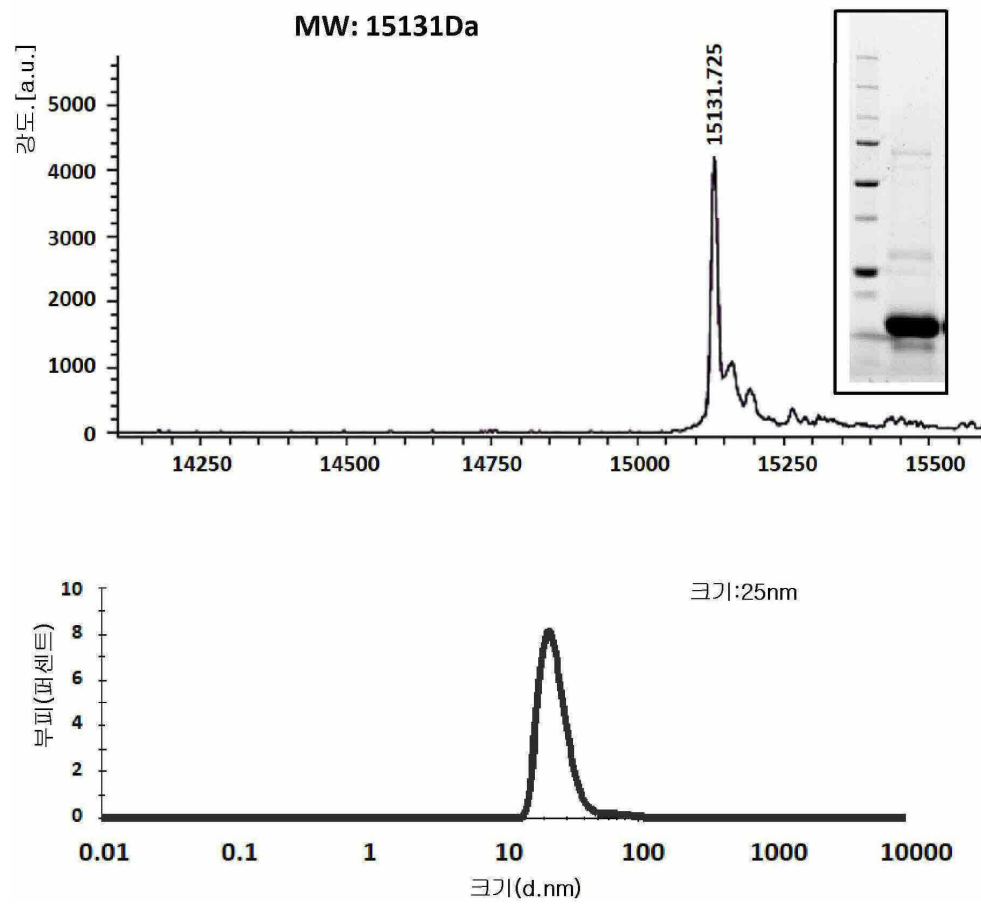
도면

도면1



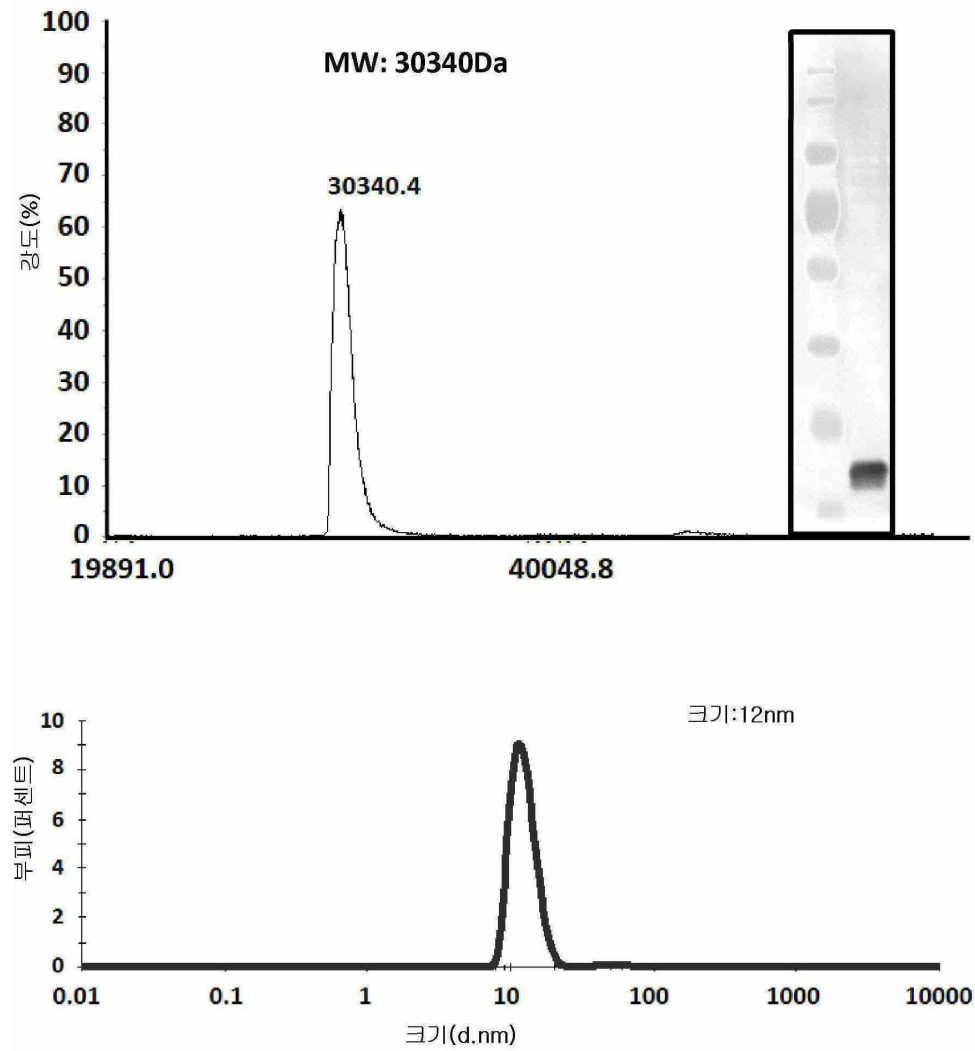
도면2

A



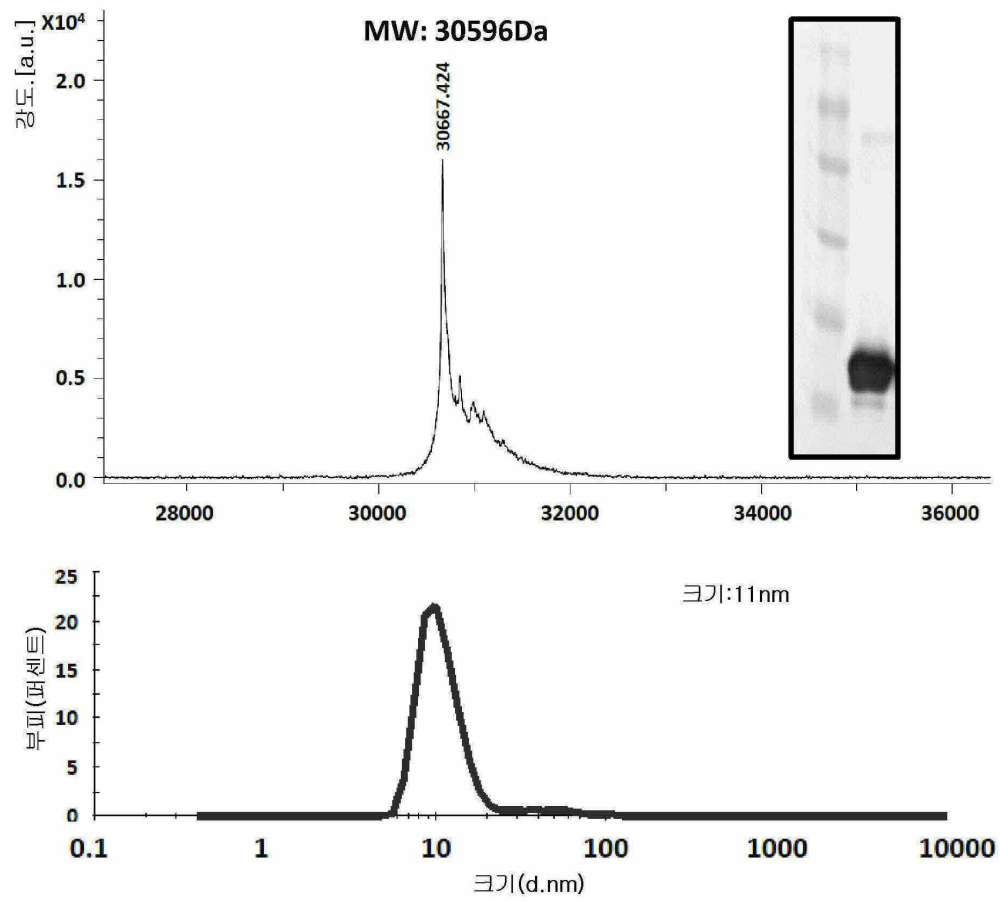
도면2a

B

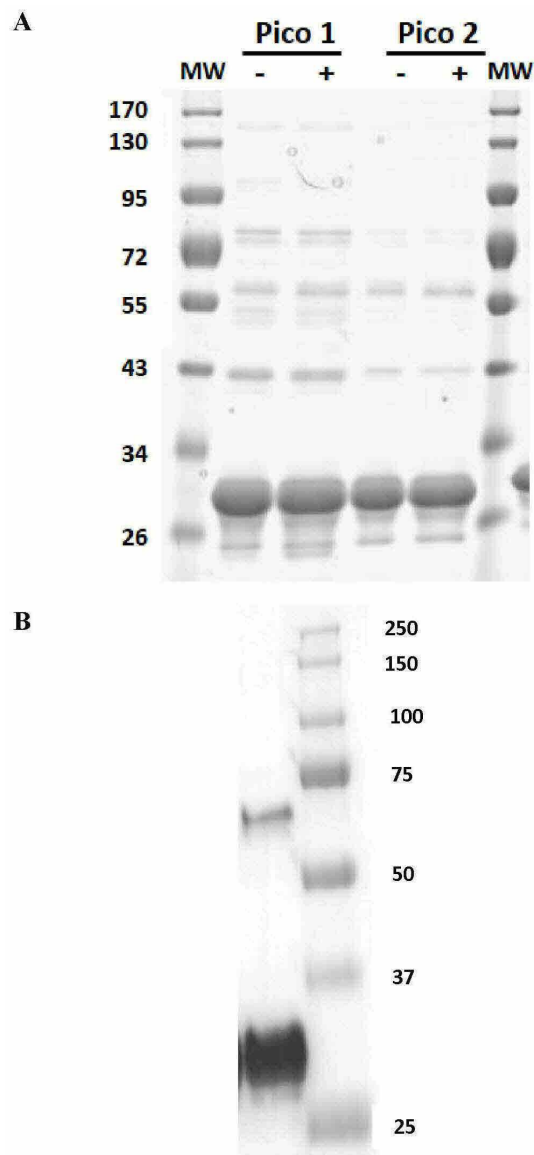


도면2b

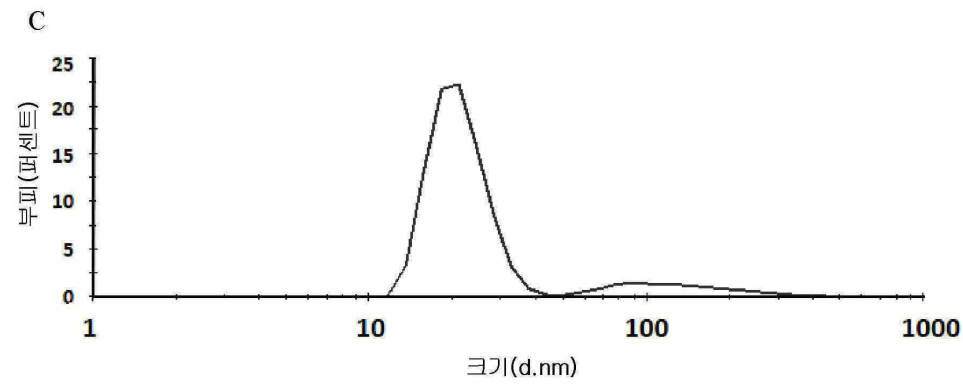
C



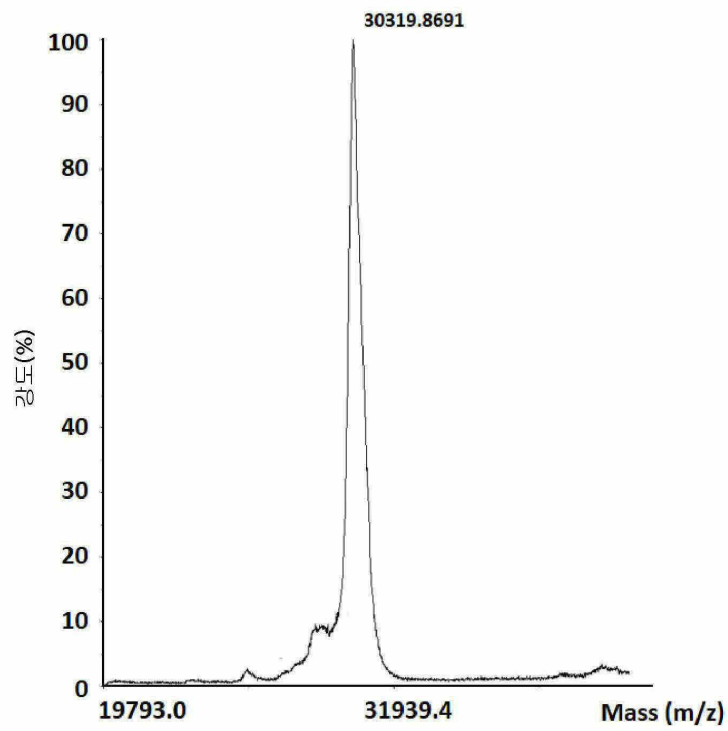
도면3



도면3a

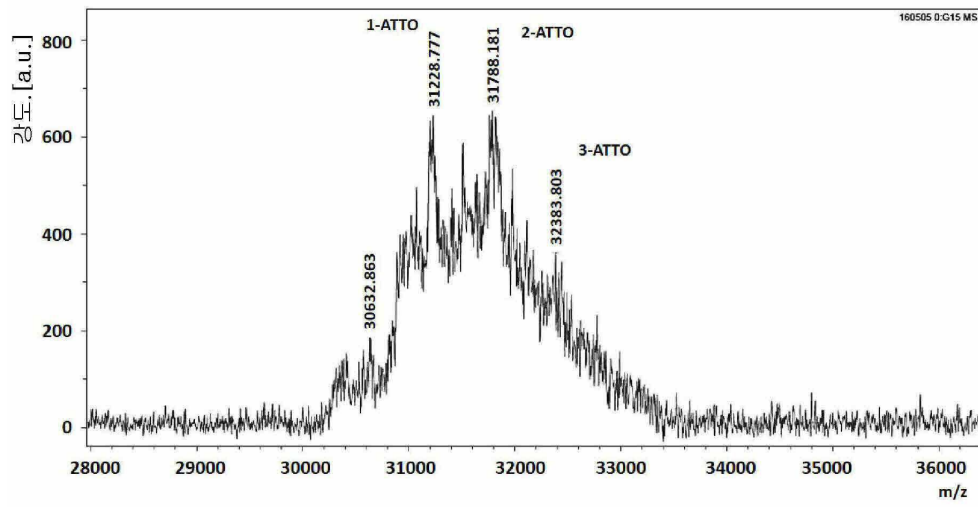


D

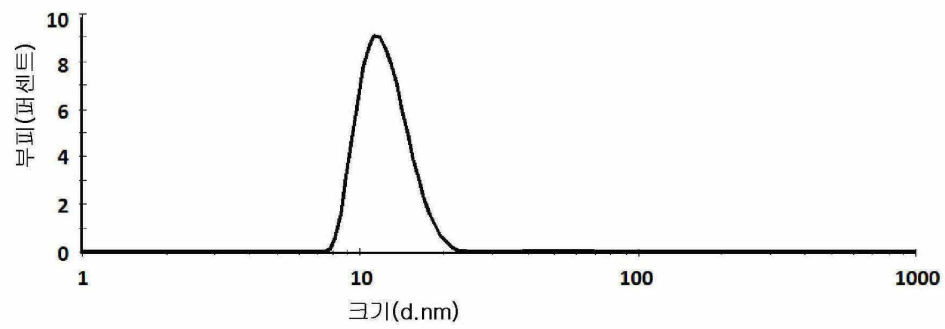


도면4

A

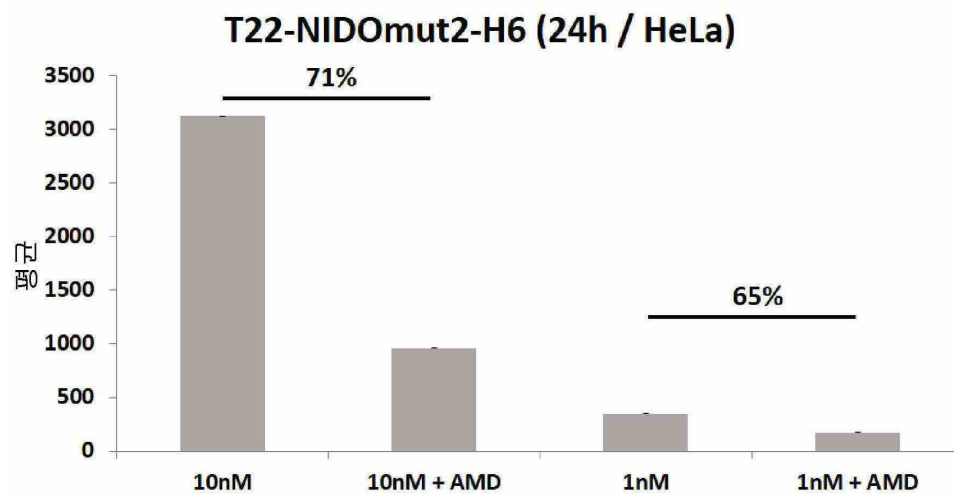


B

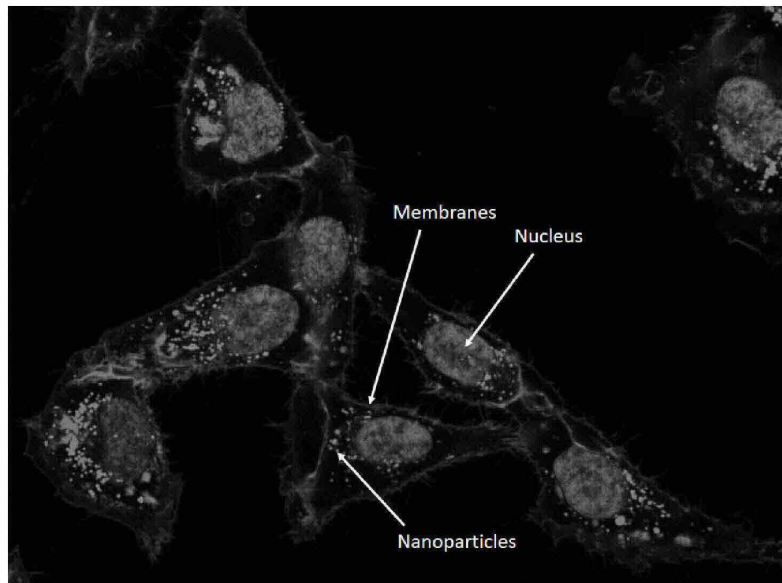


도면5

A

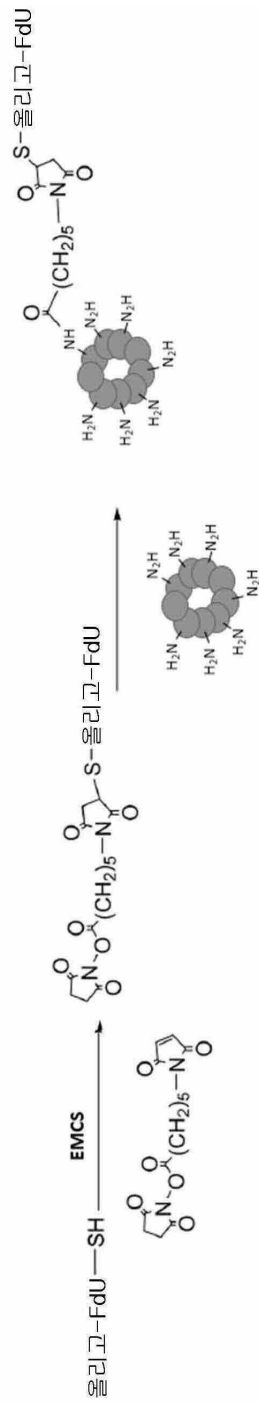


B



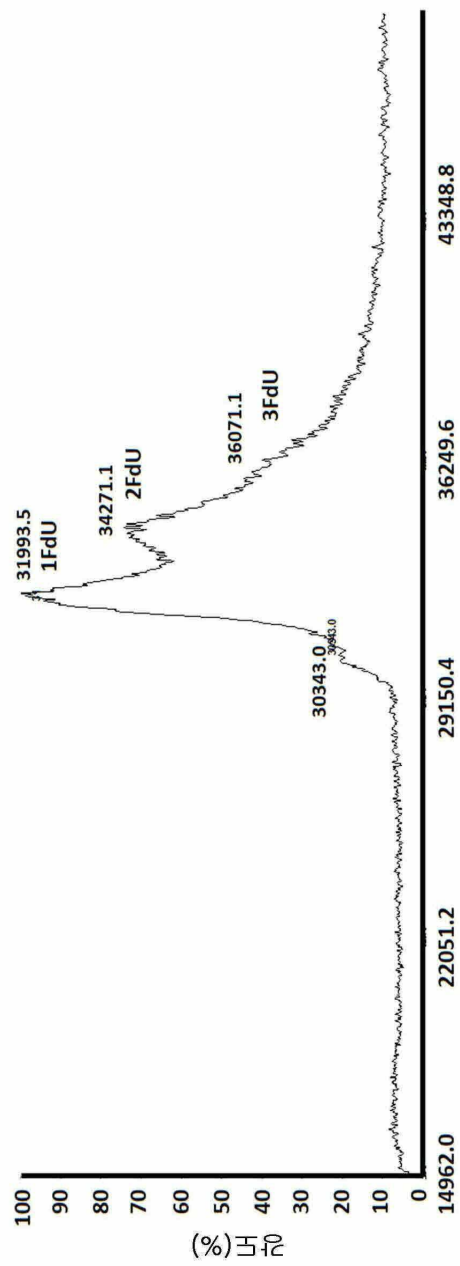
도면6

A



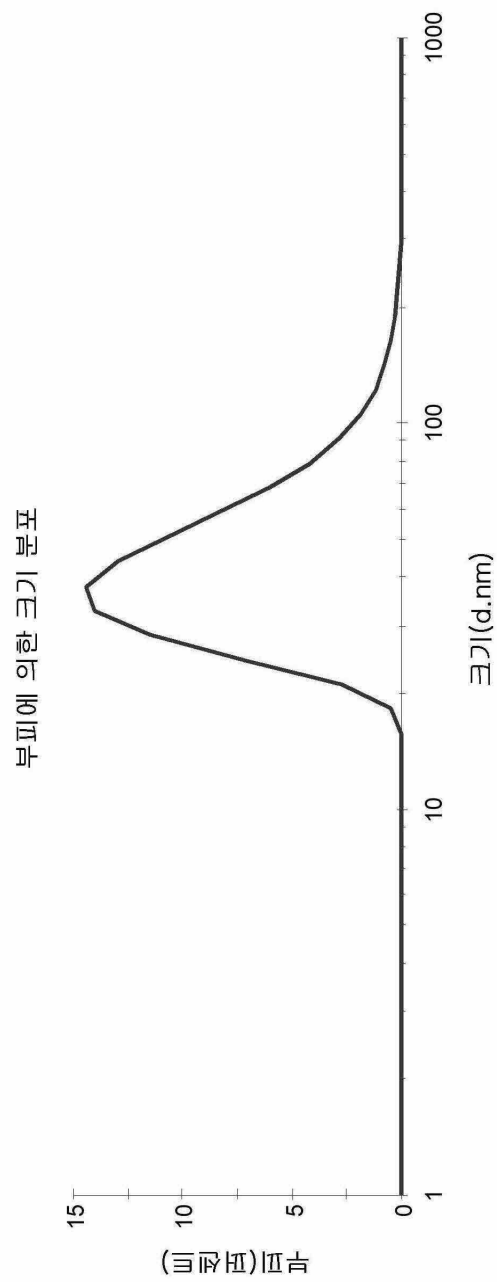
도면6a

B

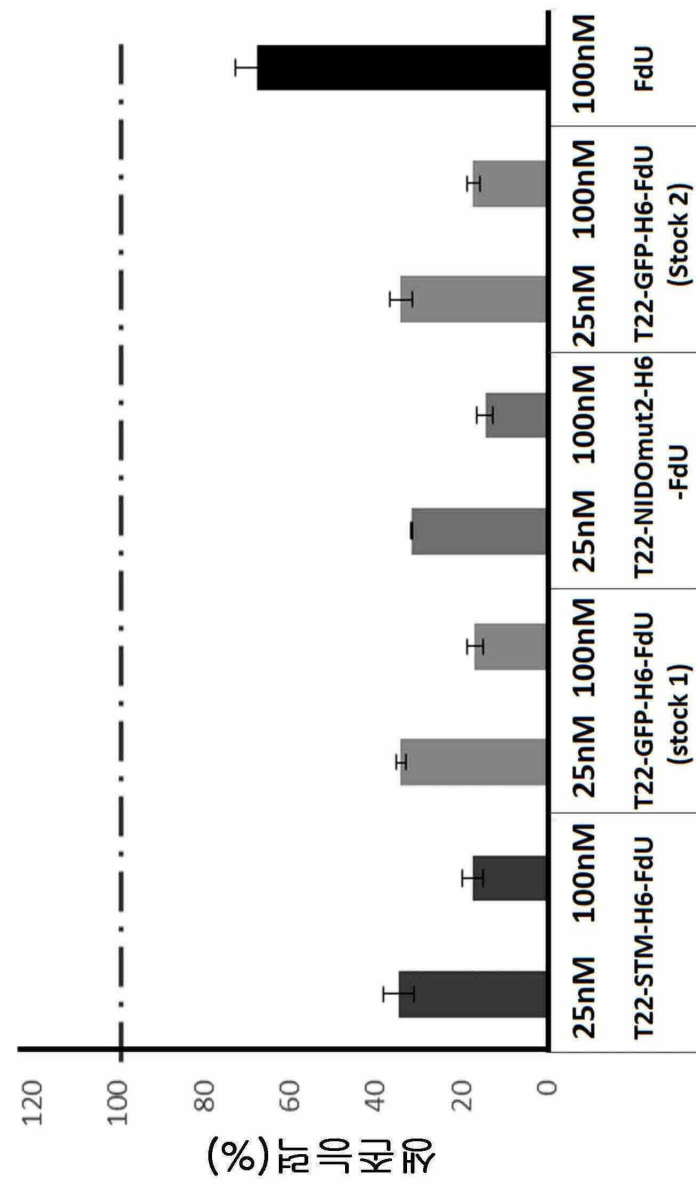


도면6b

c

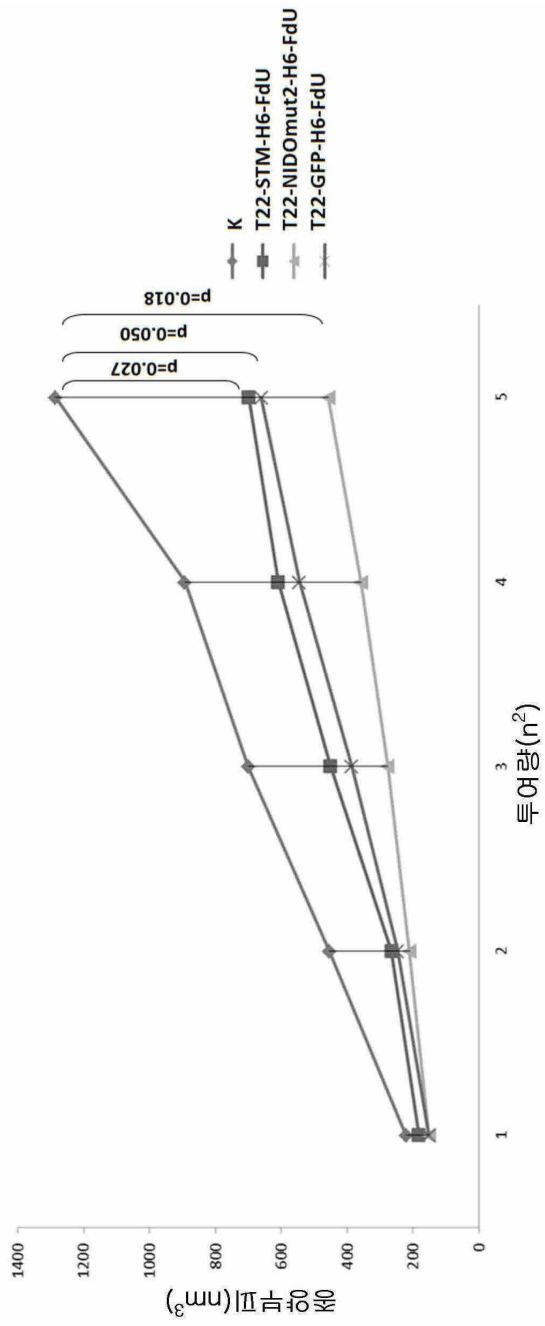


도면7

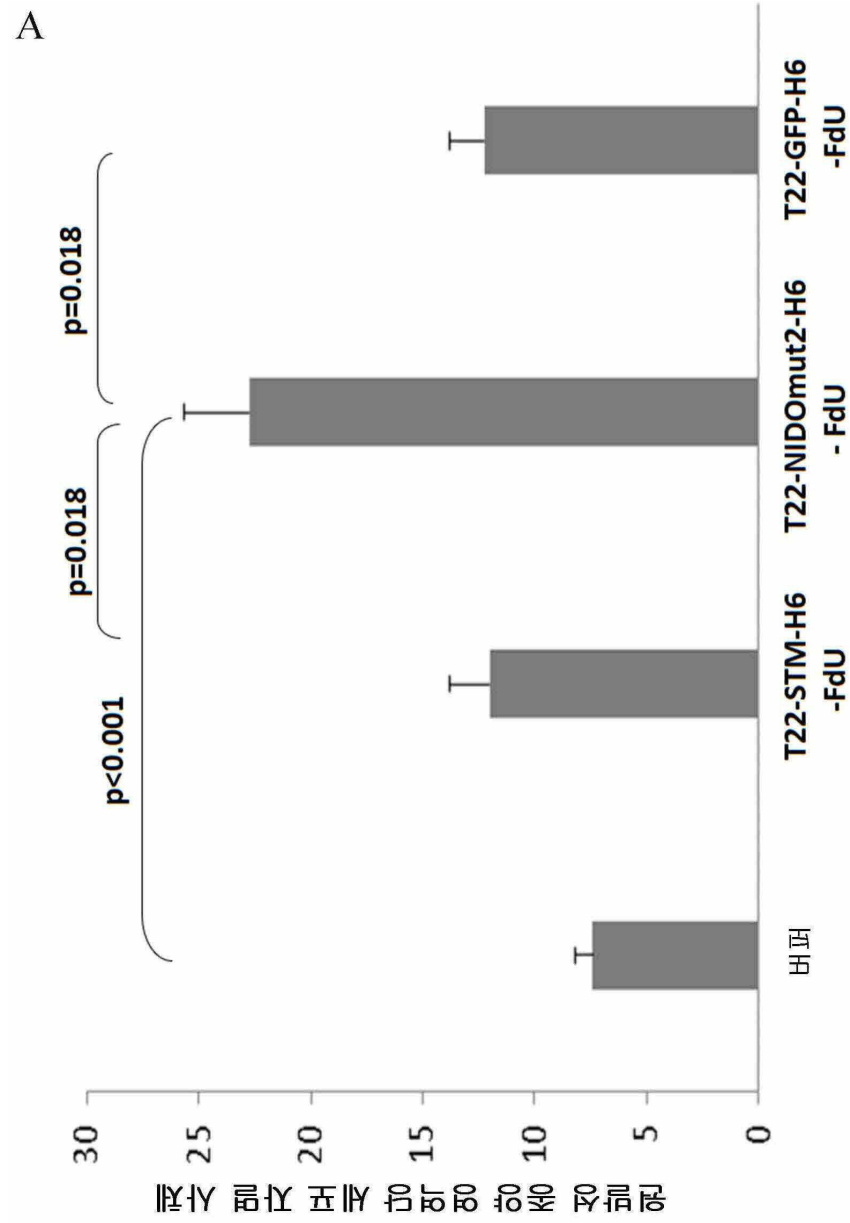


도면8

반복투여 요법에서 SC M5 NSG 모델에서의 항종양 효과
(20 μ g q3d x5 투여량)

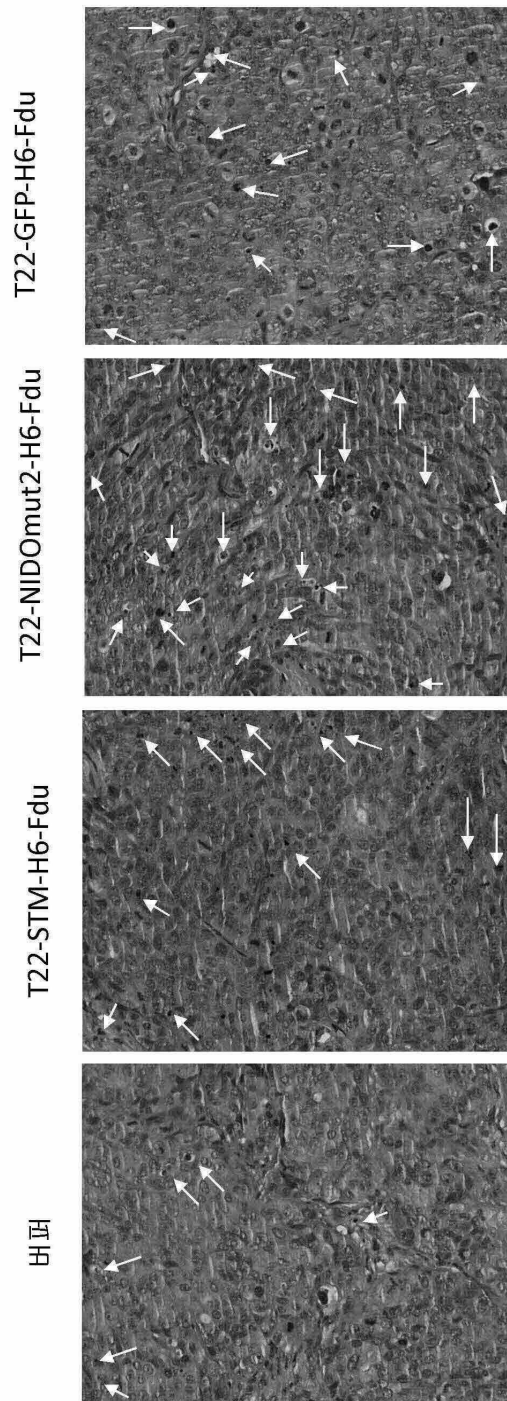


도면9

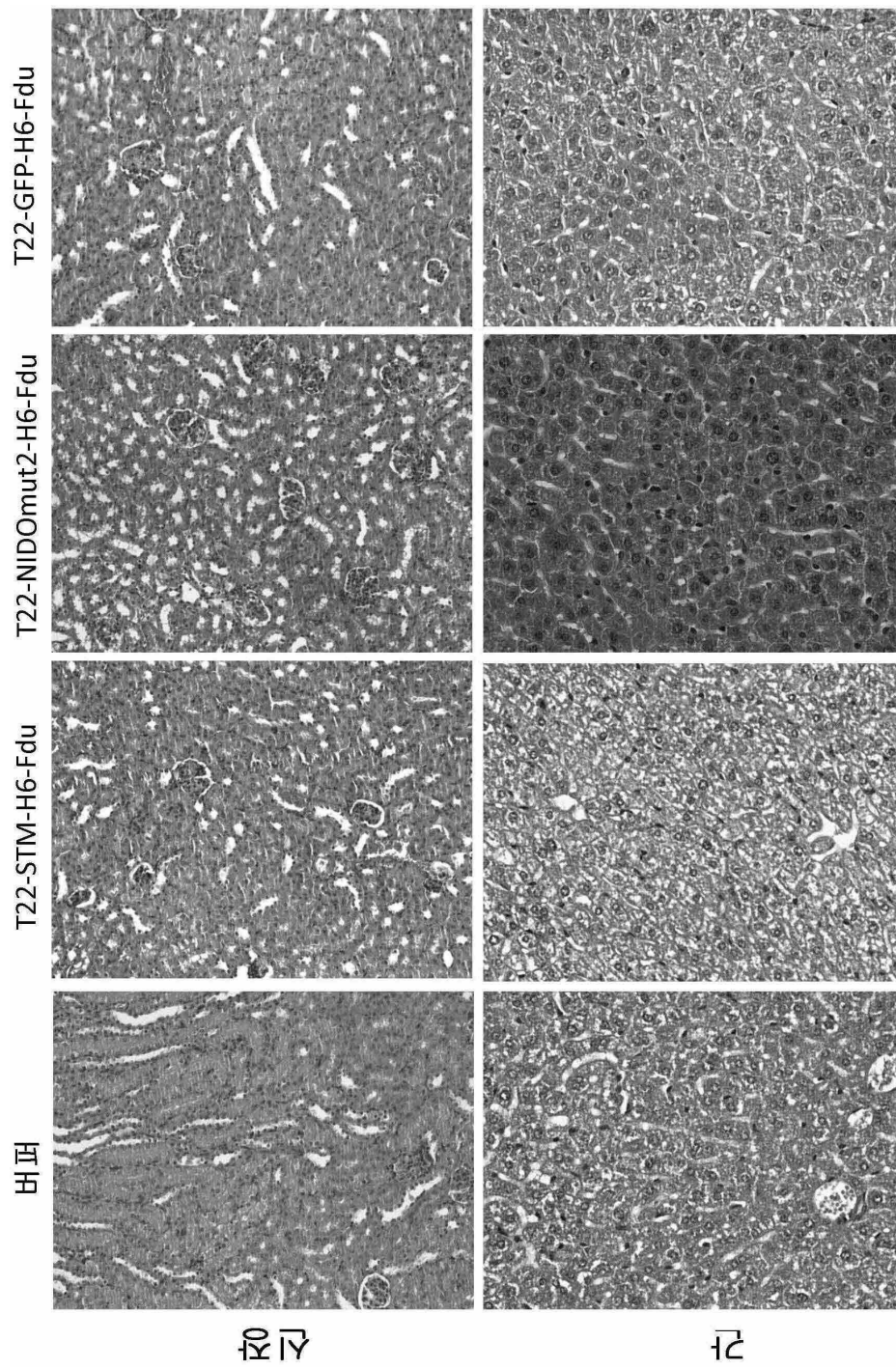


도면9a

B

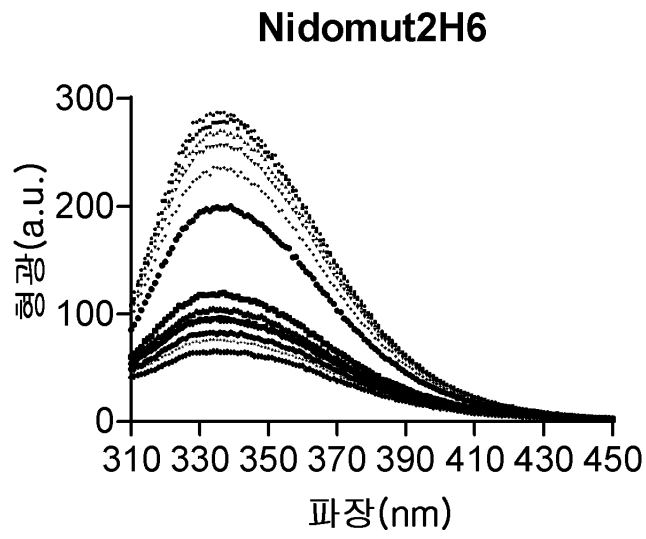


도면10

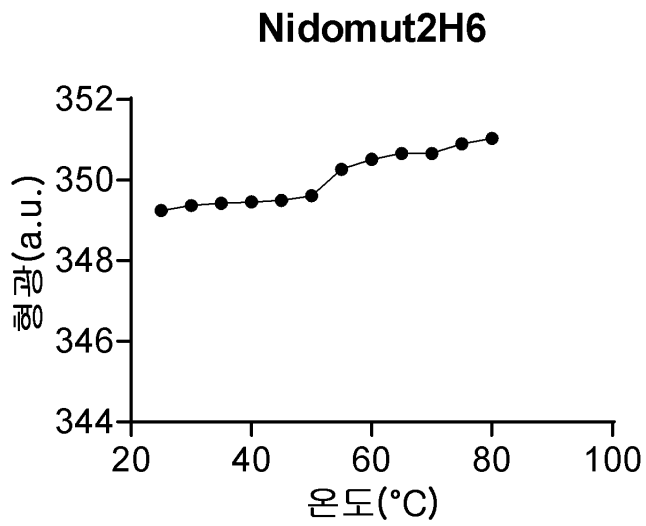


도면11

A

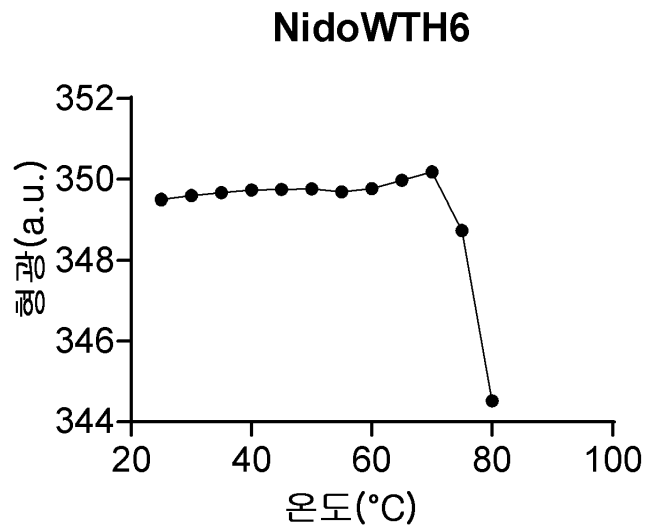


B

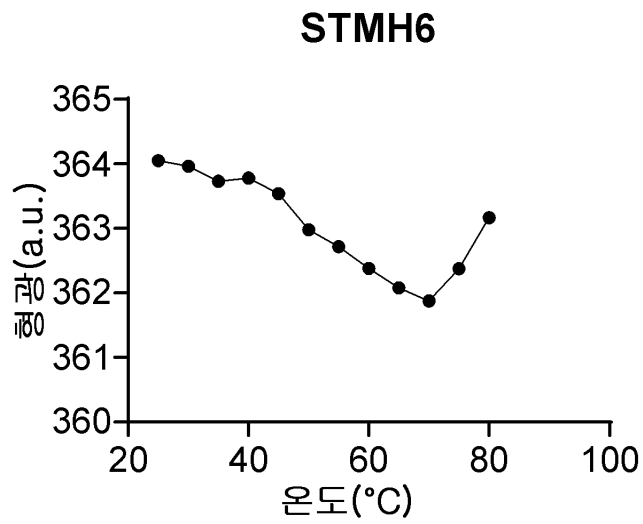


도면11a

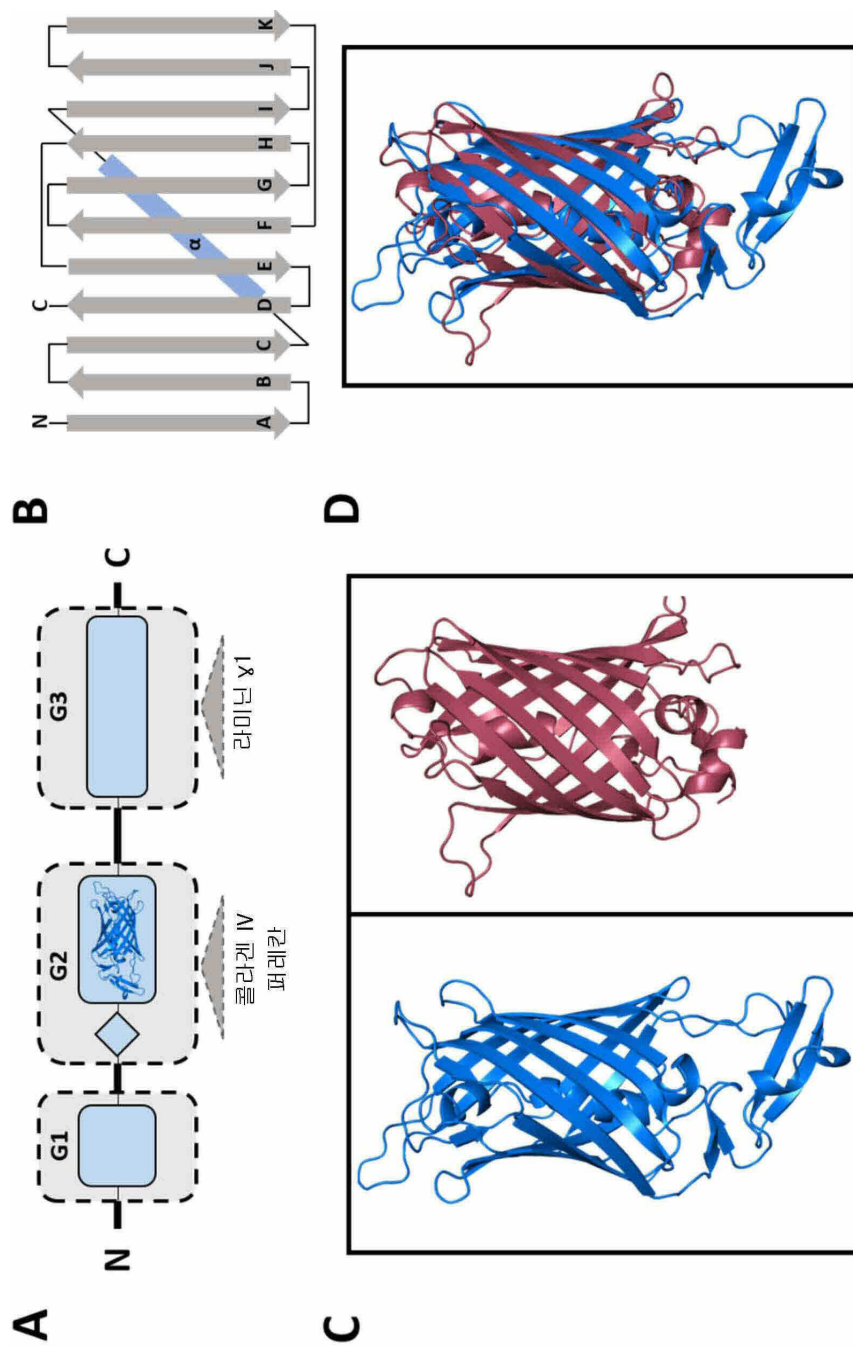
C



D



도면12



도면 13a

sp P14543 NID1_HUMAN	HQQHPQVIDVDEVEETGVVFSYNTDSRQTCANNRHQCSVHAECRDYATGCCSCVAGYTG	420
sp P10493 NID1_MOUSE	PQHHPQVIDVDEVEETGVVFSYNTGSQQTCAANNRHQCSVHAECRDYATGCCCVANYTG	418

sp P14543 NID1_HUMAN	NGRQCVAEGSPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETV	480
sp P10493 NID1_MOUSE	NGRQCVAEGSPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETV	478

sp P14543 NID1_HUMAN	GYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGI	540
sp P10493 NID1_MOUSE	GYSLLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGI	538

sp P14543 NID1_HUMAN	DEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGAS	600
sp P10493 NID1_MOUSE	DEHGHLTISTELEGRVPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSVITSSSTREYTVMEPDQDGA	598

sp P14543 NID1_HUMAN	PSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDVSVFLYNQEEKILRYALSNSIGPV	660
sp P10493 NID1_MOUSE	PSHTIHYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDVSVFLYNKEERILRYALSNSIGPV	658

sp P14543 NID1_HUMAN	REGSPDALQNPICYIGTHGCDTNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQPSV	720
sp P10493 NID1_MOUSE	RDGSPDALQNPICYIGTHGCDNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQPSR	718

도면 13b

인간 니도겐 (P14543):

MLASSSRIRAAWTRALLPLLAGPVGCLSRQELPFPGPGQDLEEDGDDFVSPALELSGALRFYDRSDIDAVVVTNGIATSEPPAKESHPLG
 FPPTFGAVAPFLADLDTTDLGKVVYREDLSPSITQRAAECVHRGFPEISFQPSAVVVTWESVAPYQGSPSRDPDQKGRNTFQAVLASSDSS
 YAIFLYPEDGLQFHTTFSKKENNQVPAVAVFSQSGVGLWKSNGAYNIFANDRESVENLAKSSNSGQQGVWVFEIGSPATTNGVVPADVILG
 TEDGAEYDDEDEDYDLATTRLGLEDVGTTPFSYKALRRGGADTYSVPSVLSPRRAATERPLGPPTERTSRFQLAVETFHQQHPQVIDVDEVEET
 GVVFSYNTDSRQTCANNRHQCSVHAECRDYATGCCSCVAGYTGNGRQCVAEGSPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNH
 GRSYTAISTIPETVGYSLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFG
 SSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDVSVFLYNQEEKILRYALSNSIGPV
 REGSPDALQNPICYIGTHGCDTNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQPSVCGSHTICNNHPGTFRCCEVEGYQFSDEGTCVAV
 VDQRPINICYETGLHNCIPQRAQCITYGSSYTCCLPGFSGDGGACQDVDECQPSRCHPDACYNTPGSFTCQCKPGYQGDGFRCPVGEVE
 KTRCQHEREHILGAAGATDQRPPIPPGLFVPECDAHGHYAPTQCHGSTGYCWCVDVDRDGREVEGTRTRPGMTTPCLSTVAPPIHQGPVAPTA
 VIPLPPGTHLLFAQTGKIERLPLEGNTMRKTEAKAFLHVPKVIIGLAFDCVDMVYWTJDITEPSIGRASLHGGEPTTIIRQDLGSPEGIADVHLG
 RNIFWTDNSLDRIEVAKLDTGTRRVLFETDLVNPRGIVTDSVRGNLYWTDWNRDNPKIETSYMDGTNRRILVQDGLPNGLTFDAFSSQLC
 WVDAGTNRAECLNPSQPSRRKALEGLQYPFAVTSYGKNLYFTDWKMNSVVALDLAISKETDAFQPHKQTRLYGITALSQCQPGHNYCSVN
 NGGCTHLCLATPGSRTCRCPDNTLGVDCIEQK

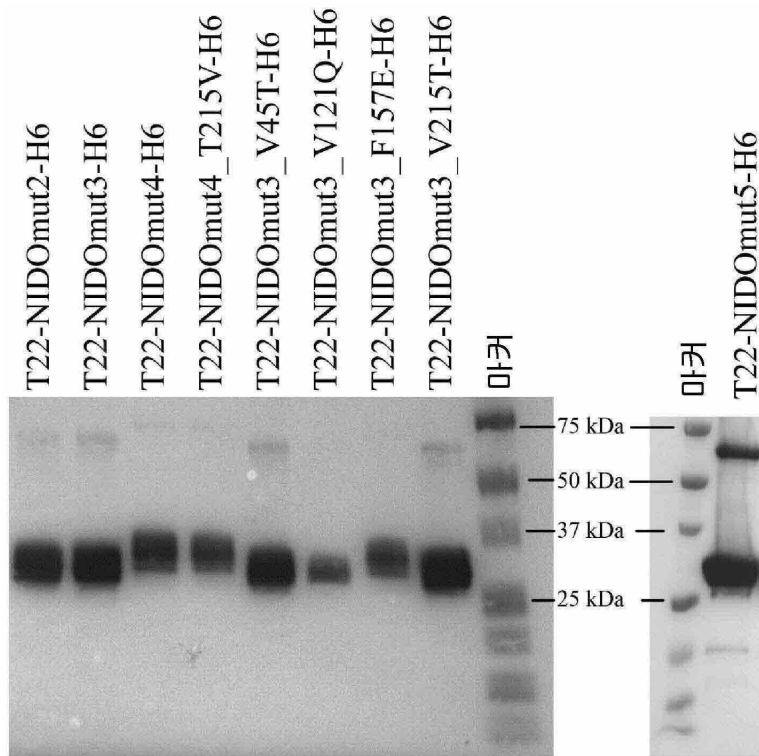
NIDOm22:

SPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLPLAPVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSGITGGFTRQAEV
 FVGHGPNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVH
 DDSRPALPSTQQLSVDVSVFLYNQEEKILAYALSNSIGPVREGSPDA

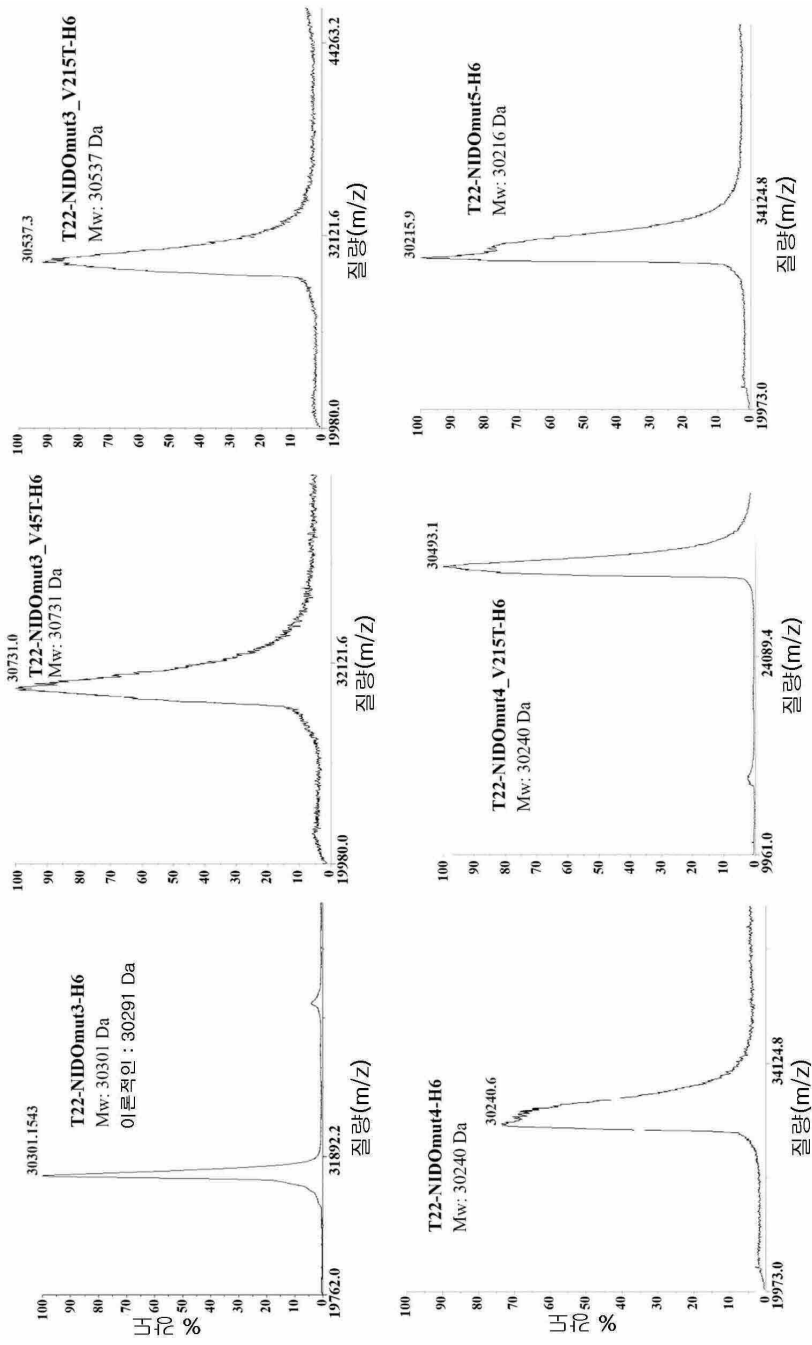
T22-NIDOm22-H6:

RRWCYRKCYKGYCYRKCRGGSSRSSPQRVNGKVKGRIFVGSSQVPIVFENTDLASYVVMNHGNSYTAISTIPETVGYSLPLAPVGGIIGWMF
 AVEQDGFKNFSGITGGFTRQAEVTFVGHGPNLVKQRFSGIDEHGHLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSVITSSSTREYTVTEPE
 RDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPALPSTQQLSVDVSVFLYNQEEKILAYALSNSIGPVREGSPDAKHHHHHH

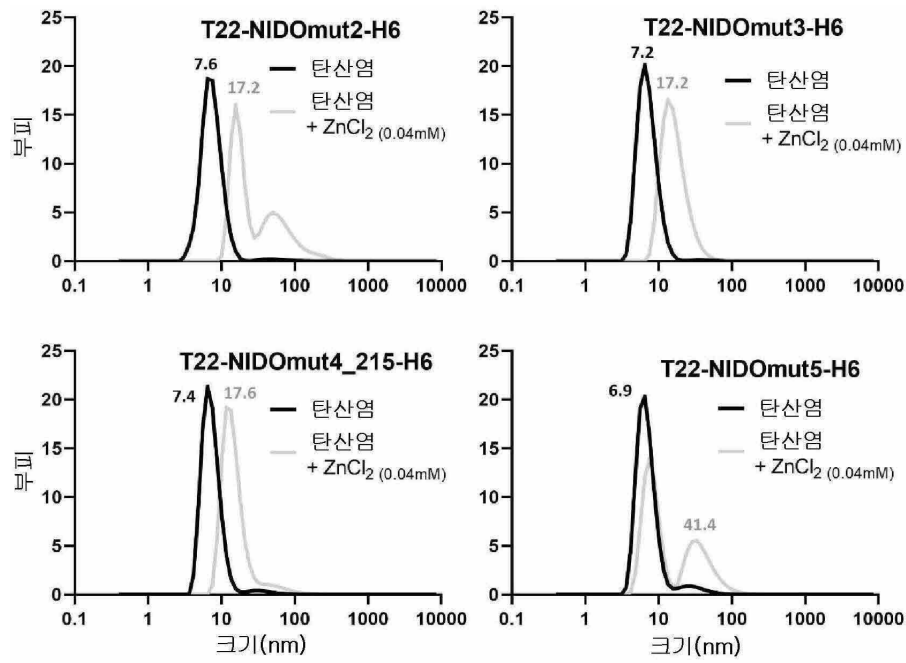
도면14



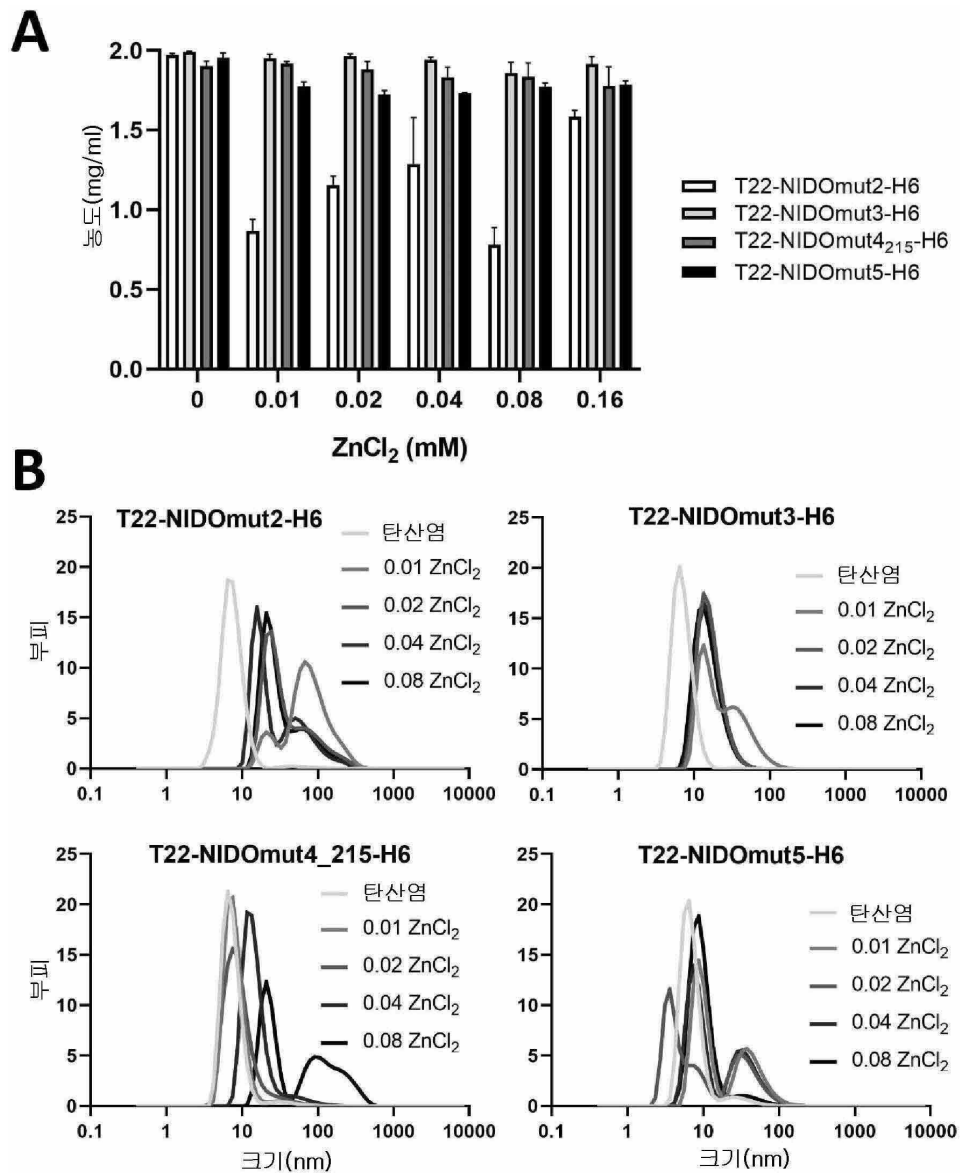
도면15



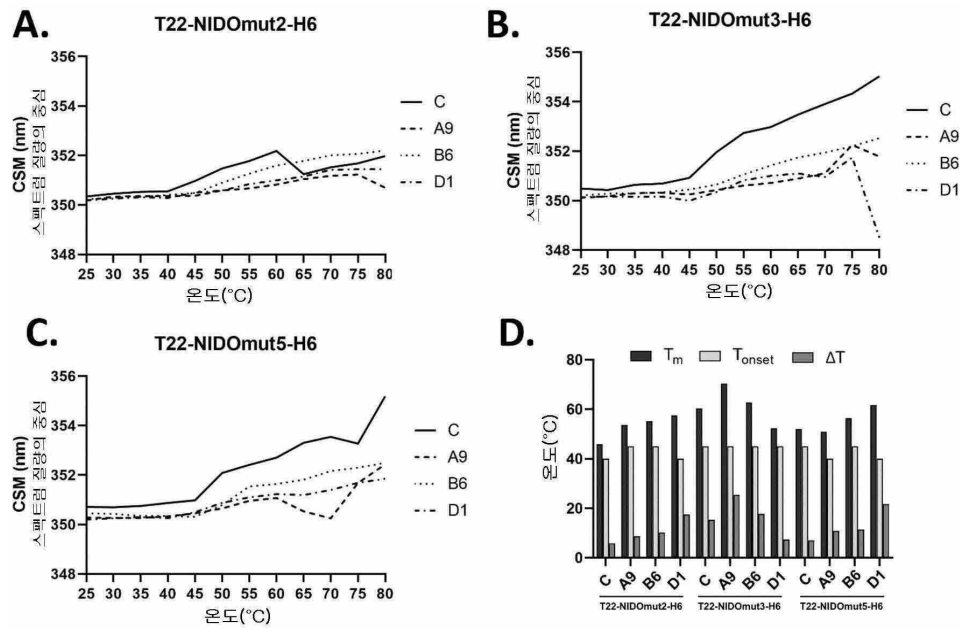
도면16



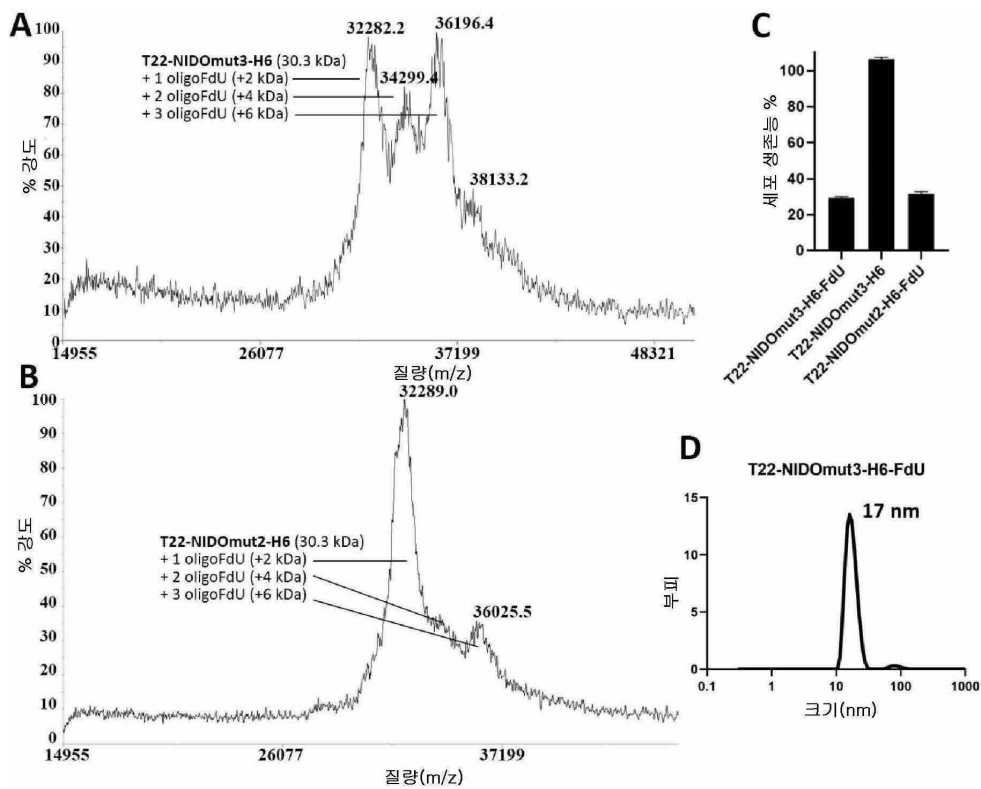
도면17



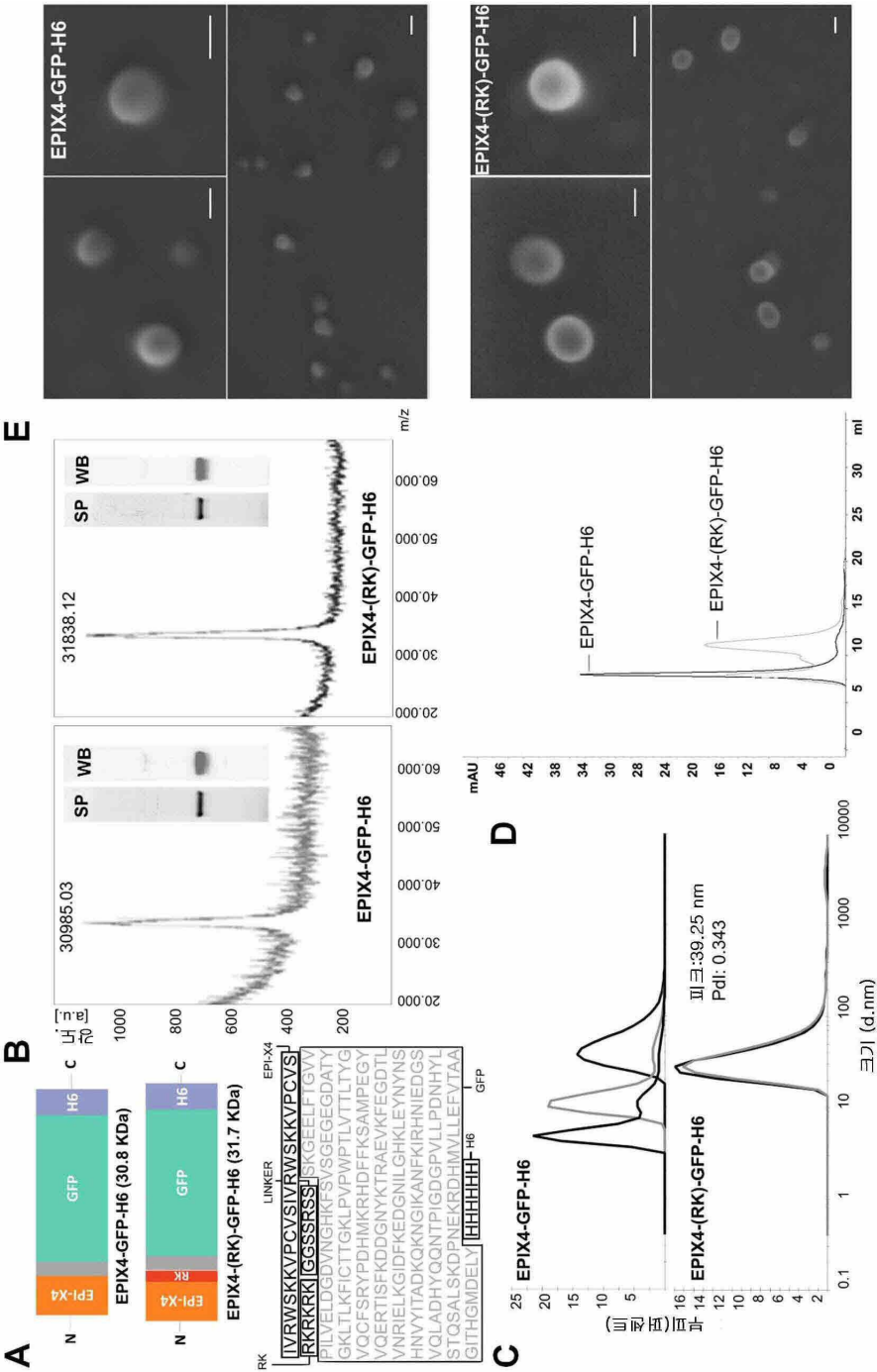
도면18



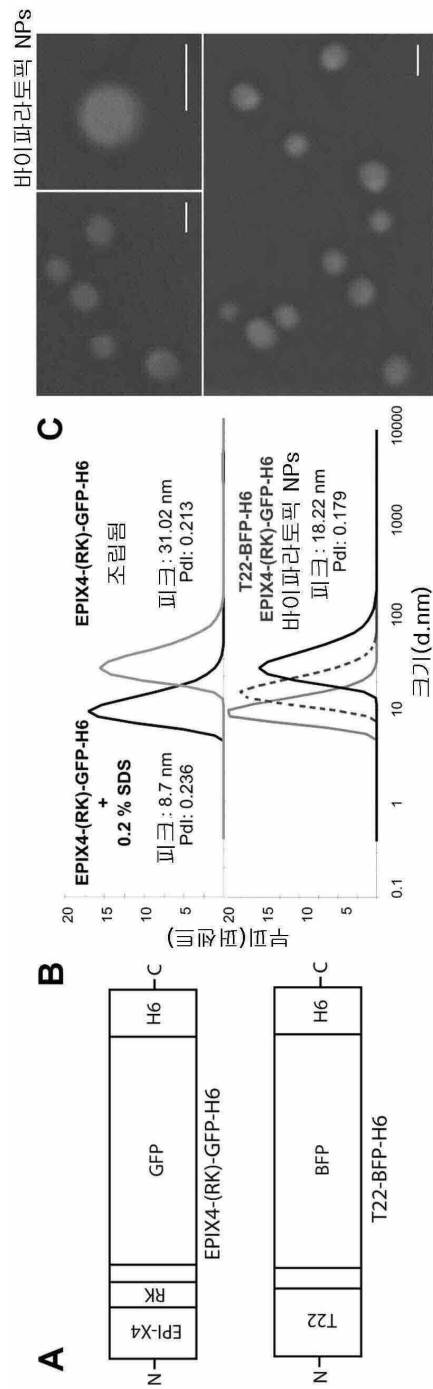
도면19



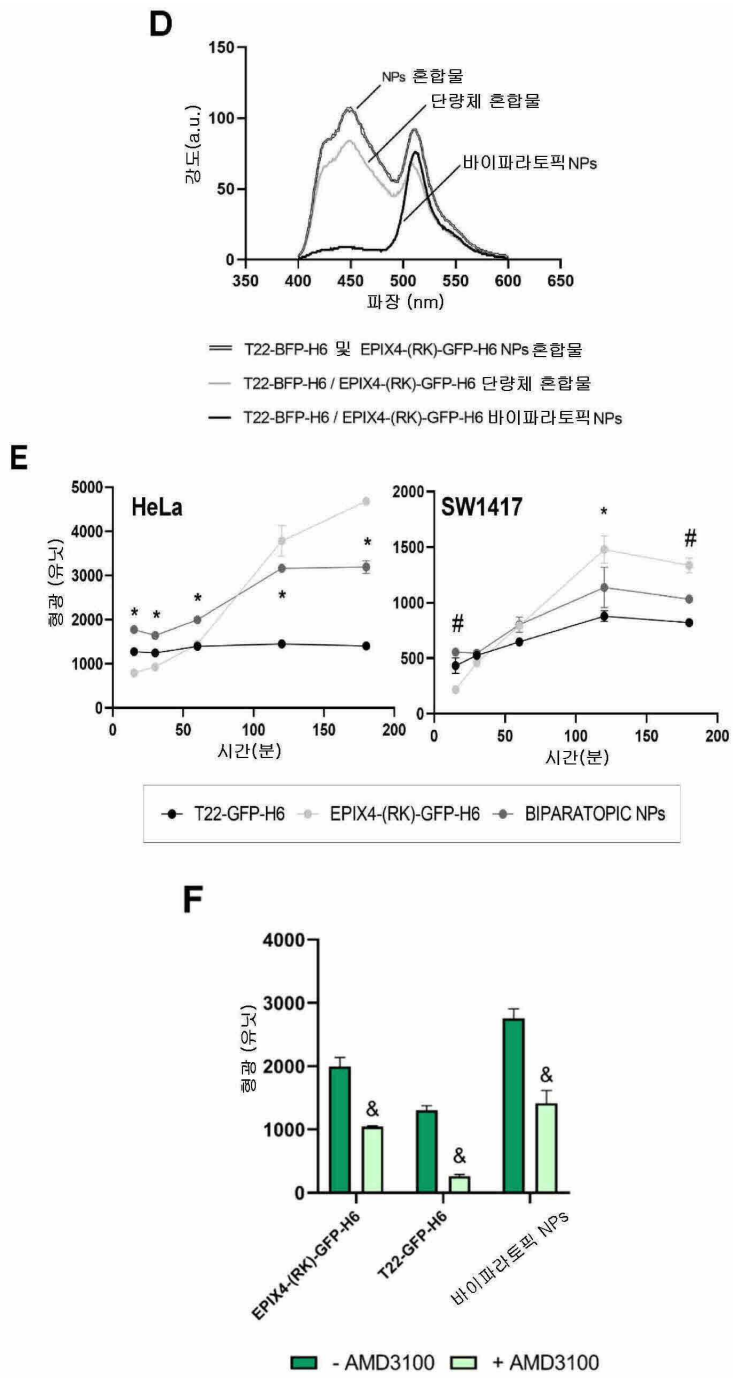
도면20



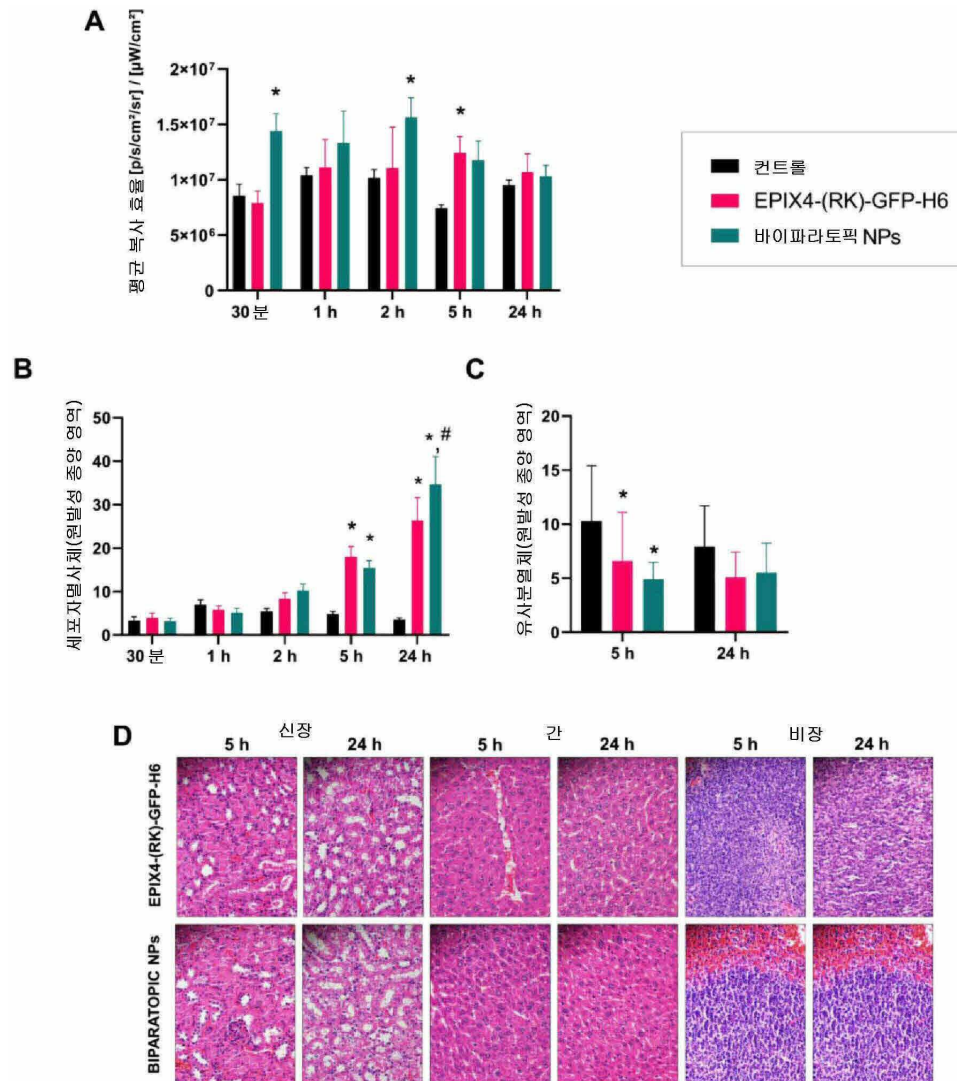
도면21



도면21a



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITAT AUTNOMA DE BARCELONA

FUNDACI INSTITUT DE RECERCA DE L' HOSPITAL DE LA SANTA

CREU I SANT PAU

CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIN BIOMDICA EN RED, M.P.

NANOLIGENT S.L.

<120> SCAFFOLD PROTEINS AND THERAPEUTIC NANOCONJUGATES BASED ON NIDOGEN

<130> P18306PC00

<150> EP19383201

<151> 2020-01-14

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region AB

<400> 1

Gly Ser Ser Gln Val Pro

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region BC

<400> 2

Met Asn His Gly

1

<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region CD

<400> 3

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

1 5 10 15

Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly

20 25 30

Phe Ser Ile Thr Gly Gly

35

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region DE

<400> 4

Val Gly His Pro Gly Asn

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region EF

<400> 5

Gly Ile Asp Glu His Gly His

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region FG

<400> 6

Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region HI

<400> 7

Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro

1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region IJ

<400> 8

Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser

1 5 10 15

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Loop region JK

<400> 9

Asn Gln Glu Glu Lys

1 5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand A

<400> 10

Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand B

<400> 11

Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu His Ser Tyr Val Val

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> beta strand C

<400> 12

Arg Ser Tyr Thr Ala Ile Ser

1 5
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta strand D
 <400> 13

Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe

1 5 10
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta strand E
 <400> 14

Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser

1 5
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta strand F
 <400> 15

Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val

1 5 10
 <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta strand G
 <400> 16

Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser

1 5 10
 <210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand H

<400> 17

Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand I

<400> 18

Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand J

<400> 19

Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Phe Val Leu Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta strand K

<400> 20

Ile Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> alpha helical region 1
 <400> 21
 Thr Val Gly Tyr Ser Leu
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> alpha helical region 2
 <400> 22
 Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met
 1 5

 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Alfa helical region 3
 <400> 23
 Gly Phe Ser Ile Thr
 1 5
 <210> 24
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CalphaD loop region
 <400> 24
 Thr Ile Pro Glu
 1
 <210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> T22 peptide

<400> 25

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> V1 peptide

<400> 26

Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr Gln

1 5 10 15

Lys Arg Pro Leu Pro

20

<210> 27

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CXCL12 peptide

<400> 27

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser

1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro

20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln

35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys

50 55 60

Ala Leu Asn

65

<210> 28

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> vCCL2 peptide

<400> 28

Leu Gly Ala Ser Trp His Arg Pro Asp Lys Cys Cys Leu Gly Tyr Gln

1 5 10 15

Lys Arg Pro Leu Pro Gln Val Leu Leu Ser Ser Trp Tyr Pro Thr Ser

20 25 30

Gln Leu Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg

35 40 45

Gln Val Cys Ala Asp Lys Asp Trp Val Lys Lys Leu Met Gln Gln Leu

50 55 60

Pro Val Thr Ala

65

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Optimized EPI-X4

<400> 29

Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser Ile Val Arg Trp

1 5 10 15

Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser

20

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polycationic peptide

<400> 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polycationic peptide

<400> 31

Arg Arg Arg Gly Arg Gly Arg Arg Arg

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polycationic peptide

<400> 32

Arg Ala Arg Gly Arg Gly Arg Arg Arg

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polycationic peptide

<400> 33

Arg Ala Arg Gly Arg Gly Gly Gly Ala

1 5

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A5G27

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> FNI/II/V

<400> 35

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu

1 5 10 15

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Lys Lys Thr

65

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Seq-1-7

<400> 36

Lys Tyr Leu Ala Tyr Pro Asp Ser Val His Ile Trp Arg Lys Arg Lys

1 5 10 15

Arg Lys

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Seq-1-8

<400> 37

Lys Tyr Leu Ala Tyr Pro Asp Ser Val His Ile Trp Arg Lys Arg Lys

1 5 10 15

Arg Lys Arg

<210> 38

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Angiopep-2-7 peptide

<400> 38

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr

1 5 10 15

Glu Glu Tyr Arg Lys Arg

20

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 39

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker

<400> 40

Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> T140 peptide

<220><221> Xaa is L-3-(2-naphthyl)alanine
 <222> (3)..(3)
 <220><221> Xaa is D-Lys
 <222>
 > (8)..(8)
 <220><221> Xaa is L-Citrulline
 <222> (12)..(12)
 <400> 41
 Arg Arg Xaa Cys Tyr Arg Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> TN14003 peptide
 <220><221> Xaa is L-3-(2-naphthyl)alanine
 <222> (3)..(3)
 <220><221> Xaa is L-Citrulline
 <222> (6)..(6)
 <220><221> Xaa is D-Lys
 <222> (8)..(8)
 <220><221> Xaa is L-Citrulline
 <222> (12)..(12)
 <400> 42
 Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> TC14012 peptide
 <220><221> Xaa is L-3-(2-naphthyl)alanine
 <222> (3)..(3)
 <220><221> Xaa is D-Citrulline

<222> (8)..(8)

<220><221> Xaa is L-Citrulline

<222> (12)..(12)

<400> 43

Arg Arg Xaa Cys Tyr Glu Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

1 5 10

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> TE14011 peptide

<220><221> Xaa is L-3-(2-naphthyl)alanine

<222> (3)..(3)

<220><221> Xaa is L-Citrulline

<222> (6)..(6)

<220><221> Xaa is D-Glutamic acid

<222> (8)..(8)

<220><221> Xaa is L-Citrulline

<222> (12)..(12)

<400> 44

Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> TZ14011 peptide

<220><221> Xaa is L-3-(2)-naphthyl)alanine

<222> (3)..(3)

<220><

221> Xaa is L-Citrulline

<222> (6)..(6)

<220><221> Xaa is D-Lysine

<222> (8)..(8)

<220><221> Xaa is L-Citrulline

<222> (12)..(12)

<400> 45

Arg Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

1 5 10

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GW-H1 peptide

<400> 46

Gly Tyr Asn Tyr Ala Lys Lys Leu Ala Asn Leu Ala Lys Lys Phe Ala

1 5 10 15

Asn Ala Leu Trp

20

<210> 47

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Nucleolin binding peptide

<400> 47

Lys Asp Glu Pro Gln Arg Arg Ser Ala Arg Leu Ser Ala Lys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Glu Pro Lys Pro Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys

20 25 30

<210> 48

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Nucleolin-binding peptide

<400> 48

Lys Asp Glu Pro Gln Arg Arg Ser Ala Arg Leu Ser Ala Lys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Glu Pro Lys Pro Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys Arg

20 25 30

Lys Arg Lys Arg Lys Arg Lys

35

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 49

Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr

1 5 10

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<

213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 50

Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr

1 5 10 15

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 51

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 52

Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 53

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Linker region

<400> 54

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr

1 5 10

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 55

Ala Ala Ala Leu Glu

1 5

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 56

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 57

Ile Glu Asp Gly Arg

1 5

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 58

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 59

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Cleavage site

<400> 60

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 61

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> T22-NidMut-H6

<400> 61

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125

Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu His Gly His Leu Thr Ile

130 135 140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165 170 175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190

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

195 200 205

Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro

210

215

220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln

225

230

235

240

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

245

250

255

Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His

260

265

270

<210> 62

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223

> Nidogen G2 domain

<400> 62

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

1

5

10

15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu His Ser Tyr

20

25

30

Val Val Met Asn His Gly Arg Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

35

40

45

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

50

55

60

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe

65

70

75

80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val

85

90

95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100

105

110

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

115

120

125

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

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

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

<210> 63

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human nidogen G2 domain (truncated)

<400> 63

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

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

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

100 105 110
Gly His Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile
115 120 125
Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His

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

195 200 205
Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Asn
210 215 220
Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 64

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human nidogen G2 domain with H459A., R468N, F639S and R650A
mutations

<400> 64

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

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe

65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val

85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp

180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala

225 230 235

<210> 65

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human nidogen G2 domain with H459A., R468N, F639S and R650A mutations (truncated)

<400> 65

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

1 5 10 15

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

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

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

 195 200 205
 Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn
 210 215 220
 Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235
 <210> 66
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> T22-G2-H6

<400> 66

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
20 25 30

Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val
35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu His Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Arg
50 55 60

Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val
85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe
100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val
115 120 125

Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu His Gly His Leu Thr Ile
130 135 140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser
145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
165 170 175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg
180 185 190

Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
195 200 205

Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
210 215 220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Phe Val Leu Tyr Asn Gln

225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ile Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270

<210> 67

<211> 210

<212> PRT

<213> Human

<400> 67

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

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

115 120 125
 Val Ala Leu Leu Gly Phe Gly Tyr Arg Leu Ala Leu His Val Tyr Gln
 130 135 140
 His Gly Leu Thr Gly Phe Leu Gly Gln Val Thr Arg Phe Val Val Asp
 145 150 155 160
 Phe Met Leu His His Cys Ile Ala Arg Trp Ile Ala Gln Arg Gly Gly
 165 170 175

Trp Val Ala Ala Leu Asn Leu Gly Asn Gly Pro Ile Leu Asn Val Leu

180 185 190

Val Val Leu Gly Val Val Leu Leu Gly Gln Phe Val Val Arg Arg Phe

195 200 205

Phe Lys

210

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> BH3 domain

<400> 68

Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg

1 5 10 15

<210> 69

<211> 193

<212> PRT

<213> Human

<400> 69

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

1 5 10 15

Leu Ala Arg Asp Gly Pro Arg Pro Phe Pro Leu Gly Arg Leu Val Pro

20 25 30

Ser Ala Val Ser Cys Gly Leu Cys Glu Pro Gly Leu Ala Ala Ala Pro

35 40 45

Ala Ala Pro Thr Leu Leu Pro Ala Ala Tyr Leu Cys Ala Pro Thr Ala

50 55 60

Pro Pro Ala Val Thr Ala Ala Leu Gly Gly Ser Arg Trp Pro Gly Gly

65 70 75 80

Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gly Pro Arg Pro Asp Gly Pro Gln Pro Ser

85 90 95

Leu Ser Leu Ala Glu Gln His Leu Glu Ser Pro Val Pro Ser Ala Pro

100 105 110
 Gly Ala Leu Ala Gly Gly Pro Thr Gln Ala Ala Pro Gly Val Arg Gly
 115 120 125
 Glu Glu Glu Gln Trp Ala Arg Glu Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met
 130 135 140
 Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln Tyr Glu Arg Arg Arg Gln Glu Glu Gln
 145 150 155 160
 Gln Arg His Arg Pro Ser Pro Trp Arg Val Leu Tyr Asn Leu Ile Met
 165 170 175
 Gly Leu Leu Pro Leu Pro Arg Gly His Arg Ala Pro Glu Met Glu Pro
 180 185 190
 Asn

<210> 70
 <211> 187
 <212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 70

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

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly

115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala
 180 185

<210> 71

<211> 209

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 71

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

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

115 120 125

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

180 185 190
 Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu
 195 200 205
 Lys

<210> 72

<211> 1247

<212> PRT

<213> Human

<400> 72

Met Leu Ala Ser Ser Ser Arg Ile Arg Ala Ala Trp Thr Arg Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ala Gly Pro Val Gly Cys Leu Ser Arg Gln
 20 25 30

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

Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Val Ala Pro Phe Leu Ala Asp Leu Asp
 100 105 110
 Thr Thr Asp Gly Leu Gly Lys Val Tyr Tyr Arg Glu Asp Leu Ser Pro

115	120	125	
Ser Ile Thr Gln Arg Ala Ala Glu Cys Val His Arg Gly Phe Pro Glu			
130	135	140	
Ile Ser Phe Gln Pro Ser Ser Ala Val Val Val Thr Trp Glu Ser Val			
145	150	155	160
Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Ser Arg Asp Pro Asp Gln Lys Gly Lys Arg			
165	170	175	
Asn Thr Phe Gln Ala Val Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Ser Tyr Ala			
180	185	190	
Ile Phe Leu Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Gln Phe His Thr Thr Phe Ser			
195	200	205	
Lys Lys Glu Asn Asn Gln Val Pro Ala Val Val Ala Phe Ser Gln Gly			
210	215	220	
Ser Val Gly Phe Leu Trp Lys Ser Asn Gly Ala Tyr Asn Ile Phe Ala			
225	230	235	240
Asn Asp Arg Glu Ser Val Glu Asn Leu Ala Lys Ser Ser Asn Ser Gly			
245	250	255	
Gln Gln Gly Val Trp Val Phe Glu Ile Gly Ser Pro Ala Thr Thr Asn			
260	265	270	
Gly Val Val Pro Ala Asp Val Ile Leu Gly Thr Glu Asp Gly Ala Glu			
275	280	285	
Tyr Asp Asp Glu Asp Glu Asp Tyr Asp Leu Ala Thr Thr Arg Leu Gly			
290	295	300	
Leu Glu Asp Val Gly Thr Thr Pro Phe Ser Tyr Lys Ala Leu Arg Arg			
305	310	315	320
Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Ser Val Pro Ser Val Leu Ser Pro Arg Arg			
325	330	335	
Ala Ala Thr Glu Arg Pro Leu Gly Pro Pro Thr Glu Arg Thr Arg Ser			
340	345	350	
Phe Gln Leu Ala Val Glu Thr Phe His Gln Gln His Pro Gln Val Ile			
355	360	365	

Asp Val Asp Glu Val Glu Glu Thr Gly Val Val Phe Ser Tyr Asn Thr
 370 375 380
 Asp Ser Arg Gln Thr Cys Ala Asn Asn Arg His Gln Cys Ser Val His
 385 390 395 400
 Ala Glu Cys Arg Asp Tyr Ala Thr Gly Phe Cys Cys Ser Cys Val Ala
 405 410 415

 Gly Tyr Thr Gly Asn Gly Arg Gln Cys Val Ala Glu Gly Ser Pro Gln
 420 425 430
 Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln
 435 440 445
 Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu His Ser Tyr Val Val Met
 450 455 460
 Asn His Gly Arg Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val
 465 470 475 480

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

 His Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro
 545 550 555 560
 Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr
 565 570 575
 Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr
 580 585 590
 Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln
 595 600 605

 Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg

610 615 620
 Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Phe Val
 625 630 635 640
 Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Asn Ser
 645 650 655
 Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Leu Gln Asn Pro Cys
 660 665 670

 Tyr Ile Gly Thr His Gly Cys Asp Thr Asn Ala Ala Cys Arg Pro Gly
 675 680 685
 Pro Arg Thr Gln Phe Thr Cys Glu Cys Ser Ile Gly Phe Arg Gly Asp
 690 695 700
 Gly Arg Thr Cys Tyr Asp Ile Asp Glu Cys Ser Glu Gln Pro Ser Val
 705 710 715 720
 Cys Gly Ser His Thr Ile Cys Asn Asn His Pro Gly Thr Phe Arg Cys
 725 730 735

 Glu Cys Val Glu Gly Tyr Gln Phe Ser Asp Glu Gly Thr Cys Val Ala
 740 745 750
 Val Val Asp Gln Arg Pro Ile Asn Tyr Cys Glu Thr Gly Leu His Asn
 755 760 765
 Cys Asp Ile Pro Gln Arg Ala Gln Cys Ile Tyr Thr Gly Gly Ser Ser
 770 775 780
 Tyr Thr Cys Ser Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Asp Gly Gln Ala Cys
 785 790 795 800

 Gln Asp Val Asp Glu Cys Gln Pro Ser Arg Cys His Pro Asp Ala Phe
 805 810 815
 Cys Tyr Asn Thr Pro Gly Ser Phe Thr Cys Gln Cys Lys Pro Gly Tyr
 820 825 830
 Gln Gly Asp Gly Phe Arg Cys Val Pro Gly Glu Val Glu Lys Thr Arg
 835 840 845
 Cys Gln His Glu Arg Glu His Ile Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp
 850 855 860

Pro Gln Arg Pro Ile Pro Pro Gly Leu Phe Val Pro Glu Cys Asp Ala
865 870 875 880
His Gly His Tyr Ala Pro Thr Gln Cys His Gly Ser Thr Gly Tyr Cys
885 890 895
Trp Cys Val Asp Arg Asp Gly Arg Glu Val Glu Gly Thr Arg Thr Arg
900 905 910
Pro Gly Met Thr Pro Pro Cys Leu Ser Thr Val Ala Pro Pro Ile His
915 920 925

Gln Gly Pro Ala Val Pro Thr Ala Val Ile Pro Leu Pro Pro Gly Thr
930 935 940
His Leu Leu Phe Ala Gln Thr Gly Lys Ile Glu Arg Leu Pro Leu Glu
945 950 955 960
Gly Asn Thr Met Arg Lys Thr Glu Ala Lys Ala Phe Leu His Val Pro
965 970 975
Ala Lys Val Ile Ile Gly Leu Ala Phe Asp Cys Val Asp Lys Met Val
980 985 990

Tyr Trp Thr Asp Ile Thr Glu Pro Ser Ile Gly Arg Ala Ser Leu His
995 1000 1005
Gly Gly Glu Pro Thr Thr Ile Ile Arg Gln Asp Leu Gly Ser Pro
1010 1015 1020
Glu Gly Ile Ala Val Asp His Leu Gly Arg Asn Ile Phe Trp Thr
1025 1030 1035
Asp Ser Asn Leu Asp Arg Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Thr
1040 1045 1050

Gln Arg Arg Val Leu Phe Glu Thr Asp Leu Val Asn Pro Arg Gly
1055 1060 1065
Ile Val Thr Asp Ser Val Arg Gly Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Trp
1070 1075 1080
Asn Arg Asp Asn Pro Lys Ile Glu Thr Ser Tyr Met Asp Gly Thr
1085 1090 1095
Asn Arg Arg Ile Leu Val Gln Asp Asp Leu Gly Leu Pro Asn Gly

1100	1105	1110
Leu Thr Phe Asp Ala Phe Ser Ser Gln Leu Cys Trp Val Asp Ala		
1115	1120	1125
Gly Thr Asn Arg Ala Glu Cys Leu Asn Pro Ser Gln Pro Ser Arg		
1130	1135	1140
Arg Lys Ala Leu Glu Gly Leu Gln Tyr Pro Phe Ala Val Thr Ser		
1145	1150	1155
Tyr Gly Lys Asn Leu Tyr Phe Thr Asp Trp Lys Met Asn Ser Val		
1160	1165	1170
Val Ala Leu Asp Leu Ala Ile Ser Lys Glu Thr Asp Ala Phe Gln		
1175	1180	1185
Pro His Lys Gln Thr Arg Leu Tyr Gly Ile Thr Thr Ala Leu Ser		
1190	1195	1200
Gln Cys Pro Gln Gly His Asn Tyr Cys Ser Val Asn Asn Gly Gly		
1205	1210	1215
Cys Thr His Leu Cys Leu Ala Thr Pro Gly Ser Arg Thr Cys Arg		
1220	1225	1230
Cys Pro Asp Asn Thr Leu Gly Val Asp Cys Ile Glu Gln Lys		
1235	1240	1245
<210> 73		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Hexahistidine tag		
<400> 73		
His His His His His His		
1 5		
<210> 74		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> IL-6 ligand		

<400> 74

Leu Ser Leu Ile Thr Arg Leu

1 5

<210> 75

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IL-6 ligand

<400> 75

Trp Gln Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe

1 5 10 15

Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp

20 25 30

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker region

<400> 76

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser

1 5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> positively charged peptide region

<400> 77

Arg Lys Arg Lys Arg Lys

1 5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 78

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 79

Lys Lys Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Positively charged peptide region

<400> 80

His His His His His His

1 5

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 81

Arg His Arg His Arg His

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 82

Arg Lys Arg Lys Arg Lys Arg Lys

1 5

<210> 83

<211> 6

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 83

Arg Lys Arg His Arg Lys

1 5

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 84

Arg Lys Arg His Arg His

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 85

Arg His Arg His Arg His

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> positively charged peptide region

<400> 86

Arg Lys Arg Lys Arg Lys Arg

1 5

<210> 87

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3

<400> 87

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

1 5 10 15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr

 20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

 35 40 45

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

 50 55 60

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe

65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val

 85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr

145 150 155 160

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

 165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp

 180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser

195 200 205
Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 88

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_V45T

<400> 88

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val
85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100 105 110
Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp

180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala

225 230 235

<210> 89

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_V121Q

<400> 89

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

1 5 10 15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe

65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln

85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100 105 110

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

115 120 125
 Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160
 Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

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

<210> 90

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_F157E

<400> 90

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

 50 55 60
 Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
 65 70 75 80
 Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val

85 90 95
Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
100 105 110
Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro

115 120 125
Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140
Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160
Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
165 170 175
Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp

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

<210> 91

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_V215T

<400> 91

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

50 55 60
 Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
 65 70 75 80
 Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val
 85 90 95
 Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
 100 105 110
 Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
 115 120 125
 Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160
 Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Thr His Asp
 180 185 190
 Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
 195 200 205
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
 210 215 220
 Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235
 <210> 92
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Seq_93
 <400> 92
 Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly

1 5 10 15

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

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

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

 195 200 205
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
 210 215 220
 Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235
 <210> 93
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut4_T215V

<400> 93

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
35 40 45

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln
85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
100 105 110

Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160

Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp
180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
195 200 205

Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala

225	230										235									
<210>	94																			
<211>	238																			
<212>	PRT																			
<213>	Artificial Sequence																			
<220><223>	NID0mut5																			
<400>	94																			
Ser	Pro	Gln	Arg	Val	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Val	Gly					
1	5				10				15											
Ser	Ser	Gln	Thr	Pro	Ile	Val	Phe	Glu	Asn	Thr	Asp	Leu	Ala	Ser	Tyr					
20				25				30												
Val	Val	Met	Asn	His	Gly	Asn	Ser	Tyr	Thr	Ala	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro					
35				40				45												
Glu	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	Ile					
50				55				60												
Ile	Gly	Trp	Met	Phe	Ala	Val	Glu	Gln	Asp	Gly	Phe	Lys	Asn	Gly	Phe					
65	70				75				80											
Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Thr	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Gln					
85				90				95												
Gly	His	Pro	Gly	Asn	Leu	Val	Ile	Lys	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp					
100				105				110												
Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile	Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Val	Pro					
115				120				125												
Gln	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	His	Ile	Glu	Pro	Tyr	Thr	Glu	Leu					
130				135				140												
Tyr	His	Tyr	Ser	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Glu	Tyr					
145				150				155				160								
Thr	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg	Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Ser	Arg	Ile	Tyr					
165				170				175												
Thr	Tyr	Gln	Trp	Arg	Gln	Thr	Ile	Thr	Phe	Gln	Glu	Ser	Thr	His	Asp					
180				185				190												
Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Asp	Ser					

195 200 205
Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu

210 215 220
Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala

225 230 235

<210> 95

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_V176T

<400> 95

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

1 5 10 15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

35 40 45

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

50 55 60

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe

65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val

85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Thr Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr

145 150 155 160

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

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 96

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_I200T

<400> 96

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

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

100 105 110
Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140
Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160
Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Thr Tyr
165 170 175
Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp
180 185 190
Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
195 200 205
Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
210 215 220
Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235
<210> 97
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NID0mut3_V236Y
<400> 97
Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15
Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30
Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
35 40 45
Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile
50 55 60
Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
65 70 75 80
Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val
85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
100 105 110

Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160

Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp
180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
195 200 205

Val Ser Tyr Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 98

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_L237T

<400> 98

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
35 40 45

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

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

115 120 125
 Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160
 Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175
 Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp

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

<210> 99

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_S65I

<400> 99

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr

20 25 30
 Val Val Met Asn His Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
 35 40 45
 Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile
 50 55 60

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

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

 Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
 195 200 205
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
 210 215 220
 Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235
 <210> 100
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NID0mut3_R114I

<400> 100

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

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

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

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

195 200 205
Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
210 215 220
Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 101

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut3_C214S

<400> 101

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
35 40 45

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val
85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
100 105 110

Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
145 150 155 160

Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Ser Val His Asp
180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser

195 200 205
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu
 210 215 220
 Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235
 <210> 102
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NID0mut3_S65I_R114I
 <400> 102
 Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
 20 25 30
 Val Val Met Asn His Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
 35 40 45
 Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile
 50 55 60
 Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
 65 70 75 80
 Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Ile Gln Ala Glu Val Thr Phe Val
 85 90 95
 Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
 100 105 110
 Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
 115 120 125
 Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160

Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp
180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser
195 200 205

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

210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
225 230 235

<210> 103
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NID0mut5_S65I_R114I
<400> 103

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
35 40 45

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Ile Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln
85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp
100 105 110

Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
115 120 125

Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160

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

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala
 225 230 235

<210> 104

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut5_S51I

<400> 104

Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr
 20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro
 35 40 45

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

Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe
 65 70 75 80

Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln
 85 90 95

Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Ser Thr His Asp

180 185 190

Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser

195 200 205

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

210 215 220

Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala

225 230 235

<210> 105

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NID0mut5_R114I

<400> 105

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

1 5 10 15

Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr

20 25 30

Val Val Met Asn His Gly Asn Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro

35 40 45

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

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

 Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro
 115 120 125
 Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu
 130 135 140
 Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr
 145 150 155 160
 Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

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

<210> 106

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3-H6

<400> 106

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30
 Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val
 35 40 45
 Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
 50 55 60
 Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val
 85 90 95
 Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe
 100 105 110
 Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175
 Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
 195 200 205
 Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
 210 215 220
 Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270

<210> 107

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_V45T-H6

<400> 107

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val

35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125

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

130 135 140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165 170 175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190

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

195 200 205

Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
210 215 220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
245 250 255

Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
260 265 270

<210> 108

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_V121Q-H6

<400> 108

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15
Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
20 25 30

Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val
35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
50 55 60

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

65 70 75 80
Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val
85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe
100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln Gly His Pro Gly Asn Leu Val
115 120 125

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

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

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

 260 265 270
 <210> 109
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut3_F157E-H6
 <400> 109
 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
 20 25 30
 Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val
 35 40 45

 Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
 50 55 60
 Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu

65						70						75						80						
Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Trp	Met	Phe	Ala	Val									
					85					90					95									
Glu	Gln	Asp	Gly	Phe	Lys	Asn	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe									
					100					105					110									
Thr	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Val	Gly	His	Pro	Gly	Asn	Leu	Val									
					115					120					125									
Ile	Lys	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile									
					130					135					140									
Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Ser									
					145					150					155					160				
Val	His	Ile	Glu	Pro	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	His	Tyr	Ser	Thr	Ser	Val									
					165					170					175									
Ile	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Glu	Tyr	Thr	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg									
					180					185					190									
Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Ser	Arg	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Trp	Arg	Gln	Thr									
					195					200					205									
Ile	Thr	Phe	Gln	Glu	Cys	Val	His	Asp	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Leu	Pro									
					210					215					220									
Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Gln									
					225					230					235					240				
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Val									
					245					250					255									
Arg	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Ala	Lys	His	His	His	His	His	His											
					260					265					270									
<210>	110																							
<211>	270																							
<212>	PRT																							
<213>	Artificial Sequence																							
<220><223>	T22-NID0mut3_V215T-H6																							
<400>	110																							
Arg	Arg	Trp	Cys	Tyr	Arg	Lys	Cys	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Lys									

1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

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

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

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

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

Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His

260 265 270

<210> 111

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut4-H6

<400> 111

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val

35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165 170 175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

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

 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270
 <210> 112
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut4_T215V-H6
 <400> 112
 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
 20 25 30
 Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val

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

 100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln Gly His Pro Gly Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

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

225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270

<210> 113

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut5-H6

<400> 113

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
 20 25 30
 Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val
 35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
 50 55 60
 Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu
 65 70 75 80

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

 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175
 Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
 195 200 205

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

<210> 114

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_V176T-H6

<400> 114

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125

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

130 135 140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Thr

165 170 175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190

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

195 200 205

Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro

210 215 220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln

225											230											235											240				
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Val																						
															245											250											255
Arg	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Ala	Lys	His	His	His	His	His	His																								
															260											265											270
<210>	115																																				
<211>	270																																				
<212>	PRT																																				
<213>	Artificial Sequence																																				
<220><223>	T22-NID0mut3_I200T-H6																																				
<400>	115																																				
Arg	Arg	Trp	Cys	Tyr	Arg	Lys	Cys	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Lys																						
1					5					10					15																						
Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Arg	Val	Asn	Gly																						
															20											25											30
Lys	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Gln	Val	Pro	Ile	Val																						
															35											40											45
Phe	Glu	Asn	Thr	Asp	Leu	Ala	Ser	Tyr	Val	Val	Met	Asn	His	Gly	Asn																						
															50											55											60
Ser	Tyr	Thr	Ala	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu																						
65					70					75					80																						
Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Trp	Met	Phe	Ala	Val																						
															85											90											95
Glu	Gln	Asp	Gly	Phe	Lys	Asn	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe																						
															100											105											110
Thr	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Val	Gly	His	Pro	Gly	Asn	Leu	Val																						
															115											120											125
Ile	Lys	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile																						
															130											135											140
Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Ser																						
															145											150											155
																																			160		

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
165 170 175
Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg
180 185 190
Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
195 200 205
Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
210 215 220
Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln
225 230 235 240
Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
245 250 255
Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
260 265 270
<210> 116
<211> 270
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> T22-NID0mut3_V236Y-H6
<400> 116
Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
1 5 10 15
Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
20 25 30
Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val
35 40 45
Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
50 55 60
Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu
65 70 75 80
Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val
85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe
 100 105 110
 Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175
 Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg
 180 185 190
 Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
 195 200 205
 Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
 210 215 220
 Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Tyr Leu Tyr Asn Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270
 <210> 117
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut3_L237T-H6
 <400> 117
 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20							25							30						
Lys	Val	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Gln	Val	Pro	Ile	Val					
35				40				45												
Phe	Glu	Asn	Thr	Asp	Leu	Ala	Ser	Tyr	Val	Val	Met	Asn	His	Gly	Asn					
50			55			60														
Ser	Tyr	Thr	Ala	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu					
65				70				75				80								
Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Trp	Met	Phe	Ala	Val					
85				90				95												
Glu	Gln	Asp	Gly	Phe	Lys	Asn	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe					
100				105				110												
Thr	Arg	Gln	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Val	Gly	His	Pro	Gly	Asn	Leu	Val					
115			120			125														
Ile	Lys	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile					
130				135				140												
Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Ser					
145				150				155				160								
Val	His	Ile	Glu	Pro	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	His	Tyr	Ser	Thr	Ser	Val					
165				170				175												
Ile	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Glu	Tyr	Thr	Val	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg					
180			185			190														
Asp	Gly	Ala	Ser	Pro	Ser	Arg	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Trp	Arg	Gln	Thr					
195				200				205												
Ile	Thr	Phe	Gln	Glu	Cys	Val	His	Asp	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Leu	Pro					
210				215				220												
Ser	Thr	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Tyr	Asn	Gln					
225				230				235				240								
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Val					
245				250				255												
Arg	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Ala	Lys	His	His	His	His	His	His							
260				265				270												

<210> 118

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_S65I-H6

<400> 118

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15
Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30
Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val

35 40 45
Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

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

65 70 75 80
Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95
Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110
Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125
Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile

130 135 140
Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145 150 155 160
Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165 170 175
Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190
Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr

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

260 265 270

<210> 119

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_R114I-H6

<400> 119

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Ile Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115 120 125

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

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

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

 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270

 <210> 120
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut3_C214S-H6
 <400> 120

 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

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

65 70 75 80

Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val

85 90 95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100 105 110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

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

130 135 140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145	150	155	160
Val	His	Ile	Glu
Pro	Tyr	Thr	Glu
Leu	Tyr	His	Tyr
Ser	Thr	Ser	Val

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190

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

Ile Thr Phe Gln Glu Ser Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro

210 215 220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln

225 230 235 240

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

Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His

260 265 270

<210> 121

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut3_S65I_R114I-H6

<400> 121

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

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

 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175
 Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

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

245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270
 <210> 122
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut5_S51I_R114I
 <400> 122
 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
 20 25 30
 Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val
 35 40 45
 Phe Glu Asn Thr Asp Leu Ala Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Asn
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val
 85 90 95
 Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe
 100 105 110
 Thr Ile Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln Gly His Pro Gly Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175
 Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190
 Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr
 195 200 205
 Ile Thr Phe Gln Glu Ser Thr His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro
 210 215 220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270

<210> 123

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut5_S65I-H6

<400> 123

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

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

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

115 120 125
Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile

130 135 140
Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser
145 150 155 160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165 170 175
Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180 185 190
Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr

195 200 205
Ile Thr Phe Gln Glu Ser Thr His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro

210 215 220
Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln

225 230 235 240
Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val

245 250 255
Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His

260 265 270

<210> 124

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T22-NID0mut5_R114I-H6

<400> 124

Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys

1 5 10 15

Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly

20 25 30

Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Thr Pro Ile Val

35 40 45

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

 Thr Ile Gln Ala Glu Val Thr Phe Gln Gly His Pro Gly Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ile
 130 135 140
 Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Glu Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val
 165 170 175

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

 Glu Glu Lys Ile Leu Ala Tyr Ala Leu Ser Asn Ser Ile Gly Pro Val
 245 250 255
 Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His
 260 265 270
 <210> 125
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Human Nidogen G2 domain from Figure 13A

<400> 125

His Gln Gln His Pro Gln Val Ile Asp Val Asp Glu Val Glu Glu Thr
1 5 10 15

Gly Val Val Phe Ser Tyr Asn Thr Asp Ser Arg Gln Thr Cys Ala Asn
20 25 30

Asn Arg His Gln Cys Ser Val His Ala Glu Cys Arg Asp Tyr Ala Thr
35 40 45

Gly Phe Cys Cys Ser Cys Val Ala Gly Tyr Thr Gly Asn Gly Arg Gln
50 55 60

Cys Val Ala Glu Gly Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly
65 70 75 80

Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr
85 90 95

Asp Leu His Ser Tyr Val Val Met Asn His Gly Arg Ser Tyr Thr Ala
100 105 110

Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly
130 135 140

Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala
145 150 155 160

Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg
165 170 175

Phe Ser Gly Ile Asp Glu His Gly His Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu
180 185 190

Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu
195 200 205

Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser
210 215 220

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

225 230 235 240
 Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln
 245 250 255
 Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln
 260 265 270

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

 Cys Ser Ile Gly Phe Arg Gly Asp Gly Arg Thr Cys Tyr Asp Ile Asp
 340 345 350
 Glu Cys Ser Glu Gln Pro Ser Val
 355 360

 <210> 126
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mouse Nidogen G2 domain from Figure 13A
 <400> 126

 Pro Gln His His Pro Gln Val Ile Asp Val Asp Glu Val Glu Glu Thr
 1 5 10 15
 Gly Val Val Phe Ser Tyr Asn Thr Gly Ser Gln Gln Thr Cys Ala Asn

 20 25 30
 Asn Arg His Gln Cys Ser Val His Ala Glu Cys Arg Asp Tyr Ala Thr
 35 40 45
 Gly Phe Cys Cys Arg Cys Val Ala Asn Tyr Thr Gly Asn Gly Arg Gln
 50 55 60
 Cys Val Ala Glu Gly Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly

65					70				75				80			
Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Gln	Val	Pro	Val	Val	Phe	Glu	Asn	Thr	
				85				90				95				
Asp	Leu	His	Ser	Tyr	Val	Val	Met	Asn	His	Gly	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ala	
				100				105				110				
Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Glu	Thr	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	
				115				120				125				
Pro	Ile	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Trp	Met	Phe	Ala	Val	Glu	Gln	Asp	Gly	
				130				135				140				
Phe	Lys	Asn	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Glu	Phe	Thr	Arg	Gln	Ala	
				145				150				155				
Glu	Val	Thr	Phe	Leu	Gly	His	Pro	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Lys	Gln	Gln	
				165				170				175				
Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Glu	His	Gly	His	Leu	Thr	Ile	Ser	Thr	Glu	Leu	
				180				185				190				
Glu	Gly	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Gly	Ala	Ser	Val	His	Ile	Glu	
				195				200				205				
Pro	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	His	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Ser	
				210				215				220				
Ser	Thr	Arg	Glu	Tyr	Thr	Val	Met	Glu	Pro	Asp	Gln	Asp	Gly	Ala	Ala	
				225				230				235				
Pro	Ser	His	Thr	His	Ile	Tyr	Gln	Trp	Arg	Gln	Thr	Ile	Thr	Phe	Gln	
				245				250				255				
Glu	Cys	Ala	His	Asp	Asp	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Thr	Gln	Gln	
				260				265				270				
Leu	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Val	Leu	Tyr	Asn	Lys	Glu	Glu	Arg	Ile	
				275				280				285				
Leu	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Val	Arg	Asp	Gly	Ser	
				290				295				300				
Pro	Asp	Ala	Leu	Gln	Asn	Pro	Cys	Tyr	Ile	Gly	Thr	His	Gly	Cys	Asp	
				305				310				315				
												320				

Ser Asn Ala Ala Cys Arg Pro Gly Pro Gly Thr Gln Phe Thr Cys Glu

325 330 335

Cys Ser Ile Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gln Thr Cys Tyr Asp Ile Asp

340 345 350

Glu Cys Ser Glu Gln Pro Ser Arg

355 360

<210> 127

<211> 1247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Nidogen (Uniprot P14534)

<400> 127

Met Leu Ala Ser Ser Ser Arg Ile Arg Ala Ala Trp Thr Arg Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Leu Phe Pro Phe Gly Pro Gly Gln Gly Asp Leu Glu Leu Glu Asp

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ile Ala Thr Ser Glu Pro Pro Ala Lys Glu Ser His Pro Gly Leu

85 90 95

Phe Pro Pro Thr Phe Gly Ala Val Ala Pro Phe Leu Ala Asp Leu Asp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ile Thr Gln Arg Ala Ala Glu Cys Val His Arg Gly Phe Pro Glu

130 135 140

Ile Ser Phe Gln Pro Ser Ser Ala Val Val Val Thr Trp Glu Ser Val

145 150 155 160
 Ala Pro Tyr Gln Gly Pro Ser Arg Asp Pro Asp Gln Lys Gly Lys Arg
 165 170 175
 Asn Thr Phe Gln Ala Val Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Ser Tyr Ala
 180 185 190
 Ile Phe Leu Tyr Pro Glu Asp Gly Leu Gln Phe His Thr Thr Phe Ser
 195 200 205
 Lys Lys Glu Asn Asn Gln Val Pro Ala Val Val Ala Phe Ser Gln Gly
 210 215 220

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

 Tyr Asp Asp Glu Asp Glu Asp Tyr Asp Leu Ala Thr Thr Arg Leu Gly
 290 295 300
 Leu Glu Asp Val Gly Thr Thr Pro Phe Ser Tyr Lys Ala Leu Arg Arg
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Ser Val Pro Ser Val Leu Ser Pro Arg Arg
 325 330 335
 Ala Ala Thr Glu Arg Pro Leu Gly Pro Pro Thr Glu Arg Thr Arg Ser
 340 345 350

 Phe Gln Leu Ala Val Glu Thr Phe His Gln Gln His Pro Gln Val Ile
 355 360 365
 Asp Val Asp Glu Val Glu Glu Thr Gly Val Val Phe Ser Tyr Asn Thr
 370 375 380
 Asp Ser Arg Gln Thr Cys Ala Asn Asn Arg His Gln Cys Ser Val His
 385 390 395 400

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

Gly Tyr Thr Gly Asn Gly Arg Gln Cys Val Ala Glu Gly Ser Pro Gln
420 425 430

Arg Val Asn Gly Lys Val Lys Gly Arg Ile Phe Val Gly Ser Ser Gln
435 440 445

Val Pro Ile Val Phe Glu Asn Thr Asp Leu His Ser Tyr Val Val Met
450 455 460

Asn His Gly Arg Ser Tyr Thr Ala Ile Ser Thr Ile Pro Glu Thr Val
465 470 475 480

Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ala Pro Val Gly Gly Ile Ile Gly Trp
485 490 495

Met Phe Ala Val Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr
500 505 510

Gly Gly Glu Phe Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro
515 520 525

Gly Asn Leu Val Ile Lys Gln Arg Phe Ser Gly Ile Asp Glu His Gly
530 535 540

His Leu Thr Ile Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro
545 550 555 560

Phe Gly Ser Ser Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr
565 570 575

Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr
580 585 590

Glu Pro Glu Arg Asp Gly Ala Ser Pro Ser Arg Ile Tyr Thr Tyr Gln
595 600 605

Trp Arg Gln Thr Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg
610 615 620

Pro Ala Leu Pro Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Phe Val
625 630 635 640

Leu Tyr Asn Gln Glu Glu Lys Ile Leu Arg Tyr Ala Leu Ser Asn Ser

	645		650		655										
Ile	Gly	Pro	Val	Arg	Glu	Gly	Ser	Pro	Asp	Ala	Leu	Gln	Asn	Pro	Cys
	660		665		670										
Tyr	Ile	Gly	Thr	His	Gly	Cys	Asp	Thr	Asn	Ala	Ala	Cys	Arg	Pro	Gly
	675		680		685										
Pro	Arg	Thr	Gln	Phe	Thr	Cys	Glu	Cys	Ser	Ile	Gly	Phe	Arg	Gly	Asp
	690		695		700										
Gly	Arg	Thr	Cys	Tyr	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Ser	Glu	Gln	Pro	Ser	Val
705			710		715										
Cys	Gly	Ser	His	Thr	Ile	Cys	Asn	Asn	His	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Cys
	725		730		735										
Glu	Cys	Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Phe	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Ala
	740		745		750										
Val	Val	Asp	Gln	Arg	Pro	Ile	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Gly	Leu	His	Asn
	755		760		765										
Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Arg	Ala	Gln	Cys	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser
	770		775		780										
Tyr	Thr	Cys	Ser	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp	Gly	Gln	Ala	Cys
785			790		795										
Gln	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Gln	Pro	Ser	Arg	Cys	His	Pro	Asp	Ala	Phe
	805		810		815										
Cys	Tyr	Asn	Thr	Pro	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Cys	Lys	Pro	Gly	Tyr
	820		825		830										
Gln	Gly	Asp	Gly	Phe	Arg	Cys	Val	Pro	Gly	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Arg
	835		840		845										
Cys	Gln	His	Glu	Arg	Glu	His	Ile	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Asp
	850		855		860										
Pro	Gln	Arg	Pro	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Phe	Val	Pro	Glu	Cys	Asp	Ala
865			870		875										
His	Gly	His	Tyr	Ala	Pro	Thr	Gln	Cys	His	Gly	Ser	Thr	Gly	Tyr	Cys
	885		890		895										

Trp Cys Val Asp Arg Asp Gly Arg Glu Val Glu Gly Thr Arg Thr Arg
900 905 910

Pro Gly Met Thr Pro Pro Cys Leu Ser Thr Val Ala Pro Pro Ile His
915 920 925

Gln Gly Pro Ala Val Pro Thr Ala Val Ile Pro Leu Pro Pro Gly Thr
930 935 940

His Leu Leu Phe Ala Gln Thr Gly Lys Ile Glu Arg Leu Pro Leu Glu
945 950 955 960

Gly Asn Thr Met Arg Lys Thr Glu Ala Lys Ala Phe Leu His Val Pro
965 970 975

Ala Lys Val Ile Ile Gly Leu Ala Phe Asp Cys Val Asp Lys Met Val
980 985 990

Tyr Trp Thr Asp Ile Thr Glu Pro Ser Ile Gly Arg Ala Ser Leu His
995 1000 1005

Gly Gly Glu Pro Thr Thr Ile Ile Arg Gln Asp Leu Gly Ser Pro
1010 1015 1020

Glu Gly Ile Ala Val Asp His Leu Gly Arg Asn Ile Phe Trp Thr
1025 1030 1035

Asp Ser Asn Leu Asp Arg Ile Glu Val Ala Lys Leu Asp Gly Thr
1040 1045 1050

Gln Arg Arg Val Leu Phe Glu Thr Asp Leu Val Asn Pro Arg Gly
1055 1060 1065

Ile Val Thr Asp Ser Val Arg Gly Asn Leu Tyr Trp Thr Asp Trp
1070 1075 1080

Asn Arg Asp Asn Pro Lys Ile Glu Thr Ser Tyr Met Asp Gly Thr
1085 1090 1095

Asn Arg Arg Ile Leu Val Gln Asp Asp Leu Gly Leu Pro Asn Gly
1100 1105 1110

Leu Thr Phe Asp Ala Phe Ser Ser Gln Leu Cys Trp Val Asp Ala
1115 1120 1125

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

1130 1135 1140
 Arg Lys Ala Leu Glu Gly Leu Gln Tyr Pro Phe Ala Val Thr Ser
 1145 1150 1155
 Tyr Gly Lys Asn Leu Tyr Phe Thr Asp Trp Lys Met Asn Ser Val
 1160 1165 1170

 Val Ala Leu Asp Leu Ala Ile Ser Lys Glu Thr Asp Ala Phe Gln
 1175 1180 1185
 Pro His Lys Gln Thr Arg Leu Tyr Gly Ile Thr Thr Ala Leu Ser
 1190 1195 1200
 Gln Cys Pro Gln Gly His Asn Tyr Cys Ser Val Asn Asn Gly Gly
 1205 1210 1215
 Cys Thr His Leu Cys Leu Ala Thr Pro Gly Ser Arg Thr Cys Arg
 1220 1225 1230

 Cys Pro Asp Asn Thr Leu Gly Val Asp Cys Ile Glu Gln Lys
 1235 1240 1245

 <210> 128
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T22-NID0mut2-H6 (Sequence in figure 13B)
 <400> 128

 Arg Arg Trp Cys Tyr Arg Lys Cys Tyr Lys Gly Tyr Cys Tyr Arg Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Gln Arg Val Asn Gly
 20 25 30

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

85

90

95

Glu Gln Asp Gly Phe Lys Asn Gly Phe Ser Ile Thr Gly Gly Glu Phe

100

105

110

Thr Arg Gln Ala Glu Val Thr Phe Val Gly His Pro Gly Asn Leu Val

115

120

125

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

130

135

140

Asp Thr Glu Leu Glu Gly Arg Val Pro Gln Ile Pro Phe Gly Ser Ser

145

150

155

160

Val His Ile Glu Pro Tyr Thr Glu Leu Tyr His Tyr Ser Thr Ser Val

165

170

175

Ile Thr Ser Ser Ser Thr Arg Glu Tyr Thr Val Thr Glu Pro Glu Arg

180

185

190

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

195

200

205

Ile Thr Phe Gln Glu Cys Val His Asp Asp Ser Arg Pro Ala Leu Pro

210

215

220

Ser Thr Gln Gln Leu Ser Val Asp Ser Val Ser Val Leu Tyr Asn Gln

225

230

235

240

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

245

250

255

Arg Glu Gly Ser Pro Asp Ala Lys His His His His His His

260

265

270

<210> 129

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EPI-X4-(RK)-GFP-H6

<400> 129

Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser Ile Val Arg Trp

1

5

10

15

Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser Arg Lys Arg Lys Arg Lys Gly Gly
 20 25 30
 Ser Ser Arg Ser Ser Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
 35 40 45
 Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser
 50 55 60
 Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu

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

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

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

260 265 270

Tyr His His His His His His

275

<210> 130

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP

<400> 130

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

1 5 10 15

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly

20 25 30

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

35 40 45

Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr

50 55 60

Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His

65 70 75 80

Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr

85 90 95

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

100 105 110

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp

115 120 125

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln

165 170 175

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

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

 225 230 235
 <210> 131
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Optimized EPI-X4 coupled to RKRRKK positively charged peptide
 region
 <400> 131
 Ile Val Arg Trp Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser Ile Val Arg Trp
 1 5 10 15
 Ser Lys Lys Val Pro Cys Val Ser Arg Lys Arg Lys Arg Lys
 20 25 30
 <210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial sequence
 <220><223> EPI-X4
 <400> 132
 Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu

 <210> 133
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> EPI-X4 coupled to RKRRKK positively charged peptide region

<400> 133

Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr

1 5 10 15

Leu Arg Lys Arg Lys Arg Lys

20