



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2011-0079912  
 (43) 공개일자 2011년07월11일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.<br/> <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>C07K 14/78</i> (2006.01)<br/> <i>CA0B 40/10</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7012129</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월27일<br/>                 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년05월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/062200</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/051274<br/>                 국제공개일자 2010년05월06일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>                 61/110,120 2008년10월31일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 센토코 오르토 바이오테크 인코포레이티드<br/>                 미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브<br/>                 800/850</p> <p>(72) 발명자<br/>                 제이콥스 스티븐<br/>                 미국 펜실베이니아 19087 래드너 킹 오브 프러시아<br/>                 로드 145<br/>                 오닐 카린<br/>                 미국 펜실베이니아 19087 래드너 킹 오브 프러시아<br/>                 로드 145</p> <p>(74) 대리인<br/>                 이은선, 최규팔</p> |
|---|--|

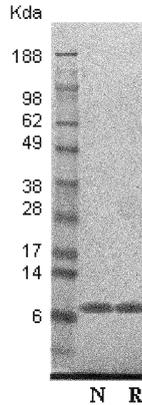
전체 청구항 수 : 총 39 항

**(54) 파이브로넥틴 타입 III 도메인 기반 스캐폴드 조성물, 방법 및 용도**

**(57) 요약**

단백질 스캐폴드를 코딩하는 단리된 핵산, 벡터, 숙주 세포, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 비롯하여, 인간 파이브로넥틴 (인간 테나신) 유래의 제10 FN3 반복체와 같은 파이브로넥틴 타입 III (FN3) 단백질을 기반으로 한 단백질 스캐폴드는 진단 및/또는 치료 조성물, 방법 및 장치에서 응용을 갖는다. 특히, IgG에 결합하는 단백질 스캐폴드 분자는 진단 및/또는 치료 응용에 유용한 것으로 확인되었다.

**대표도 - 도1**



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

파이브로넥틴 타입 III(fibronectin type III, FN3) 도메인의 콘센서스(consensus) 서열로부터 유래되고 상기 콘센서스 FN3 도메인 서열에 대한 동일성이 75% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단리된 단백질 스캐폴드(scaffold).

### 청구항 2

테나신(Tenascin) FN3 도메인들의 콘센서스 서열로부터 유래되고 서열 번호 16의 서열에 대한 동일성이 75% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단리된 단백질 스캐폴드.

### 청구항 3

파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 콘센서스 서열로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함하며 7개의 가닥과 상기 가닥들 사이의 6개의 루프를 포함하는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단리된 단백질 스캐폴드.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 루프들 중 하나 이상이 세포 단백질 및/또는 핵산 분자에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하며, 서열 번호 16의 서열의 잔기 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 및 75-81에서 또는 그 근처에서 세포 단백질 및/또는 핵산 분자를 포함하는 표적에 결합할 수 있는 루프가 형성된 단백질 스캐폴드.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 루프들 중 하나 이상이 표적에의 결합을 위하여 변경된 단백질 스캐폴드.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 표면 플라즈몬 공명법(surface plasmon resonance) 또는 키넥사법(Kinexa method)에 의해 측정할 때 적어도  $10^{-9}$  M, 적어도  $10^{-10}$  M, 적어도  $10^{-11}$  M, 및 적어도  $10^{-12}$  M, 적어도  $10^{-13}$  M, 적어도  $10^{-14}$  M 및 적어도  $10^{-15}$  M의  $K_D$ 로부터 선택되는 적어도 하나의 친화도로 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드.

### 청구항 8

파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 콘센서스 서열로부터 유래되는 폴리펩티드를 제공하는 단계; 및 다양성을 폴리펩티드의 카피(copy) 내로 도입하여 단백질 스캐폴드 라이브러리(library)를 형성하는 단계를 포함하는, FN3 도메인의 콘센서스 서열로부터 유래되는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단백질 스캐폴드의 라이브러리를 제작하는 방법.

### 청구항 9

제8항의 방법에 의해 제조된 라이브러리.

### 청구항 10

제9항의 라이브러리를 특정 표적과 접촉시키는 단계 및 소정의 친화도로 특정 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드를 단리하는 단계를 포함하는, 소정의 결합 친화도로 특정 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드를 제조하는 방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 단리 단계가 특정 표적에 결합하는 스캐폴드 분자를 단리하는 것 및 단리된 스캐폴드 분자를 특정 표적에의 결합 친화도에 대하여 시험하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 단리 단계가 특정 표적을 이용하여 라이브러리를 패닝하는(panning) 것, 특정 표적에 결합한 스캐폴드 분자를 확인하는 것 및 결합 스캐폴드 분자를 단리하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 친화도가 약  $10^{-7}$  M 이하인 방법.

**청구항 14**

서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 제공하는 단계; 및  
 다양성을 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 카피 내로 도입하여 단백질 스캐폴드 라이브러리를 형성하는 단계를 포함하는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단백질 스캐폴드의 라이브러리를 제작하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 다양성 도입 단계는 서열 번호 16의 위치 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 및 75-81의 또는 그 근처의 잔기들로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 루프 영역을 돌연변이시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 16**

제15항의 방법에 의해 제조된 라이브러리.

**청구항 17**

제16항의 라이브러리를 특정 표적과 접촉시키는 단계 및 소정의 친화도로 특정 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드를 단리하는 단계를 포함하는, 소정의 결합 친화도로 특정 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드를 제조하는 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 단리 단계가 특정 표적에 결합하는 스캐폴드 분자를 단리하는 것 및 단리된 스캐폴드 분자를 특정 표적에의 결합 친화도에 대하여 시험하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 단리 단계가 특정 표적을 이용하여 라이브러리를 패닝하는 것, 특정 표적에 결합한 스캐폴드 분자를 확인하는 것 및 결합 스캐폴드 분자를 단리하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 친화도가 약  $10^{-7}$  M 이하인 방법.

**청구항 21**

제5항의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 서열 번호 17에 개시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 23**

제21항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 단리된 핵산 벡터.

**청구항 24**

제21항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 이. 콜라이(E. coli) BL21Star(DE3), 기타 이. 콜라이 세포, 효모, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 골수종 또는 림프종 세포, 또는 이들의 임의의 유도체, 불멸화(immortalized) 또는 형질전환 세포로부터 선택되는 적어도 하나인 숙주 세포.

**청구항 26**

제5항의 단백질 스캐폴드 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 검출가능한 표지체(label) 또는 리포터(reporter), TNF 길항제, 항감염약, 심혈관(cardiovascular, CV)계 약물, 중추신경계(central nervous system, CNS) 약물, 자율신경계(autonomic nervous system, ANS) 약물, 기도 약물, 위장(gastrointestinal, GI)관 약물, 호르몬 약물, 체액 또는 전해질 균형을 위한 약물, 혈액 약물, 항신생물제, 면역조절 약물, 눈, 귀 또는 코 사용을 위한 약물, 국소 약물, 영양제 약물, 사이토카인 및 사이토카인 길항제로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물 또는 폴리펩티드를 추가로 포함하는 조성물.

**청구항 28**

제5항의 단백질 스캐폴드를 포함하고, 상기 단백질 스캐폴드를 비경구, 피하, 근내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골막내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비강내 및 경피로부터 선택되는 적어도 하나의 방식에 의해 접촉 또는 투여하기에 적합한 의료 장치.

**청구항 29**

패키징(packaging) 재료와, 제5항의 단백질 스캐폴드의 용액 또는 동결건조된 형태를 포함하는 용기를 포함하는, 인간용 의약품 용도 또는 진단 용도를 위한 제조 물품.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 용기가 비경구, 피하, 근내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골막내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비강내 또는 경피 전달 장치 또는 시스템의 구성요소인 제조 물품.

**청구항 31**

테나신 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인들의 콘센서스 서열로부터 유래되고 서열 번호 21-140의 서열의 B:C 또는 F:G 루프 중 임의의 하나에 대한 동일성이 75% 이상인 아미노산 서열을 포함하며 인간 IgG에 결합하는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단리된 단백질 스캐폴드.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 7개의 가닥과 상기 가닥들 사이의 6개의 루프를 포함하는 단백질 스캐폴드.

**청구항 33**

제31항에 있어서, 서열 번호 21-140의 서열의 B:C 또는 F:G 루프 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하며, 잔기 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 및 75-81에서 또는 그 근처에서 루프가 형성된 단백질 스캐폴드.

**청구항 34**

잔기 1-21, 29-74 및 82-89에서 서열 번호 16의 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 골격 부분;  
 서열 번호 21-45의 서열 중 임의의 하나에 대한 동일성이 75% 이상인, 서열 번호 16의 서열의 잔기 21과 잔기 29 사이의 B:C 루프 부분; 및  
 서열 번호 46-140의 서열 중 임의의 하나에 대한 동일성이 75% 이상인, 서열 번호 16의 서열의 잔기 74와 잔기 82 사이의 F:G 루프 부분을 포함하며; 인간 IgG에 결합할 수 있는, 파이브로넥틴 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단백질 스캐폴드.

**청구항 35**

제34항에 있어서,  
 잔기 1-21, 29-74 및 82-89에서 서열 번호 16의 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 골격 부분;  
 서열 번호 21-45의 서열 중 임의의 하나를 포함하는, 서열 번호 16의 서열의 잔기 21과 잔기 29 사이의 B:C 루프 부분; 및  
 서열 번호 46-140의 서열 중 임의의 하나를 포함하는, 서열 번호 16의 서열의 잔기 74와 잔기 82 사이의 F:G 루프 부분을 포함하며; 인간 IgG에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드.

**청구항 36**

제34항에 있어서, 표면 플라즈몬 공명법 또는 키넥사법에 의해 측정할 때  $10^{-9}$  M 이하,  $10^{-10}$  M 이하,  $10^{-11}$  M 이하,  $10^{-12}$  M 이하,  $10^{-13}$  M 이하,  $10^{-14}$  M 이하 및  $10^{-15}$  M 이하의  $K_D$ 로부터 선택되는 적어도 하나의 친화도로 표적에 결합하는 단백질 스캐폴드.

**청구항 37**

제35항에 있어서, 루프가 IgG에의 결합을 위한 부위를 형성하는 단백질 스캐폴드.

**청구항 38**

테나신 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인들의 콘센서스 서열로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함하며; 인간 IgG에 결합할 수 있는, 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인을 기반으로 한 단리된 단백질 스캐폴드.

**청구항 39**

본 명세서에 기재된 임의의 발명.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 세포 표적에 결합하는 능력을 비롯한 신규한 특성을 갖는 단백질 스캐폴드(scaffold)에 관한 것이다. 더욱 특히는, 본 발명은 파이브로넥틴 타입 III (FN3) 반복체의 콘센서스(consensus) 서열을 기반으로 한 단백질 스캐폴드에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 단클론 항체는 표적 분자에 대한 높은 친화성 및 특이성이 요망될 때 가장 널리 사용되는 치료 단백질 부류이다. 그러나, 그러한 표적에 결합하도록 조작될 수 있는 비-항체 단백질이 생의약품 산업에서 또한 매우 흥미가 있다. 이들 "대안적인 스캐폴드" 단백질은 그의 작은 크기, 다이설파이드 결합의 결여, 높은 안정성, 및 원핵 숙주에서 발현되는 능력으로 인하여 전통적인 항체에 비해 이점을 가질 수 있다. 신규한 정제 방법이 쉽게 적용되며, 이 방법은 약물/독소에 용이하게 콘주게이션되고, 조직 내로 효율적으로 침투하고, 다중특이적 바인더(binder)로 쉽게 포맷팅된다 (문헌[Skerra 2000, Binz and Pluckthun 2005]).

[0003] 한 가지 그러한 대안적인 스캐폴드로는 면역글로불린(Ig) 폴드(fold)가 있다. 이 폴드는 수천 가지의 비-항체

단백질뿐만 아니라 항체의 가변 영역에서도 발견된다. 한 가지 그러한 Ig 단백질, 인간 파이버넥틴 유래의 제10 파이버넥틴 타입 III(FN3) 반복체는 전체 Ig-폴드 구조는 유지하면서 표면 노출된 루프 내의 많은 돌연변이를 견딜 수 있음이 밝혀졌다. 따라서, 아미노산 변이체 라이브러리는 이들 루프로 만들어졌으며 많은 상이한 표적에 특이적인 바인더가 선택되었다 (문헌[Koide et al. 1998, Karatan et al. 2004]). 그러한 조작된 FN3 도메인은 중요한 생물물리학적 특성은 유지하면서 높은 친화도로 표적에 결합하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Parker et al. 2005]).

[0004] 잠재적인 대안적 스캐폴드 분자의 바람직한 물리적 특성은 높은 열안정성과, 열적 폴딩 및 폴딩 해제 (unfolding)의 가역성을 포함한다. 단백질 및 효소의 길보기 열 안정성을 증가시키기 위하여 몇몇 방법이 적용되었으며, 이는 고도로 유사한 열안정성 서열들에 대한 비교를 기반으로 한 합리적인 디자인, 다이설파이드 가교체를 안정화하는 디자인,  $\alpha$ -나선 성향을 증가시키는 돌연변이, 염 가교체의 조작, 단백질의 표면 전하의 변경, 지향 진화, 및 콘센서스 서열들의 조합을 포함한다 (문헌[Lehmann and Wyss 2001]). 높은 열안정성은 그러한 스캐폴드의 요망되는 특성이며, 그 이유는 이것이 얻어진 재조합 단백질의 수율을 증가시키고, 정제된 분자의 용해도를 향상시키고, 세포내 스캐폴드의 활성을 향상시키고, 면역원성을 감소시키고 제조에 있어서 저온 유통 체계(cold chain)의 필요성을 최소화할 수 있기 때문이다.

### 발명의 내용

[0005] 본 발명은 파이버넥틴 타입 III(FN3) 반복 단백질을 기반으로 한 단백질 스캐폴드, 코딩 핵산 또는 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 조성물, 조합물, 제형, 장치 및 이들의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 바람직한 실시 형태에서, 단백질 스캐폴드는 인간 테나신(Tenascin)-C (이하, "테나신") 유래의 다수의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열로 이루어진다. 추가의 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 단백질 스캐폴드는 15개의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열이다. 본 발명의 단백질 스캐폴드는 다양한 분자, 예를 들어 세포 표적 단백질에 결합하도록 디자인될 수 있다.

[0006] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 추가의 분자 또는 모이어티(moiety), 예를 들어 항체의 Fc 영역, 알부민 결합 도메인, 또는 반감기에 영향을 주는 기타 모이어티를 포함할 수 있다. 추가의 실시 형태에서, 본 발명의 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드를 코딩할 수 있는 핵산 분자에 결합될 수 있다.

[0007] 또한 본 발명은 적어도 하나의 단백질 스캐폴드가 검출가능한 양 및/또는 회수가 가능한 양으로 발현되는 조건 하에서 본 명세서에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 숙주 세포에서 다수의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열을 기반으로 한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 발현시키는 적어도 하나의 방법을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 (a) 다수의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열 및/또는 본 명세서에 기재된 코딩 핵산을 기반으로 한 단백질 스캐폴드; 및 (b) 적합한 및/또는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 적어도 하나의 조성물을 제공한다.

[0009] 추가로 본 발명은 파이버넥틴 타입 III(FN3) 반복체 단백질, 바람직하게는 다수의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열, 그리고 더욱 바람직하게는 인간 테나신 유래의 다수의 FN3 도메인들의 콘센서스 서열을 기반으로 한 단백질 스캐폴드의 라이브러리를 생성하는 방법을 포함한다. 라이브러리는 스캐폴드의 부분들, 예를 들어 루프 영역들 중 특정 위치에서 분자 내의 아미노산 또는 아미노산 개수를 (돌연변이에 의해) 변경시킴으로써 스캐폴드들의 연속 생성물들을 만듦으로써 형성된다. 라이브러리는 단일 루프의 아미노산 조성의 변경에 의해 또는 다수의 루프 또는 스캐폴드 분자의 추가의 위치의 동시 변경에 의해 생성될 수 있다. 변경된 루프는 그에 따라 길어지거나 짧아질 수 있다. 그러한 라이브러리는 각각의 위치의 모든 가능한 아미노산, 또는 아미노산의 디자인된 하위셋을 포함하도록 생성될 수 있다. 라이브러리 구성원은 시험관 내 디스플레이 (DNA, RNA, 리보솜 디스플레이 등), 효모, 박테리아 및 파지 디스플레이와 같은 디스플레이에 의한 스크리닝에 사용될 수 있다.

[0010] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 환원 조건 하에서의 안정성 및 고농도에서의 용해도와 같이 향상된 생물물리학적 특성을 제공하며, 본 단백질 스캐폴드는 원핵 시스템, 예를 들어 이. 콜라이(E. coli)에서, 진핵 시스템, 예를 들어 효모에서, 그리고 시험관 내 전사/번역 시스템, 예를 들어 토끼 망상 적혈구 용해물 시스템에서 발현 및 폴딩될 수 있다.

[0011] 추가의 일 태양에서, 본 발명은 표적 및 검출 바인더를 이용하여 본 발명의 스캐폴드 라이브러리를 패닝 (panning)함으로써 특정 표적에 결합하는 스캐폴드 분자를 생성하는 방법을 제공한다. 다른 관련된 태양에서, 본 발명은 원하는 활성을 갖는, 예를 들어 특정 친화도로 표적 단백질에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드를 생성하거나 친화성에 의해 성숙시키는 데 사용될 수 있는 스크리닝 방법을 포함한다. 친화성 성숙은 파지 디스플레이

레이 또는 시험관 내 디스플레이와 같이 시스템을 이용하여 돌연변이 유발 및 선별의 반복 라운드에 의해 달성될 수 있다. 이 과정 동안의 돌연변이 유발은 특정 스캐폴드 잔기에 대한 부위 특이적 돌연변이 유발, 변이 유발(error-prone) PCR로 인한 랜덤 돌연변이 유발, DNA 셔플링(shuffling) 및/또는 이들 기술의 조합의 결과일 수 있다. 본 발명은 추가로 본 명세서에 기재된 임의의 발명을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

<도 1>

도 1. NuPAGE 4-12% 비스-트리스 젤 (인비트로젠(Invitrogen))에서 실시되고 쿠마시 블루(coomassie blue)로 염색된 정제된 텐콘(Tencon)의 SDS-PAGE 분석. N은 천연 조건을 상징하며 R은 환원 조건을 상징한다.

<도 2>

도 2. PBS 중 텐콘의 원편광 이색성 분석.

<도 3>

도 3. PBS 중 텐콘 및 테나신 유래의 제3 FN3 도메인의 DSC 분석. 각각 54°C 및 78°C의 용융 온도가 얻어졌다.

<도 4>

도 4. pTencon-pIX의 파지미드 플라스미드 디자인. 발현은 Lac 프로모터에 의해 구동되고 분비는 OmpA 시그널 서열을 통하여 구동된다.

<도 5>

도 5. M13 파지 상에서의 Myc-텐콘의 디스플레이. 파지가 α-Myc 코팅 웰, CNT095 코팅 웰 및 비코팅 웰에 결합하는 것을 보여주는 ELISA 결과.

<도 6>

도 6. 인간 테나신의 제3 FN3 도메인의 루프 구조.

<도 7>

도 7. ELISA에 의한 IgG 선별 결과의 스크리닝. 개개의 클론은 대조군으로서 바이오티닐화 HSA 또는 바이오티닐화 IgG에의 결합에 대하여 시험되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0013] 본 발명은 파이브로넥틴 타입 III(FN3) 반복 단백질의 컨센서스 서열을 기반으로 한 단리된 재조합 및/또는 합성 단백질 스캐폴드를 제공하며, 이는 한정됨이 없이 포유류 유래의 스캐폴드를 포함하고, 이외에도 컨센서스 FN3 서열을 기반으로 한 단백질 스캐폴드를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 코딩 핵산 분자를 제공한다. 추가로, 본 발명은 진단 및 치료 조성물, 방법 및 장치를 포함하는, 상기 핵산 및 단백질 스캐폴드의 제조 방법 및 사용 방법을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0014] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 국소 투여 능력, 경구 투여 능력 또는 혈액-뇌 장벽의 횡단 능력, 다수의 표적 또는 동일 표적의 다수의 에피토프에 결합하는 2특이성 분자로 조작되는 포유류 세포 발현 능력에 대한 공급원 기능으로서의 단백질의 증가된 발현을 허용하는 이. 콜라이(E. Coli)에서의 발현 능력, 약물, 중합체 및 프로브에 콘주게이션되는 능력, 고농도로 제형화되는 능력, 및 그러한 분자가 질환에 걸린 조직 및 종양에 효과적으로 침투하는 능력과 같이, 통상적인 치료제에 비하여 이점을 제공한다.

[0015] 게다가, 단백질 스캐폴드는 항체의 가변 영역을 모방하는 이의 폴드와 관련하여 항체의 특성들 중 많은 것을 공유한다. 이러한 배향은 FN3 루프가 항체 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)과 유사하게 노출되는 것을 가능하게 한다. 상기 루프는 세포 표적에 결합할 수 있어야 하며, 루프는 변경되어, 예를 들어 친화성 성숙되어 소정 결합 특성 또는 관련 특성을 개선시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 단백질 스캐폴드의 6개의 루프 중 3개의 루프는 항체의 상보성 결정 영역들 (CDR 1-3), 즉, 항원 결합 영역들에 위상적으로 상응하는 반면, 나머지 3개의 루프는 항체 CDR에 유사한 방식으로 표면 노출된다. 이들 루프는 하기 표 3 및 도 6에 예시된 바와 같이 서열 번호 16의 서열의 잔기 13-16, 22-28, 38-43, 51-54,

60-64, 및 75-81에 걸쳐 있거나 그 근처에 걸쳐 있다. 바람직하게는, 잔기 22-28, 51-54, 및 75-81의 또는 그 근처의 루프 영역은 결합 특이성 및 친화성을 위하여 변경된다. 이들 루프 영역들 중 하나 이상을 다른 루프 영역들 및/또는 다른 가닥들에 의해 랜덤화시켜 이들의 서열을 골격 부분으로서 유지하여 라이브러리를 채우며, 특정 단백질 표적에 대하여 친화성이 높은 강력한 바인더를 상기 라이브러리로부터 선별할 수 있다. 루프 영역들 중 하나 이상은 항체 CDR의 단백질과의 상호작용과 유사하게 표적 단백질과 상호작용할 수 있다.

[0017] 본 발명의 스캐폴드는 예를 들어 공유 결합에 의한 상호작용을 통하여 다른 서브유닛을 포함할 수 있다. 항체 불변 영역의 전부 또는 일부분은 스캐폴드에 부착되어 항체-유사 특성, 예를 들어 보체 활성화 (ADCC), 반감기 등을 부여할 수 있다. 예를 들어, 이펙터 기능은 예를 들어 C1q 결합 및/또는 Fc $\gamma$ R 결합을 변경하고 그럼으로써 CDC 활성화 및/또는 ADCC 활성을 변화시킴으로써 제공 및/또는 제어될 수 있다. "이펙터 기능"은 (예를 들어, 대상에서) 생물 활성을 활성화하거나 감소시키는 데 책임이 있다. 이펙터 기능의 예에는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity; CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체(B cell receptor; BCR)의 하향 조절 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 그러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 단백질 스캐폴드 루프)과 조합되는 것을 필요로 할 수도 있으며, 다양한 분석 (예를 들어, Fc 결합 분석, ADCC 분석, CDC 분석 등)을 이용하여 평가될 수 있다.

[0018] 부가적으로, 독소 콘주게이트, 알부민 또는 알부민 바인더, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자는 원하는 특성을 위하여 스캐폴드 분자에 부착될 수 있다. 이들 기능들 중 임의의 것은 표준 기술에 의해, 예를 들어, 공개적으로 입수가능한 유전자 서열을 이용하여 제작된 재조합 융합 유전자로부터의 융합 단백질의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0019] 본 발명의 스캐폴드는 단량체 형태로 1특이성으로서 또는 다량체 형태로 2특이성 또는 다중 특이성으로 (상이한 단백질 표적에 대하여 또는 동일 단백질 표적 상의 에피토프들에 대하여) 사용될 수 있다. 부착은 공유 결합에 의한 것이거나 비-공유 결합에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 이량체성 2특이성 스캐폴드는 제1 표적 단백질 또는 에피토프에 대하여 특이성을 갖는 하나의 서브유닛 및 제2 표적 단백질 또는 에피토프에 대하여 특이성을 갖는 제2 서브유닛을 갖는다. 스캐폴드 서브유닛들은 결합가를 증가시키고 따라서 항원 결합의 결합성 (avidity)을 증가시킬 수 있는 다양한 배좌로 연결될 수 있다.

[0020] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "항체"는 면역글로불린 분자의 적어도 일부분, 예를 들어 (이에 한정되지 않음) 중쇄 또는 경쇄의 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 프레임워크 영역, 또는 이의 임의의 일부를 포함하는 분자를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 그러한 항체는 특정 리간드에 선택적으로 추가로 영향을 주는데, 예를 들어 그러한 항체는 시험관내, 원위치 및/또는 생체내에서 적어도 하나의 활성 또는 결합, 또는 수용체 활성화 또는 결합을 조절, 감소, 증가, 길항, 작용, 완화, 경감, 차단, 저해, 폐기시키고/시키거나 방해한다 (이에 한정되지 않음).

[0021] 용어 "항체"는 추가로 항체, 그의 분해 단편, 특정 부분 및 변이체를 포함하고자 의도되며, 이는 한정됨이 없이 항체 모방체 (mimetic)를 포함하거나 한정됨이 없이 단쇄 항체, 단일 도메인 항체 및 이의 단편을 포함하는, 항체 또는 이의 특정 단편 또는 부분의 구조 및/또는 기능을 모방하는 항체의 부분을 포함한다. 기능성 단편은 특정 표적에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, Fab (예를 들어, 파파인 분해에 의해), Fab' (예를 들어, 펩신 분해 및 부분적인 환원에 의해) 및 F(ab')<sub>2</sub> (예를 들어, 펩신 분해에 의해), facb (예를 들어, 플라스민 분해에 의해), pFc' (예를 들어, 펩신 또는 플라스민 분해에 의해), Fd (예를 들어, 펩신 분해, 부분적인 환원 및 재응집에 의해), Fv 또는 scFv (예를 들어, 분자생물학 기술에 의해) 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 특정 표적 또는 이의 일부에 결합할 수 있는 항체 단편이 본 발명에 포함된다 (예를 들어, [Colligan, Immunology, 상기 문헌] 참조).

[0022] 상기 단편은 당업계에 공지되어 있는 및/또는 본 명세서에 기재되어 있는 바와 같은 효소에 의한 절단, 합성 또는 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 말단절단 (truncated) 형태로 생산될 수 있다. 예를 들어, 중쇄의 CH<sub>1</sub> 도메인 및/또는 힌지 영역을 코딩하는 DNA 서열을 포함하도록, F(ab')<sub>2</sub> 중쇄 부분을 코딩하는 조합 유전자를 설계할 수 있다. 항체의 다양한 부분은 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 연결될 수 있거나 또는 유전 공학 기술을 사용하여 연속 단백질로서 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명의 스캐폴드 단백질은 세포, 조직, 기관 또는 동물 (포유류 및 인간을 포함함)에서 면역 장애 또는

질환, 심혈관 장애 또는 질환, 감염성, 악성 및/또는 신경학적 장애 또는 질환, 또는 기타 공지되거나 특정한 관련 병태 중 적어도 하나로부터 선택되는 그러나 이에 한정되는 것은 아닌 적어도 하나의 질환 또는 병태의 이환을 진단하거나, 모니터링하거나, 조절하거나, 치료하거나, 경감시키거나, 예방을 돕거나, 또는 그 증상을 감소시키기 위하여 측정되거나 초래되는 데 사용될 수 있다.

[0024] 상기 방법은 증상, 효과 또는 기작에 있어서의 이러한 조절, 치료, 경감, 예방 또는 감소를 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 스캐폴드 단백질을 포함하는 유효량의 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 유효량은 본 명세서에 기재되어 있거나 관련 기술 분야에 공지되어 있는 바와 같이 공지된 방법을 사용하여 수행되고 결정될 때, 단일 (예를 들어, 블루스), 다중 또는 연속 투여당 약 0.001 내지 500 mg/kg의 양, 또는 단일, 다중 또는 연속 투여당 혈청 1 ml 당 0.01-5000 µg의 농도의 혈청중 농도를 성취하는 양, 또는 임의의 유효 범위 또는 그 내의 값을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 스캐폴드 단백질 - 생산 및 제조

[0026] 본 발명의 적어도 하나의 스캐폴드 단백질은 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이 세포주, 혼합된 세포주, 불멸화(immortalized) 세포 또는 불멸화 세포의 클론 집단에 의해 선택적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)]을 참조하라.

[0027] 스캐폴드 단백질로부터의 아미노산은 당업계에 공지된 바와 같이 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화도, 온-레이트 (on-rate), 오프-레이트 (off-rate), 결합성, 특이성, 반감기, 안정성, 용해성 또는 임의의 다른 적합한 특성을 감소, 향상, 또는 변경시키기 위해 변경, 부가 및/또는 결실될 수 있다.

[0028] 선택적으로, 스캐폴드 단백질은 항원에 대한 고 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 조작될 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위하여 스캐폴드 단백질은 선택적으로 모 (parental) 서열 및 조작된 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 (conceptual) 조작 산물의 분석 과정에 의해 제조될 수 있다. 3차원 모델이 통상 이용가능하고 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 묘사하고 디스플레이하여 가능한 면역원성을 측정할 수 있는 컴퓨터 프로그램 (예를 들어, 미국 캘리포니아주 몬로비아 소재의 젠코, 인크.(Xencor, Inc.)의 이뮤노필터(Immunofilter) 프로그램)이 입수가 가능하다. 상기 디스플레이를 조사하여, 후보 서열이 기능함에 있어서의 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉, 후보 스캐폴드 단백질이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능케 한다. 이러한 방식으로, 잔기는 요구되는 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도가 달성되도록 모 서열 및 기준 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 상기 절차에 대하여 대안적으로, 또는 그에 더하여, 다른 적합한 조작 방법이 사용될 수 있다.

[0029] 스크리닝

[0030] 통상적으로 뉴클레오티드 (DNA 또는 RNA 디스플레이) 또는 펩티드 디스플레이 라이브러리, 예를 들어 시험관 내 디스플레이를 사용하여 유사한 단백질 또는 단편의 특이적 결합에 대하여 단백질 스캐폴드를 스크리닝할 수 있다. 이 방법은 요구되는 기능 또는 구조를 갖는 개별적인 멤버에 대하여 거대 펩티드 집단을 스크리닝하는 것을 포함한다. 디스플레이된 뉴클레오티드 또는 펩티드 서열의 길이는 3 내지 5000개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산이고, 빈번하게는 5-100개 아미노산이고, 흔히 약 8 내지 25개 아미노산이다. 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 직접적인 화학적 합성 방법 이외에, 몇몇 재조합 DNA 방법이 기재되어 있다. 한 종류는 박테리오파지 또는 세포의 표면 상에 펩티드 서열을 디스플레이하는 것을 포함한다. 각각의 박테리오파지 또는 세포는 특정 디스플레이된 펩티드 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 방법은 PCT 특허 공개 91/17271호, 91/18980호, 91/19818호, 및 93/08278호에 기재되어 있다.

[0031] 펩티드의 라이브러리를 생성하는 다른 시스템은 시험관내에서의 화학적 합성 및 재조합 방법 둘 모두의 태양을 포함한다. PCT 특허 공개 92/05258호, 92/14843호, 및 96/19256호를 참조하라. 또한 미국 특허 제5,658,754호; 및 제5,643,768호를 참조하라. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터, 및 스크리닝 키트를 인비트로젠 (Invitrogen) (미국 캘리포니아주 칼스바드), 및 캠브리지 안티바디 테크놀로지스(Cambridge Antibody Technologies) (영국 캠브리지셔)와 같은 공급처로부터 구매가능하다. 예를 들어, 미국 특허 제4704692호, 제

4939666호, 제4946778호, 제5260203호, 제5455030호, 제5518889호, 제5534621호, 제5656730호, 제5763733호, 제5767260호, 제5856456호 (엔존(Enzon)에 양도); 제5223409호, 제5403484호, 제5571698호, 제5837500호 (다이엑스(Dyax)에 양도), 제5427908호, 제5580717호 (애피맥스(Affymax)에 양도); 제5885793호 (캠브리지 안티바디 테크놀로지스에 양도); 제5750373호 (제넨테크(Genentech)에 양도), 제5618920호, 제5595898호, 제5576195호, 제5698435호, 제5693493호, 제5698417호 (엑소오마(Xoma)에 양도), 문헌[Colligan, 상기 문헌]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조하라.

[0032] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 광범위한 친화도 ( $K_D$ )로 인간 또는 기타 포유류 단백질에 결합할 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 당업자에 의해 실행되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명법 또는 키넥사법(Kinexa method)에 의해 결정할 때 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 고 친화도로, 예를 들어  $0.1-9.9$  (또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)  $\times 10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$  또는 그 안의 임의의 범위 또는 값과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 약  $10^{-7}$  M 이하의  $K_D$ 로 표적 단백질에 선택적으로 결합할 수 있다.

[0033] 임의의 적합한 방법을 사용하여 항원에 대한 단백질 스캐폴드의 친화도 또는 결합력을 실험에 의해 측정할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions, "In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984)]; 문헌[Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법 참조). 상이한 조건 (예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정할 경우, 특정 단백질 스캐폴드-항원 상호작용의 측정되는 친화도는 다양할 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 파라미터 (예를 들어,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ )의 측정은 바람직하게는 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 완충제로 행해진다.

[0034] 경쟁적 분석을 본 발명의 단백질 스캐폴드를 이용하여 실시하여 어떤 단백질, 항체 및 기타 길항제가 표적 단백질에의 결합에 대하여 본 발명의 단백질 스캐폴드와 경쟁하는지 및/또는 에피토프 영역을 공유하는지를 결정할 수 있다. 당업자에게 꽤 공지되어 있는 이들 분석은 단백질 상의 제한된 개수의 결합 부위들에 대한 길항제들 또는 리간드들 사이의 경쟁을 평가한다. 단백질 및/또는 항체는 경쟁 전 또는 후에 고정되거나 불용화되며, 표적 단백질에 결합된 샘플은 예를 들어 (단백질/항체가 사전 불용화되었을 경우) 가만히 따름으로써 또는 (단백질/항체가 경쟁 반응 후에 침전되었을 경우) 원심분리에 의해 미결합 샘플로부터 분리된다. 또한, 경쟁적 결합은 표적 단백질에의 단백질 스캐폴드의 결합에 의해 또는 상기 결합의 기여에 의해 기능이 변경되는지에 의해, 예를 들어 단백질 스캐폴드 분자가 예를 들어 표지체의 효소적 활성을 저해하는지 또는 강화하는지에 의해 결정될 수 있다. 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이 ELISA 및 기타 기능적 분석이 사용될 수 있다.

[0035] 핵산 분자

[0036] 단백질 스캐폴드를 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 RNA 형태, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태 또는 클로닝에 의해 얻어지거나 합성에 의해 생성된 게놈 DNA 및 cDNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 삼중가닥, 이중가닥 또는 단일가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 한 스트랜드의 임의의 부분은 센스 스트랜드로도 공지된 코딩 스트랜드일 수 있고, 안티-센스 스트랜드로도 언급되는 비-코딩 스트랜드일 수 있다.

[0037] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 선택적으로 하나 이상의 인트론을 갖는 개방 판독 프레임 (ORF)을 포함하는 핵산 분자, 예를 들어 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 적어도 하나의 특정 부분 (그러나 이에 한정되지 않음); 단백질 스캐폴드의 코딩 서열 또는 표적 단백질에 결합하는 루프 영역을 포함하는 핵산 분자; 및 상기에 기재된 것과 사실상 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하지만 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 본 명세서에 기재된 및/또는 당업계에 공지된 단백질 스캐폴드를 여전히 코딩하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전자 코드는 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 당업자가 본 발명의 특정한 단백질 스캐폴드를 코딩하는 상기 축퇴성 핵산 변이체를 생성시키는 것은 통상적인 것이다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌]을 참조하며, 그러한 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다.

[0038] 본 명세서에 나타난 바와 같이, 단백질 스캐폴드를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는 단독으로 단백질 스캐폴드 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 것; 전체 단백질 스캐폴드 또는 이의 일부의 코딩 서열; 단백질 스캐폴드의 단편 또는 일부의 코딩 서열과, 추가의 서열, 예를 들어, 적어도 하나의 시그널 리더 또는 융합 펩티드의 코딩 서열 - 이는 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그널을 포함하는 mRNA 프로세싱 (예를 들어, mRNA의 리보솜 결합 및 안정성), 전사에서 그 역할을 하는 전사된 비번역 서열과 같은 비-코딩 5' 및 3' 서열을 포

함하지만 이에 한정되지 않는 추가의 비-코딩 서열과 함께, 적어도 하나의 인트론과 같은, 전술한 추가의 코딩 서열을 포함하거나 포함하지 않음 - ; 부가적 기능을 제공하는 것과 같은 추가의 아미노산을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 단백질 스캐폴드를 코딩하는 서열은 마커 서열, 예를 들어 단백질 스캐폴드 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 단백질 스캐폴드의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 코딩하는 서열에 융합될 수 있다.

[0039] 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드

[0040] 본 발명은 선택적인 혼성화 조건 하에서 본원에서 설명되는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 상기 실시 형태의 폴리뉴클레오티드는 그러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 단리, 검출, 및/또는 정량하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분적인 또는 전장 클론을 확인, 단리, 또는 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 단리된 게놈 또는 cDNA 서열이거나, 또는 그렇지 않으면 인간 또는 포유류 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 상보성이다.

[0041] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80% 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90% 전장 서열, 그리고 보다 바람직하게는 적어도 95% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 제시를 증가시키도록 정규화될 수 있다. 낮거나 중등 엄격성 혼성화 조건은 전형적으로, 그러나 비배타적으로, 상보성 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중등 및 높은 엄격성 조건은 동일성이 더 큰 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮은 엄격성 조건은 약 70% 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적인 혼성화를 허용하고 동원성 (orthologous) 또는 이원성 (paralogous) 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0042] 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 단백질 스캐폴드의 적어도 일부분을 코딩할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하기 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 문헌[Colligan, 상기 문헌]을 참조하라.

[0043] 핵산의 제조

[0044] 본 발명의 단리된 핵산은 당업계에 잘 알려진 바와 같이 (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술 및/또는 (d) 이들의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0045] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 부가적으로 서열을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위는 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 핵산 내로 삽입될 수 있다. 또한, 번역가능한 서열은 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 핵사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 코딩 서열을 제외한 본 발명의 핵산은 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터, 또는 링커이다.

[0046] 추가의 서열은 클로닝 및/또는 발현에서 그 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕거나 또는 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 도입을 개선하기 위해 상기 클로닝 및/또는 발현 서열에 부가될 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터, 및 링커의 사용은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조한다).

[0047] 핵산 제조를 위한 재조합 방법

[0048] RNA, cDNA, 게놈 DNA, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 본 발명의 단리된 핵산 조성물은 업계의 당업자에게 공지된 임의의 수의 클로닝 방법을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 선택적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하기 위해 사용된다. RNA의 단리 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 제작은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌]을 참조).

[0049] 핵산 스크리닝 및 단리 방법

[0050] cDNA 또는 게놈 라이브러리는 본원에 설명된 것과 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 서열에 기초한 프로브를 사용하여 스크리닝될 수 있다. 프로브는 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 혼성화하여 동일하거나 상이한 유기체 내의 상동 유전자를 단리하기 위해 사용될 수 있다. 당업자는 다양한 정도의 혼성화 엄격성이 분석에 사용될 수

있고; 혼성화 배지 또는 세척 배지가 엄격할 수 있음을 이해할 것이다. 혼성화 조건이 보다 더 엄격해지면, 이중체 형성의 발생을 위해 프로브와 표적 사이의 상보성 정도가 보다 커야 한다. 엄격성 정도는 온도, 이온강도, pH 및 포름아미드와 같은 부분 변성 용매의 존재 중 하나 이상에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 혼성화 엄격성은 예를 들어 포름아미드의 농도를 0% 내지 50% 범위 내에서 조작하여 반응 용액의 극성을 변경하여 편리하게 변경한다. 검출가능한 결합을 위해 필요한 상보성 정도 (서열 동일성)는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 엄격성에 따라 변할 것이다. 상보성 정도는 최적으로는 100%, 또는 70-100%, 또는 그안의 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머에서의 작은 서열 변이는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 엄격성을 감소시켜 보상될 수 있음을 이해해야 한다.

[0051] RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 당업계에 공지되어 있고 과도한 실험을 실시하지 않으면서, 본 명세서의 교시 사항 및 지침을 기초로 하여 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0052] 공지의 DNA 또는 RNA 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 및 관련 증폭 방법 (예를 들어, 미국 특허 제 4,683,195호, 제 4,683,202호, 제 4,800,159호, 제 4,965,188호 (물리스(Mullis) 등); 제 4,795,699호 및 제 4,921,794호 (태보(Tabor) 등); 제 5,142,033호 (인니스(Innis)); 제 5,122,464호 (윌슨(Wilson) 등); 제 5,091,310호 (인니스); 제 5,066,584호 (질렌스텐(Gyllensten) 등); 제 4,889,818호 (젤판드(Gelfand) 등); 제 4,994,370호 (실버(Silver) 등); 제 4,766,067호 (비스워즈(Biswas)); 제 4,656,134호 (링골드(Ringold)를 참조) 및 이중-가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티-센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭 (미국 특허 제 5,130,238호, 말렉(Malek) 등), 상표명 NASBA)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 참고문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌]; 또는 문헌[Sambrook, 상기 문헌] 참조).

[0053] 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 및 관련 유전자를 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 또한, PCR 및 기타 시험관내 증폭 방법은 예를 들어 발견되는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 클로닝하고, 샘플 내의 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하는 핵산을 제조하거나, 핵산 서열 결정 또는 기타 목적에 유용할 수 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 당업자에게 지시하기에 충분한 기술의 예는 문헌[Berger, 상기 문헌], 문헌[Sambrook, 상기 문헌], 및 문헌[Ausubel, 상기 문헌], 및 미국 특허 제 4,683,202호 (1987) (물리스 등); 및 문헌[Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)]에서 볼 수 있다. 게놈 PCR 증폭을 위해 구매가능한 키트가 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 어드밴티지-지씨 게노믹 PCR 키트(Advantage-GC Genomic PCR Kit) (클론테크(Clontech))를 참조한다. 추가로, 예를 들어, T4 유전자 32 단백질 (보링거 만하임(Boehringer Mannheim))은 긴 PCR 생성물의 수율을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0054] 핵산 제조를 위한 합성 방법

[0055] 본 발명의 단리된 핵산은 또한 공지 방법에 의해 직접적인 화학적 합성으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하는데, 이는 상보성 서열과의 혼성화, 또는 단일 가닥을 주형으로서 사용하여 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 당업자라면 DNA의 화학적 합성이 약 100개 또는 이보다 많은 염기의 서열로 제한될 수 있는 반면, 보다 긴 서열은 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 얻어질 수 있음을 인식할 것이다.

[0056] 제조합 발현 카세트

[0057] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 제조합 발현 카세트를 추가로 제공한다. 본 발명의 핵산 서열, 예를 들어 본 발명의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 cDNA 또는 게놈 서열은 적어도 하나의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 제조합 발현 카세트 제작에 사용될 수 있다. 제조합 발현 카세트는 의도하는 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시하는 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 일반적으로 포함한다. 이중성 및 비-이중성 (즉, 내인성) 프로모터 모두가 본 발명의 핵산의 발현을 지시하기 위해 사용될 수 있다.

[0058] 일부 실시 형태에서, 프로모터, 인핸서, 또는 기타 요소로서의 역할을 하는 단리된 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향조절 또는 하향조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 비-이중성 형태의 적절한 위치 (상류, 하류 또는 인트론 내)에서 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내에서 또는 시험관내에서 변경될 수 있다.

- [0059] 백터 및 숙주 세포
- [0060] 또한, 본 발명은 당업계에 공지된 바와 같이, 본 발명의 단리된 핵산 분자, 재조합 백터에 의해 유전공학적으로 처리된 숙주 세포, 및 재조합 기술에 의한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 생성에 관한 것이다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]; 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌]을 참조하라.
- [0061] 폴리뉴클레오티드는 숙주 내에서 증식을 위한 선택가능한 마커를 함유하는 백터에 선택적으로 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 백터는 침전물, 예를 들어 인산칼슘 침전물 내에, 또는 하전된 지질과의 복합체 내에 도입된다. 백터가 바이러스일 경우, 적합한 패키징 (packaging) 세포주를 이용하여 시험관내에서 패키징된 후, 숙주 세포 내로 형질도입된다.
- [0062] DNA 삽입물은 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 구조체는 전사 개시, 종결을 위한 부위, 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 구조체에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 바람직하게는 번역되는 mRNA의 말단부에 적절하게 위치한, 처음의 번역 개시 및 종결 코돈 (예를 들어, UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 것이며, 포유류 또는 진핵 세포 발현에는 UAA 및 UAG가 바람직하다.
- [0063] 발현 백터는 바람직하게는 적어도 하나의 선택가능한 마커를 선택적으로 포함할 것이다. 그러한 마커는 예를 들어 메토타렉세이트 (MTX), 다이하이드로폴레이트 리덕타아제 (DHFR, 미국 특허 제4,399,216호; 제4,634,665호; 제4,656,134호; 제4,956,288호; 제5,149,636호; 제5,179,017호), 진핵 세포 배양을 위한 암피실린, 네오마이신(G418), 마이코페놀산 또는 글루타민 신테타아제(GS, 미국 특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 제5,827,739호) 내성 및 이. 콜라이 및 다른 세균 또는 원핵세포 배양을 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다 (상기 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨). 상기 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 적절한 백터는 당업자에게 자명하다. 숙주 세포 내로의 백터 구조체의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 방법은 문헌 [Sambrook, 상기 문헌, Chapters 1-4 및 16-18]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 1, 9, 13, 15, 16]과 같은 선행기술에 기재되어 있다.
- [0064] 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있고, 분비 시그널뿐만 아니라 추가의 이중성 기능성 영역도 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역은 정제 동안, 또는 후속 취급 및 보관 동안에 숙주 세포 내에서의 안정성 및 지속성을 개선시키기 위해 단백질 스캐폴드의 N-말단에 부가될 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티(moiety)가 정제를 용이하게 하기 위해 본 발명의 단백질 스캐폴드에 부가될 수 있다. 상기 영역은 단백질 스캐폴드 또는 그의 적어도 하나의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 상기 방법은 많은 표준 실험 매뉴얼, 예를 들어 문헌[Sambrook, 상기 문헌, Chapters 17.29-17.42 및 18.1-18.74]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 16, 17 및 18]에 기재되어 있다.
- [0065] 당업자는 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산의 발현에 이용가능한 많은 발현 시스템을 잘 알 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 핵산은 본 발명의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포에서 (조작에 의한) 턴온(turn on)에 의해 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호, 및 제5,733,761호에 기재되어 있는 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.
- [0066] 단백질 스캐폴드, 이의 특정 부분 또는 변이체의 생성에 유용한 세포 배양물의 예시적인 것으로는 당업계에 공지된 바와 같이 세균, 효모 및 포유류 세포가 있다. 포유류 세포 시스템은 종종 세포의 단일층 형태일 것이지만, 포유류 세포 현탁액 또는 생물반응기도 사용될 수 있다. 무손상 글리코실화 단백질을 발현할 수 있는 많은 적합한 숙주 세포주가 당업계에 개발되어 있고, COS-1 (예를 들어, ATCC CRL 1650), COS-7 (예를 들어, ATCC CRL1651), HEK293, BHK21 (예를 들어, ATCC CRL-10), CHO (예를 들어, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1 (예를 들어, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함하고, 이들은 예를 들어 미국 버지니아주 매나서스 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection) (www.atcc.org)으로부터 쉽게 입수가 가능하다. 바람직한 숙주 세포는 림프구 기원의 세포, 예를 들어 골수종 및 림프종 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 실시 형태에서, 재조합 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.

- [0067] 이들 세포에 대한 발현 벡터는 다음과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 하기 발현 조절 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 복제 기점; 프로모터 (예를 들어, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터 (미국 특허 제 5,168,062호, 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk (포스포글리세레이트 키나아제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터 (미국 특허 제5,266,491호), 적어도 하나의 인간 프로모터; 인핸서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예를 들어 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 (예를 들어, SV40 라지 T 폴리 A 부가 부위), 및 전사 종결자 서열. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., 상기 문헌]; 문헌[Sambrook, et al., 상기 문헌]을 참조한다. 본 발명의 핵산 또는 단백질 생산에 유용한 다른 세포는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어 세포주 및 하이브리도마의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 카탈로그(American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas) (www.atcc.org) 또는 다른 공지의 또는 상업적 공급원으로부터 이용가능하다.
- [0068] 진핵 숙주 세포가 사용될 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결자 서열은 일반적으로 벡터에 통합된다. 종결자 서열의 예는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사체의 정확한 스플라이싱을 위한 서열도 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40로부터의 VP1 인트론이다 (문헌[Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)]). 추가로, 숙주 세포 내의 복제를 조절하는 유전자 서열은 당업계에 공지된 바와 같이 벡터 내로 통합될 수 있다.
- [0069] 단백질 스캐폴드의 정제
- [0070] 단백질 스캐폴드는 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하지만 이에 한정되지 않는 잘 알려진 방법으로 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 ("HPLC")도 정제를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Colligan, Current Protocols in Immunology], 또는 문헌[Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 예를 들어, 제1장, 제4장, 제6장, 제8장, 제9장, 제10장]을 참조하라.
- [0071] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 천연 정제된 생성물, 화학적 합성 절차의 생성물, 및 예를 들어, 이. 콜라이, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유류 세포를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 생산된 생성물을 포함한다. 재조합 생성 절차에 사용된 숙주에 따라 본 발명의 단백질 스캐폴드는 글리코실화될 수 있거나 또는 비-글리코실화될 수 있다. 그러한 방법은 많은 표준 실험실 매뉴얼, 예를 들어 문헌[Sambrook, 상기 문헌, Sections 17.37-17.42]; 문헌 [Ausubel, 상기 문헌, Chapters 10, 12, 13, 16, 18 및 20], 문헌[Colligan, Protein Science, 상기 문헌, Chapters 12-14]에 기재되어 있고, 상기 문헌 전부는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0072] 아미노산 코드
- [0073] 본 발명의 단백질 스캐폴드를 구성하는 아미노산은 흔히 약기된다. 아미노산 표기는 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이 아미노산을 그의 1문자 코드, 그의 3문자 코드, 명칭, 또는 3 뉴클레오티드 코돈(들)에 의해 표시될 수 있다 (문헌[Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994] 참조). 본 발명의 단백질 스캐폴드는 본 명세서에 특정된 바와 같이 자연 돌연변이 또는 인간에 의한 조작으로부터의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 기능에 필수적인 본 발명의 단백질 스캐폴드의 아미노산은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 부위 지정 돌연변이 유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이 유발 (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 8, 15]; 문헌[Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085(1989)]에 의해 확인할 수 있다. 후자의 절차는 분자 내의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이어서, 생성되는 돌연변이 분자를 적어도 하나의 중화 활성과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 생물학적 활성에 대하여 시험한다. 또한, 단백질 스캐폴드 결합에 중요한 부위는 구조 분석, 예를 들어 결정화, 핵자기공명 또는 광친화 표지(photoaffinity labeling) (문헌[Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) and de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)])에 의해 확인할 수 있다.
- [0074] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 생물학적으로 활성인 단백질 스캐폴드를 포함한다. 생물학적으로 활성인 단백질 스캐폴드는 천연 (비-합성)의 내인성의 또는 관련된 그리고 공지된 단백질 스캐폴드의 적어도 20%, 30, 또는 40%, 그리고 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 또는 70%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 또는 95%-100% 또는 그 이상의 비활성을 갖는다. 효소 활성 및 기질 특이성을 분석하는 방법 및 정량화하는 수단이 당업자에게 잘 알려져 있다.

- [0075] 다른 태양에서, 본 발명은 유기 모이어티의 공유 결합적 부착에 의해 변형된, 본 명세서에 기재된 단백질 스캐폴드 및 단편에 관한 것이다. 그러한 변형에 의해 약동학적 특성 (예를 들어, 생체내 혈청 반감기 증가)이 개선된 단백질 스캐폴드 단편이 생성될 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지형 친수성 중합체기, 지방산기, 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 친수성 중합체기는 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있고, 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르기는 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 변형된 단백질 스캐폴드는 항체에 직접 또는 간접적으로 공유결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드 또는 단편에 결합되는 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산"은 모노-카르복실산 및 다이-카르복실산을 포함한다. "친수성 중합체기"는 이 용어가 본 명세서에 사용될 때 옥탄 중에서보다 물 중에서 보다 가용성인 유기 중합체를 말한다. 예를 들어, 폴리라이신은 옥탄 중에서보다 물 중에서 더 가용성이다. 따라서, 폴리라이신의 공유 결합적 부착에 의해 변형된 단백질 스캐폴드가 본 발명에 포함된다. 본 발명의 단백질 스캐폴드의 변형에 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 예를 들어 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등), 탄수화물 (예를 들어, 텍스트란, 셀룰로오스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예를 들어, 폴리라이신, 폴리알라닌, 폴리아스파레이트 등), 폴리알칸 옥사이드 (예를 들어, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 엔티티 (entity)로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 예를 들어, PEG5000 및 PEG20000 (여기서, 아래첨자는 중합체의 평균 분자량 (달톤)임)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체기는 1 내지 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환된 친수성 중합체를 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 아민기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트(예를 들어, N,N-카르보닐 다이이미다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 히드록실기와 커플링될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 단백질 스캐폴드의 변형에 적합한 지방산과 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드 변형에 적합한 지방산은 예를 들어 n-도데카노에이트 (C<sub>12</sub>, 라우레이트), n-테트라데카노에이트 (C<sub>14</sub>, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트 (C<sub>18</sub>, 스테아레이트), n-에이코사노에이트 (C<sub>20</sub>, 아라키데이트), n-도코사노에이트 (C<sub>22</sub>, 베헤네이트), n-트라이아콘타노에이트 (C<sub>30</sub>), n-테트라콘타노에이트 (C<sub>40</sub>), 시스- $\Delta$ 9-옥타데카노에이트 (C<sub>18</sub>, 올레레이트), 모든 시스- $\Delta$ 5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트 (C<sub>20</sub>, 아라키도네이트), 옥탄다이오익산, 테트라데칸다이오익산, 옥타데칸다이오익산, 도코산다이오익산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르는 선형 또는 부지형 저급 알킬기 포함하는 다이카르복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬기는 1 내지 약 12개, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.
- [0078] 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. "변형제"는 이 용어가 본 명세서에 사용될 때, 활성화기를 포함하는 적합한 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 말한다. "활성화기"는 적합한 조건 하에 제2 화학과 반응하여 변형제와 제2 화학기 사이의 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화기는 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시석신이미딜 에스테르 (NHS) 등과 같은 친전자성 기를 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화기는 예를 들어 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴롤일, 피리딜 다이설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등을 포함한다. 알데히드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지드기는 3가 인기와 반응하여 포스포라미데이트 또는 포스포리미드 연결을 형성할 수 있다. 활성화 기를 분자 내에 도입하기에 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (문헌[예를 들어, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)] 참조). 활성화 기는 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접, 또는 링커 모이어티, 예를 들어 2가 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 기 (여기서, 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 또는 황과 같은 헤테로원자에 의해 대체될 수 있음)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티는 예를 들어 테트라에틸렌 글리콜, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH- 및 -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH-NH-를 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는 예를 들어 모노-Boc-알킬다이아민 (예를 들어, 모노-Boc-에틸렌다이아민, 모노-Boc-다이아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이미드 (EDC)의 존재 하에 지방산과 반응

시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 amid 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. Boc 보호기는 트라이플루오로아세트산 (TFA) 처리에 의해 생성물로부터 제거하여, 설명된 바와 같이 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나, 말레산 무수물과 반응시키고 생성되는 생성물을 환화하여 지방산의 활성화 말레이미도 유도체를 제조할 수 있는 1차 아민을 노출시킬 수 있다 (예를 들어, 그 전체 교시 내용이 본 명세서에 참고로 포함되는 톰슨(Thompson) 등의 국제특허 공개 WO 92/16221호 참조).

[0079] 본 발명의 변형된 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드 또는 단편을 변형제와 반응시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민-반응성 변형제, 예를 들어 PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 부위 비-특이적 방식으로 단백질 스캐폴드에 결합될 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드의 특이적인 부위에 결합되는 유기 모이어티를 포함하는 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 적합한 방법, 예를 들어 역 단백질 분해 (reverse proteolysis)를 사용하여 제조될 수 있다 (문헌[Fisch *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992)]; 문헌[Werlen *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994)]; 문헌[Kumaran *et al.*, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997)]; 문헌[Itoh *et al.*, *Bioorg.*, 24(1): 59-68 (1996)]; 문헌[Capellas *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)], 및 문헌[Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)].

[0080] 치료 활성 성분을 추가로 포함하는 단백질 스캐폴드 조성물

[0081] 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 선택적으로 항감염약, 심혈관(CV)계 약물, 중추신경계(CNS) 약물, 자율신경계(ANS) 약물, 기도 약물, 위장(GI)관 약물, 호르몬 약물, 체액 또는 전해질 균형을 위한 약물, 혈액 약물, 항신생물제, 면역조절 약물, 눈, 귀 또는 코 사용을 위한 약물, 국소 약물, 영양제 약물 등 중 적어도 하나로부터 선택되는 유효량의 적어도 하나의 화합물 또는 단백질 (소분자 또는 대분자)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약물들은 본 명세서에서 제시된 각각에 있어서 제형화, 지시, 투약 및 투여를 포함하여 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001]; 문헌[Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ]; 문헌[Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al.*, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT] 참조).

[0082] 항-감염약은 살아메바제 또는 적어도 하나의 항원중제, 구충제, 항진균제, 항말라리아제, 항결핵제 또는 적어도 하나의 항나병약, 아미노글리코사이드, 페니실린, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 설펜아미드, 플루오로퀴놀론, 항바이러스제, 마크롤리드 항감염제, 및 기타 항감염제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. CV 약물은 수축촉진약, 항부정맥제, 항협심증제, 항고혈압제, 고지혈증 치료제, 및 기타 심혈관 약물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. CNS 약물은 비마약성 진통제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있거나, 해열제, 비스테로이드성 소염 약물, 마약 또는 적어도 하나의 아편유사 진통제, 진정수면제, 항경련제, 항우울제, 항불안약, 정신병 치료제, 중추신경계 자극제, 항과민성병약, 및 기타 중추신경계 약물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. ANS 약물은 콜린작용 약물 (부교감흥분제), 항콜린작용 약물, 아드레날린성 (교감신경 흥분제), 아드레날린성 차단제 (부교감신경 억제), 골격근이완제, 및 신경근육 차단제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 호흡기관 약물은 항히스타민제, 기관지확장제, 거담제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있거나, 적어도 하나의 진해제, 및 기타 호흡기관 약물일 수 있다. GI관 약물은 제산제 또는 적어도 하나의 흡착제 또는 적어도 하나의 고창 방지제(antiflatulent), 소화 효소, 또는 적어도 하나의 담석 가용화제, 지사제, 설사제, 항구토제 및 항귀양제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 호르몬 약물은 코르티코스테로이드, 안드로겐, 적어도 하나의 단백동화 스테로이드, 에스트로겐 또는 적어도 하나의 프로그스테인, 생식선자극호르몬, 항당뇨병 약물 또는 적어도 하나의 글루카곤, 갑상선 호르몬, 갑상선 호르몬 길항제, 뇌하수체 호르몬 및 부갑상선-유사 약물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 체액 및 전해질 균형을 위한 약물은 이뇨제, 전해질 또는 적어도 하나의 대체 용액, 산화제 또는 적어도 하나의 알칼리화제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 혈액 약물은 조혈제, 항응고제, 혈액 유도제 및 혈전용해 효소로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 항신생물제는 알킬화제, 항대사물질, 항생제 항신생물제, 호르몬 균형을 변경시키는 항신생물제 및 기타 항신생물제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 면역조절 약물은 면역억제제, 백신, 또는 적어도 하나의 독소이드, 항독소 또는 적어도 하나의 항백독소, 면역 혈청 및, 생물학적 반응 변형제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 눈, 귀, 및 코 사용을 위한 약물은 안과용 항감염약, 안과용 소염제, 동공축소제, 동공확대제, 안과용 혈관수축제, 기타 안과용 약제, 귀 사용 약물 및 코 사용 약물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 국소용 약물은 국소용 항감염약, 음약 또는 적어도 하나의 이살충제 또는 국소용 코르티코스테로이드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 영양제는 비타민, 미네랄, 또는 고칼로리제(calorics)로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문

현[Nursing 2001 Drug Handbook, 상기 문헌] 참조).

[0083]

적어도 하나의 살아메바제 또는 항원충제는 아토바쿠온, 클로로퀸 염산염, 클로로퀸 인산염, 메트로니다졸, 메트로니다졸 염산염 및 펜타미딘 이세티오네이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 구충제는 메벤다졸, 피란텔 파모에이트 및 티아벤다졸로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항진균제는 암포테리신 B, 암포테리신 B 콜레스테릴 설페이트 복합체, 암포테리신 B 지질 복합체, 암포테리신 B 리포솜, 플루코나졸, 플루시토신, 그리세오폴빈 마이크로시즈, 그리세오폴빈 울트라마이크로시즈, 이트라코나졸, 케토코나졸, 니스타틴 및 테르비나핀 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항말라리아제는 클로로퀸 염산염, 클로로퀸 인산염, 독시사이클린, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 메플로퀸 염산염, 프리마퀸 인산염, 피리메타민, 및 설과독신을 포함하는 피리메타민으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항결핵약 또는 항나병약은 클로파지민, 사이클로세린, 답손, 에탐부톨 염산염, 이소니아지드, 피라진아미드, 리파부틴, 리팜핀, 리파벤틴 및 스트렙토마이신 설페이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 아미노글리코시드는 아미카신 설페이트, 젠타미신 설페이트, 네오마이신 설페이트, 스트렙토마이신 설페이트 및 토브라마이신 설페이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 페니실린은 아목실린/클라불라네이트 칼륨, 아목시실린 삼수화물, 암피실린, 암피실린 나트륨, 암피실린 삼수화물, 암피실린 나트륨/술락탐 나트륨, 클록사실린 나트륨, 디클록사실린 나트륨, 메즐로실린 나트륨, 나프실린 나트륨, 옥사실린 나트륨, 페니실린 G 벤자틴, 페니실린 G 칼륨, 페니실린 G 프로카인, 페니실린 G 나트륨, 페니실린 V 칼륨, 피페라실린 나트륨, 피페라실린 나트륨/타조박탐 나트륨, 티카르실린 이나트륨 및 티카르실린 이나트륨/클라불라네이트 칼륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 세팔로스포린은 세파클로르, 세파드록실, 세파졸린 나트륨, 세프디니르, 세페피메 염산염, 세픽시메, 세프메타졸 나트륨, 세포니시드 나트륨, 세포페라존 나트륨, 세포탁심 나트륨, 세포테탄 이나트륨, 세폭시틴 나트륨, 세프포독심 프록세틸, 세프프로질, 세프타지딤, 세프티부텐, 세프티죽심 나트륨, 세프트리악손 나트륨, 세푸록심 악세틸, 세푸록심 나트륨, 세팔렉신 염산염, 세팔렉신 일수화물, 세프라딘 및 로라카르베프로로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 테트라사이클린은 데메클로사이클린 염산염, 독시사이클린 칼슘, 독시사이클린 하이클레이트, 독시사이클린 염산염, 독시사이클린 일수화물, 미노사이클린 염산염 및 테트라사이클린 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 설피나마이드는 코-트리록사졸, 설파디아진, 설과메톡사졸, 설피속사졸 및 설피속사졸 아세틸로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 플루오로퀴놀론은 알라트로플록사신 메실레이트, 시프로플록사신, 에녹사신, 레보플록사신, 로메플록사신 염산염, 날리딕스산, 노르플록사신, 오픈록사신, 스파르플록사신 및 트로바플록사신 메실레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 플루오로퀴놀론은 알라트로플록사신 메실레이트, 시프로플록사신, 에녹사신, 레보플록사신, 로메플록사신 염산염, 날리딕스산, 노르플록사신, 오픈록사신, 스파르플록사신 및 트로바플록사신 메실레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항바이러스제는 아바카비르 설페이트, 아사이클로비르 나트륨, 아만타딘 염산염, 암프레나비르, 시도포비르, 델라비리딘 메실레이트, 디다노신, 에파비렌즈, 팜사이클로비르, 포미비르센 나트륨, 포스카르넷 나트륨, 간사이클로비르, 인디나비르 설페이트, 라미부딘, 라미부딘/지도부딘, 델피나비르 메실레이트, 네비라핀, 오셀타미비르 인산염, 리바비린, 리만타딘 염산염, 리토나비르, 사퀴나비르, 사퀴나비르 메실레이트, 스타부딘, 발라사이클로비르 염산염, 잘시타빈, 자나미비르 및 지도부딘으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 마크롤린 항감염제는 아지트로마이신, 클라리트로마이신, 디리트로마이신, 에리트로마이신 염기, 에리트로마이신 에스톨레이트, 에리트로마이신 에틸석시네이트, 에리트로마이신 락토비오네이트 및 에리트로마이신 스테아레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 항-감염제는 아즈트레오남, 바시트라신, 클로람페니콜 나트륨 석시네이트, 클린다마이신 염산염, 클린다마이신 팔미테이트 염산염, 클린다마이신 인산염, 이미페넴 및 실라스타틴 나트륨, 메로페넴, 니트로푸란토인 마크로크리스탈, 니트로푸란토인 마이크로크리스탈, 퀴누프리스트인/달포프리스트인, 스펙티노마이신 염산염, 트리메토프림 및 반코마이신 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 24-214] 참조).

[0084]

적어도 하나의 수축촉진제는 암리논 락테이트, 디곡신 및 밀리논 락테이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항부정맥제는 아데노신, 아미오다론 염산염, 아트로핀 설페이트, 브레틸륨 토실레이트, 딜티아젬 염산염, 디소피라미드, 디소피라미드 인산염, 에스몰롤 염산염, 플레카이니드 아세테이트, 이부틸리드 푸마레이트, 리도카인 염산염, 메실레틴 염산염, 모리시진 염산염, 페니토인, 페니토인 나트륨, 프로카인아미드 염산염, 프로파페논 염산염, 프로프라놀롤 염산염, 퀴니딘 바이설페이트, 퀴니딘 글루코네이트, 퀴니딘 폴리갈락투로네이트, 퀴니딘 설페이트, 소탈롤, 토카이니드 염산염 및 베라파밀 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항협심증제는 암로디피딘 베실레이트, 아밀 니트라이트, 베피리달 염산염, 딜티아

젬 염산염, 이소소르비드 다이니트레이트, 이소소르비드 모노니트레이트, 나돌롤, 니카디핀 염산염, 니페디핀, 니트로글리세린, 프로파놀롤 염산염, 베라파밀 및 베라파밀 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항고혈압제는 아세부톨롤 염산염, 암로디핀 베실레이트, 아테놀롤, 베나제프릴 염산염, 베타솔롤 염산염, 비소프롤롤 푸마레이트, 칸데사르탄 실렉세틸, 카프토프릴, 카르테올롤 염산염, 카르베딜롤, 클로니딘, 클로니딘 염산염, 다이아족사이드, 딜티아젯 염산염, 독사조신 메실레이트, 에날라프릴라트, 에날라프릴 말레에이트, 에프로사르탄 메실레이트, 펠로디핀, 페놀도팜 메실레이트, 포시노프릴 나트륨, 구아나벤즈 아세테이트, 구아나드렐 설페이트, 구안파신 염산염, 히드랄라진 염산염, 이르베사르탄, 이스라디핀, 라베탈롤 염산염, 리시노프릴, 로사르탄 칼륨, 메틸도파, 메틸도페이트 염산염, 메토프롤롤 석시네이트, 메토프롤롤 타르트레이트, 미녹시딜, 모엑시프릴 염산염, 나돌롤, 니카르디핀 염산염, 니페디핀, 니솔디핀, 니트로프루시드 나트륨, 펜부톨롤 설페이트, 페린도프릴 에르부민, 펜톨아민 메실레이트, 핀돌롤, 피라조신 염산염, 프로프라놀롤 염산염, 퀴나프릴 염산염, 라미프릴, 텔미사르탄, 테라조신 염산염, 티몰롤 말레에이트, 트란돌라프릴, 발사르탄 및 베라파밀 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항고지혈제는 아토르바스타틴 칼슘, 세리바스타틴 나트륨, 콜레스티라민, 콜레스티폴 염산염, 페노피브레이트 (마이크로화), 플루바스타틴 나트륨, 겐피브로질, 로바스타틴, 니아신, 프라바스타틴 나트륨 및 심바스타틴으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 CV 약물은 압식시맙, 알프로스타딜, 아르부타민 염산염, 실로스타졸, 클로피도그렐 바이셀페이트, 디피리다몰, 엠티피바티드, 미도드린 염산염, 펜톡시필린, 티클로피딘 염산염 및 티로피반 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 215-336] 참조).

[0085]

적어도 하나의 비마약성 진통제 또는 해열제는 아세트아미노펜, 아스피린, 콜린 마그네슘 트라이살리실레이트, 다이플루니살 및 살리실산마그네슘으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 비스테로이드성 소염 약물은 셀레코시브, 디클로페나크 칼륨, 디클로페나크 나트륨, 에토돌락, 페노프로펜 칼슘, 플루로비프로펜, 이부프로펜, 인도메타신, 인도메타신 나트륨 삼수화물, 케토프로펜, 케토로락 트로메타민, 나부메톤, 나프록센, 나프록센 나트륨, 옥사프로진, 피록시캄, 로페코시브 및 숄린다크로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 마약 또는 아편성 진통제는 알펜타닐 염산염, 부프레노르핀 염산염, 부토르파놀 타르트레이트, 코데인 인산염, 코데인 설페이트, 펜타닐 시트레이트, 펜타닐 경피 시스템, 펜타닐 경점막, 하이드로모르폰 염산염, 메페리딘 염산염, 메타돈 염산염, 모르핀 염산염, 모르핀 설페이트, 모르핀 타르트레이트, 날부핀 염산염, 옥시코돈 염산염, 옥시코돈 펙티네이트, 옥시모르폰 염산염, 펜타조신 염산염, 펜타조신 염산염 및 날록손 염산염, 펜타조신 락테이트, 프로폭시펜 염산염, 프로폭시펜 나프실레이트, 레미펜타닐 염산염, 수펜타닐 시트레이트 및 트라마돌 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 진정 수면제는 클로랄 수화물, 에스타졸람, 플루라제팜 염산염, 펜토바르비탈, 펜토바르비탈 나트륨, 펜노바르비탈 나트륨, 세코바르비탈 나트륨, 테마제팜, 트리아졸람, 잘레프론 및 졸피뎀 타르트레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항경련제는 아세타졸아미드 나트륨, 카르바마제핀, 클로나제팜, 클로라제페이트 이칼륨, 다이아제팜, 디발프로엑스 나트륨, 에토숙시미드, 포스페니토인 나트륨, 가바펜틴, 라모트리진, 황산마그네슘, 페노바르비탈, 페노바르비탈 나트륨, 페니토인, 페니토인 나트륨, 페니토인 나트륨 (연장형), 프리미돈, 티아가빈 염산염, 토피라메이트, 발프로에이트 나트륨 및 발프로산으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항우울제는 아미트립티린 염산염, 아미트립티린 파모에이트, 아목사핀, 부프로피온 염산염, 시탈로프람 하이드로브로마이드, 클로미프라민 염산염, 데시프라민 염산염, 독세핀 염산염, 플록세틴 염산염, 이미프라민 염산염, 이미프라민 파모에이트, 미르타자핀, 네파조돈 염산염, 노르트립틸린 염산염, 파록세틴 염산염, 페넬진 설페이트, 세르트랄린 염산염, 트라닐시프로민 설페이트, 트리티프라민 말레에이트 및 벤라팍신 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항불안약은 알프라졸람, 부스피론 염산염, 클로르디아제폭시드, 클로르디아제폭시드 염산염, 클로르아제페이트 이칼륨, 다이아제팜, 독세핀 염산염, 히드록시진 엠보네이트, 히드록시진 염산염, 히드록시진 파모에이트, 로라제팜, 메프로바메이트, 미다졸람 염산염 및 옥사제팜으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 정신병 치료제는 클로르프로마진 염산염, 클로자핀, 플루페나진 데카노에이트, 플루에페나진 에난테이트, 플루페나진 염산염, 할로페리돌, 할로페리돌 데카노에이트, 할로페리돌 락테이트, 록사핀 염산염, 록사핀 석시네이트, 메소리다진 베실레이트, 몰린돈 염산염, 올란자핀, 페르페나진, 피모지드, 프로클로르페라진, 퀘티아핀 푸마레이트, 리스페리돈, 티오리다진 염산염, 티오틱센, 티오틱센 염산염 및 트리플루오페라진 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 중추신경계 자극제는 암페타민 설페이트, 카페인, 텍스트로암페타민 설페이트, 독사프람 염산염, 메탐페타민 염산염, 메틸페니데이트 염산염, 모다피닐, 페몰린 및 펜테르민 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항파킨슨병약은 아만타딘 염산염, 벤트트로핀 메실레이트, 비페리텐 염산염, 비페리텐 락테이트, 브로모크립틴 메실레이트, 카르비도파-레보도파, 엔타카폰, 레보도파, 페르골리드 메실레이트, 프라미페솔 이염

산염, 로피니롤 염산염, 셀레길린 염산염, 톨카폰 및 트리헥시페니딜 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 중추신경계 약물은 부프로피온 염산염, 도네페질 염산염, 드로페리돌, 플루복사민 말레에이트, 리튬 카르보네이트, 리튬 시트레이트, 나라트립탄 염산염, 니코틴 폴라크틸렉스, 니코틴 경피 시스템, 프로포폴, 리자트립탄 벤조에이트, 시부트라민 염산염 일수화물, 수마트립탄 석시네이트, 타크린 염산염 및 졸미트립탄으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp 337-530] 참조).

[0086] 적어도 하나의 콜린성 약물 (예를 들어, 부교감흥분제)는 베타네콜 클로라이드, 에드로포늄 클로라이드, 네오스티그민 브로마이드, 네오스티그민 메틸설페이트, 피소스티그민 살리실레이트 및 피리도스티그민 브로마이드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항콜린작용 약물은 아트로핀 설페이트, 디사이클로민 염산염, 글리코피롤레이트, 히오스시아민, 히오스시아민 설페이트, 프로판텔린 브로마이드, 스코폴라민, 스코폴라민 부틸브로마이드 및 스코폴라민 하이드로브로마이드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 아드레날린성 약물 (교감신경 흥분제)은 도부타민 염산염, 도파민 염산염, 메타라미놀 바이타르트레이트, 노르에피네프린 바이타르트레이트, 페닐에프린 염산염, 슈도에페드린 염산염 및 슈도에페드린 설페이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 아드레날린성 차단제 (부교감신경억제제)는 다이하이드로에르고타민 메실레이트, 에르고타민 타르트레이트, 메티세르기드 말레에이트 및 프로파놀롤 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 골격근 이완제는 바클로펜, 카리소프로돌, 클로르족사존, 사이클로벤자프린 염산염, 단트로렌 나트륨, 메토카르바몰 및 티자니딘 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 신경근육 차단제는 아트라쿠리움 베실레이트, 시스아트라쿠리움 베실레이트, 독사쿠리움 클로라이드, 미바쿠리움 클로라이드, 판쿠로늄 브로마이드, 피페쿠로늄 브로마이드, 라파쿠로늄 브로마이드, 로쿠늄 브로마이드, 석시닐콜린 클로라이드, 투보쿠라린 클로라이드 및 베쿠로늄 브로마이드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 531-84] 참조).

[0087] 적어도 하나의 항히스타민제는 브롬페니라민 말레에이트, 세티리진 염산염, 클로르페니라민 말레에이트, 클레마스틴 푸마레이트, 시프로헵타딘 염산염, 디펜히드라민 염산염, 펙소페나딘 염산염, 로라타딘, 프로메타진 염산염, 프로메타진 테오클레이트 및 트리프로리딘 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기관지확장제는 알부테롤, 알부테롤 설페이트, 아미노필린, 아트로핀 설페이트, 에페드린 설페이트, 에피네프린, 에피네프린 바이타르트레이트, 에피네프린 염산염, 이프라트로퓜 브로마이드, 이소프로테레놀, 이소프로테레놀 염산염, 이소프로테레놀 설페이트, 레발부테롤 염산염, 메타프로테레놀 설페이트, 옥스트리필린, 피르부테롤 아세테이트, 살메테롤 지나포에이트, 테르부탈린 설페이트 및 테오필린으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 거담제 또는 진해제는 벤조나테이트, 코데인 인산염, 코데인 설페이트, 텍스트라메토르판 하이드로브로마이드, 디펜히드라민 염산염, 구아이페네신 및 하이드로모르폰 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 호흡기 약물은 아세틸시스테인, 베클로메타손 다이프로피오네이트, 베틀라탄트, 부테소나이드, 칼팍탄트, 크로몰린 나트륨, 도르나제 알파, 에포프로스테놀 나트륨, 플루니솔리드, 플루티카손 프로피오네이트, 몬텔루카스트 나트륨, 네도크로밀 나트륨, 팔리비주맙, 트라이암살놀론 아세트온이드, 자피루카스트, 질류톤으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 585-642] 참조).

[0088] 적어도 하나의 제산제, 흡착제, 또는 고창 방지제는 탄산알루미늄, 수산화알루미늄, 탄산칼슘, 마갈드레이트, 수산화마그네슘, 산화마그네슘, 시메티콘 및 중탄산나트륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 소화 효소 또는 담석 가용화제는 판크레아틴, 판크레리파아제 및 우르소디올로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 지사제는 아타폴기트, 비스무스 서브살리실레이트, 칼슘 폴리카보필, 디페녹실레이트 염산염 또는 아트로핀 설페이트, 로페라미드, 옥트레오티드 아세테이트, 아편 톱크제 (opium tincture) 및 아편 톱크제 (장뇌화 (camphorated))로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 설사제는 비스코딜, 칼슘 폴리카르보필, 카스카라 사그라다, 카스카라 사그라다 방향족 유체 추출물, 카스카라 사그라다 유체 추출물, 캐스터 오일, 도큐세이트 칼슘, 도큐세이트 나트륨, 글리세린, 락툴로스, 시트르산마그네슘, 수산화마그네슘, 황산마그네슘, 메틸셀룰로오스, 미네랄 오일, 폴리에틸렌 글리콜 또는 전해질 용액, 프실리움, 쉰나 및 인산나트륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항구토제는 클로르프로마진 염산염, 디펜히드리네이트, 돌라세트론 메실레이트, 드로나비놀, 그라니세트론 염산염, 메클리진 염산염, 메토클로프로아미드 염산염, 온단세트론 염산염, 페르페나진, 프로클로르페라진, 프로클로르페라진 에디실레이트, 프로클로르페라진 말레에이트, 프로메타진 염산염, 스코폴라민, 티에틸페라진 말레에이트 및 트리메토벤즈아미드 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항괴양성 약물은 시메티딘, 시메티딘 염산염, 파모티딘, 란소프라졸, 미소프로스톨, 니자티딘, 오메프라졸, 라베프로졸 나트륨, 란티딘 비스무스 시트레이트, 라니티딘

염산염 및 수크랄페이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 643-95] 참조).

[0089] 적어도 하나의 코리코스테로이드는 베타메타손, 베타메타손 아세테이트 또는 베타메타손 나트륨 인산염, 베타메타손 나트륨 인산염, 코르티손 아세테이트, 텍사메타손, 텍사메타손 아세테이트, 텍사메타손 나트륨 인산염, 플루드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 시피오네이트, 하이드로코르티손 나트륨 인산염, 하이드로코르티손 나트륨 석시네이트, 메틸프레드니솔론, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 아세테이트, 프레드니솔론 나트륨 인산염, 프레드니솔론 테부테이트, 프레드니손, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드 및 트리암시놀론 다이아세테이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 안드로겐 또는 단백동화 스테로이드는 다나졸, 플루옥시메스테론, 메틸테스토스테론, 난드로론 데카노에이트, 난드로론 펜프로피오네이트, 테스토스테론, 테스토스테론 시피오네이트, 테스토스테론 에난테이트, 테스토스테론 프로피오네이트 및 테스토스테론 경피 시스템으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 에스트로겐 또는 프로게스틴은 에스테르화 에스트로겐, 에스트라디올, 에스트라디올 시피오네이트, 에스트라디올/노르에틴드론 아세테이트 경피 시스템, 에스트라디올 발레레이트, 에스트로겐 (곤주게이트형), 에스트로피페이트, 에티닐 에스트라디올, 에티닐 에스트라디올 및 데소게스트렐, 에티닐 에스트라디올 및 에티노디올 다이아세테이트, 에티닐 에스트라디올 및 데소게스트렐, 에티닐 에스트라디올 및 에티노디올 다이아세테이트, 에티닐 에스트라디올 및 레보노르게스트렐, 에티닐 에스트라디올 및 노르에틴드론, 에티닐 에스트라디올 및 노르에틴드론 아세테이트, 에티닐 에스트라디올 및 노르게스티메이트, 에티닐 에스트라디올 및 노르게스트렐, 에티닐 에스트라디올 및 노르에틴드론 및 아세테이트 및 푸마르산제일철, 레보노르게스트렐, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 메스트랄롤 및 노르에틴드론, 노르에틴드론, 노르에틴드론 아세테이트, 노르게스트렐 및 프로게스테론으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 고나드롭트로핀(gonadotropin)은 가니렐릭스 아세테이트, 고나도렐린 아세테이트, 히스트렐린 아세테이트 및 메노트로핀으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항당뇨제 또는 글루카곤은 아카르보스, 클로르프로파미드, 글리메피리드, 글리피지드, 글루카곤, 글리부리드, 인슐린, 메트포르민 염산염, 미글리톨, 피오글리타존 염산염, 레파글리니드, 로시글리타존 말레에이트 및 트로글리타존으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 갑상선 호르몬은 레보티록신 나트륨, 리오티로닌 나트륨, 리오티릭스 및 티로이드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 갑상선 호르몬 길항제는 메티마졸, 요오드화칼륨, 요오드화칼륨 (포화 용액), 프로필티오우라실, 방사성 요오드 (요오드화나트륨 <sup>131</sup>I) 및 강한 요오드 용액으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 뇌하수체 호르몬은 코르티코트로핀, 코싯트로핀, 테스모프레신 아세테이트, 류프롤리드 아세테이트, 저장성 코르티코트로핀, 소마트렐, 소마트로핀 및 바소프레신으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 부갑상선-유사 약물은 칼시페디올, 칼시토닌 (인간), 칼시토닌 (연어), 칼시트리올, 다이하이드로타키스테롤 및 에티드로네이트 이 나트륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 696-796] 참조).

[0090] 적어도 하나의 이뇨제는 아세타졸아미드, 아세타졸아미드 나트륨, 아밀로리드 염산염, 부메타니드, 클로르탈리돈, 에타크리네이트 나트륨, 에타크린산, 푸로세미드, 하이드로클로로티아지드, 인다파미드, 만니톨, 메톨라존, 스피로놀락톤, 토르세미드, 트리암테렌 및 우레아로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 전해질 또는 대체 용액은 아세트산칼슘, 탄산칼슘, 염화칼슘, 시트르산칼슘, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루셉테이트, 칼슘 글루코네이트, 칼슘 락테이트, 인산칼슘 (2염기성), 인산칼슘 (3염기성), 텍스트란 (고분자량), 텍스트란 (저분자량), 헤타스타치 (hetastarch), 염화마그네슘, 황산마그네슘, 아세트산칼슘, 중탄산칼슘, 염화칼륨, 칼륨 글루코네이트, 링거 주사액, 링거 주사액 (락테이트 첨가형) 및 염화나트륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 산성화제 또는 알칼리화제는 중탄산나트륨, 나트륨 락테이트 및 트로메타민으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 797-833] 참조).

[0091] 적어도 하나의 조혈제는 푸마르산제일철, 글루콘산제일철, 황산제일철, 황산제일철 (건조형), 철 텍스트란, 철 소르비톨, 다당체-철 복합체 및 글루콘산제일철나트륨 복합체로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항응집제는 아르데파린 나트륨, 달테파린 나트륨, 다나파로이드 나트륨, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 칼슘, 헤파린 나트륨 및 와파린 나트륨으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 혈액 유도체는 알부민 5%, 알부민 25%, 항혈우병 인자, 항-역제체 혈액 응고제 복합체, 항트롬빈 III (인간), 인자 IX (인간), 인자 IX 복합체 및 혈장 단백질 분획으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 혈전용해 효소

는 알테플라아제, 아나스트레플라아제, 레테플라아제 (재조합), 스트렙토키나아제 및 유로키나아제로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 834-66] 참조).

[0092] 적어도 하나의 알킬화 약물은 부설판, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 로무스틴, 메클로레타민 염산염, 멜팔란, 멜판란 염산염, 스트렙토조신, 테모졸로마이드 및 티오테파로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항대사물질은 카페시타빈, 클라드리빈, 시타라빈, 플록수리딘, 플루다라빈 인산염, 플루오로우라실, 히드록시우레아, 머캅토푸린, 메토티렉세이트, 메토티렉세이트 나트륨 및 티오구아닌으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항생 항신생물제는 블레오마이신 설페이트, 닥티노마이신, 다우노루비신 시트레이트 리포조말, 다우노루비신 염산염, 독소루비신 염산염, 독소루비신 염산염 리포조말, 에피루비신 염산염, 이다루비신 염산염, 미토마이신, 펜토스타틴, 플리카마이신 및 발루비신으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 호르몬 균형을 변경하는 적어도 하나의 항신생물제는 아나스트로졸, 비칼루타미드, 에스트라무스틴 인산염 나트륨, 엑세메스탄, 플루타미드, 고세렐린 아세테이트, 레트로졸, 류프롤리드 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 닐루타미드, 타목시펜 시트레이트, 테스토라톤 및 토레미펜 시트레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 항신생물제는 아스파라기나아제, 바실루스 칼메테-구에렌 (BCG) (살아있는 방광내용), 다카르바진, 도세탁셀, 에토포시드, 에토포시드 인산염, 겐시타빈 염산염, 이리노테칸 염산염, 미토탄, 미토잔트론 염산염, 파클리탁셀, 페가스파르가제, 포르피머 나트륨, 프로카르바진 염산염, 리톡시맙, 테니포시드, 토포테칸 염산염, 트라스투주맙, 트레티노인, 빈플라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트 및 비노렐빈 타르트레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 867-963] 참조).

[0093] 적어도 하나의 면역억제제는 아자티오프린, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙, 림프구 면역 글로불린, 뮤로노납-CD3, 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀레이트 모페틸 염산염, 시롤리무스 및 타크롤리무스로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 백신 또는 변성독소는 BCG 백신, 콜레라 백신, 디프테리아 및 파상풍 변성독소 (흡착된), 디프테리아 및 파상풍 변성독소 및 무세포 백일해 백신 (흡착된), 디프테리아 및 파상풍 변성독소 및 전세포 백일해 백신, 해모필루스 b 컨쥬게이트 백신, A형 간염 백신 (불활성화된), B형 간염 백신 (재조합), 인플루엔자 바이러스 백신 1999-2000 3가 유형 A & B (정제된 표면 항원), 인플루엔자 바이러스 백신 1999-2000 3가 유형 A & B (서브비리온 또는 정제된 서브비리온), 인플루엔자 바이러스 백신 1999-2000 3가 유형 A & B (전체 비리온), 일본 뇌염 바이러스 백신 (불활성화된), 라임병 백신 (재조합 OspA), 홍역 및 볼거리 및 풍진 바이러스 백신 (생백신), 홍역 및 볼거리 및 풍진 바이러스 백신 (약독화 생백신), 홍역 바이러스 백신 (약독화 생백신), 수막구균 다당체 백신, 볼거리 바이러스 백신 (생백신), 플라그 백신, 폐렴구균 백신 (다가), 폴리오바이러스 백신 (불활성화), 폴리오바이러스 백신 (생백신, 경구, 3가), 광견병 백신 (흡착된), 광견병 백신 (인간 이배체 세포), 풍진 및 볼거리 바이러스 백신 (생백신), 풍진 바이러스 백신 (약독화 생백신), 파상풍 변성독소 (흡착된), 파상풍 변성독소 (액체), 장티푸스 백신 (경구), 장티푸스 백신 (비경구), 장티푸스 Vi 다당체 백신, 수두 바이러스 백신 및 황열병 백신으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 항독소 또는 항벡독소는 검은 과부 거미 항벡독소, 크로탈리데 항벡독소 (Crotalidae antivenom) (다가), 디프테리아 항독소 (말) 및 미크루루스 플루비우스 (*Micrurus fulvius*) 항벡독소로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 면역 혈청은 사이토메갈로바이러스 면역글로불린 (정맥내), B형 간염 면역글로불린 (인간), 면역글로불린 근대, 면역글로불린 정맥내, 광견병 면역글로불린 (인간), 호흡기 합포체 바이러스 면역글로불린 정맥내 (인간), Rh<sub>0</sub>(D) 면역글로불린 (인간), Rh<sub>0</sub>(D) 면역 글로불린 정맥내 (인간), 파상풍 면역글로불린 (인간) 및 수두-대상포진 면역글로불린으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 생물학적 반응 변형제는 알데스류킨, 에포에틴 알파, 필그라스티뮴, 주사를 위한 글라티라머 아세테이트, 인터페론 알파-1, 인터페론 알파-2a (재조합), 인터페론 알파-2b (재조합), 인터페론 베타-1a, 인터페론 베타-1b (재조합), 인터페론 감마-1b, 레바미솔 염산염, 오프렐베킨 및 사르그라모스탐으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 964-1040] 참조).

[0094] 적어도 하나의 안용 항-감염제는 바시트라신, 클로람페니콜, 시프로플록사신 염산염, 에리트로마이신, 겐타마이신 설페이트, 오픈록사신 0.3%, 폴리믹신 B 설페이트, 설프아세트아미드 나트륨 10%, 설프아세트아미드 나트륨 15%, 설프아세트아미드 나트륨 30%, 토브라마이신 및 비다라빈으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 안용 소염제는 텍사메타손, 텍사메타손, 나트륨 인산염, 디클로페낙 나트륨 0.1%, 플루오로메톨론, 플루르비프로펜 나트륨, 케토롤락 트로메타민, 프레드니솔론 아세테이트 (현탁액) 및 프레드니솔론 나트륨 인산염 (용액)으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 동공축소제는 아세틸로콜린 클로라이드, 카르바콜 (안내), 카르바콜 (국소용), 에코티오페이트 요오다이드, 필로카르핀, 필로카르핀 염산염 및 필로카르

핀 니트레이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 동공확대제는 아트로핀 설페이트, 사이클로펜톨레이트 염산염, 에피네프린 염산염, 에피네프릴 보레이트, 호마트로핀 하이드로브로마이드, 페닐에프린 염산염, 스코폴아민 하이드로브로마이드 및 트로피카미드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 안용 혈관수축제는 나파졸린 염산염, 옥시메타졸린 염산염 및 테트라하이드로졸린 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 기타 안용제는 아프라클로니딘 염산염, 베타솔롤 염산염, 브리모니딘 타르트레이트, 카르테올롤 염산염, 디피베프린 염산염, 도르졸아미드 염산염, 에메다스틴 다이푸마레이트, 플루오레세인 나트륨, 케토티펜 푸마레이트, 란타노프로스트, 레보부놀롤 염산염, 메티프라놀롤 염산염, 나트륨 클로라이드 (고장성) 및 티몰롤 말레에이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 귀용 약물은 붕산, 카르바미드 퍼옥사이드, 클로람페니콜 및 트리에탄올아민 폴리펩티드 올레이트-축합물로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 코용 약물은 베클로메타손 다이프로피오네이트, 부테소나이드, 에페드린 설페이트, 에피네프린 염산염, 플루니솔리드, 플루티카손 프로피오네이트, 나파졸린 염산염, 옥시메타졸린 염산염, 페닐에프린 염산염, 테트라하이드로졸린 염산염, 트리암시놀론 아세토니드 및 자일로메타졸린 염산염으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 1041-97] 참조).

[0095] 적어도 하나의 국소 항-감염제는 아사이클로비르, 암포테리신 B, 아젤라산 크림, 바시트라신, 부토코나졸 니트레이트, 클린다마이신 인산염, 글로트리마졸, 에코나졸 니트레이트, 에리트로마이신, 겐타마이신 설페이트, 케토코나졸, 마페니드 아세테이트, 메트로니다졸 (국소용), 미코나졸 니트레이트, 무피로신, 나프티핀 염산염, 네오마이신 설페이트, 니트로푸라존, 니스타틴, 실버 설파디아진, 테르비나핀 염산염, 테르코나졸, 테트라사이클린 염산염, 티오코나졸 및 톨나프테이트로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 옴약 또는 이살충제는 크로타미톤, 린단, 페메트린 및 피레쓰린으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 국소용 코르티코스테로이드는 베타메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 클로베타솔 프로피오네이트, 데소나이드, 데속시메타손, 텍사메타손, 텍사메타손 나트륨 인산염, 디플로라손 다이아세테이트, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오시노니드, 플루란트레놀리드, 플루티카손 프로피오네이트, 할시오니드, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 부티레이트, 하이드로코르티손 발레레이트, 모메타손 푸로에이트 및 트리암시놀론 아세토니드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 1098-1136] 참조).

[0096] 적어도 하나의 비타민 또는 미네랄은 비타민 A, 비타민 B 복합체, 시아노코발라민, 엽산, 히드록소코발라민, 류코보린 칼슘, 니아신, 니아신아미드, 피리독신 염산염, 리보플라빈, 티아민 염산염, 비타민 C, 비타민 D, 콜레칼시페롤, 에르고칼시페롤, 비타민 D 유사체, 독세르칼리페롤, 파리칼시톨, 비타민 E, 비타민 K 유사체, 피토나디온, 불화나트륨, 불화나트륨 (국소용), 미량 원소, 크롬, 구리, 요오드, 망간, 셀레늄 및 아연으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 적어도 하나의 고칼로리제는 아미노산 주입액 (결정체), 텍스트로스 중의 아미노산 주입액, 전해질을 갖는 아미노산 주입액, 텍스트로스 중의 전해질을 갖는 아미노산 주입액, 간 부전에 대한 아미노산 주입액, 고 대사 스트레스에 대한 아미노산 주입액, 신 부전에 대한 아미노산 주입액, 텍스트로스, 지방 유액 및 중쇄 트리글리세리드로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nursing 2001 Drug Handbook, pp. 1137-63] 참조).

[0097] 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 상기 조절, 처리 또는 치료가 필요한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 접촉 또는 투여되는 단백질 스캐폴드를 포함하는 적어도 하나의 임의의 적합하고 유효한 양의 조성물 또는 약학 조성물을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 선택적으로 적어도 하나의 TNF 길항제 (그러나 예를 들어, TNF 화학물질 또는 단백질 길항제, TNF 단클론 또는 다클론 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 (예를 들어, p55, p70 또는 p85) 또는 이의 단편, 융합 폴리펩티드, 또는 소분자 TNF 길항제, 예를 들어 TNF 결합 단백질 I 또는 II (TBP-I 또는 TBP-II), 네렐리몬맵, 인플릭시맵, 에타네르셉트, CDP-571, CDP-870, 아펠리모맵, 레네르셉트 등에 한정되지 않음), 항류머티즘제 (예를 들어, 메토티렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노마이드, 설파살진), 근육 이완제, 마약, 비스테로이드성 항염증제 (NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근육 차단제, 항미생물제 (예를 들어, 아미노글리코시드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 설파아미드, 테트라사이클린, 또다른 항미생물제), 건선치료제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 약제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항궤양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴 (예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티프 (예를 들어, G-CSF, 뉴포젠(Neupogen)), 사르그라마스티프 (GM-CSF, 류카인(Leukine)), 면역제, 면역글로블린, 면역억제제 (예를 들어, 바실릭시맵, 사이클로스포린, 다클리주맵), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품,

항우울제, 항조병제, 항정신병약, 불안 완화제, 수면제, 교감신경흥분제, 흥분제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파 (플모자임(Pulmozyme)), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 사이토카인의 비제한적인 예는 IL-1 내지 IL-28 (예를 들어, IL-1, IL-2 등) 중 임의의 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 투여량은 당업계에 공지되어 있다 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]을 참조하는데, 상기 참고 문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0098] 상기 항암제 또는 항감염제는 적어도 하나의 본 발명의 단백질 스캐폴드와 회합, 결합, 공동-제형화 또는 공동 투여되는 독소 분자를 또한 포함할 수 있다. 독소는 선택적으로 병원 세포 또는 조직을 선택적으로 죽이는 작용을 할 수 있다. 병원 세포는 암 또는 다른 세포일 수 있다. 상기 독소는 독소의 적어도 하나의 기능적 세포 독성 도메인, 예를 들어 리신, 디프테리아 독소, 뱀독소, 또는 세균 독소로부터 선택된 것을 포함하는 정제된 또는 재조합 독소 또는 독소 단편일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 용어 "독소"는 인간 및 기타 포유동물에서 죽음에 이를 수도 있는 독소 쇼크를 포함하는 임의의 병태를 일으킬 수 있는 임의의 자연 발생, 돌연변이 또는 재조합 세균 또는 바이러스에 의해 생성될 수 있는 내독소 또는 외독소를 모두 포함한다. 상기 독소는 장독성 이. 콜라이 열-불안정성 장독소 (LT), 열-안정성 장독소 (ST), 시겔라 (*Shigella*) 세포독소, 아에로모나스 (*Aeromonas*) 장독소, 독성 쇼크 증상 독소-1 (TSST-1), 스태필로코커스 장독소 A (SEA), B (SEB), 또는 C (SEC), 스태필로코커스 장독소 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 상기 세균은 장독성 이. 콜라이 (ETEC), 장출혈 이. 콜라이 (예를 들어, 혈청형 O157:H7의 균주), 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) 종 (예를 들어, 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 피오게네스 (*Staphylococcus pyogenes*), 시겔라 종 (예를 들어, 시겔라 디센테리아에 (*Shigella dysenteriae*), 시겔라 플렉스네리 (*Shigella flexneri*), 시겔라 보이디이 (*Shigella boydii*), 및 시겔라 손네이 (*Shigella sonnei*), 살모넬라 (*Salmonella*) 종 (예를 들어, 살모넬라 티피 (*Salmonella thphyi*), 살모넬라 콜레라-수이스 (*Salmonella cholera-suis*), 살모넬라 엔테리티디스 (*Salmonella enteritidis*), 클로스트리디움 (*Clostridium*) 종 (예를 들어, 클로스트리디움 페르프린젠스 (*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 디피실레 (*Clostridium difficile*), 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 캄플로박터 (*Camphlobacter*) 종 (예를 들어, 캄플로박터 제주니 (*Camphlobacter jejuni*), 캄플로박터 페투스 (*Camphlobacter fetus*), 헬리오박터 (*Helioabacter*) 종, (예를 들어, 헬리오박터 필로리 (*Helioabacter pylori*), 아에로이노나스 (*Aeroionas*) 종 (예를 들어, 아에로이노나스 소브리아 (*Aeroionas sobria*), 아에로이노나스 하이드로필라 (*Aeroionas hydrophila*), 아에로이노나스 카비아에 (*Aeroionas caviae*), 플레이소모나스 시겔로이데스 (*Pleisomonas shigelloides*), 예르시나 엔테로콜라이티카 (*Yersina enterocolitica*), 비브리오스 (*Vibriosis*) 종 (예를 들어, 비브리오스 콜레라에 (*Vibriosis cholerae*), 비브리오스 파라헤몰리티쿠스 (*Vibriosis parahemolyticus*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*) 종, 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 및 스트렙토코커스 (*Streptococci*) 를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. (예를 들어, 그 내용이 본 명세서에 참고로 포함되는 문헌[Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990)]; 문헌[Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991)]; 문헌[Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990)]; 문헌[Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, NJ., 1992; Wood et al., FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991)]; 문헌 [Marrack et al., Science, 248:705-711 (1990)] 참조).

[0099] 본 발명의 단백질 스캐폴드 화합물, 조성물 또는 조합물은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 아주번트 등과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 임의의 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 보조제가 바람직하다. 상기 무균 용액의 제조 방법의 비제한적 예는 문헌 [Gennaro, Ed., Rentington's Pharrnaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990]과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 문헌에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 당업계에 공지되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 단백질 스캐폴드 단편 또는 변이체 조성물의 투여 양식, 용해도 및/또는 안정성에 적합한 것으로 통상적으로 선택될 수 있다.

[0100] 본 발명의 조성물에 유용한 약학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및, 탄수화물 (예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당과 같은 당류; 알디톨, 알도산, 에스테르화된 당 등과 같은

유도체화된 당; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 이들은 단독으로 또는 조합되어 존재할 수 있고, 단독으로 또는 조합되어 1-99.99 중량% 또는 부피%로 포함된다. 예시적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민 (HSA), 재조합 인간 알부민 (rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충 용량에서도 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/단백질 성분은 알라닌, 글라이신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 바람직한 아미노산은 글라이신이다.

[0101] 본 발명에 사용하기 적합한 탄수화물 부형제는 예를 들어 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등의 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등의 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등의 다당류; 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨 (글루시톨), 미오이노시톨 등의 알디톨을 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스, 및 라피노스이다.

[0102] 단백질 스캐폴드 조성물은 완충제 또는 pH 조절제를 또한 포함할 수 있으며; 전형적으로, 완충제는 유기 산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 숙신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산염; 트리스, 트로메타민 염산, 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 발명의 조성물에서 사용하기 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기산 염이다.

[0103] 추가로, 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 폴리비닐피롤리돈, 피콜 (중합 당), , 텍스트레이트 (예를 들어, 2-히드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향료, 향미생물제, 감미제, 산화방지제, 정전기 방지제, 계면활성제 (예를 들어, "트윈 20" 및 "트윈 80"과 같은 폴리소르베이트), 지질 (예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드 (예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA)와 같은 중합체 부형제/첨가제를 포함할 수 있다.

[0104] 본 발명에 따른 단백질 스캐폴드, 일부 또는 변이체 조성물에 사용하기 적합한 상기 및 추가의 공지의 약학적 부형제 및/또는 첨가제는 예를 들어 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995)] 및 문헌["Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)]에 열거된 바와 같이 당업계에 공지되어 있고, 상기 문헌의 개시 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물 (예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제 (예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체 물질이다. 예시적인 담체 분자로는 뮤코다당류, 하이알루론산이 있으며, 이는 관절내 전달에 유용할 수 있다.

[0105] 제형

[0106] 상기에 나타난 바와 같이, 본 발명은 안정한 제형을 제공하고, 이는 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 제형 내에 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는, 약학적 또는 수의학적 용도에 적합한 다용도의 보존된 제형뿐만 아니라 보존제를 함유하는 보존된 용액 및 제형과, 염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제도 포함한다. 보존된 제형은 수성 희석제 중의, 적어도 하나의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 페닐머큐릭 니트라이트, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘 (예를 들어, 육수 화물), 알킬과라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 테하이드로아세테이트 및 티메로살, 중합체 또는 이들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택적으로 선택되거나 공지된 적어도 하나의 보존제를 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이 임의의 적합한 농도 또는 조합, 예를 들어 약 0.0015%, 또는 그 안의 임의의 범위, 값 또는 분율이 사용될 수 있다. 비제한적 예는 보존제를 포함하지 않거나, 약 0.1-2% m-크레졸 (예를 들어, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 약 0.1-3% 벤질 알콜 (예를 들어, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 약 0.001-0.5% 티메로살 (예를 들어, 0.005, 0.01), 약 0.001-2.0% 페놀 (예를 들어, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005-1.0% 알킬과라벤(들) (예를 들어, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 등을 포함한다.

[0107] 상기에 나타난 바와 같이, 본 발명은 패키징 재료, 및 선택적으로 수성 희석제 내의 처방된 완충제 및/또는 보존제를 포함하는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 용액을 포함하는 적어도 하나의 바이알을 포함하는 제조 물품을 제공하고, 여기서 상기 패키징 재료는 상기 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72시간 또는 그 이상의 시간에 걸쳐 유지될 수 있음을 표시하는 라벨을 포함한다. 추가로 본 발명은 패키징 재료, 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 제1 바이알, 및 처방된 완충제 또

는 보존제의 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알을 포함하는 제조 물품을 포함하고, 여기서 상기 패키징 재료는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제 내에 재구성하여 24시간 또는 그 이상의 시간에 걸쳐 유지될 수 있는 용액을 형성하도록 환자에게 지시하는 라벨을 포함한다.

- [0108] 본 발명에 따라 사용되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 포유류 세포 또는 트랜스제닉 제제에 의한 것을 포함하는 재조합 수단에 의해 제조될 수 있거나, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 공지된 바와 같은 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 제품에서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 범위는 재구성시에, 습윤/건조 시스템의 경우 약 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  내지 약 1000  $\text{mg}/\text{ml}$  농도를 생성하는 양을 포함하지만, 더 낮거나 더 높은 농도가 사용가능하고 의도하는 전달 비히클에 의존적인데, 예를 들어 용액 제형은 경피 패치, 폐, 경점막, 또는 삼투압 또는 마이크로 펌프 방법에 의해 달라질 것이다.
- [0110] 바람직하게는, 선택적으로 수성 희석제는 약학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 바람직한 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 것을 포함한다. 제형 내에 사용되는 보존제의 농도는 항-미생물 효과를 내기에 충분한 농도이다. 그러한 농도는 선택된 보존제에 따라 결정되고, 당업자에 의해 쉽게 결정된다.
- [0111] 다른 부형제, 예를 들어 등장화제, 완충제, 산화방지제, 및 보존성 증강제가 선택적으로 그리고 바람직하게는 희석제에 첨가된다. 글리세린과 같은 등장화제는 공지된 농도에서 통상 사용된다. 생리학상 허용되는 완충제는 바람직하게는 향상된 pH 제어를 제공하기 위해 첨가된다. 제형은 약 pH 4 내지 약 pH 10과 같은 넓은 범위의 pH를 포함할 수 있고, 바람직한 범위는 약 pH 5 내지 약 pH 9이고, 가장 바람직한 범위는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 바람직하게는 본 발명의 제형은 약 6.8 내지 약 7.8의 pH를 갖는다. 바람직한 완충제는 인산염 완충제, 가장 바람직하게는 인산나트륨, 특히 인산염 완충 염수 (PBS)를 포함한다.
- [0112] 약학적으로 허용가능한 가용화제, 예를 들어 트윈 20 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레이트), 플루로닉(Pluronic) F68 (폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG (폴리에틸렌 글리콜) 또는 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉<sup>®</sup> 폴리올과 같은 비이온성 계면활성제, 다른 블록 공중합체, 및 EDTA 및 EGTA 같은 킬레이팅제와 같은 다른 첨가제가 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 선택적으로 첨가될 수 있다. 이들 첨가제는 펌프 또는 플라스틱 용기가 제형을 투여하기 위해 사용될 경우에 특히 유용하다. 약학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재는 단백질 응집 성향을 완화시킨다.
- [0113] 본 발명의 제형은 수성 희석제 중 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 보존제와 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 혼합을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중 보존제 및 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 혼합은 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 제형을 제조하기 위해, 예를 들어, 완충액 중 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 측정된 양을 요구되는 농도의 단백질 및 보존제를 제공하기에 충분한 양의 완충액 내의 요구되는 보존제와 조합시킨다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.
- [0114] 특히 청구되는 제형은 투명한 용액으로서, 또는 물, 보존제 및/또는 부형제, 바람직하게는 인산염 완충제 및/또는 염수 및 선택된 염을 수성 희석제 내에 포함하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성을 요구하는 이중 바이알은 여러 번 재사용될 수 있고 단일 또는 여러 사이클의 환자 치료에 충분하고 따라서 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.
- [0115] 본 발명의 특허 청구된 제조 물품은 즉시 내지 24시간 또는 그 이상의 범위의 기간에 걸쳐 투여하는 데 유용하다. 따라서, 본 발명에서 특허 청구되는 제조 물품은 환자에 상당한 이점을 준다. 본 발명의 제형은 선택적으로 약 2°C 내지 약 40°C의 온도에서 안전하게 보관될 수 있고 장시간 동안 단백질의 생물학적 활성을 유지하고, 따라서 용액이 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 유지 및/또는 사용될 수 있음을 패키지 라벨이 표시하는 것을 허용한다. 보존된 희석제가 사용된 경우, 상기 라벨은 1-12달, 반년, 1년

반, 및/또는 2년의 사용을 포함할 수 있다.

- [0116] 본 발명에서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 용액은 수성 희석제 중에 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 혼합은 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 희석물을 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중에 측정된 양의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 단백질 및 선택적으로 보존제 또는 완충제를 요구되는 농도로 제공하기에 충분한 양으로 조합한다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.
- [0117] 특히 청구되는 제조 물품은 투명한 용액으로서 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성될 필요가 있는 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고 환자 치료의 단일 또는 여러 사이클을 충족시킬 수 있고 따라서 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.
- [0118] 특히 청구되는 제조 물품은 투명한 용액, 또는 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알을 약국, 병원, 또는 다른 그러한 기관 및 기구에 제공하여 환자에게 간접적으로 제공될 수 있다. 이 경우 투명한 용액은 최대 1리터 또는 그보다 훨씬 더 큰 크기일 수 있고, 이는 더욱 작은 바이알 내에 전달하기 위해 그로부터 더욱 소량의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 용액이 1회 또는 다수회 회수될 수 있고 약국 또는 병원에 의해 고객 및/또는 환자에게 제공될 수 있는 큰 저장부를 제공한다.
- [0119] 단일 바이알 시스템을 포함하는 승인된 장치는 용액 전달을 위한 펜-인젝터 장치, 예를 들어 비디 펜즈(BD Pens), 비디 오토젝터(BD Autojector)<sup>®</sup>, 휴마젝트(Humaject)<sup>®</sup>, 노보펜(NovoPen)<sup>®</sup>, B-D<sup>®</sup>펜, 오토펜(AutoPen)<sup>®</sup>, 및 옵티펜(OptiPen)<sup>®</sup>, 게노트로핀펜(GenotropinPen)<sup>®</sup>, 게노트로놈 펜(Genotronorm Pen)<sup>®</sup>, 휴마트로 펜(Humatro Pen)<sup>®</sup>, 레코-펜(Reco-Pen)<sup>®</sup>, 로페론 펜(Roferon Pen)<sup>®</sup>, 바이오젝터(Biojector)<sup>®</sup>, 이젝트(Iject)<sup>®</sup>, 제이-팁 니들-프리 인젝터(J-tip Needle-Free Injector)<sup>®</sup>, 인트라젝트(Intraject)<sup>®</sup>, 메디-젝트(Medi-Ject)<sup>®</sup>; 예를 들어, 벡톤 디킨슨(Becton Dickenson) (미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스, www.bectondickenson.com), 디세트로닉(Disetronic) (스위스 부르그도르프, www.disetronic.com); 바이오젝트(Bioject) (미국 오레곤주 포틀랜드, www.bioject.com); 내셔널 메디칼 프로덕츠, 웨스턴 메디칼(National Medical Products, Weston Medical) (영국 피터보로우, www.weston-medical.com), 메디-젝트 코퍼레이션(Medi-Ject Corp) (미국 미네소타주 미니애폴리스, www.mediject.com)에 의해 제조되거나 개발된 것, 및 유사한 적합한 장치를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 승인된 장치는 휴마트로펜(등록상표)과 같은 재구성 용액의 전달을 위한 카트리지 내의 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜-인젝터 시스템을 포함한다. 적합한 다른 장치의 예는 사전 충전 시린지, 자동 주사기, 니들이 없는 주사기 및 니들이 없는 IV 주입 세트를 포함한다.
- [0120] 본 발명에서 특히 청구되는 제조 물품은 패키징 재료를 포함한다. 패키징 재료는 규제 당국에 의해 요구되는 정보 이외에 제조 물품을 사용할 수 있는 조건을 제공한다. 본 발명의 패키징 재료는 2개의 바이알, 습윤/건식 제조 물품에 대하여 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제에 재구성하여 용액을 형성하고 상기 용액을 2-24시간 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 사용하도록 하는 지시사항을 환자에게 제공한다. 단일 바이알, 용액 제조 물품에 대하여, 라벨은 상기 용액을 2-24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용할 수 있음을 나타낸다. 본 발명에서 특히 청구되는 제조 물품은 인간의 제약 제조 물품 용도로 유용하다.
- [0121] 본 발명의 제형은 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 및 선택된 완충제, 바람직하게는 염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제와 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중 완충제 및 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 혼합은 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를, 요구되는 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기 충분한 양의 물 중의 요구되는 완충제와 조합한다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.
- [0122] 특히 청구되는 안정한 또는 보존된 제형은 투명한 용액으로서 또는 수성 희석제 중의 보존제 또는 완충제 및 부형제를 포함하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서

환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성될 필요가 있는 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고 환자 치료의 단일 또는 여러 사이클을 충족시킬 수 있고 따라서 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0123] 단백질 스캐폴드를 안정화시키는 다른 제형 또는 방법을 통해, 상기 단백질 스캐폴드를 포함하는 동결건조된 분말의 투명한 용액 이외의 것을 수득할 수 있다. 투명하지 않은 용액 중에는 미립자 현탁액을 포함하는 제형이 있으며, 상기 미립자는 다양한 치수의 구조의 단백질 스캐폴드를 함유하는 조성물이며, 미세구, 마이크로입자, 나노입자, 나노스피어, 또는 리포솜으로 다양하게 공지되어 있다. 활성제를 함유하는 상대적으로 균질하고 본질적으로 구형인 그러한 미립자 제형은 미국 특허 제4,589,330호에 교시된 바와 같이, 활성제 및 중합체를 함유하는 수성 상과 비수성 상을 접촉시킨 후, 비수성 상을 증발시켜 수성 상으로부터 입자를 응결시켜 형성할 수 있다. 다공성 마이크로입자는 미국 특허 제4,818,542호에 교시된 바와 같이 연속 용매 중에 분산되어 있는 활성제 및 중합체를 포함하는 제1 상을 사용하고 냉동-건조 또는 회석-추출-침전에 의해 현탁액으로부터 상기 용매를 제거하여 제조할 수 있다. 그러한 제조에 바람직한 중합체는 천연 또는 합성 공중합체 또는 중합체이고, 이는 젤라틴 아가, 전분, 아라비노갈락탄, 알부민, 콜라겐, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산), 폴리( $\beta$ -하이드록시 부티르산), 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌, 폴리(알킬-2-시아노아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트), 폴리아미드, 폴리(아미노산), 폴리(2-하이드록시에틸 DL-아스파르타미드), 폴리(에스테르 우레아), 폴리(L-페닐알라닌/에틸렌 글리콜/1,6-다이아이소시아나토헥산) 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 중합체는 폴리에스테르, 예를 들어 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산), 및 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산)이다. 중합체 및/또는 활성 물질의 용해에 유용한 용매는 물, 헥사플루오로이소프로판올, 메틸렌클로라이드, 테트라하이드로푸란, 헥산, 벤젠, 또는 헥사플루오로아세톤 세스퀴히드레이트이다. 제2 상과 함께 활성 물질을 포함하는 상을 분산시키는 방법은 노즐내 오리피스를 통해 상기 제1 상에 압력을 가하여 소적 형성에 영향을 주는 것을 포함할 수 있다.

[0124] 건조 분말 제형은 동결건조 이외의 공정, 예를 들어, 결정질 조성물을 분무 건조시키거나 증발시키거나 침전에 의해 용매를 추출한 후, 수성 또는 비수성 용매를 제거하는 하나 이상의 단계에 의해 수득할 수 있다. 분무 건조된 단백질 스캐폴드 제제의 제조는 미국 특허 제6,019,968호에 교시되어 있다. 단백질 스캐폴드-기재 건조 분말 조성물은 흡입가능한 건조 분말을 제공하기 위한 조건 하에서 용매 중의 단백질 스캐폴드 및 선택적으로 부형제의 용액 또는 슬러리를 분무 건조시켜 제조할 수 있다. 용매는 용이하게 건조될 수 있는 극성 화합물, 예를 들어 물 및 에탄올을 포함할 수 있다. 산소의 부재 하에, 예를 들어, 질소 블랭킷 하에 또는 건조 가스로서 질소를 사용하여 분무 건조 절차를 수행하여 단백질 스캐폴드 안정성을 향상시킬 수 있다. 다른 상대적으로 건조한 제형은 국제특허 공개 W09916419호에 교시된 바와 같이 전형적으로 하이드로플루오로알칸 추진제를 포함하는 현탁 매질 중에 분산된 복수의 천공된 미세구조체의 분산액이다. 안정화된 분산액을 정량 흡입기를 사용하여 환자의 폐로 투여할 수 있다. 분무 건조된 약제의 상업적 제조에 유용한 장치는 부치 리미티드(Buchi Ltd.) 또는 니로 코포레이션(Niro Corp.)에서 제작되었다.

[0125] 본 명세서에 기재된 안정한 또는 보존된 제형 또는 용액 내의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 당업계에 공지된 바와 같이 SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 임플란트, 삼투 펌프, 카트리지, 마이크로 펌프, 또는 당업자가 이해하는 다른 방법을 비롯한 다양한 전달 방법을 통하여 본 발명에 따라 환자에게 투여될 수 있다.

[0126] 치료적 응용

[0127] 또한 본 발명은 당업계에 공지되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 사용하여, 예를 들어 치료적 유효량의 단백질 스캐폴드를 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 투여하거나 그와 접촉시켜 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 질환을 조절하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 적어도 하나의 비만, 면역 관련 질환, 심혈관 질환, 감염 질환, 악성 질환 또는 신경 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는 질환을 조절 또는 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0128] 본 발명은 또한 류머티스성 관절염, 소아 류머티스성 관절염, 전신성 소아 류머티스성 관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 위궤양, 혈청 반응 음성 관절염, 골관절염, 골용해, 정형외과 임플란트의 무균적 이완, 염증성 장질환, 궤양성 대장염, 전신성 홍반성 루푸스, 항인지질 증후군, 홍채섬모체염/포도막염/시신경염, 특발성 폐섬유증, 전신성 혈관염/베게너 육아종증, 유육종증, 고환염/정관절제술 역전 처치 (reversal procedure), 알레

르기성/아토피성 질환, 천식, 알레르기성 비염, 습진, 알레르기성 접촉 피부염, 알레르기성 결막염, 과민성 폐렴, 이식, 기관이식 거부반응, 이식편 대 숙주 질환, 전신성 염증 반응 증후군, 패혈증 증후군, 그람 양성균 패혈증, 그람 음성균 패혈증, 배양 음성 패혈증, 진균성 패혈증, 호중구 감소성 발열, 요로성 패혈증, 수막구균혈증, 외상/출혈, 화상, 전리방사선 피폭, 급성 췌장염, 성인성 호흡곤란 증후군, 류머티스성 관절염, 알코올성 간염, 만성 염증성 병상, 유육종증, 크론병, 겸상적혈구 빈혈, 당뇨병, 신장증, 아토피성 질환, 과민 반응, 알레르기성 비염, 고초열, 다년성 비염, 결막염, 자궁내막증, 천식, 두드러기, 전신성 아나플락시스, 피부염, 악성 빈혈, 용혈성 질환, 혈소판 감소증, 임의의 기관 또는 조직의 이식 거부반응, 신장 이식 거부반응, 심장 이식 거부 반응, 간 이식 거부 반응, 췌장 이식 거부 반응, 폐 이식 거부 반응, 골수 이식 (BMT) 거부반응, 피부 동종이식 거부반응, 연골 이식 거부 반응, 뼈 이식 거부반응, 소장 이식 거부 반응, 태아 흉선 이식 거부반응, 부갑상선 이식 거부 반응, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부반응, 동종이식 거부반응, 항수용체 과민 반응, 그레이브스 (Graves) 병, 레이노병, B형 인슐린 저항성 당뇨병, 천식, 중증 근무력증, 항체 매개성 세포독성, III형 과민 반응, POEMS 증후군 (다발성 신경병증, 기관비대증, 내분비병증, 단클론 감마병증, 및 피부 변화 증후군), 다발신경증, 기관비대증, 내분비병증, 단클론 감마병증, 피부 변화 증후군, 항인지질 증후군, 천포창, 피부경화증, 혼합성 결합조직 질환, 특발성 애디슨병, 진성당뇨병, 만성 활동성 간염, 원발성 담즙성 간경변증, 백반, 혈관염, 심근 경색후 (post-MI) 심장절개술 증후군, IV형 과민증, 접촉 피부염, 과민성 폐렴, 동종 이식 거부반응, 세포내 유기체에 의한 육아종, 대사성 또는 특발성 약물 과민증, 윌슨병, 혈색소증, 알파-1 항트립신 결핍증, 당뇨병성 망막증, 하시모토 갑상선염, 골다공증, 시상하부-뇌하수체-부신축 평가, 원발성 담즙성 간경변증, 갑상선염, 뇌척수염, 악액질, 낭포성 섬유증, 신생아 만성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 가족성 적혈구잠식성 림프조직구증, 피부 질환, 건선, 탈모증, 신증후군, 신장염, 사구체신염, 급성 신부전증, 혈액 투석, 요독증, 독성, 자간전증, okt3 요법, 항-CD3 요법, 사이토카인 요법, 화학 요법, 방사선 요법 (예를 들어, 무력증, 빈혈, 악액질 등을 포함하나 이에 한정되지 않음), 만성 살리실산염 중독 등 중 적어도 하나를 포함하나 이에 한정되지 않는, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 적어도 하나의 면역 관련 질환을 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 참고로 포함된 문헌[Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999)], 문헌[Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000)]을 참조하라.

[0129] 본 발명은 또한 심장 기절 (cardiac stun) 증후군, 심근경색증, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 허혈성 뇌졸중, 출혈, 급성 관동맥 증후군, 동맥경화증, 아테롬성 동맥경화증, 재협착, 당뇨병성 동맥경화성 질환, 고혈압, 동맥성 고혈압, 신혈관성 고혈압, 실신, 쇼크, 심혈관계 매독, 심부전, 폐심장증, 원발성 폐고혈압, 심부정맥, 이소성 심방 박동, 심방 조동, 심방 세동 (지속성 또는 일과성), 관류후 증후군, 심폐 바이패스 염증 반응, 혼돈성 또는 다소성 심방 빈맥, 규칙적인 좁은 QRS 빈맥, 특정 부정맥, 심실세동, 히스 다발 (His bundle) 부정맥, 방실 차단, 다발 갈래 차단, 심근 허혈 장애, 관상 동맥 질환, 협심증, 심근경색증, 심근병증, 확장형 울혈성 심근병증, 제한성 심근병증, 심장 판막 질환, 심내막염, 심낭 질환, 심종양, 대동맥류 및 말초동맥류, 대동맥박리, 대동맥 염증, 폐쇄성 혈전혈관염, 배대동맥 및 이의 분지의 폐쇄, 말초 혈관 장애, 동맥 폐쇄성 질환, 말초 아테롬성 동맥경화성 질환, 폐쇄성 혈전혈관염, 기능성 말초 동맥 장애, 레이노 현상 및 레이노병, 말단청색증, 피부홍통증, 정맥 질환, 정맥혈전증, 정맥류성 정맥, 동정맥류, 림프부종, 지방부종, 불안정성 협심증, 체관류 손상, 펌프 후 (post pump) 증후군, 허혈-재관류 손상 등 중 적어도 하나를 포함하나 이에 한정되지 않는, 세포, 조직, 기관, 동물, 또는 환자에서 적어도 하나의 심혈관 질환을 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 선택적으로 상기 조절, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 유효량의 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0130] 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 및 만성 기생충 또는 감염성 돌기, 세균, 바이러스 및 진균 감염 포함, HIV 감염/HIV 신경병증, 수막염, 간염 (A, B, 또는 C형 등), 패혈성 관절염, 복막염, 폐렴, 후두개염, 이. 콜라이 0157:h7, 용혈성 요독증후군/특발성 혈소판감소성 자반, 말라리아, 멧기 출혈열, 리슈만편모충증, 나병, 독성 쇼크 증후군, 연쇄구균 근육염, 기체 괴저, 결핵균, 조류형 결핵균 (Mycobacterium avium intracellulare), 폐포자충 폐렴, 골반내 감염 질환, 고환염/부고환염, 레지오넬라, 라임 병, 인플루엔자 a, 엡스타인 바 바이러스, 바이러스-관련 혈구탐식구 증후군, 바이러스성 뇌염/무균수막염 등 중 적어도 하나를 포함하나 이에 한정되지 않는 적어도 감염성 질환을 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0131] 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병 (ALL), 급성 림프구성 백혈병, B-세포, T-세포 또는 FAB ALL, 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 골수성 백혈병, 만성 골

수성 백혈병 (CML), 만성 림프모세포성 백혈병 (CLL), 모발상세포 백혈병, 골수이형성 증후군 (MDS), 림프종, 호지킨 (Hodgkin) 병, 악성 림프종, 비-호지킨 림프종, 버키트 (Burkitt) 림프종, 다중 흑색종, 카포시 (Kaposi) 육종, 결장직장 암종, 췌장 암종, 비인두 암종, 악성 조직구증, 부신생물 증후군/악성종양의 과갈습혈 증, 고형 종양, 방광 암, 유방 암, 직장결장 암, 자궁내막 암, 두부 암, 목 암, 유전성 비폴립증 암, 호지킨 림프종, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장 암, 전립선 암, 신장 세포 암종, 고환 암, 선암종, 육종, 악성 흑색종, 혈관종, 전이 질환, 암 관련 뼈의 재흡수, 암 관련 골통 등 중 적어도 하나를 포함하지만 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 악성 질환을 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0132] 본 발명은 또한 신경 변성 질환; 다발성 경화증; 편두통; AIDS 치매 복합증; 탈수초성 질환, 예를 들어 다발성 경화증 및 급성 횡단성 척수염; 추체외로 및 소뇌 질환, 예컨대 피질 척수계 병변; 기저핵 장애; 과다운동성 운동 장애, 예컨대 헌팅턴 무도병 및 노인무도병; 약물유발성 운동 장애, 예컨대 CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도된 것; 과소운동성 운동 장애, 예컨대 파킨슨병; 진행성 핵상마비; 소뇌 구조 병변; 척수 소뇌 변성증, 예컨대 척수성 운동실조증; 프리드리히 운동실조증; 소뇌 피질 변성증, 예를 들어 척추 운동실조증, 프리드리히 운동실조증, 소뇌 피질 변성, 다발계통 변성증 (멘셀 (Mencel), 데제린-토마스 (Dejerine-Thomas), 샤이-드래거(Shi-Drager), 및 마카도-조셉 (Machado-Joseph)); 전신성 질환 (레프섬 병, 무베타리포단백혈증, 모세혈관확장성 운동실조증, 및 미토콘드리아 다발계통 질환); 탈수초성 코어 (core) 장애, 예컨대 다발성 경화증; 급성 횡단성 척수염; 및 운동단위 장애, 예컨대 신경성 근위축증 (전각 세포 변성, 예컨대 근위축성 측삭경화증, 유아 척수성 근육위축증 및 소아 척수성 근육위축증); 알츠하이머병; 다운 증후군 관련 정신 장애; 미만성 루이소체병; 루이소체형 노인성 치매; 베르니케-코르사코프 증후군; 만성 알코올 중독; 크로이츠펠트-야콥병; 아급성 경화성 범뇌염; 할리포르텐-스파츠 병; 권투선수 치매; 신경외상성 손상 (예를 들어, 척수 손상, 뇌 손상, 뇌진탕, 반복성 뇌진탕); 통증; 염증성 통증; 자폐증; 우울증; 뇌졸중; 인식 장애; 간질 등 중 적어도 하나를 포함하나 이에 한정되지 않는, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 신경 질환을 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 선택적으로 조절, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 TNF 항체 또는 특정 부분 또는 변이체를 포함하는 유효량의 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Merck Manual, 16<sup>th</sup> Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)] 참조).

[0133] 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 치주 수술, 치아 발치(들), 근관 치료, 치아 임플란트의 삽입, 치아 보철물의 적용 및 사용을 포함하는 구강 수술과 관련된 신체 손상 또는 외상; 또는 무균 창상, 좌창, 절창, 열창, 비관통성 창상, 개방창, 관통성 창상, 관통창, 자창, 감염창, 경색 및 피하창으로 이루어진 균으로부터 선택되는 창상; 또는 허혈성 궤양, 압박 욕창, 누관, 중증 교상, 열 화상 및 공여 부위 창상으로 이루어진 균으로부터 선택되는 창상; 또는 아프타 구내염성 창상, 외상성 창상 또는 헤르페스 관련 창상으로 이루어진 균으로부터 선택되는 창상 중 적어도 하나를 포함하지만 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 창상, 외상 또는 조직 손상 또는 관련 만성 병태를 조절 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0134] 창상 및/또는 궤양은 보통 피부로부터 돌출하여 발견되거나 점막 표면 상에서 발견되거나 또는 기관에서 경색의 결과로서 ("뇌졸중") 발견된다. 창상은 연조직 결함 또는 병변의 결과 또는 기저가 되는 병태의 결과일 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "피부"는 인간을 포함하는 동물의 신체의 최외측 표면에 관련되며, 온전하거나 거의 온전한 피부뿐만 아니라 손상을 입은 피부 표면도 포함한다. 용어 "점막"은 인간과 같은 동물의 손상을 입지 않거나 손상을 입은 점막에 관련되며, 구강, 협측, 귀, 코, 폐, 눈, 위장, 질 또는 직장 점막일 수 있다.

[0135] 본 발명의 맥락에서, 용어 "창상"은 조직 구조의 정상적인 완전함이 붕괴된 신체 손상을 나타낸다. 또한 이 용어는 용어 "중기", "병변", "괴사" 및 "궤양"을 포함하는 것으로 의도된다. 보통, 용어 "욕창"은 피부 또는 점막의 거의 모든 병변에 대한 대중적인 용어이며, 용어 "궤양"은 기관 또는 조직의 표면의 국소적 결함 또는 함요부(excavation)이며, 이는 괴사 조직의 벗겨짐에 의해 생성된다. 병변은 일반적으로 임의의 조직 결함에 관련된다. 괴사는 감염, 손상, 염증 또는 경색에서 생기는 죽은 조직에 관련된다.

[0136] 본 발명의 맥락에서 사용되는 용어 "창상"은 임의의 창상(창상 분류에 대하여 하기 참조) 및 임의의 치유가 시작되기 전 또는 심지어 수술 절개와 같은 특정 창상이 만들어지기 전(예방적 치료) 단계를 포함하는, 치유 과정에서의 임의의 특정 단계에서의 것을 나타낸다. 본 발명에 따라 예방되고/되거나 치료될 수 있는 상처의 예는 예를 들어, 무균 창상, 좌창, 절창, 열창, 비관통성 창상(즉, 피부의 파괴가 없으나 기저 구조에 손상이 있는 상처), 개방창, 관통성 창상, 관통창, 자창, 감염창, 피하창 등이다. 중기의 예로는 욕창, 아구창, 크롬 중기(chrome sores), 단순 포진, 압박 욕창 등이 있다. 궤양의 예로는 예를 들어, 소화성 궤양, 십이지장 궤양, 위

퀘양, 통풍성 퀘양, 당뇨병 퀘양, 고혈압 허혈성 퀘양, 울혈성 퀘양, 하퇴 퀘양(정맥성 퀘양), 설하 퀘양, 점막 하 퀘양, 증후성 퀘양, 영양성 퀘양, 열대퀘양, 및 성병성 퀘양, 예를 들어, 임질에 의해 야기되는 것(요도염, 자궁경내막염 및 직장염 포함)이 있다. 본 발명에 따라 성공적으로 치료될 수 있는 창상 또는 종기에 관련된 병태는 화상, 탄저병, 파상풍, 가스 괴저병, 성홍열, 단독, 모창, 모낭염, 전염성 농가진, 또는 수포성 농가진 등이다. 용어 "창상"과 "퀘양" 및 "창상"과 "종기"의 사용 간에는 종종 소정의 중복이 있으며, 더욱이, 상기 용어들은 흔히 랜덤하게 사용된다. 따라서, 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 맥락에서 용어 "창상"은 용어 "퀘양", "병변", "종기" 및 "경색"을 포함하며 용어들은 달리 표시되지 않으면 구별되지 않고 사용된다.

[0137] 본 발명에 따라 치료될 창상의 종류는 또한 (i) 일반 창상, 예를 들어, 수술, 외상, 감염, 허혈, 열, 화학 및 수포성 창상; (ii) 구강에 특이적인 창상, 예를 들어, 발치 후 창상, 특히 낭포 및 농양의 치료와 관련한 치내 요법 창상, 세균, 바이러스 또는 자가면역 기원의 퀘양과 병변, 기계, 화학, 열, 감염성 및 태선상 창상; - 헤르페스성 퀘양, 아프타성 구내염, 급성 괴사성 퀘양성 치은염 및 구강 작열 증후군이 구체적 예임- ; 및 (iii) 피부 상의 창상, 예를 들어, 종양, 화상(예를 들어, 화학, 열), 병변(세균, 바이러스, 자가면역), 교상 및 수술 절개를 포함한다. 창상을 분류하는 다른 방식은 (i) 수술 절개, 사소한 마찰 및 사소한 교상으로 인한 작은 조직 손실, 또는 (ii) 상당한 조직 손실로서 분류하는 것이다. 후자 그룹은 허혈성 퀘양, 압박 욕창, 누관, 열상, 중증 교상, 열 화상 및 공여부 창상(연조직 및 경조직) 및 경색을 포함한다.

[0138] 본 발명과 관련하여 중요한 다른 창상은 허혈성 퀘양, 압박 욕창, 누관, 중증 교상, 열 화상 및 공여부 창상과 같은 창상이다. 허혈성 퀘양 및 압박 욕창은 보통 단지 매우 느리게 치유되는 창상이며 그러한 경우에 특히 개선되고 더 신속한 치유 과정이 물론 환자에게 매우 중요하다. 더욱이, 그러한 창상으로 인해 고통받고 있는 환자의 치료에 관련된 비용은 치유가 개선되고 더 신속하게 발생할 때 크게 감소된다.

[0139] 공여부 창상은 예를 들어, 신체의 한 부분으로부터의 경조직을 신체의 다른 부분으로 옮기는 것과 관련하여, 예를 들어, 이식과 관련하여 발생하는 창상이다. 그러한 작업에서 생기는 창상은 매우 고통스러우며 개선된 치유는 따라서 매우 중요하다. 용어 "피부"는 피부의 상피층 및 - 피부 표면이 다소 손상되는 경우에 - 피부의 진피층 또한 포함하는 매우 넓은 의미로 사용된다. 각질층과 별개로, 피부의 상피층은 외부(상피) 층이며 피부의 더 깊은 결합 조직 층은 진피로 불린다.

[0140] 본 발명의 임의의 방법은 상기 조절, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 유효량의 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 그러한 방법은 그러한 질환 또는 장애의 치료를 위한 공동 투여 또는 병용 요법을 선택적으로 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 적어도 하나의 단백질 스캐폴드, 이의 특정한 부분 또는 변이체의 투여는 적어도 하나의 TNF 길항제 (그러나 예를 들어, TNF 화학물질 또는 단백질 길항제, TNF 단클론 또는 다클론 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 (예를 들어, p55, p70 또는 p85) 또는 이의 단편, 융합 폴리펩티드, 또는 소분자 TNF 길항제, 예를 들어 TNF 결합 단백질 I 또는 II (TBP-I 또는 TBP-II), 네렐리몬맵, 인플릭시맵, 에타네르셉트 (엔브렐 (Enbrel™)), 아달리몰랍 (휴미라(Humira™)), CDP-571, CDP-870, 아펠리모맵, 레네르셉트 등에 한정되지 않음), 항류머티즘제 (예를 들어, 메토틀렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 금 나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노마이드, 설과살진), 근육 이완제, 마약, 비스테로이드성 항염증제 (NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근육 차단제, 항미생물제 (예를 들어, 아미노글리코사이드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페뎴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 설펜아미드, 테트라사이클린, 또다른 항미생물제), 건선치료제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 약제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항퀘양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴 (예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스티م (예를 들어, G-CSF, 뉴포겐(Neupogen)), 사르그라모스틴 (GM-CSF, 류카인(Leukine)), 면역제, 면역글로불린, 면역억제제 (예를 들어, 바실릭시맵, 사이클로스포린, 다클리주맵), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병약, 불안 완화제, 수면제, 교감신경흥분제, 흥분제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입 스테로이드, 류코트리엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파 (풀모자임 (Pulmozyme)), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 적어도 하나를 투여하기 전에, 그와 동시에 또는 그 후에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 적절한 투여량은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 각각이 전체적으로 참고로 본 명세서에 포함된 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000,

Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)]; 문헌[Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001]; 문헌[Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ.]을 참조하라.

- [0141] 사이토카인은 임의의 공지의 사이토카인을 포함한다 (예를 들어, www.Copewithcytokines.com, 참조) 사이토카인 길항제는 임의의 단백질 스캐폴드, 이의 항체, 단편 또는 모방체, 임의의 가용성 수용체, 단편 또는 모방체, 임의의 소분자 길항제 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0142] 전형적으로, 병리학적 병태의 치료는 유효량 또는 유효 투여량의 적어도 단백질 스캐폴드 조성물의 투여에 의해 수행되며, 상기 유효량 또는 투여량은 합계가 평균적으로 투여당 적어도 약 0.01 내지 500 밀리그램의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드/환자의 킬로그램, 바람직하게는 단일 또는 다중 투여당 적어도 약 0.1 내지 100 밀리그램의 단백질 스캐폴드/환자의 킬로그램이며, 이것은 조성물에 포함된 활성제의 비활성에 의존한다. 별법으로, 효과적인 혈청 농도는 단일 또는 다중 투여당 0.1-5000 µg/ml 혈청 농도를 포함할 수 있다. 적합한 용량이 의사들에게 공지되어 있고, 물론 특정 질병 상태, 투여되는 조성물의 특정 활성 및 치료할 특정 환자에 따라 달라질 것이다. 일부의 경우, 요구되는 치료량을 달성하기 위해 반복 투여, 즉 특정 모니터링 또는 계량 용량의 반복적인 개별 투여를 제공하는 것이 필요할 수 있으며, 여기서 상기 개별 투여는 요구되는 1일 용량 또는 효과가 달성될 때까지 개별적인 투여를 반복하는 것이 필요할 수 있다.
- [0143] 바람직한 용량은 선택적으로 투여 당 약 0.1-99 및/또는 100-500 mg/kg, 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율을 포함할 수 있거나, 단일 투여 또는 다회 투여 당 약 0.1-5000 µg/ml의 혈청중 농도의 혈청중 농도를 달성하는 용량, 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율일 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드에 바람직한 투여량 범위는 환자의 체중 1 kg 당 약 1 mg, 최대 약 3, 약 6 또는 약 12 mg이다.
- [0144] 별법으로, 투여 용량은 공지된 인자, 예를 들어 특정 제형의 약물동태학적 특성 및 그의 투여 방식 및 경로; 환자의 연령, 건강 및 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료 빈도, 및 요구되는 효과에 따라 달라질 수 있다. 통상, 활성 성분의 용량은 체중 1 킬로그램당 약 0.1 내지 100 밀리그램일 수 있다. 통상적으로, 0.1 내지 50, 바람직하게는 0.1 내지 10 밀리그램/킬로그램/투여 또는 지효성 형태가 요구되는 결과를 얻는데 효과적이다.
- [0145] 비제한적인 예로서, 인간 또는 동물의 치료는 1회 또는 기간 투여로 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 약 0.1 내지 100 mg/kg 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율을 일일당, 1-40일 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 또는 부가적으로 1-52주 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 또는 부가적으로 1-20년 중 적어도 하나, 또는 이의 임의의 조합으로 단일, 융합 또는 반복 용량을 사용하여 제공될 수 있다.
- [0146] 체내 투여에 적합한 투여형 (조성물)은 일반적으로 단위 또는 용기당 약 0.001 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유한다. 이들 약학 조성물에서, 활성 성분은 대체로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5 내지 99.999 중량%의 양으로 존재할 것이다.
- [0147] 비경구 투여의 경우, 단백질 스캐폴드는 약학적으로 허용가능한 비경구 비히클과 함께 또는 별도로 제공되는 용액, 현탁액, 에멀전, 입자, 분말 또는 동결건조 분말로서 제형화될 수 있다. 그러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 약 1-10% 인간 혈청 알부민이다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예를 들어 고정유가 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조 분말은 등장성 (예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성 (예를 들어, 완충제 및 보존제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형을 공지된 기술 또는 적합한 기술에 의해 살균시킨다.
- [0148] 적합한 약학적 담체가 이 분야의 표준 참고서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol]의 최신 판에 개시되어 있다.
- [0149] 대안적 투여
- [0150] 약학적 유효량의 본 발명에 따른 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 투여를 위해 많은 공지되고 개발된 방식이 이용될 수 있다. 폐 투여가 하기 설명에서 이용되며, 다른 투여 방식이 적합한 결과를 보이면서 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드는 흡입 또는 본 명세서에서 설명되거나 당업계에 공지된 다른 방식에 의한 투여에 적합한 임의의 다양한 장치 및 방법을 이용하여, 용액, 에멀전, 콜로이드, 현탁액 또는 건조 분말로서 담체 중에서 운반될 수 있다. 비경구 제형 및 투여
- [0151] 비경구 투여를 위한 제형은 통상적인 부형제로서 살균수 또는 염수, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리

콜, 식물 기원의 오일, 수소화 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사를 위한 수성 또는 유성 현탁액은 공지된 방법에 따라 적당한 유화제 또는 습윤화제 및 현탁제를 이용하여 제조될 수 있다. 주사를 위한 제형은 용매 중의 수성 용액, 살균 주사용 용액 또는 현탁액과 같은 비-독성 비-경구 투여가능 희석제일 수 있다. 사용가능한 비히클 또는 용매로서, 물, 링거액, 등장성 염수 등이 허용되며; 통상적인 용매 또는 현탁 용매로서, 살균 비휘발성 오일이 이용될 수 있다. 이 목적을 위해 천연 또는 합성 또는 반합성 지방산 오일 또는 지방산; 천연 또는 반합성의 모노- 또는 다이- 또는 트라이-글리세리드를 포함하는 임의의 종류의 비휘발성 오일 및 지방산이 이용될 수 있다. 비경구적 투여는 당업계에 공지되어 있고, 통상적인 주사 수단, 미국 특허 5,851,198에 기재된 기체 압력 무-바늘 주사 장치, 및 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 5,839,446에 기술된 레이저 천공기 장치를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0152] 대안적 전달

[0153] 본 발명은 추가로 비경구, 피하, 근내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질내, 직장내, 구강내, 설하, 비강내, 또는 경피 수단에 의한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 투여에 관한 것이다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물은 특히 액체 용액 또는 현탁액의 형태로의 비경구 (피하, 근내 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여를 위해; 특히 크림제 및 좌제 (이에 한정되지 않음)와 같은 반고체 형태로의 질내 또는 직장내 투여에서의 사용을 위해; 정제 또는 캡슐제 (이에 한정되지 않음)의 형태로의 구강내, 또는 설하 투여를 위해; 또는 분말, 또는 비점적제 또는 에어로졸 또는 특정 제형 (이에 한정되지 않음)의 형태로 비강 내로; 또는 젤, 연고, 로션, 현탁액 또는 피부 구조를 변경시키거나 경피 패치에서의 약물 농도를 증가시키기 위한 다이메틸 설펍사이드와 같은 화학적 증진제를 갖거나 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994)] 또는 단백질 및 펩티드를 함유하는 제형의 피부 적용을 가능하게 하는 산화제를 갖거나 (국제특허 공개 WO 98/53847호), 또는 전기천공과 같은 일시적 수송 경로를 형성하거나 또는 이온영동법과 같이 피부를 통해 하전된 약물의 이동을 증가시키는 전기장의 적용 또는 초음파 치료와 같은 초음파의 적용을 갖기 위해 제조될 수 있다 (미국 특허 제4,309,989호 및 제4,767,402호) (상기 공보 및 특허는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다).

[0154] 폐/비 투여

[0155] 폐 투여에 대해, 바람직하게는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물은 폐 또는 동 (sinus)의 더 낮은 기도에 도달하기에 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명에 따라, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 흡입에 의한 치료제의 투여를 위해 당업계에 공지된 임의의 다양한 흡입 또는 비내 투여 장치에 의해 전달될 수 있다. 환자의 공강 (sinus cavity) 또는 파리 내에 에어로졸화된 제형을 침적시킬 수 있는 상기 장치는 정량 흡입기, 분무기, 건조 분말 생성기, 스프레이어 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드의 폐 또는 비내 투여에 적합한 기타 장치는 당업계에 공지되어 있다. 그러한 모든 장치는 단백질 스캐폴드를 에어로졸로 분배하기 위해 투여에 적합한 제형을 이용할 수 있다. 그러한 에어로졸은 용액 (수성 및 비수성 모두) 또는 고체 입자로 구성될 수 있다.

[0156] 벤톨린(Ventolin)<sup>(등록상표)</sup> 정량 흡입기와 같은 정량 흡입기는 일반적으로 추진제 기체를 이용하며, 흡기 동안의 발동 (actuation)을 필요로 한다 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 94/16970호, WO 98/35888호 참조). 터부홀러 (Turbuhaler)<sup>TM</sup> (아스트라(Astra)), 로타홀러(Rotahaler)<sup>(등록상표)</sup> (글락소(Glaxo)), 디스쿠스(Diskus)<sup>(등록상표)</sup> (글락소), 스피로스(Spiros)<sup>TM</sup> 흡입기 (듀라(Dura)), 인홀 서라퓨틱스(Inhale Therapeutics)에 의해 판매되는 장치, 및 스피너홀러(Spinhaler)<sup>(등록상표)</sup> 분말 흡입기 (피슨스(Fisons))와 같은 건조 분말 흡입기는 혼합된 분말의 호흡-발동을 이용한다 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제4668218호 (아스트라), 유럽 특허 제 237507호 (아스트라), 국제특허 공개 WO97/25086호 (글락소), WO 94/08552호 (듀라), 미국 특허 제5458135호 (인홀(Inhale)), 국제특허 공개 WO 94/06498호 (피슨스). AERx<sup>TM</sup> 아라디그(Aradigm), 울트라벤트(Ultravent)<sup>(등록상표)</sup> 분무기 (몰린크로트(Mallinckrodt)), 및 아코닐(AcornII)<sup>(등록상표)</sup> 분무기 (마퀘스트 메디칼 프로덕츠 (Marquest Medical Products)) (미국 특허 제5404871호 (아라디그), 국제특허 공개 WO 97/22376호 - 상기 참고 문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨-)와 같은 분무기는 용액으로부터 에어로졸을 생성시키고, 정량 흡입기, 건조 분말 흡입기 등은 소입자 에어로졸을 생성한다. 상업적으로 이용가능한 흡입 장치의 이러한 특별한 예는 본 발명의 실시를 위해 적합한 특정 장치의 대표적인 것으로 의도되며, 본 발명의 범위가 이로 제한되

는 것은 아니다.

[0157] 본 발명의 범위가 이로 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 조성물은 건조분말 흡입기 또는 스프레이어에 의해 전달된다. 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 투여하기 위한 흡입 장치에는 수 개의 바람직한 특성이 있다. 예를 들어, 흡입 장치에 의한 전달은 유리하게 신뢰가 높고, 재생산가능하고 정확하다. 흡입 장치는 선택적으로 우수한 흡입성을 위해, 예를 들어 약 10  $\mu\text{m}$  미만, 바람직하게는 약 1-5  $\mu\text{m}$ 의 작은 건조 입자를 전달할 수 있다.

[0158] 스프레이로서 단백질 스캐폴드 조성물의 투여

[0159] 단백질 스캐폴드를 포함하는 스프레이는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 현탁액 또는 용액을 압력 하에서 노즐을 통과시켜 생산될 수 있다. 노즐 크기 및 입체형태, 적용되는 압력 및 액체 공급 속도는 요구되는 결과 및 입자 크기를 달성하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 전기스프레이는 모세관 또는 노즐 공급부와 연결된 전기장에 의해 생산될 수 있다. 유리하게는, 스프레이에 의해 전달되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 입자는 약 10  $\mu\text{m}$  미만, 바람직하게는 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ , 가장 바람직하게는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 범위의 입자 크기를 갖는다.

[0160] 스프레이에서의 사용에 적합한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 제형은 전형적으로 용액 1 ml 당 또는 약 0.1 mg 내지 약 100 mg, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값 또는 분율의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 농도의 수용액 중의 단백질 스캐폴드 조성물을 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장성 제제, 보존제, 계면활성제 및 바람직하게는 아연과 같은 시약을 포함할 수 있다. 제형은 또한 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 부형제 또는 제제를 포함할 수 있다. 단백질 스캐폴드 조성물의 제형화시에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드의 제형화에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토오스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드 단백질 제형은 또한 에어로졸 형성시에 용액의 연무화에 의해 야기되는 단백질 스캐폴드의 표면유도된 응집을 감소하거나 방지할 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 그리고 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상적인 계면활성제가 이용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 0.001 내지 14 중량%일 것이다. 본 발명의 목적을 위해 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질 스캐폴드, 또는 특정 부분 또는 변이체와 같은 단백질의 제형화를 위해 당업계에 공지된 추가의 제제가 또한 제형 중에 포함될 수 있다.

[0161] 분무기에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여

[0162] 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 젯 분무기 또는 초음파 분무기와 같은 분무기에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 젯 분무기에서는, 압축된 공기 원료가 구멍을 통해 고속 공기 제트를 형성하기 위해 이용된다. 노즐 너머로 가스를 팽창시킬 때 낮은 압력 영역이 형성되고, 이 영역이 단백질 스캐폴드 조성물 용액을 액체 저장소와 연결된 모세관을 통해 배출시킨다. 모세관으로부터의 액체 흐름은 관을 나감으로써 불안정한 필라멘트 및 소적으로 전달되어, 에어로졸을 형성한다. 일정 범위의 입체형태, 유속 및 배플 유형이 제시된 젯 분무기로부터 요구되는 성능 특성을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 초음파 분무기에서, 고주파 전기에너지가 일반적으로 압전 변환기를 사용하여, 진동성의 기계적 에너지를 형성하기 위해 이용된다. 이 에너지는 직접 또는 커플링 유체를 통해 단백질 스캐폴드 조성물의 제형에 전달되어, 단백질 스캐폴드 조성물을 포함하는 에어로졸을 형성한다. 유리하게는, 분무기에 의해 전달되는 단백질 스캐폴드 조성물의 입자는 약 10  $\mu\text{m}$  미만, 바람직하게는 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ , 가장 바람직하게는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 입자 크기를 갖는다.

[0163] 젯 또는 초음파 분무기에 사용하기 적합한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 제형은 일반적으로 용액 1 ml 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 농도의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장성 제제, 보존제, 계면활성제 및 바람직하게는 아연과 같은 시약을 포함할 수 있다. 제형은 또한 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 부형제 또는 제제를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 제형화시에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 제형화에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토오스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 제형은 또한 에어로졸 형성시에 용액의 연무화에 의해 야기되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 표면유도된 응집을 감소하거나 억제할 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상적인 계면활성제가 이용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 약

0.001 내지 4 중량%일 것이다. 본 발명의 목적을 위해 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질 스캐폴드와 같은 단백질의 제형화를 위해 당업계에 공지된 추가의 물질도 제형에 포함될 수 있다.

[0164] 정량 흡입기에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여

[0165] 정량 흡입기 (MDI)에서는, 추진제, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드, 및 임의의 부형제 또는 기타 첨가제가 액화 압축 기체를 포함하는 혼합물로서 캐니스터 (canister) 내에 함유된다. 계량 밸브의 작동은 혼합물을, 바람직하게는 약 10  $\mu\text{m}$  미만, 바람직하게는 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 5  $\mu\text{m}$ , 가장 바람직하게는 약 2  $\mu\text{m}$  내지 약 3  $\mu\text{m}$ 의 크기 범위의 입자를 함유하는 에어로졸로서 방출한다. 요구되는 에어로졸 입자 크기는 제트-연마, 스프레이 건조, 임계점 응축 등을 포함하는, 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 생산된 단백질 스캐폴드 조성물의 제형을 사용하여 얻을 수 있다. 바람직한 정량 흡입기는 3M 또는 글락소에 의해 제조된 것 및 하이드로플루오로카본 추진제를 이용하는 것을 포함한다. 정량 흡입기 장치에 사용하기 위한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 제형은 일반적으로, 예를 들어 계면 활성제의 도움을 받는 추진제 중에 현탁된 비수성 매질 중의 현탁액으로서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 항체를 함유하는 미분할된 분말을 포함할 것이다. 추진제는 트라이클로로플루오로메탄, 다이클로로다이플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로에탄 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134a (하이드로플루오로알칸-134a), HFA-227 (하이드로플루오로알칸-227) 등을 포함하는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 또는 하이드로카본과 같은 추진제가 상기 목적을 위해 사용되는 임의의 통상적인 물질일 수 있다. 바람직하게는 추진제는 하이드로플루오로카본이다. 계면활성제는 화학적 분해 등에 대해 활성 물질을 보호하기 위해 추진제 중의 현탁액으로서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 안정화할 수 있도록 선택된다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트, 대두 레시틴, 올레산 등을 포함한다. 일부 경우에서, 용액 에어로졸은 에탄올과 같은 용매를 이용하는 것이 바람직하다. 단백질의 제형화를 위해 당업계에 공지된 추가의 물질이 또한 제형 중에 포함될 수 있다. 당업자는 본 발명의 방법이 본원에서 설명되지 않은 장치를 통한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 폐 투여에 의해 달성될 수 있음을 알 수 있을 것이다.

[0166] 경구 제형 및 투여

[0167] 경구 투여를 위한 제형은 장벽의 투과성을 인공적으로 증가시키기 위한 아췌반트(예를 들어, 레소르시놀 및 비이온성 계면활성제, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르 및 n-헥사데실폴리에틸렌 에테르)의 동시투여, 및 효소 분해를 억제하기 위한 효소 억제제(예를 들어, 췌장 트립신 억제제, 다이아이소프로필플루오로포스페이트(DFF) 및 트라실롤)의 동시투여에 의존한다. 단백질과 단백질 스캐폴드 및 경구, 볼, 점막, 비강, 폐, 질 경막, 또는 직장 투여를 위해 의도된 적어도 두 계면활성제의 조합을 포함하는 친수성 제제의 전달을 위한 제형은 미국 특허 제 6,309,663호에 개시된다. 경구 투여를 위한 고체형 제형의 활성 구성성분 화합물은 수크로스, 락토스, 셀룰로오스, 만니톨, 트레할로스, 라피노스, 말티톨, 텍스트란, 전분, 한천, 아르기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트라가칸트 고무, 아라비아 고무, 젤라틴, 콜라겐, 카제인, 알부민, 합성 또는 반합성 중합체, 및 글리세리드를 비롯한 적어도 하나의 첨가제와 혼합될 수 있다. 이들 투여 형태는 또한 다른 유형(들)의 첨가제, 예를 들어, 불활성 희석제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 파라벤, 소르브산, 아스코르브산과 같은 보존제, 알파-토코페롤, 시스테인과 같은 산화방지제, 붕해제, 결합제, 비후제, 완충제, 감미제, 향미제, 방향제 등을 함유할 수 있다.

[0168] 정제 및 환제는 장용 코팅된 제형으로 추가로 처리될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 제형은 의학적 용도에 대해 허용가능한 에멀전, 시럽, 엘릭시르, 현탁액 및 용액 제형을 포함한다. 이러한 제형은 상기 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물을 함유할 수 있다. 리포솜은 또한 인슐린 및 헤파린에 대한 약물 전달 시스템으로서 설명된 바 있다 (미국 특허 제4,239,754호). 보다 최근에는, 혼합된 아미노산 (프로테노이드)의 인공 중합체의 미세구가 약물을 전달하기 위해 사용된 바 있다 (미국 특허 제4,925,673호). 또한, 생물학적 활성 제형을 경구 전달하기 위해 이용되는, 미국 특허 제5,879,681호 및 미국 특허 제5,871,753호에 기재된 담체 화합물이 당업계에 공지되어 있다.

[0169] 점막용 제형 및 투여

[0170] 마이크로캡슐을 생성시키는 하나 이상의 생체적합성 중합체 또는 공중합체 부형제, 바람직하게는 생분해성 중합체 또는 공중합체 내에 캡슐화되는 생활성 물질을 경구 투여하기 위한 제형에서는, 상기 물질이 생성되는 마이크로캡슐의 적당한 크기에 의해 위장관을 통과하는 물질에 의해 효율성이 손실되지 않으면서, "페이어 (Peyer) 의 패치" 또는 "GALT"로 공지된 동물의 집합림프소절에 도달되고 여기에서 흡수된다. 유사한 집합림프소절을

기관지관 (BALT) 및 대장에서 찾아볼 수 있다. 상기 설명된 조직은 일반적으로 점막에 관련된 림프세망 조직 (MALT)으로 언급된다. 점막 표면을 통한 흡수를 위해 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 투여하는 조성물 및 방법은 마이크론 미만의 입자, 점막부착 거대분자, 생활성 펩티드, 및 에멀전 입자의 점막부착을 달성함으로써 점막 표면을 통한 흡수를 증진시키는 수성 연속상을 포함하는 에멀전을 포함한다 (미국 특허 제5,514,670호). 본 발명의 에멀전 적용에 적합한 점막 표면은 각막, 결막, 구강내, 설하, 비내, 질내, 폐, 위, 장, 및 직장내 투여 경로를 포함할 수 있다. 질내 또는 직장내 투여를 위한 제형, 예를 들어 좌제는 부형제로서, 예를 들어 폴리알킬렌글리콜, 바셀린, 코코아 버터 등을 포함할 수 있다. 비강내 투여를 위한 제형은 고체일 수 있으며, 부형제로서, 예를 들어 락토스를 포함할 수 있거나, 또는 비내 점적제의 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 구강내 투여를 위한 부형제는 당, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 프리젤리네이티드 전분 (pregelatinated starch) 등을 포함한다 (미국 특허 제5,849,695호).

[0171] 경피 제형 및 투여

[0172] 경피 투여를 위해, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 리포솜 또는 중합체 나노입자, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 또는 미세구 (달리 언급하지 않으면 마이크로입자로서 집합적으로 언급됨)와 같은 전달 장치에 캡슐화된다. 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 그의 공중합체와 같은 폴리히드록시산과 같은 합성 중합체, 폴리오르토에스테르, 폴리아니하이드, 및 폴리포스파진, 및 콜라겐, 폴리아미노산, 알부민 및 기타 단백질, 아르기네이트와 같은 천연 중합체 및 기타 다당류, 및 그의 조합물로 만들어진 마이크로입자를 포함하는 많은 수의 적합한 장치가 공지되어 있다 (미국 특허 제5,814,599호).

[0173] 연장된 투여 및 제형

[0174] 연장된 기간 동안, 예를 들어, 단일 투여로부터 1주 내지 1년의 기간 동안 대상에게 본 발명의 화합물을 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 다양한 서방제, 데포제, 임플란트 형태가 이용될 수 있다. 예를 들어, 투여 형태는 예를 들어 (a) 인산, 황산, 시트르산, 타르타르산, 탄닌산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌 모노- 또는 다이-설폰산, 폴리갈락투론산 등과 같은 폴리염기산의 산 부가염, (b) 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과 같은 다가 금속 양이온을 갖거나, 예를 들어, N,N'-다이벤질-에틸렌다이아민 또는 에틸렌다이아민으로부터 형성된 유기 양이온을 갖는 염; 또는 (c) 예를 들어, 탄닌산아연 염과 같은 (a) 및 (b)의 조합물과 같은 체액 중에서 낮은 정도의 용해도를 갖는 화합물의 약학적으로 허용가능한 비독성 염을 함유할 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물, 바람직하게는 상기 설명된 것과 같은 비교적 불용성의 염은 겔로, 예를 들어, 주사에 적합한, 예를 들어 참깨유를 갖는 알루미늄 모노스테아레이트 겔로 제형화될 수 있다. 특히 바람직한 염은 아연 염, 탄닌산아연 염, 파모에이트 염 등이다. 주사를 위한 다른 유형의 서방성 데포제는 천천히 분해되는, 비독성 비항원성 중합체, 예를 들어, 미국 특허 제3,773,919호에 개시된 폴리락트산/폴리글리콜산 중합체에서 봉지화를 위해 분산된 화합물 또는 염을 함유할 것이다. 화합물, 또는 바람직하게는 상기에 개시한 것과 같은 상대적 불용성 염은 또한 특히 동물에서 사용하기 위해, 콜레스테롤 매트릭스 실라스틱 펠렛에 제형화될 수 있다. 추가의 서방제, 데포제 또는 임플란트 제형, 예를 들어, 기체 또는 액체 리포솜은 문헌에 공지되어 있다 (미국 특허 제5,770,222호 및 문헌["Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinsoned., Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1978]).

[0175] 본 발명을 일반적으로 설명하였지만, 본 발명은 예시를 위해 제공되고 본 발명을 제한하는 것으로서 간주되지 않는 하기 실시예를 참고로 하여 보다 쉽게 이해될 것이다.

[0176] 실시예

[0177] 실시예 1 - 텐콘 디자인

[0178] 인간 테나신으로부터의 세번째 FN3 도메인(서열 번호 3)은 항체 상보성 결정 영역(CDR)에 구조적으로 유사한 표면 노출 루프를 통해 특정 표적 분자에 결합하도록 조작될 수 있는 대안적 스캐폴드로서 사용될 수 있다. 이 도메인의 용융 온도는 그 천연 형태에서 PBS에서 54°C이다. 유사한 구조 및 개선된 물리적 특성, 예를 들어, 개선된 열 안정성을 가진 스캐폴드 분자를 생성하기 위하여, 콘센서스 서열은 인간 테나신으로부터의 15 FN3 도메인의 배열에 기초하여 디자인하였다(서열 번호 1-15).

[0179] 표 1에서 다수의 서열 배열의 분석은 이들 15개 도메인이 13% 내지 80% 범위로 서로 서열 동일성을 가지며 쌍간의 평균 서열 동일성은 29%임을 보여준다. 콘센서스 서열(서열 번호 16)은 표 1에 나타난 배열로부터 각 위치에 가장 보존된(빈번한) 아미노산을 통합시켜 디자인하였다. 쌍방식 배열에서, 텐콘으로 표시된 본 발명의 콘센서스 서열은 위치의 34-59%에서 테나신으로부터의 FN3 도메인과 동일하며 평균 서열 동일성은 43%이다.

[0180] 발현 및 정제

[0181] 텐콘의 아미노산 서열(서열 번호 16)을 역 번역시켜, 서열 번호 17에 나타난 DNA 서열을 생성하였다. 이 서열을 오버랩핑 PCR에 의해 조립하고, 개질 pET15 벡터내로 서브클로닝하고, BL21Star(DE3) 이. 콜라이(E. coli) (인비트로젠(Invitrogen))내로 형질전환시키고 75 µg/ml 카르베니실린을 함유한 LB 한천 플레이트상에 플레이팅하였다. 단일 콜로니를 선택하여 2% 글루코스 및 100 µg/ml 카르베니실린을 함유한 TB 배지 50 ml에서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 이 배양물을 이용하여 2.5L 울트라 일드(Ultra Yield) 플라스크(톰슨 인스트루먼트 컴퍼니(Thomson Instrument Company))에서 자가유도 배지(오버나이트 익스프레스 인스턴트(Overnight Express Instant) TB 배지, 노바젠(Novagen)) 500 ml에 접종시켰다. 성장과 발현은 ATR 멀티트론(Multitron) 진탕 인큐베이터에서 이중 프로그램(37°C, 300 rpm에서 3시간 후, 30°C, 250 rpm에서 16시간)을 이용하여 이루어졌다.

[0182] 배양물을 수집하고 JL8.1 로터에서 15분 동안 7000 rpm으로 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 세포를 20 mM 인산나트륨, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% 글리세롤, 20 mM 이미다졸, 0.37 mg/ml 라이소솜, 1X 완전 프로테아제 억제제 (무-EDTA; 로쉐(Roche)) 및 벤조나제(Benzonase) (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 0.25 µl/ml 최종)을 함유한 30 ml 버퍼에 재현탁시키고 펄스 모드로 얼음에서 5분 동안 미소닉스(Misonix) XL2020 소니케이터로 용해시켰다(5 초 온, 30 초 오프). 불용성 물질을 JA-17 로터에서 30분 동안 17,000 rpm에서 원심분리하여 제거하였다.

[0183] 텐콘 단백질을 2단계 크로마토그래프 과정에서 가용성 용해물로부터 정제하였다. 먼저, 2 ml Ni-NTA 아가로스 비드(키아젠(Qiagen))를 용해물에 첨가하고 그것을 1시간 동안 4°C에서 흔들 플랫폼에 두어, 고정 금속 친화성 크로마토그래피에 의해 단백질을 포획하였다. 이어서 수지를 폴리-프렙(Poly-Prep) 컬럼(바이오-래드(Bio-Rad))에 패키징시키고 20 mM 인산나트륨, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% 글리세롤 및 20 mM 이미다졸로 세척하여 미결합 물질을 제거하였다. 단백질을 20 mM 인산나트륨, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% 글리세롤 및 500 mM 이미다졸을 이용하여 수지로부터 용출시켰다. 분획을 쿠마시 염색 및 HRP-접합된 항-His 항체(이뮤놀로지 컨설턴츠 래보라토리(Immunology Consultants Laboratory))에 의해 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 원하는 분획을 모아서 PBS pH 7.4 내로 투석시켰다. 두번째 정제 단계로서 단백질을 PBS 에서 평형화된 슈퍼덱스(Superdex)-75 하이로드(HiLoad) 16/60 컬럼(지이 헬스케어(GE Healthcare))상에 로딩하였다. 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하였으며, 텐콘을 함유한 분획을 모아서 센트리프렙 울트라셀(Centrifrep UltraCel) YM-3 농축기(아미콘(Amicon))를 이용하여 농축시켰다.

[0184] 단백질 농도는 280 nm에서 샘플의 흡광도를 측정하기 위하여 바이오텍(BioTek) 플레이트 판독기를 이용하여 결정하였다. 최종 제제를 쿠마시 염색(도 1), 항-His 항체를 이용한 웨스턴 블롯, 및 PBS에 평형화된 G3000SW-XL 컬럼(토소 바이오사이언시즈(TOSOH Biosciences))을 이용한 HPLC-SEC에 의해 분석하였다. SDS-PAGE 분석은 텐콘이 6 내지 14 kDa 사이에서 이동함을 보여주며, 단량체 단백질에 대한 10.7 kDa의 예상 질량과 일치한다. 배양물 1리터 당 >50 mg의 순수한 텐콘 단백질의 수율이 얻어졌다.

[0185] 생물물리학적 특성화

[0186] 텐콘의 구조 및 안정성을 원편광 이색성 분광법 및 시차 주사 열량계에 의해 각각 특성화하였다. CD 측정은 PBS에서 20°C에서 그리고 0.2 mg/ml의 농도에서 AVIV 분광계에서 이루어졌다. 도 2의 스펙트럼은 218 nm에서 최소를 나타내어, 디자인된 대로 FN3 패밀리에 속하는 단백질에 대해 예상되는 β-시트 구조를 제안한다. DSC 데이터는 PBS중의 테나신 또는 텐콘으로부터의 3<sup>rd</sup> FN3 도메인의 0.5 mg/ml 용액을 N-DSCII 열량계 (어플라이드 서모다이나믹스(Applied Thermodynamics))에서 1°C/분의 속도로 35°C에서 95°C로 가열하여 얻었다. 버퍼만의 곡선을 차감시켜 도 3에 나타난 프로파일을 생성하였다. 이 데이터로부터, CpCalc (어플라이드 서모다이나믹스) 소프트웨어를 이용하여, 각각 3<sup>rd</sup> FN3 도메인과 텐콘에 대해 54°C 및 78°C의 용융 온도를 계산하였다. 두 도메인의 접힘과 풀림은 이들 온도에서 가역적이다.

[0187] 면역원성 분석

[0188] 아미노산 서열의 인간에 대한 면역원성을 모델링하는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 인간 테나신, 텐콘, 및 몇몇 치료 항체의 3<sup>rd</sup> FN3 도메인을 나타내는 아미노산 서열의 예상 면역원성을 비교하였다(표 2에 나타남). 프로그램으로 분석된 키메릭 mAb 및 인간 mAb (아다리무맙)는 허용오차 역치의 적용이 이어졌다(인간 생식세포계열 코딩된 서열과 100% 동일성을 가진 9-머 펩티드를 제거함). 허용오차 역치는 테나신 또는 텐콘에 적용되지 않았다. 허용오차 역치는 생식세포계 코딩된 mAb 서열에 대한 넓은 T 세포 허용을 가정하며 주로 CDR 및 인접 도메

인에서 신규 서열에 대한 분석에 집중한다.

[0189] 이들 분석은 분석된 서열로부터 유래된 9-머 펩티드가 하나 이상의 HLA 분자에 결합할 가능성에 기초하여 테나신과 텐콘 둘 모두에 대한 낮은 면역원성 위험을 예측한다. 점수는 각 HLA 대립유전자의 출현율에 대하여 가중된다. 모델을 위한 점수는 각 서열에 대해 요약되어 각 서열의 전체 PIR을 설명하는 단일 수를 제공한다(점수 합). 이 분석으로부터의 결과가 표 2에 요약된다. 테나신은 가장 낮은 전체 점수 (11.9)를 갖는 것으로 나타났다. 테나신처럼, 텐콘은 주로 비결합제 및 낮은 예상 면역원성 위험 애그리토프 점수를 가졌다(점수 = 13.2). 테나신과 텐콘 서열은 치료 항체에 비교하여 우호적인 점수를 가졌다.

[0190] pIX 융합에 의한 M13 파지에서의 텐콘의 디스플레이

[0191] 텐콘 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 PCR 및 제한 분해 클로닝에 의해 파지미드 발현 벡터 pPep9내로 서브클로닝하여, 벡터 pTencon-pIX를 생성하였다. 이 시스템은 M13 pIX 단백질의 N-말단에의 C-말단 융합으로서 N-말단에 Myc-태깅된 텐콘을 발현한다(도 4). Lac 프로모터는 IPTG없이 더 낮은 수준의 발현을 허용하며 IPTG의 첨가 후 발현 증가를 허용한다. OmpA 시그널 서열을 텐콘의 N-말단에 부착시켜 주변세포질로의 효율적인 전좌를 촉진하였다. 짧은 TSGGGGS 링커(서열 번호 141)를 텐콘과 pIX 사이에 구성하여 이들 단백질 사이의 입체 상호작용을 방지하였다.

[0192] M13 파지 입자의 표면 상의 디스플레이의 확인을 위해, pTencon-pIX를 XL1-Blue 이. 콜라이로 형질전환시키고 단일 콜로니를 이용하여 암피실린으로 보충된 5 ml LB 배양물을 접종하였다. 이 배양물을 중간-로그 단계에 도달할 때까지 37°C에서 성장시키고 이 시점에  $6^{10}$  pfu의 VCSM13 헬퍼 파지를 첨가하고 진탕없이 10분 동안 배양물을 37°C에서 항온처리한 후 진탕하면서 50분 동안 항온처리하였다. 헬퍼 파지 구제 배양물을 이어서 암피실린과 카나마이신으로 보충된 50 ml의 2YT 배지에서 희석시키고 O.D.<sub>600</sub> 이 0.7에 도달할 때까지 진탕하면서 37°C에서 성장시킨 후, 이 시점에서 IPTG를 1 mM의 최종 농도로 첨가하고 온도를 30°C로 감소시켰다. 16 시간 후, 배양물을 20분 동안 4000 X g에서 원심분리하고, 상청액을 수집한 후 분석을 위해 4°C에 보관하였다.

[0193] 항-Myc 항체(인비트로젠)에의 파지 입자의 결합을 이용하여 M13 파지 표면에서 Myc-텐콘 구조체의 디스플레이를 확인하였다. 맥시솔프(Maxisorp) 플레이트를  $\alpha$ -Myc 또는 항- $\alpha$ v 항체(음성 대조군)으로 2.5  $\mu$ g/ml의 농도로 밤새 코팅 한 후 슈퍼블록(SuperBlock) T20 (피얼스(Pierce))로 차단시켰다. 상기한 파지미드 배양 상청액의 2배 연속 희석물을 PBS에서 제조하고 코팅된 플레이트의 벽에 첨가하였다. 1시간 후, 플레이트를 TBST로 세척하고  $\alpha$ -M13 HRP 항체를 각 벽에 첨가하고 1시간 항온처리 후 TBST로 세척하였다. 로체 BD ELISA POD 기질을 첨가하고 플레이트 판독기(테칸(Tecan))에서 발광을 검출하였다. 도 5는 Myc-텐콘 파지 입자가 농도 의존 방식으로 플레이트의  $\alpha$ -myc 코팅된 벽에 결합하지만, 항- $\alpha$ v 항체 코팅된 벽 또는 미코팅 대조군 벽에는 결합하지 않음을 나타내며, M13 파지 입자 상의 Myc-텐콘의 특이적 디스플레이를 확인한다.

[0194] 추가의 파지미드 벡터는 단백질 pIII를 코딩하기 위한 융합체로서 M13 파지 상에 텐콘과 라이브러리 구성원(실시예 2 참조)을 디스플레이하기 위해 구성될 수 있다. 이 시스템의 경우, pIX를 위한 유전자는 pIII의 절단 버전을 코딩하는 유전자로 대체된다(문헌[Bass et al. 1990]). 도 4에 나타난 시스템에 비교한 추가의 변화는 DsbA를 위한 시그널 서열로 OmpA 시그널 서열을 대체한 것을 포함하며, 이는 이 서열을 이용한 분비가 안정한 대안적 스캐폴드 분자의 디스플레이에 유익한 것으로 나타났기 때문이다(문헌[Steiner et al. 2006]).

[0195] 실시예 2 - 텐콘 라이브러리의 생성

[0196] 텐콘 변이체 라이브러리는 원하는 복잡성과 분자 내의 돌연변이의 상대적 위치에 따라, 많은 상이한 방법에 의해 제조될 수 있다. DNA 합성법은 텐콘 유전자에 걸쳐 산재된 돌연변이를 생성하기에 바람직하다. 제한 효소 클로닝 또한 유전자의 상이한 영역에서 돌연변이를 함유한 DNA 단편을 재조합하기 위해 사용될 수 있다. 단일 텐콘 루프와 같은 작은 한정 영역 내의 포화성 돌연변이유발은 축퇴성 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 지시 돌연변이유발을 이용하여 도입될 수 있다(문헌[Kunkel et al. 1987]).

[0197] 올리고뉴클레오티드 지시 돌연변이유발을 이용하여 7개의 임의의 아미노산으로 FG 루프를 대체하기 위해 디자인된, 텐콘 라이브러리인 라이브러리 FG7을 제작하였다. FG 루프를 코딩하는 위치에서 NNS의 21 염기쌍(bp) 축퇴 서열 및 텐콘 코딩 서열에의 상보성의 두 개의 인접 20-27 bp 뉴클레오티드 서열을 갖도록 올리고뉴클레오티드(TconFG7-For-5'pho)를 합성하였다. 이 디자인에서, 모든 20개 아미노산은 FG 루프에서 나타내질 수 있다. 뉴클레오티드 수준에서 계산된 다양성은  $1.3 \times 10^9$ 이다.

- [0198] TconFG7-For5'pho: (서열 번호 18)
- [0199] GAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSCCGCTGTCTGCGGAATTCAC
- [0200] 올리고뉴클레오티드 지시 돌연변이유발을 위한 주형인 pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-pIII는, 텐콘 F:G 루프 코딩 서열을 AscI 제한 부위를 함유한 스텝 루프 서열로 대체함으로써 제작하였다. 이 시스템은 형질전환 전에 AscI 로 생성된 DNA를 분해함으로써 돌연변이유발 후 백그라운드 주형 DNA의 제거를 허용한다. 돌연변이유발을 위한 단일 가닥 DNA 주형을 정제하기 위하여, pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-pIII를 보유한 이. 콜라이 CJ236의 단일 콜로니를 카르베니실린(50ug/ml 최종 농도) 및 클로람페니콜(10ug/ml)을 가진 5 ml의 2YT 성장 배지 내로 피킹 하였다. 6시간 후, VCSM13 헬퍼 파지를  $10^{10}$  pfu/ml의 최종 농도로 첨가하고 10분 동안 진탕없이 항온처리 한 후 카르베니실린(10ug/ml)과 유리딘 (0.25 ug/ml)을 가진 150 ml의 2YT로 옮기고 밤새 200 rpm에서 진탕하면서 37°C에서 항온처리하였다. 세포를 원심분리에 의해 펠렛화하고 상청액을 수집하고 파지를 PEG NaCl로 펠렛화 하였다. 단일 가닥 DNA를 제조사의 설명서에 따라 퀴아프랩(QIAprep) 스핀(Spin) M13 kit (퀴아젠)을 이용하여 이 펠렛으로부터 정제하였다.
- [0201] 주형에 축퇴 올리고뉴클레오티드를 어닐링하기 위하여, 5 µg의 주형 DNA를 Tris-HCl (50 mM, pH7.5) 및 MgCl2 (10 mM)에서 10:1의 몰비로 올리고 TconFG7-For-5-pho와 조합하고 90°C에서 2분 동안, 60°C에서 3분 동안, 그리고 20°C에서 5분 동안 항온처리하였다. 어닐링 반응 후, ATP (10mM), dNTP (각각 25mM), DTT (100 mM), T4 리가아제 (7 유닛), 및 T7 DNA 폴리머라아제 (10 유닛)를 반응 혼합물에 첨가하고 6시간 동안 14°C에서 그리고 이어서 12시간 동안 20°C에서 항온처리하였다. 생성된 DNA를 PCR 정제 키트(퀴아젠)를 이용하여 정제하고 100 µl의 물에서 회수하였다. 라이브러리 DNA를 4시간 동안 10 유닛의 AscI로 분해한 후 다시 퀴아젠 PCR 정제 키트로 정제하였다. 최종 라이브러리 DNA를 50 µl의 물에 회수하였다. 그 후 생성된 이중쇄 DNA 생성물을 전기 천공에 의해 이. 콜라이 MC1061F' 내로 형질전환시켰다.
- [0202] 형질전환체를 20 ml SOC 배지에 모으고 1시간 동안 37°C에서 회복시켰다. 회복 마지막에, 형질전환 분석을 연속 희석하고 1% 글루코스를 함유한 카르베니실린(100ug/ml) 플레이트에 플레이팅하여 전체 형질전환체 수를 평가하였다. 나머지 SOC 배양물을 사용하여 카르베니실린과 1% 글루코스를 가진 1 L의 2xYT 배지를 접종시키고 OD<sub>600</sub>이 0.6에 도달할 때까지 성장시켰다. 100 ml의 이 배양물을 M13 헬퍼 파지로  $10^{10}$ /ml로 접종하고 37°C에서 항온처리한 후 원심분리하였다. 생성되는 세포 펠렛을 카르베니실린 (100ug/ml)과 카나마이신 (35ug/ml)을 함유한 500 ml의 신선한 2xYT 배지에 재현탁시키고 원심분리 전에 밤새 30°C에서 성장시켰다. 파지 입자를 PEG/NaCl을 첨가하여 침전시키고 -80°C에서 저장하였다.
- [0203] 두번째 라이브러리인 BC6/FG7은 텐콘의 B:C 및 F:G 루프 내에 동시에 다양성을 도입하도록 디자인하였다. 그렇게 하기 위하여, 두 가지 올리고뉴클레오티드인 Tc-BC6-For-5'phos 및 POP149를 합성하였다. 전방 올리고는 인산화되었으며 B:C 루프를 코딩하는 각 위치에서 NNS 코돈의 18 염기를 함유한 한편, 역방 올리고는 5' 단부에서 비오틴화되었으며 F:G 루프를 코딩하는 각 위치에서 NNS 코돈의 21 염기를 함유하였다. 두 올리고뉴클레오티드 모두 돌연변이될 영역의 선행 및 후행 영역과 동일한 두 개의 18 bp 뉴클레오티드 서열에 의해 인접된다(프라이머 상세사항을 위해 하기 참조).
- [0204] Tc-BC6-For-5'phos: (서열 번호 19)
- [0205] gactctctgctctgtcttggNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSSTCGACTCTTCCTGATCCAGTACC
- [0206] POP 2149: (서열 번호 20)
- [0207] GTGAATTCGCGACAGCGSNNNSNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGTG
- [0208] 라이브러리를 제작하기 위하여, 텐콘 DNA 주형을 증폭시키기 위해 올리고 Tc-CB6-For5'phos 및 POP2149를 이용하여 16개의 100 µl PCR 반응을 실시하여, 과정에서 동시에 B:C 및 F:G 루프 내로 NNS 코돈을 도입하였다. 이중쇄 PCR 생성물을 B&W 버퍼 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl, 0.1% Tween-20)에서 자기 스트랩타비딘 비드(다이날(Dynal))와 혼합하고, 20분 동안 항온처리하고, 자석으로 무너뜨리고(pulled down) B&W 버퍼로 2회 세척하였다. 전방 가닥을 300 µl의 150 mM NaOH로 비드로부터 용출시켰다. 이론적 다양성이  $8 \times 10^{16}$ 보다 큰 긴 프라이머들의 혼합물인 이 "메가프라이머(megaprimer)"를 이용하여 단일 가닥 라이브러리 주형에 어닐링시켰다. 라이브러리 제작은 FG7 라이브러리에 대해 상기한 대로 실시하였다.

[0209] 실시예 3 - IgG 결합제의 선택

[0210] IgG에 결합하는 텐콘 라이브러리 구성원의 선택을 실시하기 위하여, 재조합 IgG (인간 IgG1 아형)를 세포-NHS-LC-비오틴(피얼스)을 이용하여 비오틴화한 후 PBS 내로 투석시켰다. 선택을 위해, 200  $\mu$ l의 파지 디스플레이 라이브러리 FG7 또는 BC6/FG7을 200  $\mu$ l의 케미블로커(chemiblocker)로 차단시킨 후 500 nM (1회) 또는 100 nM (2회 및 3회)의 농도로 비오틴화 IgG를 첨가하였다. 결합된 파지를 1회에서는 뉴트라비딘(Neutravadin) 자기 비드(세라다인(Seradyne))로 또는 2회와 3회에서는 스트렙타비딘 자기 비드(프로메가(Promega))에 의해 회수하였다. 미결합 파지는 트윈을 가진 트리스 완충된 염수(TBST) 1 ml로 5-10회 세척하고 이어서 트리스 완충된 염수(TBS)로 1 ml 세척을 2회하여 비드로부터 세척하였다. 결합 파지는 중간-로그 단계 이. 콜라이 MC1061F'의 첨가에 의해 비드로부터 용출시켰다. 감염된 세포를 카르베니실린과 글루코스로 보충된 LB 한천에 플레이팅하였다. 다음날, 세포를 플레이트로부터 스크래핑하여 중간-로그 단계까지 성장시킨 후 VCSM13 헬퍼 파지로 구제하고 밤새 성장시켰다. 파지 입자를 PEG/NaCl 침전에 의해 단리하고 다음 회의 선택을 위해 사용하였다.

[0211] IgG에 대한 3회의 패닝 후, PCR에 의해 텐콘 유전자를 증폭시켜 리가아제 독립적 클로닝 부위를 포함하도록 변경된 pET27 벡터 내로 결과물을 서브클로닝하였다. 이 PCR 생성물을 벡터에 어닐링시키고 BL21-GOLD(DE3) 세포 (스트라타젠 (Stratagene)) 내로 형질전환시켰다. 개별 콜로니를 96 딥웰 플레이트(코닝(Corning)) 내의 1 ml 배양물 내로 피킹하여 포화시까지 밤새 37°C에서 성장시켰다. 다음날, 50  $\mu$ l의 밤샘 배양물을 사용하여 신선한 1 ml 배양물을 접종시켰다. 배양물을 2시간 동안 37°C에서 성장시킨 후 IPTG를 1 mM로 첨가하고 온도를 30°C로 감소시켰다. 세포를 유도 후 16시간에 원심분리하여 수집하고 100  $\mu$ l의 버그버스터(BugBuster) (노바젠 (Novagen))로 용해시켰다. 생성된 용해물을 원심분리에 의해 청정화하여 ELISA에 의해 IgG에의 결합에 대해 시험하였다.

[0212] 맥시솔프 플레이트(눈크(Nunc))를 0.1  $\mu$ g의 항-HIS 항체(퀴아젠)으로 밤새 코팅하고, TBST로 세척하고, 스타팅 블록(Starting Block) T20 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))으로 차단시켰다. 출발 블록에서 1:4로 희석한 투명하게 한 용해물을 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 결합시킨 후 TBST로 세척하였다. 비오틴화 IgG 또는 비오틴화 HSA를 1  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하고, 1시간 인큐베이션 후 TBST로 세척하였다. 결합 IgG 또는 HSA의 검출은 스트렙타비딘-HRP (잭슨 이뮤노리서치)를 첨가하고 POD 화학발광 기질을 이용하여 검출함으로써 달성하였다. ELISA의 결과가 도 7에 예시되어 있다. ELISA 시그널에 의해 판단할 때 비오틴화 HSA에 비하여 비오틴화 IgG에 10배보다 많이 결합한 제작물을 서열결정하였다. 몇몇 선별 실험의 완료 후, 라이브러리 FG7 유래의 60개의 유일무이한 결합 서열 및 라이브러리 BC6FG7 유래의 10개의 유일무이한 서열을 얻었으며, 표 4는 IgG 바인더의 대표적인 서열을 예시하는데, 여기서 B:C 및/또는 F:G 루프가 서열 번호 16의 서열과는 상이한 정도로 예시되어 있다. 또한 도 4에는 스캐폴드의 다른 영역의 많은 돌연변이가 예시되어 있다.

[0213] 여기서 디자인하고, 발현시키고 정제된 텐콘 단백질은 대안적인 스캐폴드 분자로서 사용한 인간 테나신 유래의 제3 FN3 도메인의 열안정성에 대하여 26°C만큼 향상된 열안정성을 갖는다. 이러한 안정성 증가에 기반하여, 이 스캐폴드 분자는 아미노산 치환을 더욱 잘 따르고 제조가 더욱 용이할 가능성이 있다. 단백질 안정성을 감소시키는 돌연변이는 더욱 안정한 스캐폴드의 맥락에서 더욱 우수하게 견디어질 가능성이 있으며, 따라서 안정성이 향상된 스캐폴드는 스캐폴드 변이체의 라이브러리 유래의, 더욱 기능적이고 잘 폴딩된 바인더를 생성할 가능성이 있다. 이러한 신규한 단백질은 인간 게놈에 의해 코딩되는 단백질이 아니기 때문에, 이것은 치료제로서 사용될 때 예를 들어 천연 인간 테나신에 대한 위험보다 더 적은, 면역 반응의 생성에 대한 위험을 또한 제공할 수 있다 (본질적으로, 야생형 도메인을 기반으로 한 치료제에서보다 더 적은 위험).

[0214] 본 발명의 목적에 있어서, 70-100% 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 동일성(즉, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)을 당업계에서 공지된 바와 같이 적합한 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정한다.

[0215] 본 발명은 상기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 및 실시예에서 구체적으로 설명된 것과 다르게 실시할 수 있음이 명백할 것이다. 상기 교시 내용에 비추어 본 발명의 많은 변형 및 변경이 가능하며, 따라서 이들은 첨부된 특허청구범위의 범주 내이다.

표 1

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1 (1) ---SPPKDLVVTEVTEETVNLAWDN-EMRVTEYLVVYTPTH--EGGLEMQFRVPGDQSTIIQELEPGVEYFIRVFAILENKKSI PVSARVAT-----
2 (1) TYLPAPPEGLKFKSIKETSVEVEWDPDIAFETWEIIFRNMN-KEDEGEITKSLRRPETSyrqTGLAPGQEYEISLHVKNNTRGPKLRVTTTRLD----
3 (1) ---DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKD--VPGDRITIDLTEDENQYSIGNLKPDTYEYVSLISRRGDMSSNPAKETFTT-----
4 (1) TGLDAPRNLRRVSCQDNSITLEWRNGKAAIDSYRIKYAPISGGDHAEDVVPKSOQATTKTTLGLRPGTEYGI GVSAVKEDKESNPATINAATELDTPKD
5 (1) ---DTPKDLQVSETAETSILTLWKTPLAKFDRYRLNYSLPT--GQWGVQLPRNTTSYVLRGLPEGQYINULLTAEKGRHKSPPAKSKPARVK-----
6 (1) QAPLENLTVTEVGDGLRLNWTAAQAYEHFIQVQEAN--KVEARMLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSIIYGVIIQYRTPVLSAEASTGE-----
7 (1) ETPNLGEVVVAEvgwdalKLNWTapegayeyffIQVQead--TVEAAQNLTVPGSLRSTDLpglkaathytitirgvtqdfsttplsvevlte
8 (1) EVPDMGNLTVTEVSDALRLNWTTPDGTyDQFTIQVQead--QVEEAHNLTVPGSLRSMETIPGLRAGTPYTVTLHGEVrghstrplavevte
9 (1) DLpQGLdLAVSEVGDGLRLNWTAAADNAYEHFVIQVQEVN--KVEAAQNLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYRVSIIYGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPE
10 (1) KEPTIGNLVSDITPSPFNLSWMTADGIFETPTTIEIIDSN--RLLETVEYNI SGAERTAHISGLPPSTDFIVVLSGLAPSIRTKTTSATATTE-----
11 (1) ALPLLENLITSDINPYGFTVSWMAENAFDSPLVTVVDSG--KLLDQRFITLSGTQRKLELRGLITIGIYEVVMVSGPTQGHOTKPLRAEIVTE-----
12 (1) AEPVNDLIVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNVLKIRDTK--KQSEPLEITLAPERTDLTGLREATEYIEIYKISGRRSQTVSAIATTAM-----
13 (1) ---GSPKVEIFSDITENSATVSWRAPTAQVESPRITVVPITG---GTPSMVTVDGTKTQTRLAKLIPGVEYLVSIAMKGFESPPVSGSFTTAL-----
14 (1) ---DGPSGLVTANI TDSEALARWQPAIATVDSYVVISYTGEX---VPEITRTVSGNTVEYALTDLEPATEYTLRIFAEKGFQKSSITITAKETITDL-----
15 (1) ---DSPRDLTATEVQSETALLTWRPPRASVTGYLLVWESVD---GTVKEVIVGPDITTSYSLADLSPSTHYTAKIQALNGPLRSNMIQITFTTIGL-----
    
```

[0216]

표 2

서열	설명	제 1 스코어 총계	제 2 스코어 총계	스코어 총계 (사슬)	스코어 총계 (분자)
테나신	Alt. Scaff.	6.01	5.85	11.86	11.86
텐큰	Alt. Scaff.	5.83	7.37	13.20	13.20
아달리부맙	Vh 인간화 mAb	9.45	8.06	17.50	45.42
	VI	15.29	12.63	27.92	
세록시맙	Vh 키메라 mAb	17.63	16.89	34.52	64.44
	VI	14.45	15.47	29.92	
리록시맙	Vh 키메라 mAb	16.57	14.38	30.96	61.65
	VI	16.63	14.06	30.69	
바실릭시맙	Vh 키메라 mAb	16.48	13.40	29.89	58.98
	VI	16.05	13.05	29.09	

[0217]

[0218]

서열

[0219]

서열 번호: 1

[0220]

sppkdlvvt evteetvnlawdnemrvtey lvyvtpthegglemqfrvpgdqst i iqelepgveyf irvfai lenkks ipvsarvat

[0221]

서열 번호: 2

[0222]

tylpapeglkfk siket svevewdp ldi afetwei i frnmkedegei tkslrrpet syrq tglapgqeyei slhivkn ntrgpglkrvt t trld

[0223]

서열 번호: 3

[0224]

dapsqievkdvt dt tal itwfkplaeidgi eltygikdvp gdr t t idl tedenqys ignl kpd t eyevsl isrrgdmssnpaket f t t

[0225]

서열번호: 4

[0226]

tgl daprnl rrvsqt dns it lewrngk aaid syri kyapi sggdhaevdvpksqat tkt t l tgl rpgt eygigvsavkedkesnpat inaat eldtpkd

[0227]

서열번호: 5

[0228]

dtpkdlqvsetaets l tllwktplakfdryr lnyslptqwgvgqlprnt tsyvlrgl epgqeynvl lt aekgrhkskpkaksparvk

[0229]

서열번호: 6

[0230]

qapelenl tvtevgwdgl rlnwt aadqayehfi iqvqean kveaarn l tvpgsl ravidipglkaatpyt vsiygviqgyrtpvl saeastge

[0231]

서열번호: 7

[0232]

etpnlgevvvaevgdalklnwtapegayeyffiqvqeadtveaaqnl tvpgglrstdlpglkaathytitirgvtqdfsttplsvevlte

[0233]

서열번호: 8

[0234]

evpdmgnl tvtevsdalarlnwt tpdgtydqf tiqvqeadqveeahnl tvpgslr smeipglragt pytvt lhgevrghstrplavevte

[0235]

서열번호: 9

[0236]

dlpqlgdlavsevgwdgl rlnwt aadnayehfviqvqevnkveaaqnl lpgsl ravidipglkaatpyr vsiygvirgyrtpvl saeastakepe

- [0237] 서열번호: 10
- [0238] kepeignlnvsditpesfnlswmatdgifetf tieiidsnrllletveynisgaertahisglppstdfivylsglpsirtktisatatte
- [0239] 서열번호: 11
- [0240] alpllenltisdinpygftvswmasenafdsflvtvdsghklldpqeftlsgtqrklelrglitgigyevmvsgftqghqtkplraeivte
- [0241] 서열번호: 12
- [0242] aepevdnllvsdatpdgfrlswtadegvfdnfvkirdtkkqsepleitllapertrdltglreateyeielygiskrrsqtvsaiattam
- [0243] 서열번호: 13
- [0244] gspkevi fsditensatvswraptaqvesfrityvpitggtpsmvtvdgktqtrlvklipgveylvsi iamkgfeesevsgsfttal
- [0245] 서열번호: 14
- [0246] dgpsglvtanitdsealarwqpaiatvdsyvisytgekvpeitrtvsgntveyaltdlepateytlrifaekgpqksstitakfttdl
- [0247] 서열번호: 15
- [0248] dsprdltat evqsetalltwrpprasvtgyllyvesvdgtvkeivgpdtt sysladlspsthyt akiqalngplrsmniqtiftt igl
- [0249] 서열번호: 16
- [0250] LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
- [0251] 서열번호: 17
- [0252] ctgccggcgccgaaaaacctggttggttctgaagtaccgaagactctctgcgtctgtctggaccgcccggacgcggcgttcgactcttctcctgatccag  
taccaggaatctgaaaaagtgggtgaagcgatcaacctgaccgttccgggtctctgaacgtctctacgacctgaccggtctgaaaccgggtaccgaatacacc  
gtttctatctacgggtgtaaaggtgggtcaccgttctaacccgctgtctgcggaattcaccacc
- [0253] 루프를 예시하는 टेकन 서열 (서열 번호: 16)
- [0254] A-B 루프          B-C 루프          C-D 루프
- [0255] 1-LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGGEA
- [0256] -E 루프 E-F 루프          F-G 루프
- [0257] INLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT-89

**표 3**

테콘의 루프

루프	서열 번호 16의 서열의 잔기	아미노산 서열
A-B	13-16	TEDS
B-C	22-28	TAPDAAF
C-D	38-43	SEKVGGE
D-E	51-54	GSER
E-F	60-64	GLKPG
F-G	75-81	KGGHRSN

[0258]

표 4

IgG에의 스캐폴드의 결합

칼론 번호	B:C 루프 잔기 22-28 (서열 번호)	F:G 루프 잔기 75-81 (서열 번호)	스캐폴드 돌연변이
1	SYGFNN (21)	QIGPIIP (46)	
2	TYEGES (22)	QIGPIIP (46)	
3	TYESES (23)	QIGPIIP (46)	
4	TNWMDS (24)	SIRTIDS (47)	
5	KSVFIM (25)	PKFHSP (48)	
6	YSSYAT (26)	WKTIIWF (49)	
7	RFHFP (27)	RKNWKTR (50)	
8	MMCMPL (28)	RLFRIYQ (51)	
9	YCRVRD (29)	WLSRSYD (52)	
10	SYGFNN (21)	WLSRSYD (52)	
11	MDCFMG (30)	WLSRSCD (53)	
12	TYRFNS (31)	WMGPYCD (54)	
13	ASRRSL (32)	RRRRYSF (55)	
14	TIESES (33)	HIVPMVP (56)	
15	TL*MQS (34)	QIEPIIR (57)	
도 16	IYDSES (35)	PSAANNP (58)	
17		VRLRYVQ (59)	
도 18		QVGPLIP (60)	
도 19		RIGPILP (61)	
도 20		QIGPLL (62)	
21		RIGPLL (63)	
22		QVGPLL (64)	
23		RIGPMLP (65)	
24		QIGPVLP (66)	
25		RIGPVLP (67)	
26		QIGPMMP (68)	
27		QVGPLVP (69)	
28		QIGPMLP (70)	R18P
29		QVGPIIP (71)	
30		QVGPLL (64)	
31		QVGPMPL (72)	
32		QIGPIVP (73)	I33V
33		MIGPLL (74)	
34		QIGPLFP (75)	
35		QIGPVLP (66)	T59A
36		QIGPMVP (76)	
37		QIGPIVP (77)	
38		RIEPIIP (78)	V74G
39		VAGSVWP (79)	
40		REGATLY (80)	
41		KQIPIL (81)	S38G
42		LSLSSVL (82)	
43		HMLLPL (83)	V74A

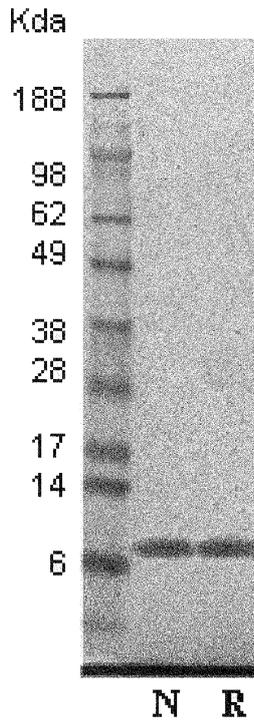
[0259]

44		MIGPLIP (84)	
45		TIGPHIP (85)	
46		EIGPCLP (86)	
47		EIGPVLP (87)	
48		KIGPCLP (88)	Y35H
49		MIGPVLP (89)	
50		QIGPILP (90)	S52P
51		QIGPILP (90)	Q36R
52		QIGPILP (90)	
53		EVGPIPL (91)	
54		QVGPLL (92)	A23T
55		QIGPVMP (93)	
56		QIGPCVP (94)	
57		QIGPLVP (95)	
58		RGLVMPM (96)	V74A
59		MIGPILP (97)	
60		QIGPILP (90)	E37G
61		QIGPILP (90)	T68A
62		QIGPILP (90)	T22I
63		QIGPILP (90)	S52F
64		QIGPILP (90)	Y56H
65		QIGPILP (90)	A44V
66		QIGPILP (90)	P24S
67		RIGPILP (61)	
68		CIGPMVP (98)	
69		FIGPVLP (99)	
70		HIGPILP (100)	
71		HIGPIMP (101)	
72		HIGPYLP (102)	
73		HVGPILP (103)	
74		HIGPLL (104)	
75		LIGPLL (105)	
76		MVGPLL (106)	
77		NIGPYLP (107)	
78		NIGPYLP (108)	
79		QIGPHLP (109)	
80		QIGPIIP (46)	
82		QIGPILG (110)	
83		QIGPILS (111)	
83		QIGPILT (112)	
84		QIGPIMP (113)	
85		QIGPIPI (114)	
86		QIGPLLN (115)	
87		QIGPLL (62)	
88		QIGPVFP (116)	
89		QIGPVLS (117)	
90		QIGPWLP (118)	
92		QVGPIPL (71)	

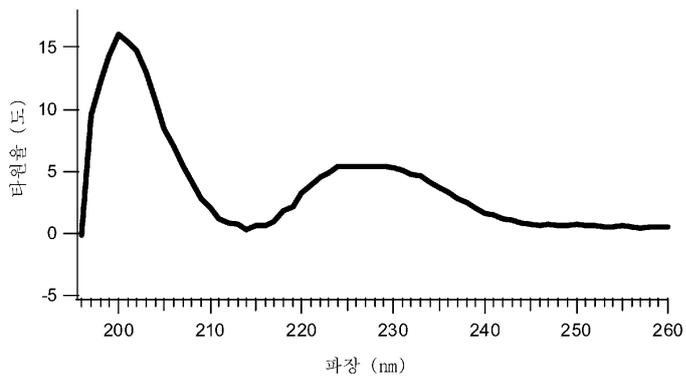
[0260]

도면

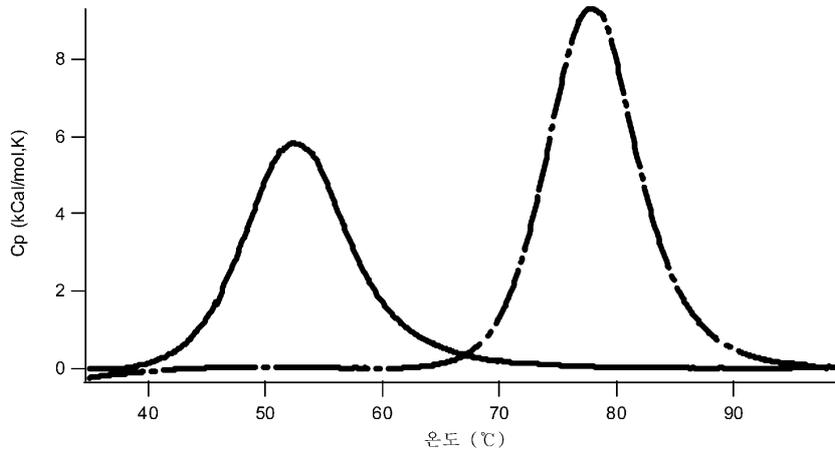
도면1



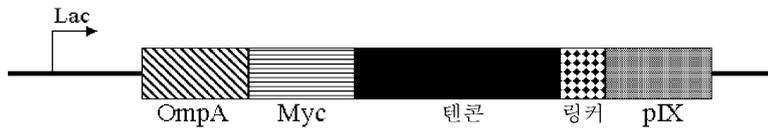
도면2



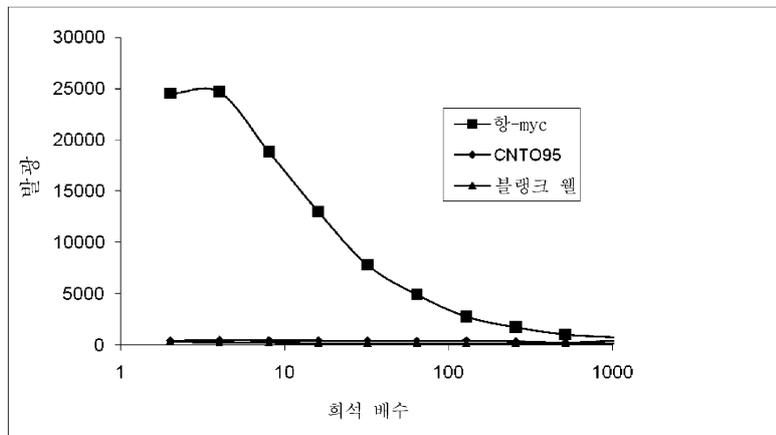
도면3



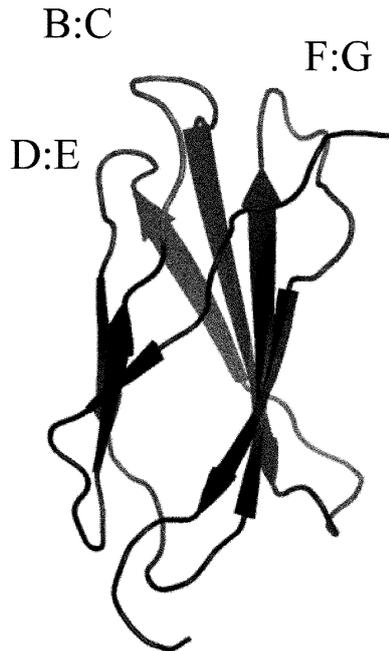
도면4



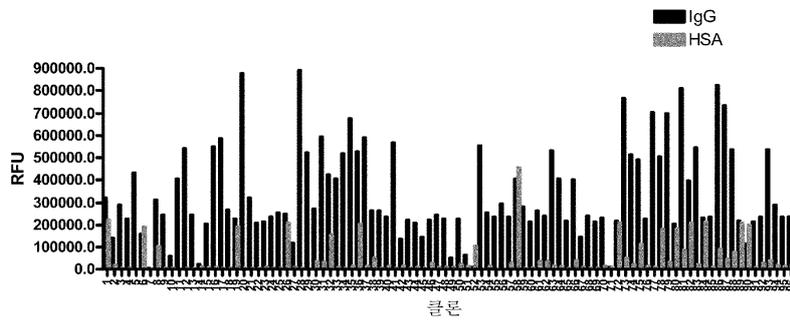
도면5



도면6



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JACOBS, STEVEN

O'NEIL, KARYN

<120> FIBRONECTIN TYPE III DOMAIN BASED

SCAFFOLD COMPOSITIONS, METHODS AND USES

<130> CEN5240PCT

<140> PCT/US2009/062200

<141> 2009-10-26

<150> 61/110120

<151> 2008-10-31

<160> 141

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Pro Pro Lys Asp Leu Val Val Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Val

1 5 10 15

Asn Leu Ala Trp Asp Asn Glu Met Arg Val Thr Glu Tyr Leu Val Val

20 25 30

Tyr Thr Pro Thr His Glu Gly Gly Leu Glu Met Gln Phe Arg Val Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Ala Arg Val Ala Thr

85

<210> 2

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Tyr Leu Pro Ala Pro Glu Gly Leu Lys Phe Lys Ser Ile Lys Glu

1 5 10 15

Thr Ser Val Glu Val Glu Trp Asp Pro Leu Asp Ile Ala Phe Glu Thr

20 25 30

Trp Glu Ile Ile Phe Arg Asn Met Asn Lys Glu Asp Glu Gly Glu Ile

35 40 45

Thr Lys Ser Leu Arg Arg Pro Glu Thr Ser Tyr Arg Gln Thr Gly Leu

50 55 60



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

<210> 5

<

211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ala Pro Glu Leu Glu Asn Leu Thr Val Thr Glu Val Gly Trp Asp  
 1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp Gln Ala Tyr Glu His Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90

<210> 7

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe

20 25 30

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

35 40 45

Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala

50 55 60

Ala Thr His Tyr Thr Ile Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser

65 70 75 80

Thr Thr Pro Leu Ser Val Glu Val Leu Thr Glu

85 90

<210> 8

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Pro Asp Met Gly Asn Leu Thr Val Thr Glu Val Ser Trp Asp  
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Leu Asn Trp Thr Thr Pro Asp Gly Thr Tyr Asp Gln Phe  
 20 25 30

Thr Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp Gln Val Glu Glu Ala His Asn Leu  
 35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Leu Arg Ser Met Glu Ile Pro Gly Leu Arg Ala  
 50 55 60

Gly Thr Pro Tyr Thr Val Thr Leu His Gly Glu Val Arg Gly His Ser  
 65 70 75 80

Thr Arg Pro Leu Ala Val Glu Val Val Thr Glu  
 85 90

<210> 9

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Gly Leu Arg Leu Asn Trp Thr Ala Ala Asp Asn Ala Tyr Glu His Phe  
 20 25 30

Val Ile Gln Val Gln Glu Val Asn Lys Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu  
 35 40 45

Thr Leu Pro Gly Ser Leu Arg Ala Val Asp Ile Pro Gly Leu Glu Ala  
 50 55 60

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

Thr Pro Val Leu Ser Ala Glu Ala Ser Thr Ala Lys Glu Pro Glu  
 85 90 95

<210> 10

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

65 70 75 80  
 Thr Lys Thr Ile Ser Ala Thr Ala Thr Thr Glu  
 85 90

<210> 11

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

65                    70                    75                    80  
 Ser Gln Thr Val Ser Ala Ile Ala Thr Thr Ala Met  
                   85                    90

<210> 13

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

85

<210> 14

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

65	70	75	80
Thr Ala Lys Phe Thr Thr Asp Leu			

85

<210> 15

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

65                    70                    75                    80  
 Gln Thr Ile Phe Thr Thr Ile Gly Leu

85

<210> 16

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding polypeptide

<400

> 16

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1                    5                    10                    15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr

85

<210> 17

<211> 267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide encoding binding polynucleotide

<400> 17

ctgccggcgc cgaaaaacct ggtgttttct gaagttaccg aagactctct gcgtctgtct 60

tggaccgcgc cggacgcggc gttcgactct ttctgatcc agtaccagga atctgaaaaa 120

gttggtgaag cgatcaacct gaccgttccg ggttctgaac gttcttacga cctgaccggc 180

ctgaaaccgg gtaccgaata caccgtttct atctacggg ttaaaggtgg tcaccgttct 240  
aaccgctgt ctgcggaatt caccacc 267

<210> 18  
<211> 68  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> unknown  
<222> (28)(29)(31)(32)(34)(35)(37)(38)(40)(41)(43)(44)(46)(47)  
<223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g  
<400> 18

gaatacaccg tttctatcta cgggttnns nnsnnsnns nsnnsnnscc getgtctgcg 60  
gaattcac 68

<210>  
> 19  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> unknown  
<222> (22)(23)(25)(26)(28)(29)(30)(31)(32)(34)(35)(37)(38)  
<223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g  
<400> 19

gactctctgc gtctgtcttg gnnsnnsnns nnsnnsnst tegactcttt cctgatccag 60  
tacc 64

<210> 20  
<211> 63  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> unknown  
<222> (22)(23)(25)(26)(28)(29)(30)(31)(32)(34)(35)(36)(37)(38)(39)(40)  
<223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g and  
s can be represented by g or c.

<400> 20

gtgaattccg cagacagcgg snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta gatagaaacg 60

gtg 63

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 21

Ser Tyr Gly Phe Asn Asn

1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 22

Thr Tyr Glu Gly Glu Ser

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 23

Thr Tyr Glu Ser Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 24

Thr Asn Trp Met Asp Ser

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 25

Lys Ser Val Phe Ile Met

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 26

Tyr Ser Ser Tyr Ala Thr

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 27

Arg Phe His Pro Phe Pro

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 28

Met Met Cys Met Pro Leu

1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 29

Tyr Cys Arg Val Arg Asp

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 30

Met Asp Cys Phe Met Gly

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 31

Thr Tyr Arg Phe Asn Ser

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 32

Ala Ser Arg Arg Ser Leu

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 33

Thr Ile Glu Ser Glu Ser

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 34

Thr Leu Met Gln Ser

1 5

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 35

Ile Tyr Asp Ser Glu Ser

1 5

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 36

Asp Arg Lys Arg Phe Ile

1 5

<210> 37

<211> 6

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 37

Glu Phe Trp Arg Gly Ser

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 38

Gly Leu Leu Asp Pro Leu

1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 39

Gly Leu Val Leu Pro Glu

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 40

Met Ala Ser Asp Gly Leu

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 41

Asn Lys Thr Glu Thr Asn

1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 42

Gln Ala Glu Arg Lys Val

1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 43

Ser Gln Val Cys Thr Leu

1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 44

Tyr Phe Asp Lys Asp Ser

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 45

Tyr Phe Glu Cys Glu Pro

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 46

Gln Ile Gly Pro Ile Ile Pro

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 47

Ser Ile Arg Thr Ile Asp Ser

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 48

Pro Lys Phe His Ser Pro Leu

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 49

Trp Lys Thr Thr Ile Trp Phe

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 50

Arg Lys Asn Trp Lys Thr Arg

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 51

Arg Leu Phe Arg Ile Tyr Gln

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 52

Trp Leu Ser Arg Ser Tyr Asp

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 53

Trp Leu Ser Arg Ser Cys Asp

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 54

Trp Met Gly Pro Tyr Cys Asp

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 55

Arg Arg Arg Arg Tyr Ser Phe

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 56

His Ile Val Pro Met Val Pro

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 57

Gln Ile Glu Pro Ile Ile Arg

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 58

Pro Ser Ala Ala Asn Asn Pro

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 59

Val Arg Leu Arg Tyr Val Gln

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 60

Gln Val Gly Pro Leu Ile Pro

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 61

Arg Ile Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain

<400> 62

Gln Ile Gly Pro Leu Leu Pro

1                    5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 63

Arg Ile Gly Pro Leu Leu Pro

1                    5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 64

Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro

1                    5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 65

Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro

1                    5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 66

Gln Ile Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 67

Arg Ile Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 68

Gln Ile Gly Pro Met Met Pro

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 69

Gln Val Gly Pro Leu Val Pro

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 70

Gln Ile Gly Pro Met Leu Pro

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 71

Gln Val Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 72

Gln Val Gly Pro Met Leu Pro

1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 73

Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro

1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 74

Met Ile Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 75

Gln Ile Gly Pro Leu Phe Pro

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 76

Gln Ile Gly Pro Met Val Pro

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 77

Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 78

Arg Ile Glu Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 79

Val Ala Gly Ser Val Trp Pro

1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 80

Arg Glu Gly Ala Thr Leu Tyr

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 81

Lys Gln Ile Pro Pro Ile Leu

1 5

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 82

Leu Ser Leu Ser Ser Val Leu

1                    5  
<210> 83  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain  
<400> 83

His Met Leu Leu Pro Leu Pro

1                    5  
<210> 84  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 84  
Met Ile Gly Pro Leu Ile Pro

1                    5  
<210> 85  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 85

Thr Ile Gly Pro His Ile Pro

1                    5  
<210> 86  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 86

Glu Ile Gly Pro Cys Leu Pro

1                    5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 87

Glu Ile Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 88

Lys Ile Gly Pro Cys Leu Pro

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 89

Met Ile Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 90

Gln Ile Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 91

Glu Val Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 92

Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 93

Gln Ile Gly Pro Val Met Pro

1 5

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 94

Gln Ile Gly Pro Cys Val Pro

1 5

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain

<400> 95

Gln Ile Gly Pro Leu Val Pro

1 5

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 96

Arg Gly Leu Val Met Pro Met

1 5

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 97

Met Ile Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 98

Cys Ile Gly Pro Met Val Pro

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 99

Phe Ile Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 100

His Ile Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 101

His Ile Gly Pro Ile Met Pro

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 102

His Ile Gly Pro Tyr Leu Pro

1 5

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 103

His Val Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 104

Ile Ile Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 105

Met Val Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 106

Met Val Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 107

Asn Ile Gly Pro Tyr Leu Pro

1 5  
<210> 108  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 108  
Asn Ile Gly Pro Tyr Leu Pro

1 5  
<210> 109  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 109  
Gln Ile Gly Pro His Leu Pro

1 5  
<210> 110  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 110  
Gln Ile Gly Pro Ile Leu Gly

1 5  
<210> 111  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 111  
Gln Ile Gly Pro Ile Leu Ser

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 112

Gln Ile Gly Pro Ile Leu Thr

1                    5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 113

Gln Ile Gly Pro Ile Met Pro

1                    5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 114

Gln Ile Gly Pro Ile Pro Ile

1                    5

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 115

Gln Ile Gly Pro Leu Leu Asn

1                    5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 116

Gln Ile Gly Pro Val Phe Pro

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 117

Gln Ile Gly Pro Val Leu Ser

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 118

Gln Ile Gly Pro Trp Leu Pro

1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 119

Gln Val Gly Pro Ile Met Asn

1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 120

Gln Val Gly Pro Ile Met Pro

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 121

Gln Val Gly Pro Ile Val Pro

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 122

Gln Val Gly Pro Leu Leu Ser

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 123

Gln Val Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 124

Gln Val Gly Pro Val Leu Pro

1 5

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 125

Arg Ile Gly Pro Ile Met Pro

1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 126

Arg Ile Gly Pro Ile Val Pro

1 5

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 127

Arg Ile Gly Pro Met Phe Pro

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 128

Arg Ile Gly Pro Met Ile Pro

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 129

Arg Ile Gly Pro Met Val Pro

1 5

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 130

Arg Ile Gly Pro Val Ile Pro

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 131

Arg Val Gly Pro Ile Leu Pro

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 132

Arg Val Gly Pro Leu Leu Pro

1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 133

Thr Val Gly Pro His Ile Pro

1 5

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 134

Pro Ser Trp Arg Ser Asn Trp

1 5

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 135

Ala Leu Arg Ala Thr Leu Glu

1 5

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 136

Lys Tyr Gly Tyr Leu Thr Pro

1                    5  
<210> 137  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence  
<400> 137  
Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro

1                    5  
<210> 138  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 138  
Asn Pro Phe Cys Ser Arg Phe

1                    5  
<210> 139  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 139  
Tyr Tyr Leu His Gln Trp Cys

1                    5  
<210> 140  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 140  
His Ile Val Pro Leu Leu Arg

1                    5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Protein Scaffold Based On A Human Fibronectin Type III (FN3) Domain Sequence

<400> 141

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5