



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0055397
(43) 공개일자 2015년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C40B 40/10 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0137700

(22) 출원일자 2013년11월13일

심사청구일자 2013년11월13일

(71) 출원인

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김학성

대전광역시 유성구 지족로 362, 310동 304호 (지족동, 반석마을3단지아파트)

이중재

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3220호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 20 항

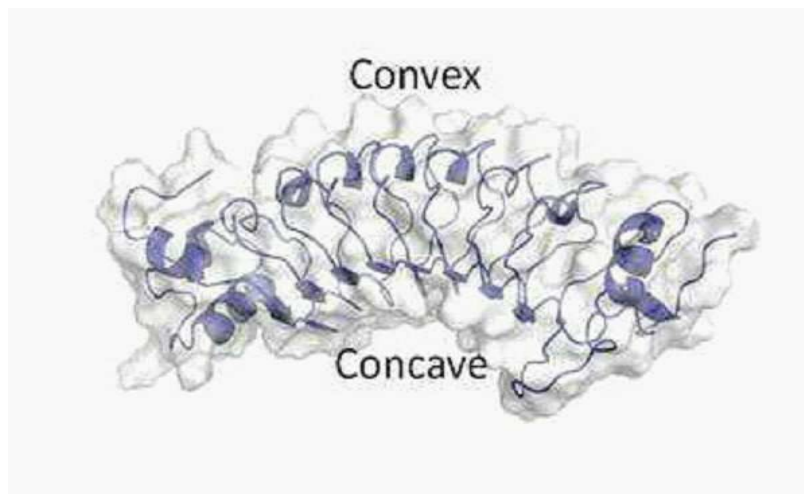
(54) 발명의 명칭 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법

(57) 요약

본 발명은 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법 및 리피바디 단백질 개량을 위한 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것으로, 더욱자세하게는 리피바디 단백질을 구성하는 반복모듈을 순차적으로 변이시키는 모듈 진화방법을 이용한 리피바디 단백질의 개량방법 및 상기 단백질 개량에 사용되는 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것이다.

본 발명에 따른 모듈진화 방법에 의하면, 높은 결합친화도를 가지고 이에 따른 특이도 및 활성이 증가된 개량된 리피바디 단백질을 스크리닝할 수 있어, 타겟물질에 대한 억제제, 치료제 및 분석수단으로 사용되는 리피바디를 개발하는데에 용이하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

경현호

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3220호

최정민

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3220호

황다은

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3220호

정해갑

충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 161, 자기공명팀 (한국기초과학지원연구원)

김현정

충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 161, 자기공명팀 (한국기초과학지원연구원)

조은경

대전광역시 서구 둔산북로 160, 108동 1304호 (둔산동, 한마루아파트)

양철수

대전광역시 서구 가장로 107, 208동 105호 (가장동, 삼성래미안아파트)

육재민

대전 대덕구 대화13길 16, (대화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-2000218

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니아사업

연구과제명 반복단백질의 구조/기능분석 및 기능요소수준에서의 단백질라이브러리 제조

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

2이상의 아미노산으로 구성되는 모듈이 반복되는 반복모듈로 구성되고, 상기모듈의 반복에 의하여, 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 리피바디의 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 가지며, 타겟물질과 결합하는 능력을 가지는 리피바디를 2 이상 포함하고, 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 반복모듈은 2~30개의 모듈이 반복되는 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반복모듈은 서로 직접 연결되는 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 반복모듈은 (폴리)펩타이드 링커에 의해 연결되는 것이 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반복모듈의 N-말단 또는 C-말단은 다른 반복모듈과 다른 종류의 단백질에서 기원한 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 반복모듈의 N-말단은 미생물 유래이고 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping motif)를 가지는 LRR (Leucine rich repeat) 패밀리의 단백질의 N-말단인 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단백질의 N-말단은 서열번호 12 의 아미노산 서열 및 하기의 반복 모듈 패턴으로 구성되는 것인 융합 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.:

LxxLxxLxLxxN

(상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고 N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및 x는 친수성 아미노산이다.)

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단백질은 인터날린, A, 인터날린 B, 인터날린 C, 인터날린 H 및 인터날린 J로 이루어진

군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 반복모듈의 C-말단은 미생물 유래이고, VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 C-말단인 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리..

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 반복모듈은 VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈인 것을 특징으로 하는 리피바디 단백질 라이브러리.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 것이 특징인 리피바디 단백질 라이브러리:

LxxLxxLxLxxN

(상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고 N은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및 x는 임의의 아미노산이다).

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 리피바디 단백질 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리.

청구항 13

제12항의 뉴클레오타이드 라이브러리를 포함하는 벡터 라이브러리.

청구항 14

제13항의 벡터 라이브러리를 포함하는 숙주세포 라이브러리.

청구항 15

다음의 단계를 포함하는 제12항의 뉴클레오타이드 라이브러리를 제작하는 방법:

- (a) 주형 리피바디에서 반복모듈을 확인하고, 상기 반복 모듈에서 타겟과의 상호작용을 고려하여 선택한 부위를 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 결정한 반복모듈을 하나 이상 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 조합을 구축하는 단계.

청구항 16

다음 단계를 포함하는 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법:

- (a) 주형 리피바디에서 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 확인하고, 타겟의 상호작용을 고려하여 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계;

- (b) 상기 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작하는 단계;
- (c) 상기 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계;
- (d) (c) 단계에서 선택된 리피바디의 변이된 부위를 확인하고, 상기 변이 부위의 인접하는 모듈에서 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계;
- (e) 상기 (d) 단계에서 결정된 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작하는 단계;
- (f) 상기 (e) 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계;
- (g) 상기 (d)~(f)를 n회 반복하는 단계.

청구항 17

제16항에 있어서, (b) 단계의 라이브러리는 파아지 디스플레이 방법으로 제작하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 파아지 디스플레이 방법은 주형 리피바디를 코딩하는 DNA를 이용한 오버래핑 PCR 방법에 의한 산물을 파아지 디스플레이하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 타겟물질과 선택된 리피바디가 결합한 복합체의 결합 구조분석을 통하여, 타겟물질과 리피바디의 결합 부위에 추가적인 변이를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 단백질 라이브러리는 제1항 내지 제11항 중 어느 한항의 리피바디 단백질 라이브러린 것을 특징으로하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법 및 리피바디 단백질 개량을 위한 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 리피바디 단백질을 구성하는 반복모듈을 순차적으로 변이시키는 모듈 진화방법을 이용한 리피바디 단백질의 개량방법 및 상기 단백질 개량에 사용되는 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

생체 내에 존재하는 다양한 물질 중에서, 단백질은 생명 현상의 유지 및 기능을 수행하는 거대 분자로서 넓은 범위의 생물학적 역할을 담당하고 있다. 이런 역할을 수행하기 위해서는 우선 단백질-단백질 간 상호작용이 이루어져야 하며, 이는 모든 생명현상의 기초라고 할 수 있다. 만약 단백질 상호작용이 제대로 조절되어지지 않게 되면 체내의 항상성은 망가지게 되어 결과적으로 다양한 질병을 일으키게 된다. 따라서 단백질 상호작용을 인위적으로 조절함으로써 질병을 치료하기 위한 다양한 방법이 연구 및 개발되어 왔으며 실제로 치료 목적에 사용가능한 다양한 의약품들이 성공적으로 개발되어 왔다.

[0003]

항체는 면역반응의 주요단백질로 항원과의 특이적 상호작용을 통해 생물학적 기능을 수행한다. 이런 특이적인

결합력은 기존의 저분자 화학제제와 달리 부작용 없이 높은 치료효과를 가능하게 한다. 따라서, 많은 연구기관과 제약회사들은 다양한 선별기술을 활용하여 잘 알려진 치료제 표적에 대해 결합력을 갖는 항체들을 개발하기 위한 연구를 활발히 진행하고 있다. 최근 수십 년간 개발된 치료용 항체들은 다양한 질병 치료에 높은 효능과 더불어 낮은 부작용을 보여줌으로서 전체 치료제 시장에서 상당한 성공을 이루었으며, 지속적으로 전체 치료제 시장에서 높은 성장세를 유지하고 있다. 또한, 치료용 목적만이 아닌 생체물질의 분리정제 및 분자 의학적 진단 기술 등 다양한 분야에서 폭 넓게 이용되고 있다. 하지만, 이런 장점에도 불구하고 큰 분자량으로 인한 낮은 조직 침투력, 복잡한 생산 공정으로 인한 높은 제품단가, 그리고 기존의 특허에 의한 진입장벽 등의 문제점으로 인해 항체를 이용한 새로운 치료제 개발은 별다른 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 이러한 한계를 극복하고자, 여러 연구단에서는 항체를 대체할 새로운 단백질 골격에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 그 결과, 리피바디(Repebody)라는 단백질이 개발되었다. 상기 Repebody는 LRR(Leucine-rich repeat) 구조를 갖는 인터날린의 N-말단과 상기 VLR의 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨센서스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드를 의미하는데, 상기 Repebody는 대장균에서 수용성 단량체 형태로 대량 발현되기 때문에 생산 단가를 낮출 수 있고, 높은 물리화학적 안정성을 지니고 있어 단백질의 변형이 용이하다. 또한, 연구 개발되지 않은 신규 단백질 골격이기 때문에 기존 특허로부터 자유롭다는 장점을 가지고 있다.

[0004] 그러나, 리피바디를 치료제로 사용할 시의 치료효과, 분석용 항체대체제로 사용할때의 분석 민감도 및 타겟으로의 이동 효율 등을 개선하기 위하여, 타겟물질에 대한 리피바디 단백질의 친화도를 높이는 것은 아직 해결해야 할 과제로 남아 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 리피바디의 타겟물질에의 결합친화도를 높이하고자 예의 노력한 결과, 리피바디 모듈에서 단백질-단백질 상호작용이 일어나는 결합부위의 변이를 변이 라이브러리를 이용하여, 각 모듈별로, 순차적, 반복적으로 수행함으로써, 타겟 물질과의 결합친화도가 현저히 높은 리피바디를 선별할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 단백질 라이브러리를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 반복모듈을 포함하는 리피바디에서 반복모듈에 변이를 포함하는 복수 개의 리피바디를 가지는 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오티드 라이브러리 및 이의 제작방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 뉴클레오티드 라이브러리를 포함하는 벡터 라이브러리 및 상기 벡터 라이브러리를 포함하는 숙주세포 라이브러리를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질에서 타겟물질과의 결합친화도를 높이는 리피바디 단백질의 개량방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2 이상의 아미노산으로 구성되는 모듈이 반복되는 반복모듈로 구성되고, 상기모듈의 반복에 의하여, 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 리피바디의 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 가지며, 타겟물질과 결합하는 능력을 가지는 리피바디를 2 이상 포함하고, 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 단백질 라이브러리를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 2 이상의 아미노산으로 구성되는 모듈이 반복되는 반복모듈로 구성되고, 상기모듈의 반복에 의하여, 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 리피바디의 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 가지며, 타겟물질과 결합하는 능력을 가지는 리피바디를 2 이상 포함하고, 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오티드 라이브러리를 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 뉴클레오타이드 라이브러리를 포함하는 벡터 라이브러리 및 상기 벡터 라이브러리를 포함하는 숙주세포 라이브러리를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 주형 리피바디에서 반복모듈을 확인하고, 상기 반복 모듈에서 타겟과의 상호작용을 고려하여 선택한 부위를 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 결정한 반복모듈을 하나 이상 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 조합을 구축하는 단계를 포함하는 상기 뉴클레오타이드 라이브러리를 제작하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, (a) 주형 리피바디에서 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 확인하고, 타겟의 상호작용을 고려하여 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; (b) 상기 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작하는 단계; (c) 상기 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계; (d) (c) 단계에서 선택된 리피바디의 변이된 부위를 확인하고, 상기 변이 부위의 인접하는 모듈에서 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; (e) 상기 (d) 단계에서 결정된 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작하는 단계; (f) 상기 (e) 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계; 및 (g) 상기 (d)~(f)를 n회 반복하는 단계를 포함하는 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 모듈진화 방법에 의하면, 높은 결합친화도를 가지고 이에 따른 특이도 및 활성이 증가된 개량된 리피바디 단백질을 스크리닝할 수 있어, 타겟물질에 대한 억제제, 치료제 및 분석수단으로 사용되는 리피바디를 개발하는데에 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 리피바디의 전체 단백질 구조를 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 발명에서 선별된 리피바디의 변이위치 및 해리상수그래프를 나타낸 것이다(a:리피바디; B:r-D3, C:r-D3E8; D:r-D3E8C4).

도 3은 모듈을 기반으로 수행한 오버랩핑 PCR 반응의 전체적인 개략도이다. 각 노란색 부분은 가변적인 반복 모듈 (Variable repeat module)로 총 4개가 폴리펩타이드 상 위치한다. 붉게 표시된 선택막대는 실험에 사용된 프라이머이며 상기 프라이머에서의 녹색부분은 NNK 동의코돈이 포함되는 오목한 지역의 서열을 의미한다.

도 4는 repebody와 인터루킨-6이 결합하고 있는 복합체의 결정화 구조를 보여주는 개략도이다.

도 5는 비소세포폐암 세포의 배양액에 폴리펩타이드(D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE)를 처리하여 STAT3 활성 및 인터루킨-6의 생성 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 비소세포폐암 세포에 리피바디(D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE)를 처리한 뒤, MTT 실험을 수행하여 세포의 생존율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 비소세포폐암 세포가 주사된 이중이식 마우스 동물에 폴리펩타이드(D3E8-KE)와 대조군(PBS)을 10일 동안 3일 간격으로 4회 복강 내 주사로 처리한 후 종양 크기의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 비소세포폐암 세포가 주사된 이중이식 마우스 동물에 리피바디(D3E8-KE)와 대조군(PBS)을 15일 동안 3일 간격으로 5회 복강 내 주사로 처리한 후 종양 크기의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 일관점에서, 본 발명은 2 이상의 아미노산으로 구성되는 모듈이 반복되는 반복모듈로 구성되고, 상기모듈의 반복에 의하여, 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 리피바디의 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 가지며, 타겟물질과 결합하는 능력을 가지는 리피바디를 2 이상 포함하고, 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 단백질 라이브러리, 상기 리피바디 단백질 라이브러리를 코딩하는 뉴클레오타이드 라이브러리 및 상기 뉴클레오타이드 라이브러리의 제작방법에

관한 것이다.

- [0018] 리피바디(Repebody)는 자연계에 존재하는 LRR 단백질들과 마찬가지로 보존된 류신 서열을 갖는 반복 단위체(Repeat unit)가 연속적으로 연결되어 전체 단백질 구조를 유지하는 모듈성과 전체 구조의 모양의 곡률로 인한 오목한 지역(Concave region)과 볼록한 지역(Convex region)으로 구별되는 구조적 특징을 갖는다(도 1). 도 1는 Repebody의 전체 단백질 구조를 나타내는 개략도로서, 생체 분자를 인식하는 Concave와 구조 유지에 중요한 Convex지역으로 구분된다. 상기 오목한 지역에는 항체의 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR) 처럼 초가변영역(Hypervariable region)이 위치하여, 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 또한, 볼록한 지역은 잘 보존되어 있는 서열을 바탕으로 LRR의 전체구조의 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 Repebody의 단백질 구조를 분석하여 하기의 같은 방식으로 무작위적인 라이브러리를 설계하였다.
- [0019] 또한, 상기 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 파지미드의 형태가 될 수 있다. 본 발명의 용어 "파지미드"란, 대장균을 숙주로 하는 바이러스인 파지로부터 유래된 원형의 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하는데, 번식과 증식에 필요한 단백질 및 표면 단백질이 서열이 포함되어 있다. 재조합 파지미드는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 파지미드는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있고, 주로 원하는 단백질을 파지의 표면 단백질과 융합하여 파지 표면에 표지하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 파지미드의 프로모터는 주로 유도성이며, 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수도 있다.
- [0020] 본 발명의 목적상 상기 파지미드는 상기 라이브러리를 구성하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현 및 분비하기 위한 신호 서열 또는 리더 서열인 MalEss, DsbAss 또는 PelBss를 포함하고, 파지의 표면에 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위한 히스티딘-태그와 파지 표면으로의 발현을 위한 M13 파지의 표면 단백질의 일종인 gp3 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 반복모듈은 2~30개의 모듈이 반복될 수 있으며, 상기 반복모듈은 서로 직접 연결되거나, (폴리)펩타이드 링커에 의해 연결될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 반복모듈의 N-말단 또는 C-말단은 다른 반복모듈과 다른 종류의 단백질에서 기원한 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 반복모듈의 N-말단은 미생물 유래이고 알파 나선형 캡핑 모티프(capping motif)를 가지는 LRR(Leucine rich repeat) 패밀리 단백질의 N-말단인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 단백질의 N-말단은 서열번호 12의 아미노산 서열 및 하기의 반복 모듈 패턴으로 구성되는 것인 융합 폴리펩타이드인 것을 특징으로 할 수 있다:
- [0024] LxxLxxLxLxxN
- [0025] (상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고 N은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및 x는 친수성 아미노산이다.)
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 단백질은 인터날린, A, 인터날린 B, 인터날린 C, 인터날린 H 및 인터날린 J로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 상기 반복모듈의 C-말단은 미생물 유래이고, VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 C-말단인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 반복모듈은 VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈일 수 있으며, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 것이 특징으로 할 수 있다:
- [0028] LxxLxxLxLxxN
- [0029] (상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고 N은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및 x는 임의의 아미노산이다).
- [0030] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 주형 리피바디에서 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 확인하고, 타겟의 상호작용을 고려하여 랜덤화 시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; (b) 상기 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작하는 단계; (c) 상기 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계; (d) (c) 단계에서 선택된 리피바디의 변이된 부위를 확인하고, 상기 변이 부위의 인접하는 모듈에서 랜덤화시킬 아미노산 잔기를 결정하는 단계; (e) 상기 (d) 단계에서 결정된 아미노산 잔기들이 랜덤화된 반복모듈을 포함하는 단백질 라이브러리를 제작

하는 단계; (f) 상기 (e) 단백질 라이브러리로부터 타겟과의 결합력이 증가한 리피바디를 선택하는 단계; 및 (g) 상기 (d)~(f)를 n회 반복하는 단계를 포함하는 반복모듈을 포함하는 리피바디 단백질의 개량방법에 관한 것이다.

- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 라이브러리는 파아지 디스플레이 방법으로 제작할 수 있으며, 상기 파아지 디스플레이 방법은 주형 리피바디를 코딩하는 DNA를 이용한 오버레핑 PCR 방법에 의한 산물을 파아지 디스플레이 이하는 것을 특징으로할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 타겟물질과 선택된 리피바디가 결합한 복합체의 결합 구조분석을 통하여, 타겟물질과 리피바디의 결합 부위에 추가적인 변이를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 단백질-단백질 결합 부위를 쉽고 효율적으로 조작할 수 있는 모듈타입 조작방법이며, 단백질 결합체의 결합친화도를 높이기 위한 모듈 수준으로의 접근은 전통적인 방법보다 더 효과적이고 간단한 방법이다.
- [0034] 본 발명에서는 모듈-바이-모듈(module-by-module) 방법으로 단백질-단백질 결합부위를 단계적으로 최적화하여, 결합친화도를 피코몰(picomolar) 단위로 높일 수 있는 방법을 개발하였다.
- [0035] 본 발명의 방법은 단백질-단백질 결합 부위를 조절하는데 유용하며, 특히, 구조적으로 상동성 모티프로 구성되는 단백질의 기능적 표면을 확장하고 최적화하는데 유용하다.
- [0036] 최근 무턱무척추동물(jawless vertebrate)의 면역시스템에서 항원에 대한 수용체를 형성하도록 다중 LRR 모듈 재배열하고 조합한 어레이에 대한 연구가 수행된바 있다(Pancer, Z. *et al.* *Nature* 430:174, 2004; Alder, M. N. *et al.*, *Science* 310:1970, 2005).
- [0037] 본 발명의 모듈 진화 방법은 반복적인 라이브러리 제작 경로와 모듈 기반 선택을 포함하는 상기 조합 과정을 포함하는 것이다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서는 인간 IL-6(hIL-6)에 대한 리피바디인 r-D3(K_D=47nM)를 출발물질로하여, 모듈 진화방법을 사용하여, 결합친화도를 397pM까지 높여, 120배로 증가시킨 인간 IL-6 리피바디를 제작하였다.
- [0039] 본 발명의 모듈 진화 방법은 종래 방법보다 상호작용 부위의 정보 없이도 랜덤 잔기를 쉽게 확인할 수 있고, 모듈조합을 통하여 확인된 모티프로 다양한 라이브러리를 효과적으로 제작할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 양태에서는 모듈진화방법으로 제조한 r-D3E8 리피바디와 hIL-6의 결합체인 r-D3E8/hIL6 복합체 형성시에 다중 정전(electrostatic) 및 소수성 상호작용이 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 특히, hIL-6의 α-헬릭스부위의 양전하 잔기(R24, K27 및 R30)가 hIL-6의 높은 결합친화도에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 덧붙여, r-D3E8의 모듈 4 및 모듈 5의 소수성 잔기는 hIL-6와 소수성 상호작용을 일으키고, 이 또한 결합친화도를 높이는 데 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었으며, hIL-6에 대한 결합친화도를 63pM로 최적화시키는 것으로 나타나 모듈 디자인의 효율성을 입증하였다. 두 단백질 사이의 결합부위는 모듈 사이의 낮은 상호작용을 나타내는 모듈라 패션(modular fashion)에서 형성되므로, 모듈-바이-모듈(module-by-module) 접근법은 단백질-단백질 결합부위를 조작하는데 매우 효율적이다.
- [0041] hIL-6 연관 질병치료제로서 단백질 결합체를 개발하기 위해서는, hIL-6가 IL-6Rα 또는 gp130과 결합하여 헥사머릭 복합체를 형성하는 것을 효율적으로 억제할 수 있는 단백질 결합체를 개발하여야 한다.
- [0042] r-D3E8/hIL6 복합체(PDB(protein data bank) ID 4J4L)의 결정구조와 헥사머릭복합체(PDB ID 1P9M)을 비교한 결과, r-D3E8가 IL-6Rα 및 gp130과 결합모드와 많은 수의 항원인식부위 (에피토프; epitope) 잔기가 일치하는 것을 확인하였다. hIL-6의 헬릭스 A 및 헬릭스 D의 Arg30 및 Arg182가 IL-6Rα와의 결합에서 중요하다는 것을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 또다른양태에서 hIL-6 연관 시그널 프로세스에서 리피바디의 강한 저해 효과는 상기 IL-6Rα 및 gp130이 hIL-6에 결합하는 것을 효과적인 억제에 기인하는 것으로 확인되었으며, 이는 본 발명의 리피바디 제조방법을 에피토프가 알려진 hIL-6에 대한 항체를 사용하는 경쟁적 면역분석에도 사용될 수 있다는 것을 시사한다.
- [0044] 본 발명의 또다른 양태에서, 본 발명의 방법으로 제작된 리피바디 r-D3E8-KE는 종양이 증식중인 마우스에 투여 시 종양의 증식을 억제하여 높은 항암 활성을 가지는 것을 확인하였다. 이러한 높은 항암활성은 r-D3E8-KE가 가지는 hIL-6에 대한 높은 결합 친화력(63pM)에 의한 것이며, 이는 본 발명의 모듈 진화방법에 의한 단백질-단백

질 결합부위 조작용의 효용성을 입증하는 것이다.

[0045] 본 발명에서 용어, "인터루킨-6 (IL-6)"은 B세포의 항체생산세포로의 최종분화를 유도하는 B세포자극인자2 (BSF-2) 로 분리한 분자량이 210,000인 당단백질로서, T림프구, B림프구, 대식세포, 섬유아세포 등 여러 세포에서 생산되는 사이토카인의 일종을 의미하는데, 면역응답, 조혈계와 신경계세포의 증식 및 분화, 급성반응, 다양한 세포의 성장과 분화 등에 관여한다.

[0046] 본 발명에서 용어, "Repebody(리피바디)"란, LRR 단백질 구조를 갖는 인터날린 B의 N-말단과 상기 VLR의 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨센서스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드이다. Repebody 단백질은 반복 모듈을 갖는 LRR 패밀리에 속하는 모든 단백질을 상기 방법으로 수용성 발현 및 단백질의 생물리학적 성질을 향상시킨 모든 융합 LRR 패밀리 단백질을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 용어, "인터날린 B 단백질"이란, 리스테리아(Listeria) 균주에서 발현되는 LRR (Leucine-rich repeat) 패밀리 단백질의 일종으로 소수성 코어가 전 분자에 걸쳐서 일정하게 분포되어 있는 LRR 패밀리 단백질들과는 다른 유형의 N-말단 구조 때문에 미생물에서도 안정적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 인터날린 B 단백질의 N-말단은 반복모듈의 접힘 (folding)에 가장 중요한 N-말단 부위가 미생물 유래일 뿐 아니라 그 형태가 알파 나선을 포함하는 더욱 안정적인 모양을 가졌기 때문에 미생물에서 안정적으로 발현되는 것으로 생각되고 있다.

[0048] 본 발명에서 용어, "인터날린 B 단백질의 N-말단"이란, 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 B 단백질의 N-말단을 의미하며 알파 나선형캡핑 모티프(capping motif) 및 인터날린 B 단백질의 반복 모듈을 의미한다. 인터날린 B 단백질의 N-말단은 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 단백질의 N-말단은 제한 없이 포함되나, 그 예로 알파 나선형 캡핑 모티프인"ETITVSTPIKQIFPDFAETIKANLKKKSVTDVATQNE" 및 반복 모듈을 포함할 수 있다. 바람직하게 반복 모듈 패턴은 "LxxLxxLxLxxN"을 포함할 수 있다. 상기 반복 모듈 패턴중 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌, x는 임의의 아미노산을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 융합될 수 있는 LRR 패밀리 단백질의 종류에 따라 높은 구조 유사도를 갖는 N-말단이 선택될 수 있으며 결합 에너지 등의 계산을 통해 가장 안정적인 아미노산을 선택하여 해당 모듈의 아미노산의변이가 가능하다.

[0049] 본 발명에서 용어, "VLR (Variable Lymphocyte Receptor; 가변 림프구 수용체) 단백질"은 먹장어와 칠성장어에서 발현되는 LRR 패밀리 단백질의 일종으로, 먹장어와 칠성장어에서 면역 기능을 수행하는 단백질로서 다양한 항원 물질에 결합할 수 있는 골격으로 유용하게 주목받고 있다. 상기 인터날린 B 단백질의 N-말단 및 VLR 단백질이 융합된 폴리펩타이드는 인터날린 B 단백질이 융합되지 않은 VLR 단백질보다 수용성 및 발현양이 증가하므로, 이를 기반으로 한 신규한 단백질 치료제의 제조에 유용하게 사용될 수 있다. 이와 같은 발현양의 향상은 본 발명의 폴리펩타이드를 이용할 경우 경제성이 크게 향상될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0050] 본 발명에서 용어 "VLR 단백질의 변형된 반복모듈"이란, VLR 단백질의 24개아미노산으로 이루어진 루이신이 일정한 위치에 반복되는 모듈에 있어서, MD-2와 원래 상호작용하는 것으로 알려진 TV3 단백질 중 MD-2와 결합하는 것으로 알려진 중요한 TV3 아미노산을 해당하는 VLR 단백질의 반복모듈에 이식한 것을 의미한다.

[0051] 상기 반복모듈은 보존 패턴으로 "LxxLxxLxLxxN"을 갖고 있으며, 여기서 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 및 트립토판과 같은 소수성 아미노산을, N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌을, x는 임의의 아미노산을 의미한다. 본 발명의 LRR 패밀리 단백질은 이미 그 서열이 알려져 있거나, 생체에서 새로 유도된 mRNA나 cDNA를 이용하여 찾아낸 것 뿐 아니라, 컨센서스 디자인 (consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 용어, "LRR(Leucine rich repeat) 단백질"이란, 루이신이 일정한 위치에 반복되는 모듈의 조합으로 이루어진 단백질을 의미하는 것으로, (i) 하나 이상의 LRR 반복 모듈을 갖고 있고, (ii) 상기 LRR 반복 모듈은 20 내지 30개의아미노산으로 이루어져 있고, (iii) LRR 반복 모듈은 보존 패턴으로 "LxxLxxLxLxxN"을 갖고 있으며, 여기서 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 및 트립토판과 같은 소수성 아미노산을, N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌을, x는 임의의 아미노산을 의미하며, (iv) LRR 패밀리 단백질은 말발굽과 같은 삼차원 구조를 갖고 있는 단백질을 의미한다. 본 발명의 LRR 패밀리 단백질은 이미 그 서열이 알려져 있거나, 생체에서 새로 유도된 mRNA나 cDNA를 이용하여 찾아낸 것 뿐 아니라, 컨센서스 디자인(Consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구

조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

- [0053] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 라이브러리가 코딩하고, 2이상의 아미노산으로 구성되는 모듈이 반복되는 반복모듈로 구성되고, 상기 모듈의 반복에 의하여, 생체분자를 인식하는 콘케이브(Concave) 부위와 리피바디의 구조를 유지하는 콘벡스(convex) 부위를 가지며, 타겟물질과 결합하는 능력을 가지는 리피바디를 2 이상 포함하고, 상기 리피바디의 반복모듈 위치에서 적어도 하나 이상의 아미노산이 서로 다른 복수의 리피바디로 구성된 리피바디 단백질 라이브러리에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명에서 용어, “변이”, “변형”이란 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되는 것을 모두 포함하나, 종기로는 기존의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것일 수 있다.
- [0055] 또다른 관점에서, 본 발명은 또한, 상기 뉴클레오타이드 라이브러리를 포함하는 벡터 라이브러리 및 상기 벡터 라이브러리를 포함하는 숙주세포 라이브러리에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에서 용어, “벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 벡터는 적당한 숙주내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 pACYC177, pCL, pCC1BAC 벡터를 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 용어 “재조합 미생물”이란, 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 벡터가 숙주세포에 도입되거나, 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 미생물에 도입되어 폴리뉴클레오타이드가 염색체에 통합되어 목적 단백질을 발현시키도록 형질이 감염된 세포를 의미하며, 진핵세포, 원핵세포 등의 모든 세포가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포가 될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 용어 “형질전환”이란, 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하거나 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포의 염색체에 통합 완성시켜 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내에 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.
- [0060] 상기 방법에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 단계는 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행됨이 바람직하고, 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 염기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH(pH 5 내지 9, 바람직하게는 pH 6 내지 8, 가장 바람직하게는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있으며, 배양온도는 20 내지 45, 바

람직하게는 25 내지 40를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 동안 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 리피바디는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[0061]

아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으며; 인 공급원으로서 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

[0062]

본 발명의 상기 배양 단계에서 제조된 리피바디를 회수하는 방법은 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 리피바디를 수집할 수 있다.

[0063]

실시예

[0064]

이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한, 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0065]

실시예 1: 무작위적인 Repebody 라이브러리 선별을 위한 phagemid 설계

[0066]

발명의 구성요소로서 Repebody로 이름 붙인 단백질 골격을 사용하였다. 상기 골격은 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR 단백질의 C-말단을 포함하는 LRR 부분이 융합된 수용성 폴리펩타이드로 서열번호 1과 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0067]

실시예 1-1: 신호 서열을 이용한 주변세포질에서의 Repebody 발현

[0068]

Repebody가 파지 디스플레이에 적용가능한지를 알아보기 위해서는 숙주로 사용될 대장균의 주변세포질 발현(Periplasmic expression) 확인과 파지의 표면 입자에 단백질이 제대로 발현되었는지를 확인해야 한다. 이를 위하여, pMAL-c2x(NEB, USA) 벡터를 이용하여 구별되는 신호 폴리펩타이드인 MaIE 와 DsbA 신호서열을 개시코돈 바로 뒤에 삽입한 두 개의 재조합 벡터를 제작하였다. 그런 다음, 상기 신호서열과 종결코돈 사이에 Repebody와 히스티딘-태그가 융합된 DNA를 삽입하여 최종 벡터를 완성하였다. 완성된 두개의 벡터를 대장균 XL1-blue 균주에 도입하여 형질전환체를 제작하고, 상기 형질전환체를 흡광도(OD600)가 0.5에 도달할 때까지 배양한 다음, 0.1mM IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 처리하여 단백질의 발현을 유도한 다음, 다시 30℃에서 16시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 원심분리하여 균체를 수득하고, 상기 균체에 초음파를 처리하여 수용성 단백질 분획을 수득하였다.

[0069]

수득한 수용성 단백질 분획을 Ni-NTA(Nickel-nitrilotriacetic acid) 레진에 적용하여 정제한 후, SDS-PAGE 분석을 통해서 생산된 Repebody의 주변세포질에서의 발현량을 확인하고, DsbA 신호서열에 비해 MaIE 신호서열이 좀 더 높은 주변세포질 발현율을 나타냄을 확인하였다.

[0070]

실시예 1-2: 파지 표면에서의 Repebody 발현을 위한 파지미드 제작

[0071]

상기 실시예 1-1에서 최종 결정한 MaIE 신호서열을 바탕으로 파지미드를 설계하였다. 파지미드는 pTV118N(Takara, Japan)을 기본으로 하여, 개시코돈 바로 뒤에 MaIE 신호서열을 삽입하였으며 이어 Repebody와 히스티딘-태그가 융합된 DNA를 추가하도록 제작하였다. 아울러, 여러 파지 표면 단백질 중에서 비교적 크기가

큰 단백질을 표지할 수 있는 gp3를 이용했으며 C-말단을 엠버코돈 (Amber codon)을 뒤에 두었으며 최종적으로 두 개의 연속적인 종결코돈을 삽입하여 pBEL118N(서열번호 2)으로 명명되는 파지미드를 완성하였다. 상기 파지미드는 XL1-Blue에 도입하여 형질전환체를 제작하였고, 상기 제작된 형질전환체는 0.5mM IPTG를 처리하는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 배양하고, 이를 원심분리하여 배양액을 수득하였다.

상기 배양액을 폴리에틸렌글리콜 침강법에 적용하여 파지를 정제하였다.

상기 파지를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과, 상기 파지의 표면에 Repebody가 발현됨을 확인하였다.

실시예 2: 모듈 진화 방법에 의한 단백질 결합 부위의 조작

실시예 2-1 1차 라이브러리 제작

리피바디의 오목한 지역(concave region)에는 항체의 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR) 처럼 초가변영역(Hypervariable region)이 위치하여, 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 또한, 볼록한 지역(convex region)은 잘 보존되어 있는 서열을 바탕으로 LRR의 전체구조의 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 Repebody의 단백질 구조를 분석하여 하기의 같은 방식으로 모듈 순차적 랜덤 라이브러리를 제작하였다.

구체적으로, 리피바디의 오목한 지역의 모듈 3 및 모듈 4에 위치하는 세군데의 파변이 사이트(8, 10, 11 위치)에 무작위 변이를 유도하기 위하여, 라이브러리를 제작하였다(도 2의 a).

상기 선택한 아미노산을 NNK 동의코돈(Degenerate codon)으로 치환하고, 나머지 볼록한 지역의 염기서열을 잠재성 돌연변이(Silent mutation)를 포함하도록 구성하여, 라이브러리를 구축하기 위한 돌연변이 유발 프라이머(Mutagenic primer)를 합성하였다.

모듈 2 변이유발 프라이머: CGA GAT GTC ATG CAG TTT GTT MNN MNN CAG MNN CAG MNN ACG AAC ATT CGG CAG ATA CTG (서열번호 3)

모듈 3 변이유발 프라이머: TTT ATC AAA CAC GCC GTT CGG CAG GCT CTG CAG TTG GTT MNN MNN CAG MNNCAG ATA CGT CAG ATT GGT CAG TTC TTT CAG TGC CGA GAT GTC ATG (서열번호 4)

모듈 4 변이유발 프라이머: TTT GTC GAA CAC ACC ATC CGG CAG AGA CTG CAG TTG ATT MNN MNN CAG MNN CAG TTC TTT CAG GTT CGT CAG TTT ATC AAA CAC GCC GTT

CGG CAG(서열번호 5)

모듈 5 변이유발 프라이머: CTT ATC GAA GAC ACC TTT CGG CAG ACT CTG CAG TTG GTT MNN MNN CAG MNN CAG MNN CGT CAG GTT GGT CAG TTT GTC GAA CAC ACC ATC CGG (서열번호 6)

이어, 상기 프라이머들을 이용하여 두 모듈에 대한 겹침 중합효소 연쇄 반응(Overlap PCR) 을 수행하며 라이브러리 DNA를 수득하고(도 3), 상기 파지미드 pBEL118N에 삽입하여 최종적인 라이브러리 파지미드를 확보하였다. 도 3은 모듈을 기반으로 수행한 오버랩 PCR의 전체적인 개략도이다. 각 노란색 부분은 가변적인 반복 모듈(Variable repeat module)로 총 4개가 폴리펩타이드 상 위치한다. 붉게 표시된 선행막대는 실험에 사용된 프라이머이며 상기 프라이머에서의 녹색부분은 NNK 동의코돈이 포함되는 오목한 지역(concave region)의 서열을 의미한다.

상기 확보된 라이브러리를 전기천공법(electroporation)으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환체를 수득함으로써, 1.8×10^8 수준의 합성적 다양성을 갖는 라이브러리를 구축하였다.

실시예 2-2: 파지 디스플레이를 이용한 IL-6 특이적 결합 단백질 선별

실시예 2-1에서 구축한 라이브러리를 실시예 1-1의 방법으로 배양하고, Repebody가 표면에 발현된 파지를 실시예 1-2의 방법으로 선별하여 정제하였다. IL-6와 결합할 수 있는 후보를 선별하기 위하여, IL-6를 면역튜브(Immuno-tube)에 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하고, 4°C에서 12시간동안 코팅하였다. 상기 코팅된 면역튜브를 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA와 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA)으로 4°C에서 2시간동안 블로킹(Blocking)하였다. 그런 다음, 상기 정제된 파지를 10^{12} cfu/ml의 농도로 상기 코팅된 면역튜브에 가하고, 상온에서 2시간

반응시켰다. 반응이 종료된 후, 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBS)으로 총 2분간 5번씩 및 PBS로 2번 세척하였다. 마지막으로, 1ml 0.2M Gly-HCl(pH2.2)를 상기 면역튜브에 가하고, 상온에서 10분간 반응시킴으로써, IL-6와 결합할 수 있는 후보를 표면에 발현시킨 파지를 용출시켰다. 상기 용출액에 60 μ l의 1.0M Tris-HCl(pH9.1)를 가하여 중화시키고, 숙주세포인 10ml 대장균 XL1-Blue 용액(OD600 = 0.5)에 가한 다음, 2xYT 플레이트에 도말하는 바이오패닝(Bio-panning) 과정을 4회 반복하여 수행하였다. 그 결과, 각 패닝 과정을 통해 IL-6와 특이적으로 결합하는 파지가 농축됨을 확인하였다. 상기 결과는 IL-6와 결합하는 라이브러리 파지가 특이적으로 증가함을 의미하는 것으로 분석되었다.

실시예 2-3: 선별된 Repebody의 IL-6에 대한 특이적인 결합여부 확인 및 서열 분석

상기 실시예 2-2의 방법을 통하여 선별된 파지를 IL-6와 BSA가 코팅된 96-웰플레이트를 이용하여 ELISA를 수행함으로써, BSA 대비 IL-6의 흡광도(OD450)가 10배 이상 높은 84개의 Repebody 후보들을 선별하고, 이들 각각의 아미노산 서열을 확인한 후, 공통서열(Consensus sequence)을 확인하기 위해서 WebLogo를 수행하였다. 그 결과, 상기 선별된 파지에서 발현되는 IL-6와 특이적으로 결합하는 단백질의 아미노산 서열 중에서 돌연변이의 빈도가 높은 잔기가 존재함을 확인하였다.

즉, 91번 아미노산인 이소류신이 트립토판, 발린 또는 트레오닌으로 치환되고, 93번 아미노산인 트레오닌이 아르기닌 또는 글루탐산으로 치환되며, 94번 아미노산인 글리신이 알라닌, 세린 또는 프롤린으로 치환되고, 115번 아미노산인 발린이 발린 (침묵돌연변이), 세린, 알라닌 또는 아스파라긴으로 치환되며, 117번 아미노산인 발린이 리신 또는 트립토판으로 치환되고, 118번 아미노산인 글루탐산이 아르기닌, 리신 또는 류신으로 치환됨을 확인하였다.

상기 결과는 IL-6와 결합하는데 중요한 역할을 수행하는 잔기가 존재함을 의미하는 것으로 분석되었다.

실시예 2-4: 인터루킨-6에 대한 특이적인 결합 Repebody의 특성 분석

상기 실시예 2-3에서 수행한 ELISA 결과를 바탕으로 앞에서 얻어진 Repebody 후보들 중에 IL-6에 대한 흡광도가 가장 좋게 나타난 후보들의 해리상수(Dissociation constant)를 측정하였다. 구체적으로, PBS에 0.2mM(6mg/ml)로 용해된 Repebody와 PBS에 0.02mM(0.5mg/ml)로 용해된 IL-6를 사용하고, 등온열량측정기(Isothermal titration calorimetry, ITC)를 이용하여, 상온에서 IL-6에 대한 후보 리피바디의 해리상수를 측정하였다(표 1).

표 1

Clone	Module 3			Module 4			K _D (nM)	Clone	Module 3			Module 4		
	126	128	129	150	152	153			126	128	129	150	152	153
WT	I	T	G	V	V	E		WT	I	T	G	V	V	E
r-B10	V	D	P	S	W	T		r-F3	T	E	P	Q	W	A
r-H8	P	D	G	V	T	S		r-H5	V	E	P	A	W	L
r-F7	V	D	P	S	W	T		r-G5	D	I	R	G	N	T
r-A1	T	E	P	N	W	L		r-H3	G	K	S	F	D	L
r-D10	T	E	V	Q	W	I		r-A4	D	L	D	E	M	F
r-D3	T	E	P	Q	W	A	47	r-F9	R	L	A	Y	S	P
r-D7	V	E	P	A	W	I		r-G12	G	P	T	R	V	N
r-C5	T	E	P	S	W	T		r-B9	T	Q	P	N	A	G
r-B4	V	E	P	S	W	L		r-C11	W	R	S	V	K	R
r-E11	V	E	S	S	W	P		r-E10	W	R	S	V	K	R
r-E12	V	E	P	A	W	S		r-D12	W	R	S	V	K	R
r-A3	V	E	P	A	W	T		r-D2	W	R	S	V	K	R
r-A2	T	E	P	S	W	L		r-A12	W	R	A	V	K	R
r-C4	T	E	P	S	W	T		r-E5	W	R	A	V	K	R
r-F1	T	E	P	S	W	F		r-E1	W	R	A	V	K	R
r-C2	T	E	P	N	W	P		r-E4	W	R	A	V	K	R
r-E8	T	E	P	N	W	P		r-A6	W	R	A	V	K	R
r-C7	T	E	P	N	W	P		r-B6	W	R	A	V	K	R
r-C8	V	E	P	A	W	L	90	r-B11	W	R	A	V	K	R
r-A5	V	E	P	S	W	M		r-B5	W	R	A	V	K	R
r-B1	V	E	P	N	W	L		r-C3	W	R	A	V	K	R
r-B2	V	E	P	N	W	L		r-E6	W	R	A	V	K	R
r-D1	V	E	P	A	W	L		r-B8	W	R	A	V	K	R
r-E3	V	E	P	A	W	L		r-D6	W	R	A	V	K	R
r-B3	V	E	P	A	W	I	49	r-D5	W	R	G	V	K	R
r-B7	T	E	P	S	W	L		r-D8	W	R	A	V	K	K
r-C9	V	E	P	N	W	S		r-C10	W	R	A	V	K	R
r-C1	V	E	P	S	W	P		r-E9	W	R	S	V	K	R
r-D11	V	E	P	S	W	S		r-A10	W	R	A	V	K	R
r-F10	V	E	S	S	W	P		r-E2	W	R	A	V	K	K
r-G4	V	E	P	A	W	L		r-G9	W	R	A	V	K	R
r-F11	T	E	P	S	W	M	117	r-H7	T	R	R	T	K	A
r-G8	V	E	P	A	W	L		r-G2	W	R	A	V	K	K
r-G3	R	E	W	H	Y	E		r-F12	W	R	A	V	K	R
r-H1	V	E	P	N	W	L		r-F5	W	R	A	V	K	R
r-H10	V	E	P	S	W	L		r-G1	T	V	I	S	N	R
r-H2	V	E	P	A	W	L		r-C6	V	W	P	D	V	V
r-A7	T	E	P	S	W	V		r-H9	S	Y	S	P	L	A
r-F8	V	E	P	N	W	L		r-G11	W	Y	P	P	P	R
r-A9	V	E	P	N	W	L		r-F2	D	Y	V	V	V	E
r-F4	V	E	P	N	W	L		r-G6	D	Y	V	V	V	E

[0094]

[0095]

상기 4종의 후보 중에서 IL-6에 대한 Repebody-D3의 해리상수(KD)는 47nM이고, Repebody-B3의 해리상수(KD)는 48nM이며, Repebody-C8의 해리상수(KD)는 90nM이고, Repebody-F11의 해리상수(KD)는 117nM임을 확인하였다. 따라서, 상기 4종의 후보 중에서 Repebody-D3(서열번호 7)가 가장 효과적으로 IL-6에 결합할 수 있음을 알 수 있었다.

[0096]

실시예 2-5: 모듈진화를 위한 2차 라이브러리 제작

[0097]

실시예 2-4에서 선별된 r-D3 리피바디의 추가 개량을 위하여, 모듈-바이 모듈 방법으로, 2차 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리의 제작은 실시예 2-1과 동일한 방법을 사용하였으며, r-D3 리피바디의 모듈 5의 4개 위치(β -스트랜드의 는 6, 8, 10 및 11 위치)를 랜덤 변이 시켰다.

[0098]

실시예 2-2 및 2-3과 동일한 방법으로, hIL-6와 결합친화도가 높은 리피바디 r-D3E5, r-D3E8 및 r-D3E10을 선별하였고, 이들 중 결합친화도가 2.5nM로 가장 높은 r-D3E8(서열번호 8)를 선별하였으며, 이는 r-D3와 비교하였을때, 20배로 높은 결합친화도를 가지는 것이다(표 2 및 도 2c).

표 2

Clone	Substituted residues														K _D (nM)	IC ₅₀ (uM)
	Module 2				Module 3			Module 4			Module 5					
	102	104	106	107	126	128	129	150	152	153	172	174	176	177		
<i>First round (library module: 3, 4)</i>																
r-D3	Y	A	G	G	T	E	P	Q	W	A	Y	N	A	H	47 ± 3	1.5
<i>Second round (library module: 5)</i>																
r-D3E8														F	2.5 ± 0.5	1.32
r-D3E5											M			F	9.0 ± 0.9	
r-D3E10														W	13 ± 1.7	
<i>Third round (library module: 2)</i>																
r-D3E8C4	K	T	V	S											0.40 ± 0.08	0.51
r-D3E8B2		T	V	Q											1.18 ± 0.11	
r-D3E8B3		T	Q	S											0.95 ± 0.13	
r-D3E8C9			S	S											0.54 ± 0.12	
r-D3E8H2		L	R	S											1.04 ± 0.09	

이는 r-D3에서 H177F의 단일변이만으로 hIL-6와 결합친화도를 현저히 상승시킬 수 있다는 것을 의미한다.

실시예 2-6: 모듈진화를 위한 3차 라이브러리 제작

실시에 2-5에서 선별된 r-D3E8 리피바디의 추가 개량을 위하여, 모듈-바이 모듈 방법으로, 3차 라이브러리를 제작하였다. 라이브러리의 제작은 실시예 2-1과 동일한 방법을 사용하였으며, r-D3E8 리피바디의 모듈 1의 4개 위치를 랜덤 변이 시켰다.

실시에 2-2 및 2-3과 동일한 방법으로, hIL-6와 결합친화도가 높은 리피바디 r-D3E8C4, r-D3E8B2, r-D3E8B3, r-D3E8C9 및 r-D3E8H2를 선별하였고, 이들 중 결합친화도가 397nM로 가장 높은 r-D3E8C4(서열번호 9)를 선별하였으며, 이는 r-D3와 비교하였을때, 118배로 높은 결합친화도를 가지는 것이다(표 2 및 도 2d).

실시예 3: 복합체 구조를 기반으로 rebody의 결합력 증가를 위한 합리적 설계 수행

상기 실시예 2에서 확보한 rebody-D3E8 (서열번호 8)을 합리적 설계를 위한 폴리펩타이드로 사용하였다. 상기 폴리펩타이드 rebody-D3E8는 해리상수가 2.5nM 이 되는 친화력을 바탕으로 IL-6와 결합한다.

실시예 3-1: Repebody/IL-6 복합체 구조 확보

합리적 설계를 위한 과정으로, repebody-D3E8과 IL-6를 대장균에서 발현하였다. Ni-NTA 컬럼과 겔침투크로마토그래피 (Gel permeation chromatography, GPC)를 이용하여 폴리펩타이드 repebody-D3E8를 순수하게 정제한 이후, 총 60mg/ml의 농도조건으로 복합체를 Crystallization Buffer (0.1M Magnesium formate, 15-18% PEG3350)와 섞서 17도의 조건에서 반응하여 결정구조를 확보하였다. 이를 X-선 회절 분석 (X-ray Diffraction) 방법으로 상기 복합체 구조를 관찰하였다 (도 4, 해상도: 2.3Å).

실시예 3-2: 복합체 구조를 바탕으로 단백질 간 상호작용 분석

실시예 3-1에서 수행하여 얻어진 복합체 구조를 바탕으로 repebody의 각 잔기를 분석하였으며 그 결과, 정전기 상호작용 (Electrostatic interaction) 이 결합력에 관련된 주된 요소임을 알 수 있었다. 정전기 상호작용을 최적화하면 단백질 간의 친화력을 증가시킬 수 있을 것이라 판단하여, 본 발명자들은 복합체 구조에서 IL-6와 근접하게 위치하고 있는 repebody의 잔기의 결합형태 (Interaction type)를 분석하였다.

실시예 3-3: 구조 분석결과를 바탕으로 rebody의 친화력 증가를 위한 합리적 설계

실시예 3-2의 분석결과를 바탕으로 본 발명자들은 repebody의 잔기들의 정전기 상호작용을 최적화시키는 과정을 수행하였다. IL-6에 근접한 repebody의 아미노산 중에서 82번 이소류신과 84번 아스파라긴은 음전화를 갖는

글루탐산에 가까이 위치함을 확인하였다. 따라서 82번과 84번 아미노산 각각을 양전하를 갖는 리신으로 치환하였다. 등온열량측정기 (Isothermal titration calorimetry, ITC)를 이용하여 이 돌연변이들의 IL-6와의 친화력 변화를 관찰하였다 (표 3). 126번 잔기인 트레오닌의 경우, 152번 트립토판으로 구성된 소수성 부위와 인접하여 있기 때문에 보다 향상된 소수성 결합을 유도하기 위해서 발린으로 치환하였다. 또한, 222번 아르기닌과 244번 타이로신의 경우, 각각 양전하를 갖는 잔기인 아르기닌과 리신이 근접하게 위치하고 있어, 잔기의 길이가 비교적 길며 동시에 음전하를 띄고 있는 글루탐산으로 치환하였다. 상기의 구조 분석 결과를 토대로 정전기 상호작용을 최적화시키는 합리적인 설계 방식을 바탕으로 84번 아스파라긴을 제외한 모든 repebody들이 50 내지 9300pM 수준의 해리상수(Dissociation constant)를 가진다는 것을 확인하였다. 즉 IL-6에 대하여 향상된 결합력을 가짐을 확인하였다. 그 중에서도, repebody-D3E8-KE (서열번호 10)은 해리상수가 63 ± 14 pM인바, 효과적으로 인터루킨-6에 결합할 수 있음을 확인하였다.

표 3

Repebody	Mutation	Interaction Type	K_D (pM)	상승배수	IC_{50} (nM)
	Rb-D3E8		2470 ± 45	1.0	1323
D3E8 (I82K)	I82K	Ionic	117 ± 51	21	34.3
D3E8 (N84K)	N84K	Ionic	9259 ± 1714	0.27	
D3E8 (T126V)	T126V	Hydrophobic	240 ± 153	10	
D3E8 (R222E)	R222E	Ionic	214 ± 26	12	
D3E8 (Y244E)	Y244E	Ionic	236 ± 66	10	
D3E8 (I82K, T126V)	I82K, T126V		2500 ± 358	1.0	
D3E8-KE (D3E8(I82K, R222E))	I82K, R222E		63 ± 14	39	2.1

실시예 4: 비소세포페암 세포 폴리펩타이드 처리

상기의 결합력이 향상된 repebody들의 생물학적 활성도를 평가하기 위하여 상기 repebody의 IL-6 활성저해 효과를 확인하였다.

실시예 4-1: 비소세포페암 세포 배양

먼저, 사람 유래 비소세포페암 (H1650) 세포주를 배양액 [RPMI(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin G (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)]에 1×10^5 /ml의 농도로 부유시켜, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 100파이 세포 배양 dish에 배양하였다.

실시예 4-2: 폴리펩타이드(리피바디) 처리

실시예 4-1에서 준비한 비소세포페암 세포 배지 내에, 실시예 2에서 선발한 repebody-D3E8(I82K) (서열번호 11), repebody-D3E8C4 (서열번호 9) 및 실시예 3에서 선발한 repebody-D3E8-KE (서열번호 10)과 repebody-D3E8 (서열번호 8), repebody-D3 (서열번호 7)을 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도로 첨가하였다. 대조군으로, 항-인터루킨-6 단일클론 항체와 아이소타입 컨트롤을 1 mg/ml의 농도로 첨가하여 18 시간 처리하였다.

실시예 4-3: STAT3 와 인터루킨-6에 대한 리피바디의 영향 분석

상기 실시예 4-2에서 리피바디를 처리한 비소세포페암 세포의 배양액은 수집하여 인터루킨-6 효소면역측정을 수행하였고, 세포는 수집하여 STAT3 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과는 도 5에 도시하였다.

도 5에 나타난 바와 같이, 리피바디의 처리에 의하여 세포 내의 STAT3의 활성(P-STAT3) 및 인터루킨-6 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명에 따라 선발된 D3E8(I82K) (서열번호 11), D3E8-KE (서열번호 10)는 세포 내의 STAT3의 활성(P-STAT3) 및 인터루킨-6 생성 억제 효과가 다른

repebody (D3, D3E8)에 비하여 우수하다는 것을 확인할 수 있으며, 그 중에서도 D3E8-KE (서열번호 10)은 대조군인 항-인터루킨-6 단일클론 항체와 비슷한 억제능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0123] **실시예 5 : 세포 생존율에 대한 리피바디의 영향 분석**

[0124] 실시예 4-2에서 폴리펩타이드와 대조군을 각각 1 mg/ml의 농도로 처리한 비소세포페암 세포에 대하여 MTT 실험을 수행하여 세포의 생존율을 확인하였다. 폴리펩타이드와 대조군들을 1일 간격으로 총 4일 동안 처리한 비소세포페암 세포의 배양액을 제거한 후, 세포에 MTT tetrazolium 용액을 4시간 동안 반응 시켰다. 용액을 제거한 후, DMSO를 첨가하여 15-20분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 파장 540nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 6에 도시하였다.

[0125] 그 결과, D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE 순서로 세포 생존율이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 repebody D3E8-KE (서열번호 10)는 대조군인 항-인터루킨-6 단일클론 항체와 비슷한 세포 사멸능을 나타냄을 확인할 수 있었다. 즉, 도 5와 도 6의 결과로부터, 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 처리에 의하여 비소세포페암 세포에서의 세포 사멸능이 유도됨을 확인할 수 있었다.

[0126] **실시예 6 : 이종이식 마우스모델에 대한 리피바디의 영향 분석**

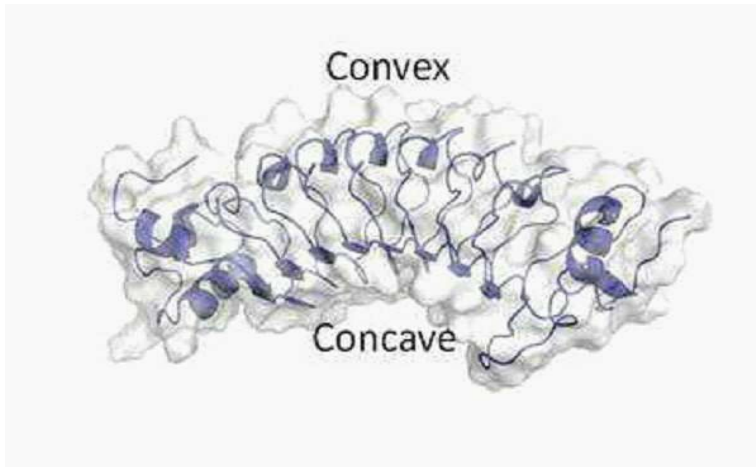
[0127] 비소세포페암 세포 5×10^6 을 누드 마우스 우측에 피하주사하여 이종이식 마우스 모델을 구축한 후, 리피바디 D3E8-KE (서열번호 10)를 10 mg/kg로 10일 동안 3일 간격으로 4번 복강 내 주사하였다. 대조군으로는 PBS를 사용하였다. 종양의 크기를 3일 간격으로 측정하여, $(\text{길이} \times \text{너비}^2)/2$ 로 계산하여 분석하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 그 결과, D3E8-KE (서열번호 10)를 처리한 군에서의 종양의 크기가 확연하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 별도로, 비소세포페암 세포 이종이식 마우스 모델에 리피바디를 처리하여 종양 사멸능을 분석하여 종양에 대한 폴리펩타이드의 영향을 분석하되, 먼저 15일간 종양을 활발히 자라게 한 후에 D3E8-KE를 10 mg/kg의 농도로 15일 동안 3일 간격으로 5회 복강 내 주사하였다. 대조군으로는 PBS를 사용하였다. 종양의 크기를 3일 간격으로 측정하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8로부터, D3E8-KE를 처리한 경우, 활발히 자라는 종양의 크기가 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

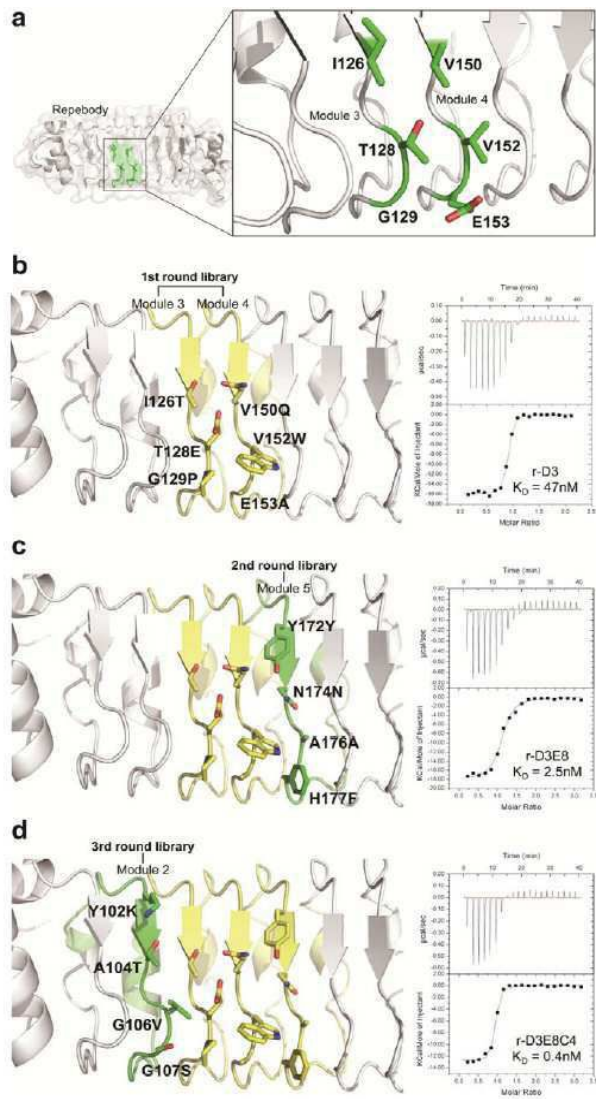
[0129] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

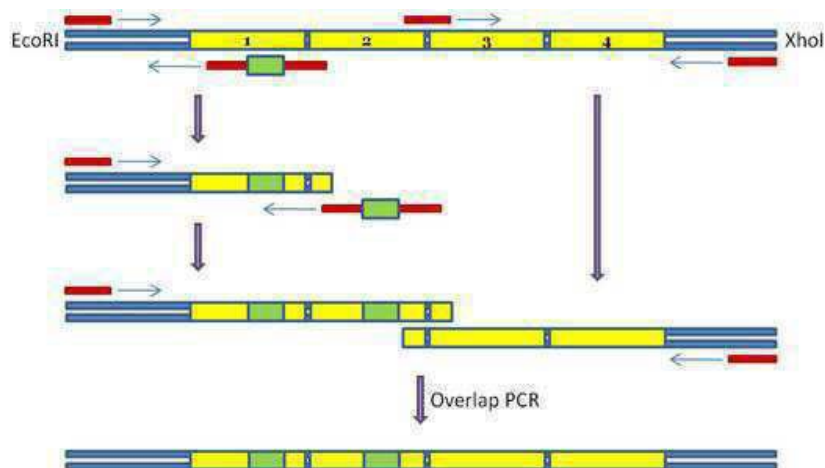
도면1



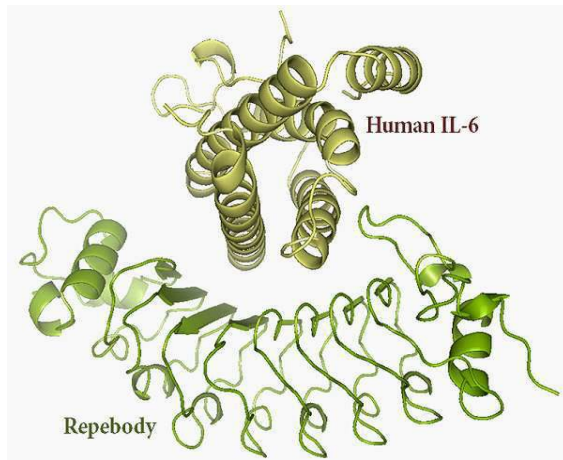
도면2



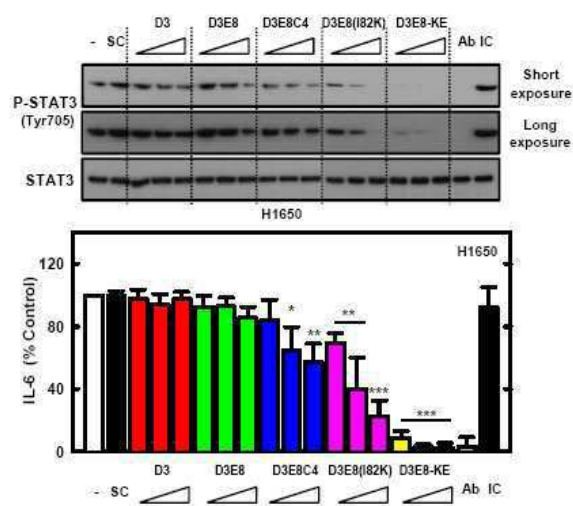
도면3



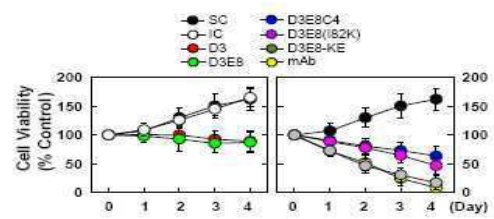
도면4



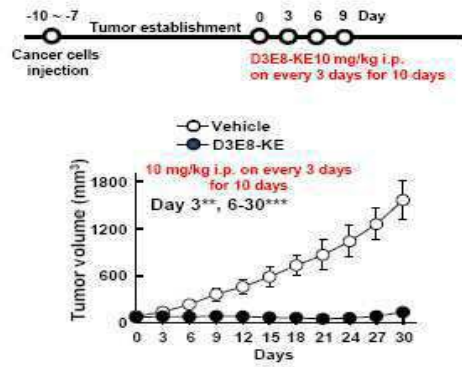
도면5



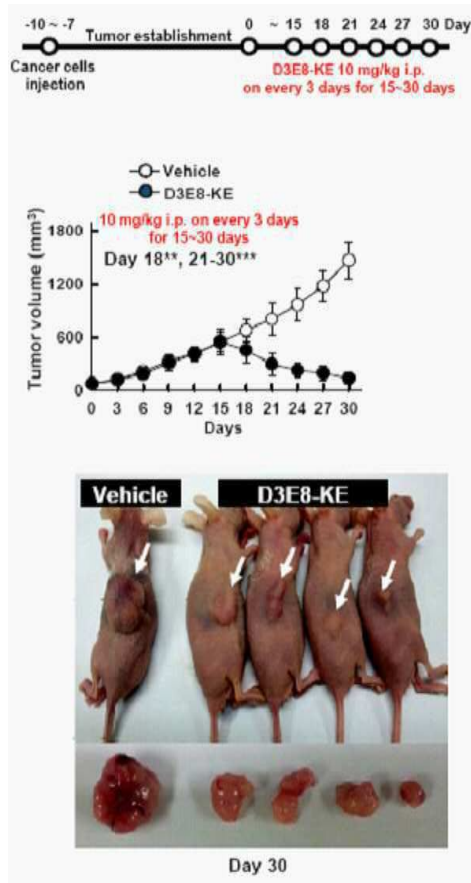
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> Method for Improving Repebody Containing Repeat Module
- <130> P13-B182
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-MD2

<400> 1

Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp

1 5 10 15

Ala Phe Ala Glu Thr Ile Lys Ala Asn Leu Lys Lys Lys Ser Val Thr

20 25 30

Asp Ala Val Thr Gln Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Ile Ile Ala

35 40 45

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

50 55 60

Val Arg Tyr Leu Ala Leu Gly Gly Asn Lys Leu His Asp Ile Ser Ala

65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Ile Leu Thr Gly Asn Gln

85 90 95

Leu Gln Ser Leu Pro Asn Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Lys

100 105 110

Glu Leu Val Leu Val Glu Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val

115 120 125

Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala His Asn Gln

130 135 140

Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr

145 150 155 160

Glu Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Glu Gly Val

165 170 175

Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Gln Asn Gln

180 185 190

Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln

195 200 205

Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile

210 215 220
 Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn
 225 230 235 240
 Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly

245 250 255
 Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr

260 265

<210> 2

<211> 4615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pBEL118N

<400> 2

acatgttctt tectgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 60

gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaag 120

cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 180

gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacga attaattga 240

gttagctcac tcattagca cccaggtt tacactttat gttccggct cgtatgtgt 300

gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag accatggcca tgaataaaa 360

aacaggtgca cgcactctcg cattatccgc attaacgacg atgatgttt cgcctcggc 420

tctcgccgaa ttcgaaacca ttaccgtgag caccgccatc aaacagattt ttccggatga 480

cgcgttcgcc gaaacgatca aagcaaacct gaagaaaaag agcgttaccg atgctgtcac 540

gcaaatgaa ctgaacagta ttgaccagat cattgcgaat aactccgata tcaaatcagt 600

gcaaggcatt cagtatctgc cgaatgttcg ttacctggcc ctgggtggca acaactgca 660

tgacatctcg gcaactgaaag aactgaccaa tctgacgtat ctgnnktgn nknkaacca 720

actgcagagc ctgccgaacg gcgtgtttga taaactgacg aacctgaaag aactgnnkt 780

gnknknkaat caactgcagt ctctgccgga tgggtgttc gacaaactga ccaactgac 840

gtacctgaat ctggctcaca accaactgca gagtctgccg aaaggcgtgt ttgacaaact 900

gaccaatctg acggaactgg atctgtccta taaccaactg cagtcactgc cggaaggtgt 960

tttcgacaaa ctgaccagc tgaagatct gcgcctgtac cagaatcagc tgaatcgggt 1020

ccggacggc gtgtttgatc gtctgaccag cctgcagtat atctggctgc atgataaacc 1080

gtgggattgc acctgtccgg gtattcgcta cctgtctgaa tggatcaata aacacagtgg	1140
cgttgtccgt aactccgcgg gttcagttgc cccggattcg gcgaaatgct ccgacagcgg	1200
taaaccgggtg cgtagcatta tttccccgac ctgagcacc accaccacca ccactagggc	1260
ggcggctctg gtggtgggtc tggtaggcggc tctgagggtg gtggctctga gggtagcggt	1320
tctgagggtg gcggctctga gggaggcgggt tccggtagtg gctctgggtc cggtagtttt	1380
gattatgaaa agatggcaaa cgctaataag ggggctatga ccgaaatgc cgatgaaaac	1440
gcgctacagt ctgacgctaa aggcaaaactt gattctgtcg ctactgatta cggtagctgt	1500
atcgatggtt tcattggtga cgtttccggc cttgctaata gtaatggtgc tactggtgat	1560
tttgctggct ctaattccca aatggctcaa gtcggtagcg gtgataattc acctttaatg	1620
aataatttcc gtcaatatit accttccctc cctcaatcgg ttgaatgtcg cccttttctc	1680
tttggcgctg gtaaacata tgaattttct attgattgtg acaaaataaa cttattccgt	1740
ggtgtctttg cgtttctttt atatgttgcc acctttatgt atgtattttc tacgtttgct	1800
aacatactgc gtaataagga gtcttagtaa ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc	1860
aagcttgga ctagccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca	1920
acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg	1980
caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgtc taagaaacca	2040
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggctgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc	2100
gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt	2160
gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg gcgctcagcg ggtgttggcg	2220
ggtgtcgggg ctggttaac tatcgggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata	2280
aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat tcgctgtaaa tttttgttaa atcagctcat	2340
ttttaacca ataggccgaa atcggaataa tcccttataa atcaaaagaa tagcccgaga	2400
tagggttag tgtgtttcca gtttgaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca	2460
acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccca	2520
aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct aaaggagacc	2580
cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa ggaagaaag	2640
cgaaggagc gggcgctagg gcgtggcaa gtgtagcggc cagctgcgc gtaaccacca	2700
caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgctacta tgggtgcttt gacgtatgcg	2760
gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgtc aggtggcact	2820
tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg	2880
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaagaagagt	2940

atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct	3000
gtttttgtct acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca	3060
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc	3120
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc	3180
cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actatttctca gaatgacttg	3240
gttgagtact caccagtcaac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta	3300
tgcagtgtct ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgac	3360
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactgcctt	3420
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg	3480
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct	3540
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc	3600
tcggcccttc cggttggtct gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct	3660
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac	3720
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc	3780
tcactgatta agcatttgta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat	3840
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg	3900
acaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc	3960
aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa	4020
ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag	4080
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aataactgtc ttctagtga gccgtagtta	4140
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgtctgtct aatcctgtta	4200
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag	4260
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg	4320
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacacgtg agctatgaga aagcgccacg	4380
cttcccgaag ggagaaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag	4440
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc	4500
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcgag cctatggaaa	4560
aaccccagca acgcggcctt ttacggctc ctggcctttt gctggccttt tgctc	4615
<210> 3	
<211> 60	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer for module 2

<400> 3

cgagatgtca tgcagtttgt tmnnmncag mncagmna cgaacattcg gcagatactg 60

60

<210> 4

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer for module 3

<400> 4

tttatcaaac acgccgttcg gcaggctctg cagttggtm nmmncagmn ncagatacgt 60

cagattggtc agttctttca gtgccgagat gtcattg 96

<210> 5

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer for module 4

<400> 5

tttgcgaac acaccatccg gcagagactg cagttgatm nmmncagmn ncagttcttt 60

caggttcgtc agtttatcaa acacgccgtt cggcag 96

<210> 6

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutagenic primer for module 5

<400> 6

cttatcgaag acacctttcg gcagactctg cagttggtm nmmncagmn ncagmncgt 60

caggttggtc agtttgcga acacaccatc cgg 93

<210> 7

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3

<400> 7

Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp

1 5 10 15

Ala Phe Ala Glu Thr Ile Lys Ala Asn Leu Lys Lys Lys Ser Val Thr

20 25 30

Asp Ala Val Thr Gln Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Ile Ile Ala

35 40 45

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

50 55 60

Val Arg Tyr Leu Ala Leu Gly Gly Asn Lys Leu His Asp Ile Ser Ala

65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Val Leu Glu Pro Asn Gln

85 90 95

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

100 105 110

Glu Leu Ala Leu Trp Leu Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val

115 120 125

Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala His Asn Gln

130 135 140

Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr

145 150 155 160

Glu Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Glu Gly Val

165 170 175

Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Gln Asn Gln

180 185 190

Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln

195 200 205

Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile

210 215 220

Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn

225 230 235 240
 Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly
 245 250 255
 Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr
 260 265
 <210> 8
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repebody-D3E8
 <400> 8
 Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Leu Gln Ser Leu Pro Asn Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Lys
 100 105 110
 Glu Leu Gln Leu Trp Ala Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val
 115 120 125
 Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala Phe Asn Gln
 130 135 140
 Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr
 145 150 155 160

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

165 170 175
 Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Gln Asn Gln
 180 185 190
 Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile
 210 215 220
 Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn

 225 230 235 240
 Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly
 245 250 255
 Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr
 260 265
 <210> 9
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Repebody-D3E8C4 (Y102K, A104T, G106V, G107S)
 <400> 9
 Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Leu Gln Ser Leu Pro Asn Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Lys

100 105 110
 Glu Leu Gln Leu Trp Ala Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val
 115 120 125
 Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala Phe Asn Gln
 130 135 140
 Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr
 145 150 155 160

Glu Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val
 165 170 175
 Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Gln Asn Gln
 180 185 190
 Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile
 210 215 220
 Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn

225 230 235 240
 Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly
 245 250 255
 Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr
 260 265

<210> 10

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3E8-KE, D3E8(I82K, R222E)

<400> 10

Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Glu Thr Ile Lys Ala Asn Leu Lys Lys Lys Ser Val Thr
 20 25 30
 Asp Ala Val Thr Gln Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Ile Lys Ala

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

 85 90 95
 Leu Gln Ser Leu Pro Asn Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Lys
 100 105 110
 Glu Leu Gln Leu Trp Ala Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val
 115 120 125
 Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala Phe Asn Gln
 130 135 140
 Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr
 145 150 155 160

 Glu Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val
 165 170 175
 Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Glu Leu Tyr Gln Asn Gln
 180 185 190
 Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile
 210 215 220
 Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn

 225 230 235 240
 Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly
 245 250 255
 Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr
 260 265
 <210> 11
 <211> 266
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3E8(I82K)

<400> 11

Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp

1 5 10 15

Ala Phe Ala Glu Thr Ile Lys Ala Asn Leu Lys Lys Lys Ser Val Thr

20 25 30

Asp Ala Val Thr Gln Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Ile Lys Ala

35 40 45

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

50 55 60

Val Arg Tyr Leu Ala Leu Gly Gly Asn Lys Leu His Asp Ile Ser Ala

65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Thr Leu Glu Pro Asn Gln

85 90 95

Leu Gln Ser Leu Pro Asn Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Lys

100 105 110

Glu Leu Gln Leu Trp Ala Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Asp Gly Val

115 120 125

Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr Tyr Leu Asn Leu Ala Phe Asn Gln

130 135 140

Leu Gln Ser Leu Pro Lys Gly Val Phe Asp Lys Leu Thr Asn Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asp Lys Leu Thr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Leu Tyr Gln Asn Gln

180 185 190

Leu Lys Ser Val Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Ser Leu Gln

195 200 205

Tyr Ile Trp Leu His Asp Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Pro Gly Ile

210 215 220

Arg Tyr Leu Ser Glu Trp Ile Asn Lys His Ser Gly Val Val Arg Asn

225 230 235 240

Ser Ala Gly Ser Val Ala Pro Asp Ser Ala Lys Cys Ser Gly Ser Gly

245 250 255

Lys Pro Val Arg Ser Ile Ile Cys Pro Thr

260 265

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> partial N-terminal fragment of Internalin protein

<400> 12

Glu Thr Ile Thr Val Ser Thr Pro Ile Lys Gln Ile Phe Pro Asp Asp

1 5 10 15

Ala Phe Ala Glu Thr Ile Lys Ala Asn Leu Lys Lys Lys Ser Val Thr

20 25 30

Asp Ala Val Thr Gln Asn Glu

35