



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0094837  
(43) 공개일자 2014년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0007380  
(22) 출원일자 2013년01월23일  
심사청구일자 2013년01월23일

(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  
대전 유성구 대학로 291, 생명과학과 3220호 (구성동, 한국과학기술원)  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
이치영

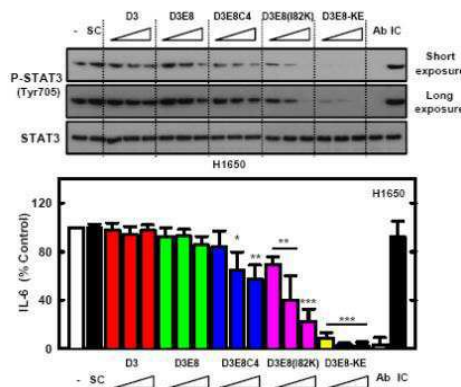
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신규한 인터루킨-6 결합 폴리펩타이드 및 이의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 인터루킨-6과의 특이적인 결합을 통해 그의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 신규한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입된 형질전환체, 상기 형질전환체를 이용하여 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 STAT3의 활성과 인터루킨-6의 농도를 유의하게 감소시키므로 IL-6 관련 질환의 예방 또는 치료용 제제로 널리 활용될 수 있다.

**대표도 - 도2**



(72) 발명자

**조은경**

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

**양철수**

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

**정해갑**

충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 161, 자기공명팀 (한국기초과학지원연구원)

**김현정**

충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 161, 자기공명팀 (한국기초과학지원연구원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0002350

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 반복단백질의 구조/기능분석 및 기능요소수준에서의 단백질라이브러리 제조

기여율 1/1

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 9의 폴리펩타이드 아미노산 서열에서 82번, 84번, 126번, 182번, 222번 및 244번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된, 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 9로 표시되는 폴리펩타이드는 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드:

여기서, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 것:

LxxLxxLxLxxN

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

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 7중 어느 하나의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 인터루킨-6 단백질에 결합하여 그의 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

### 청구항 5

제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

### 청구항 6

제5항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

### 청구항 7

제5항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제6항의 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

### 청구항 8

- (i) 제7항의 재조합 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및
- (ii) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 제1항의 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 인터루

킨-6에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 생산방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제4항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 암 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 인터루킨-6과 결합하여 이루어지는 것인 암 예방 또는 치료용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 인터루킨-6과 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 인터루킨-6과 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포, 숙주세포 내에서 벡터를 발현시켜서 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 인터루킨-6은 사이토카인 (cytokine)의 일종으로 면역을 비롯한 다양한 생물학적 활성에 폭넓게 작용하는 단백질로서, 일반인의 경우에는 1pg/ml 수준의 매우 낮은 농도로 혈액내 존재하며 생명현상에 중요한 조절자로 작용하는 단백질이다. 이러한 인터루킨-6이 과량으로 체내에 존재하는 경우, 자가면역질환 및 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 질병이 류마티즘 관절염으로, 해당 환자는 건강한 일반인에 비해서 상당히 높은 인터루킨-6의 혈중농도를 보이는 것으로 보고되어 있다. 이렇게 과량으로 존재하는 인터루킨-6과 특이적으로 결합하는 항체들이 그의 활성을 저해함으로써 다양한 질병들에 있어서 치료 효능을 확보할 수 있다는 보고가 있다. 따라서 다양한 다국적 제약업체에서는 인터루킨-6과 인터루킨-6 수용체간의 결합을 억제하여 신호전달을 차단할 수 있는 단일클론항체 (monoclonal antibody)의 개발에 많은 힘을 기울이고 있는 실정이다. 그 중 다국적 제약업체인 Roche와 일본 제약업체인 Chugai는 최초로 인터루킨-6 수용체에 결합하여 인터루킨-6의 신호전달을 억제할 수 있는 치료용 항체인 Tocilizumab (판매품 Actemra) 개발에 성공하였으며, 현재 FDA의 승인을 받아 류마티즘 관절염을 적응증으로 하여 치료제 시장에 진출하여 있다. 이외에도 다양한 치료용 항체 후보들이 임상에 돌입하여 치료효능을 평가받고 있다.

[0003] 그러나 항체는 큰 분자량으로 인한 낮은 조직 침투력, 복잡한 생산 공정으로 인한 높은 제품단가 등의 문제점이 있어 최근에는 항체를 대체할 수 있는 새로운 단백질 골격에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 그 결과, 리피바디(Repebody)라는 단백질이 개발되었다. 상기 Repebody는 LRR (Leucine-rich repeat)의 구조를 갖는 인터날린 B의 N-말단과 VLR의 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨센시스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드를 의미하는데, 이는 대장균에서 수용성 단량체 형태로 대량 발현되기 때문에 생산 단가를 낮출 수 있고, 높은 물리화학적 안정성을 지니고 있어 단백질의 변형이 용이하다. 또한, 연구 개발되지 않은 신규한 단백질 골격이기 때문에 기존의 특허로부터 자유롭다는 장점이 있다.

[0004] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 인터루킨-6과 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 신규한 폴리펩타이드인 repebody를 설계하여 상기 repebody 및 그의 생산방법에 대하여 2012년 2월 27자로 특허출원을 한 바 있다 (대한민국 출원번호 제10-2012-001927호). 본 발명자들은 상기 출원된 인터루킨-6과 결합하는 repebody의 생물학적 효능을 확보하기 위하여, 단백질 복합체 구조를 기본으로 유익한 돌연변이 (beneficial mutation)를 예측하여 인터루킨-6에 대한 결합력이 더욱 향상된 신규한 repebody인 폴리펩타이드를 제조 및 선별하였다. 또한, 상기 폴리펩타이드가 암을 예방 또는 완화할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0005] 본 발명의 목적은 인터루킨-6과의 특이적인 결합을 통해 그의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 신규한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용하여 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 폴리펩타이드를 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드인, 서열번호 9로 표시되는 폴리펩타이드 아미노산 서열에서 82번, 84번, 126번, 182번, 222번 및 244번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된, 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 제공한다. [여기서, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 것:LxxLxxLxLxxN (상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며; x는 임의의 아미노산이다)].
- [0008] 본 발명에서 용어, "인터루킨-6 (IL-6)"은 B세포의 항체생산세포로의 최종 분화를 유도하는 B세포자극인자2 (BSF-2) 로 분리한 분자량이 210,000인 당단백질로서, T림프구, B림프구, 대식세포, 섬유아세포 등 여러 세포에서 생산되는 사이토카인의 일종을 의미하는데, 면역응답, 조절계와 신경계세포의 증식 및 분화, 급성 반응, 다양한 세포의 성장과 분화 등에 관여한다.
- [0009] 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.
- [0010] 본 발명에서 용어, "인터날린 B 단백질"이란, 리스테리아(Listeria) 균주에서 발현되는 LRR (Leucin-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.
- [0011] 본 발명에서 용어, "인터날린 B 단백질의 N-말단"이란, 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 B 단백질의 N-말단을 의미하며 알파 나선형 캡핑 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 "ETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKANLKKKSVTDAVTQNE" 및 반복 모듈을 포함할 수 있다. 바람직하게 반복 모듈 패턴은 "LxxLxxLxLxxN"을 포함할 수 있다. 상기 반복 모듈 패턴 중 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 아미노산의 변이가 가능하다.
- [0012] 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 것이며, 이와 같이 인터날린 B 단백질과 VLR 단백질이 융합된 융합 폴리펩타이드가 발현양이 증가하는 것은 본 발명자에 의해 최초로 개발된 것이다.

[0013] 본 발명에서 용어 "VLR 단백질의 변형된 반복모듈"이란, VLR 단백질의 24개 아미노산으로 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. 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 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[0014] 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 30개의 아미노산으로 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 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 용어, "변이"란 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되는 것을 모두 포함하나, 좋기로는 기존의 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명자들은, 인터날린 B (Internalin B) 단백질의 N-말단, VRL (Variable Lymphocyte Receptor; 가변 림프구 수용체)의 변형된 반복모듈 및 VRL 단백질의 C-말단이 융합된, IL-6와 효과적으로 결합하는 신규 폴리펩타이드인 repebody를 개발한 바 있다 (특허출원 제10-2012-0019927호). 그러나, 상기 개발된 IL-6과 결합하는 repebody는 자연계에 존재하는 IL-6의 수용체(IL-6Ra)보다는 높은 친화력으로 IL-6에 결합하여 그의 활성을 억제할 수는 있으나, 이의 생물학적 효능은 아직 확인된 바 없었다. 이에, 본 발명자들은 IL-6과의 결합능이 더욱 개선됨과 동시에 생물학적 효능을 갖는 repebody를 확보하기 위하여, 선 개발한 폴리펩타이드와 IL-6의 복합체 구조 (Complex structure)를 기반으로 합리적 설계 (Rational design) 방식으로 결합력이 더욱 향상된 repebody를 확보하였다. 구체적으로, 선 개발한 IL-6에 결합하는 서열번호 9의 폴리펩타이드와 IL-6의 복합체를 대장균에서 발현하여 상기 복합체의 구조를 바탕으로, IL-6에 근접한 repebody의 아미노산 중 일부를 돌연변이 시킴으로써 IL-6에 대하여 친화력이 증가한 폴리펩타이드를 선별하였다. 본 발명의 일 실시예에서는, 선 개발한 IL-6에 결합하는 repebody-D3E8 (서열번호 9)로 표시되는 폴리펩타이드 아미노산 서열에서 82번, 84번, 126번, 182번, 222번 및 244번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된 것인 서열번호 1 내지 7의 폴리펩타이드를 선별하였다 (표 1 참조).

[0017] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 내지 7로 표시되는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 75%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖고 인터루킨-6 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 본 발명의 목적상 IL-6에 특이적으로 결합하는 활성을 유지하는 폴리펩타이드는 상기 서열번호 1 내지 7로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나의 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 부가된 폴리펩타이드도 본 발명의 범위에 들어가는 것은 자명하다.

[0018] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가

능하게 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 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 계능과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계능 그 자체에 통합될 수 있다.

[0020] 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, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, 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.

[0021] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0022] 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, 진핵 세포, 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.

[0023] 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.

[0024] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (ii) 상기 배양된 형질전환체 또는 배양물로부터 본 발명에 따른 인터루킨-6에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩타이드의 생산방법을 제공한다.

[0025] 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°C, 바람직하게는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간동안 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 폴리펩타이드는 배지중으로 분리되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.

[0026] 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 코코넛

유), 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.

[0027] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 폴리펩타이드를 회수하는 방법은 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 폴리펩타이드를 수집할 수 있다.

[0028] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에서 용어 “암” 또는 “종양”은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하는 것이다. 인터루킨-6은 종양의 증식과 신생혈관생성을 유도하는 성장 인자인바, 본 발명에서의 암 또는 종양은, 인터루킨-6이 과량 분비되는 비소세포폐암, 난소암, 다발성 골수종, 캐슬만씨 병, 간암 등을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[0030] 본 발명에서 용어 "치료"란 조성물의 투여로 폐혈증이나 그로부터 야기된 하나 또는 그 이상의 증상을 억제하거나 완화하는 것 뿐만 아니라 질환의 증상을 반전시키는 폐혈증의 치료 또는 폐혈증의 진행을 방지하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 폐혈증을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명에서는, 암의 예방 또는 치료는 본 발명에서 확보한 폴리펩타이드가 인터루킨-6과 결합하여 이루어지는 것으로, 혈청 내 인터루킨-6의 농도와 STAT3(signal transduction and activator of transcription3)의 활성을 유의하게 억제하여 암을 예방 또는 치료하는 것이다.

[0032] 인터루킨-6은 종양의 증식과 신생혈관생성을 유도하는 가장 중요한 성장 인자로 알려져 있으며, 비소세포폐암, 난소암, 다발성 골수종, 캐슬만씨 병, 간암 등 같은 사람 종양에서 사이토카인 네트워크에 중요한 매개자로 알려져 있다. 구체적으로, ① 혈청 내 인터루킨-6의 양과 인터루킨-6 수용체 발현 정도는 암 발달과 밀접한 연관이 있으며, ② 인터루킨-6 결손 마우스에서는 종양 발달이 실패하고, ③ 환자에 항-인터루킨-6 단일클론 항체를 투여하였을 때, 암 발달이 감소되며, ④ 시험관내의 다발성 골수종 세포에 인터루킨-6 또는 인터루킨-6 수용체의 중화 단일클론 항체를 처리하는 경우 그 증식이 억제되고, ⑤ 인터루킨-6 작은 간섭 RNA (siRNA)로 인터루킨-6 메신저 RNA를 억제하면 형질 세포의 증식이 억제되며, ⑥ 인터루킨-1, 인터루킨-3과 과립대식세포집락자극인자 같은 사이토카인들은 함께 작용하여 종양 세포 증식 시너지효과를 나타내고, 종양 발달 환경에서 인터루킨-6의 생산을 유도한다는 것이 알려진 바 있다.

[0033] 그러나 아직까지, repebody가 종양 치료제로서의 효과가 있는지는 전혀 알려진 바가 없다. 이에, 본 발명자들은 본 발명에 따른 repebody의 생물학적 활성을 평가하기 위하여 비소세포폐암 (Non-small-cell lung cancer) 세포를 실험모델로 하여, 상기 비소세포폐암 세포에 본 발명에 따른 다양한 농도의 repebody를 처리하여 ① STAT3의 활성 감소 여부, ② 인터루킨-6 생산 억제 여부 및 ③ 비소세포폐암 세포 이종이식 마우스에서의 종양 억제 여부를 분석하였다. 그 결과, 상기 세 가지 실험 항목 모두에서 폴리펩타이드가 종양 억제 활성이 있음을 확인함으로써 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 인터루킨-6의 생산과 STAT3의 활성을 억제하여 종양세포를 사멸시키는 것을 알 수 있었다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 1 내지 7의 폴리펩타이드를 갖는 repebody는 IL-6에 대한 결합력이 우수할 뿐 아니라 (표 1 참조), repebody-D3E8 (I82K) (서열번호 1), repebody-D3E8-KE (서열번호 7)를 비소세포폐암 세포 배지에 첨가하였을 때, 세포내의 STAT3의 활성(P-STAT3)과 인터루킨-6이 농도 의존적으로 유의하게 감소함을 확인하였으며 (실시예 3, 도 2 참조), 이와 같은 결과는 본 발명의 폴리펩타이드가 효과적으로 인터루킨-6과 결합하여 STAT3의 활성을 저해함으로써 인하여, 암을 예방 또는 치료할 수 있음을 입증하는 것이다. 반면, 본 발명자들이 선 개발한 IL-6 결합 repebody인 repebody-D3E8C4 (서열번호 8), D3E8 (서열번호 9)와 D3 (서열번호 10)은 STAT3의 활성 및 IL-6의 농도 억제 효과가 미비하다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 암의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있으며, 또한 인터루킨-6 관련 질환의 예방 또는 치료에도 사용될 수 있음은 명백하다.



- [0034] 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 포함하는 패혈증 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 상기 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 붙 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [0039] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 암 예방 또는 치료용 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 암의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.
- [0042] 또한, 본 발명의 치료 방법은 인터루킨-6의 과도한 분비로 인하여 STAT3가 지속적으로 활성화됨으로써 종양 발달과 신생혈관생성 등의 질병이 발생할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

**발명의 효과**

[0043] 본 발명의 폴리펩타이드는 높은 친화력으로 IL-6와 결합하여 인터루킨-6의 생산 및 STAT3의 활성을 억제할 수 있으므로, 암 뿐 아니라 IL-6 관련 질환의 예방 또는 치료를 위하여 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0044] 도 1은 repebody와 인터루킨-6가 결합하고 있는 복합체의 결정화 구조를 보여주는 개략도이다.
- 도 2는 비소세포폐암 세포의 배양액에 폴리펩타이드(D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE)를 처리하여 STAT3 활성 및 인터루킨-6의 생성 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 비소세포폐암 세포에 폴리펩타이드(D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE)를 처리한 뒤, MTT 실험을 수행하여 세포의 생존율을 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 4는 비소세포폐암 세포가 주사된 이종이식 마우스 동물에 폴리펩타이드(D3E8-KE)와 대조군(PBS)를 10일 동안 3일 간격으로 4회 복강 내 주사로 처리한 후 종양 크기의 차이를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 5는 비소세포폐암 세포가 주사된 이종이식 마우스 동물에 폴리펩타이드(D3E8-KE)와 대조군(PBS)를 15일 동안 3일 간격으로 5회 복강 내 주사로 처리한 후 종양 크기의 차이를 그래프로 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0045] 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.

**[0046] 실시예 1: 복합체 구조를 기반으로 repebody의 결합력 증가를 위한 합리적 설계 수행**

[0047] 발명의 구성요소로 선행특허 (제10-2012-0019927호)에서 이미 확보한 repebody-D3E8 (서열번호 9)을 합리적 설계를 위한 폴리펩타이드로 사용하였다. 상기 폴리펩타이드는 해리상수가 2.7nM이 되는 친화력을 바탕으로 IL-6와 결합하고 있으며, 선행특허에서의 서열번호 9와 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

**[0048] 실시예 1-1: Repebody/IL-6 복합체 구조 확보**

[0049] 합리적 설계를 위한 과정으로, repebody-D3E8과 IL-6를 대장균에서 발현하였다. Ni-NTA 컬럼과 겔침투크로마토 그래피 (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 섭씨 17도의 조건에서 반응하여 결정구조를 확보하였다. 이를 X-선 회절 분석 (X-ray Diffraction) 방법으로 상기 복합체 구조를 관찰하였다 (도 1 참조, 해상도: 2.3Å).

**[0050] 실시예 1-2: 복합체 구조를 바탕으로 단백질 간 상호작용 분석**

[0051] 상기 실시예 1-1에서 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.

**[0052] 실시예 1-3: 구조 분석결과를 바탕으로 repebody의 친화력 증가를 위한 합리적 설계**

[0053] 상기 실시예 1-2의 분석결과를 바탕으로 본 발명자들은 repebody의 잔기들의 정전기 상호작용을 최적화시키는 과정을 수행하였다. IL-6에 근접한 repebody의 아미노산 중에서 82번 이소류신과 84번 아스파라긴은 음전하를 갖는 글루탐산에 가까이 위치함을 확인하였다. 따라서 82번과 84번 아미노산 각각을 양전하를 갖는 리신으로 치

환하였다. 등온열량측정기 (Isothermal titration calorimetry, ITC)를 이용하여 이 돌연변이들의 IL-6와의 친화력 변화를 관찰하였다 (표 1). 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 rebody들이 50 내지 9300pM 수준의 해리상수(Dissociation constant)를 가진다는 것을 확인하였다. 즉 IL-6에 대하여 향상된 결합력을 가짐을 확인하였다. 그 중에서도, rebody-D3E8-KE (서열번호 7)은 해리상수가 63pM인바, 효과적으로 인터루킨-6에 결합할 수 있음을 확인하였다.

**표 1**

서열번호	Mutation	Interaction Type	K <sub>d</sub> (pM)
	Rb-D3E8		2470
1	I82K	Ionic	117
2	N84K	Ionic	9300
3	T126V	Hydrophobic	240
4	R222E	Ionic	214
5	Y244E	Ionic	236
6	I82K, T126V		2500
7	I82K, R222E		63

[0054]

**실시예 2: 비소세포폐암 세포 폴리펩타이드 처리**

[0055]

상기의 결합력이 향상된 rebody들의 생물학적 활성도를 평가하기 위하여 상기 rebody의 IL-6 활성저해 효과를 확인하였다.

[0056]

**실시예 2-1: 비소세포폐암 세포 배양**

[0057]

먼저, 사람 유래 비소세포폐암 (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  $1 \times 10^5$ /ml의 농도로 부유시켜, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 100파이 세포 배양 dish에 배양하였다.

[0058]

**실시예 2-2: 폴리펩타이드 처리**

[0059]

상기 실시예 2-1에서 준비한 비소세포폐암 세포 배지 내에, 실시예 1-3에서 선발한 rebody-D3E8(I82K) (서열번호 1), rebody-D3E8-KE (서열번호 7) 과 본 발명자들이 선행 특허에서 선발한, 인터루킨-6과의 결합능을 갖는 rebody-D3E8C4 (서열번호 8), rebody-D3E8 (서열번호 9), rebody-D3 (서열번호 10)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.

[0060]

**실시예 3 : STAT3 와 인터루킨-6에 대한 폴리펩타이드의 영향 분석**

[0061]

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

[0062]

도 2에서 확인할 수 있듯이, 폴리펩타이드의 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 1), D3E8-KE (서열번호 7)는 세포 내의 STAT3의 활성(P-STAT3) 및 인터루킨-6 생성 억제 효과가 다른 rebody (D3, D3E8)에 비하여 우수하다는 것을 확인할 수 있으며, 그 중에서도 D3E8-KE (서열번호 7)은 대조군

[0063]

인 항-인터루킨-6 단일클론 항체와 비슷한 억제능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

**[0064] 실시예 4 : 세포 생존율에 대한 폴리펩타이드의 영향 분석**

**[0065]** 실시예 2-2에서 폴리펩타이드와 대조군을 각각 1 mg/ml의 농도로 처리한 비소세포폐암 세포에 대하여 MTT 실험을 수행하여 세포의 생존율을 확인하였다. 폴리펩타이드와 대조군들을 1일 간격으로 총 4일 동안 처리한 비소세포폐암 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 3에 도시하였다.

**[0066]** 그 결과, D3, D3E8, D3E8C4, D3E8(I82K), D3E8-KE 순서로 세포 생존율이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 repebody D3E8-KE (서열번호 7)는 대조군인 항-인터루킨-6 단일클론 항체와 비슷한 세포 사멸능을 나타냄을 확인할 수 있었다. 즉, 도 2와 도 3의 결과로부터, 본 발명에 따른 폴리펩타이드의 처리에 의하여 비소세포폐암 세포에서의 세포 사멸능이 유도됨을 확인할 수 있었다.

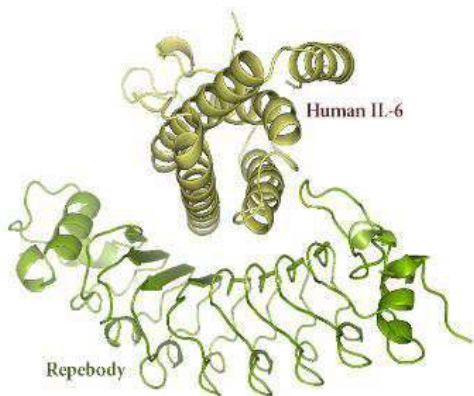
**[0067] 실시예 5 : 이종이식 마우스모델에 대한 폴리펩타이드의 영향 분석**

**[0068]** 비소세포폐암 세포  $5 \times 10^6$ 을 nude 마우스 우측에 피하주사하여 이종이식 마우스 모델을 구축한 후, 폴리펩타이드 D3E8-KE (서열번호 7)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 4에 나타내었다. 그 결과, D3E8-KE (서열번호 7)를 처리한 군에서의 종양의 크기가 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

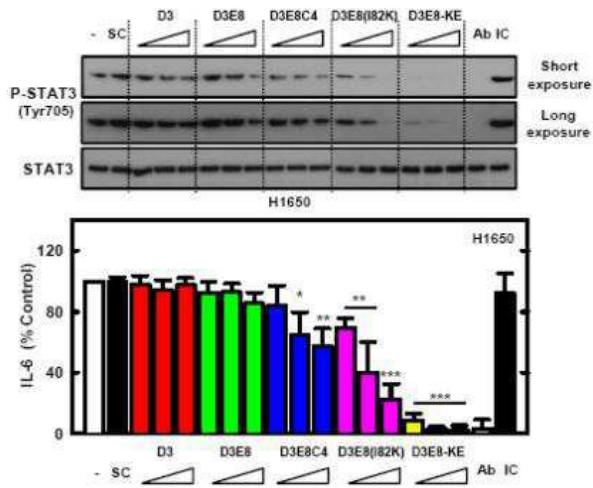
**[0069]** 별도로, 비소세포폐암 세포 이종이식 마우스 모델에 폴리펩타이드를 처리하여 종양 사멸능을 분석하여 종양에 대한 폴리펩타이드의 영향을 분석하되, 먼저 15일간 종양을 활발히 자라게 한 후에 D3E8-KE (서열번호 7)를 10 mg/kg의 농도로 15일 동안 3일 간격으로 5회 복강 내 주사하였다. 대조군으로는 PBS를 사용하였다. 종양의 크기를 3일 간격으로 측정하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5로부터, D3E8-KE (서열번호 7)를 처리한 경우, 활발히 자라는 종양의 크기가 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

**도면**

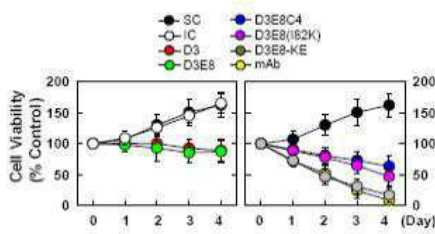
**도면1**



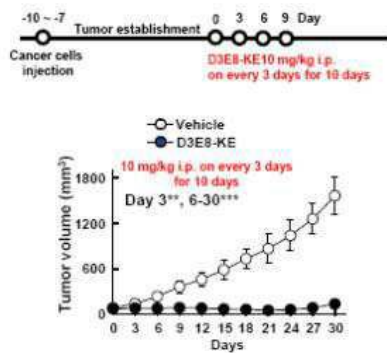
도면2



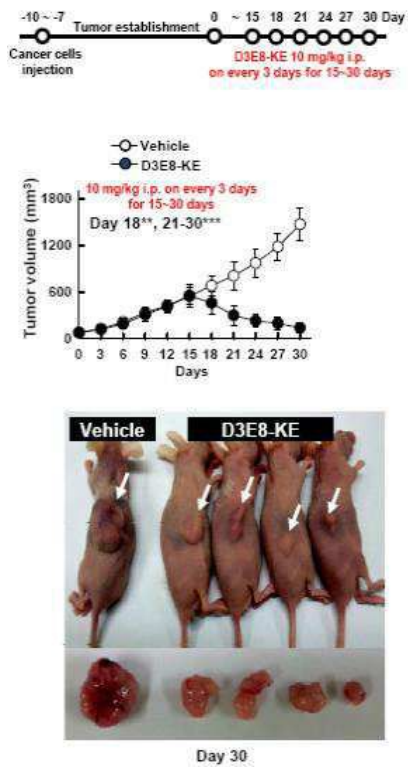
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology  
Korea Basic Science Institute
  - <120> Novel Polypeptides Binding with Interleukin-6 and Uses Thereof
  - <130> P12-B246
  - <160> 10
  - <170> KopatentIn 2.0
  - <210> 1
  - <211> 266
  - <212> PRT
  - <213> Artificial Sequence
  - <220><223> Repebody-D3E8(I82K)
  - <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 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> 2  
 <211> 266  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3E8(N84K)

<400> 2

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

Lys 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>    3  
 <211>    266  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Repebody-D3E8(T126V)  
 <400>    3  
 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 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> 4  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Repebody-D3E8(R222E)  
 <400> 4  
 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 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> 5

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3E8(Y244E)

<400> 5

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  
 Glu 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> 6

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3E8(I82K, T126V)

<400> 6

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 Val 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>    7  
 <211>    266  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Repebody-D3E8-KE, D3E8(I82K, R222E)  
 <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 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>    8  
 <211>    266  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Repebody-D3E8C4 (Y102K, A104T, G106V, G107S)  
 <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 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> 9  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Repebody-D3E8  
 <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 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> 10

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Repebody-D3

<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 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