



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월28일
 (11) 등록번호 10-1782790
 (24) 등록일자 2017년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 14/765* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7014067
 (22) 출원일자(국제) 2011년11월25일
 심사청구일자 2014년09월26일
 (85) 번역문제출일자 2013년05월31일
 (65) 공개번호 10-2014-0002657
 (43) 공개일자 2014년01월08일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/071083
 (87) 국제공개번호 WO 2012/069654
 국제공개일자 2012년05월31일
 (30) 우선권주장
 10192711.9 2010년11월26일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2010505436 A*
 H. Kaspar Binz 등, J. Mol. Biol. Vol. 332,
 No. 2, 페이지 489-503 (2003.)*
 H. Kaspar Binz 등, Nat. Biotechnol. Vol. 23,
 No.10, 페이지1257-1268 (2005.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
몰리콜라 파트너스 아게
 스위스 체하-8952 쉴리에렌 바기슈트라세 14
 (72) 발명자
슈타이너 다니엘
 스위스 체하-8006 취리히 랑마우어슈트라세 28
빈츠 한스 카스파르
 스위스 체하-8903 비르멘스도르프 바흐슈트라세
 27
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
백덕열

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 **혈청 알부민에 결합하는 설계된 반복 단백질**

(57) 요약

혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖는 새로이 설계된 반복 단백질, 이러한 혈청 알부민 결합 단백질을 코딩하는 핵산, 이러한 단백질을 포함하는 약학적 조성물, 치료성 관련 폴리펩티드의 약동학을 변형하기 위한 단백질의 용도, 및 질병 치료에서 이러한 단백질의 사용이 개시되어 있다. 본 발명의 반복 단백질은 혈청 알부민에 대해 결합하지 않는 단백질에 비교하여 실질적으로 증가된 반감기를 갖는다.

(72) 발명자

글로티-게오그기에바 마야

스위스 체하-8907 베츠빌 아.아. 니더스베크 36

메르츠 프리더 베.

스위스연방 체하-5507 멜링겐 임 게리히 79

필립스 더글라스

스위스 체하-5400 바덴 오일렌베크 37

존데레거 이포

스위스연방 체하-8902 우르도르프 임 바우렌 애커
9

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질로서, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대하여 결합 특이성을 갖고, 또 상기 안키린 반복 도메인은

- (1) 서열번호:49;
- (2) 서열번호:50;
- (3) 서열번호:51;
- (4)서열번호: 52;
- (5) X₁DX₂X₃GX₄TPLHLAAX₅X₆GHLEIVEVLLKX₇GADVNA(서열번호:10)

식중, X₁은 A, D, M, F, S, I, T, N, Y, 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 E, K, D, F, M, N, I 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 W, R, N, T, H, K, A 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 N, T 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 N, V 및 R로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₆은 E, Y, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또

X₇은 S, A, Y, H 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임;

- (6) X₁DYFX₂HTPLHLAARX₃X₄HLX₅IVEVLLKX₆GADVNA(서열번호:11)

식중, X₁은 D, K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 D, G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 E, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 G 및 D로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 E, K 및 G로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또

X₆은 H, Y, A 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임;

- (7) X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄X₅GHLEIVEVLLKX₆GADVNA (서열번호:54)

식중, X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 N, D, Q, S, A, T 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또

X₆은 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임;

(8) X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄DGHLEIVEVLLKX₅GADVNA (서열번호:12)

식중, X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또

X₅는 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임;

(9) X₁DX₂X₃GTTPHLAAVYGHLEX₄VEVLLKX₅GADVNA (서열번호:13)

식중, X₁은 K, A, D, M, F, S, I, T, N, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 E, K, D, F, M, N 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 R, N, T, H, K, A 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 I 및 M로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또

X₅는 H, Y, K, A 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임; 및

(10) X₁NETGYTPLHLADSSGHX₂EIVEVLLKX₃X₄X₅DX₆NA (서열번호:14)

식중, X₁은 Q 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 L 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 H, N, Y 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 A, V, T 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또

X₆은 V 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임;

으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 안키린 반복 모듈을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 1일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 3일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 5일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 10일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 모듈은 아미노산 서열 X₁DYFX₂HTPLHLAARX₃X₄HLX₅IVEVLLKX₆GADVNA(서열번호:11)로 이루어지는, 결합 단백질:

식 중,

X₁은 D, K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 D, G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 E, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 G 및 D로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 E, K 및 G로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또

X₆은 H, Y, A 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 모듈은 아미노산 서열

X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄X₅GHLEIVEVLLKX₆GADVNA (서열번호:54)로 이루어지는, 결합 단백질:

식 중,

X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₅는 N, D, Q, S, A, T 및 E로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또

X₆은 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 모듈은 아미노산 서열

X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄DGHLEIVEVLLKX₅GADVNA (서열번호:12)로 이루어지는, 결합 단백질:

식 중,

X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;

X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또

X₅는 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기임.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 결합하기 위하여 서열번호:17 내지 31 및 서열번호: 43 내지 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁하는, 결합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 결합하기 위하여 서열번호:27 및 서열번호:46으로 이루어진 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁하는, 결합 단백질.

청구항 11

제1항에 따른 결합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 12

삭제

청구항 13

적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질로서,

상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대하여 결합 특이성을 갖고, 또 상기 안키린 반복 도메인은

(1) 서열번호:49;

(2) 서열번호:50;

(3) 서열번호:51; 및

(4)서열번호:52로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진 안키린 반복 모듈을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 서열번호:49의 아미노산 서열로 이루어진 안키린 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 1일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 3일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 5일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 인간에서 적어도 10일의 종말 혈장 반감기를 갖는, 결합 단백질.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 결합하기 위하여 서열번호:46으로 이루어진 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁하는, 결합 단백질.

청구항 20

제13항에 따른 결합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖는 설계된 반복 단백질뿐만 아니라, 이러한 혈청 알부민 결합 단백질을 코딩하는 핵산, 이러한 단백질을 포함하는 약학적 조성물, 생활성 화합물의 약동학을 변형하는 이러한

단백질의 용도 및 질병 치료에서 이러한 단백질의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생체내 특성에서 약동학(pharmacokinetic: PK)을 조절하거나 증가시키는 것에 의해 단백질 치료제와 같은 생활성 화합물의 효능을 증가시키려는 약학 산업의 강한 관심이 존재한다. 이는 신장 클리어런스(renal clearance)에 의해 순환으로부터 신속하게 제거되는 생활성 화합물의 경우에 특히 사실이다. 신장은 일반적으로 60 kDa 미만의 겔보기 분자량을 갖는 분자들을 순환으로부터 여과한다. 이러한 소형 생활성 화합물의 약동학을 증가시키는 한 가지 전략은, 예컨대 WO 2007/103515호 및 WO 2008/155134호에 기재된 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 중합체 또는 당 잔기와 같은 비단백질성 중합체 부분의 부가 또는 구상 단백질 또는 비구조화된 폴리펩티드와 같은 단백질성 중합체 부분의 부가를 통하여, 단순히 이들의 겔보기 분자 크기를 증가(즉, 이들의 유체역학적 반경을 증가)시키는 것이다.
- [0003] 다른 전략은 면역글로불린 및 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질의 긴 순환 반감기를 단축하는 것이다. 67 kDa의 분자량을 갖는 혈청 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질로서, 약 50 mg/ml(0.6 mM)로 존재하며, 또 인간에서 19일의 혈청 반감기를 갖는다. 혈청 알부민은 혈장 pH를 유지하고, 콜로이드성 혈압에 기여하며, 많은 대사물질 및 지방산의 캐리어로서 작용하고, 또 혈장에서 주요 약물 수송 단백질로서 작용한다. 기재된 알부민에서 주요 소분자 결합 부위가 몇 개 존재한다.
- [0004] 혈청 알부민과 비공유 결합은 단수명 소분자 또는 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있음이 밝혀졌다(WO 1991/001743호). 혈청 알부민에 특이적으로 결합하고 또 따라서 이들에 결합된 다른 분자의 생체내 반감기를 연장할 수 있는 폴리펩티드는 세균성 알부민 결합 도메인의 변이체(예를 들어 WO 2005/097202 및 WO 2009/016043), 소형 펩티드(예를 들어 Dennis, M.S., et al., J. Biol. Chem. 277(3), 35035-43, 2002 및 WO 2001/045746) 및 면역글로불린의 단편(예를 들어 WO 2008/043822호, WO 2004/003019호; WO 2008/043821호; WO 2006/040153호; WO 2006/122787호 및 WO 2004/041865호)을 포함한다. WO 2008/043822호는 혈청 알부민에 특이적으로 결합하기 위해 생성되는 단백질 A 도메인, 텐다미스타트, 피브로넥틴, 리포칼린, CTLA-4, T-세포 수용체, 설계된 안키린 반복서열(ankyrin repeats) 및 PDZ 도메인을 기본으로 하는 분자와 같은 면역글로불린의 단편 이외의 다른 결합 단백질을 지칭한다. 그럼에도 불구하고, WO 2008/043822호는 혈청 알부민(SA)에 대한 결합 특이성을 갖는 설계된 안키린 반복 도메인의 선택을 개시하지 않을 뿐만 아니라 SA에 특이적으로 결합하는 반복 도메인의 구체적인 반복 서열 모티프(motif)를 개시하지 않는다. 또한, 폴리펩티드의 생체내 반감기는 혈청 알부민에 대한 유전자 융합에 의해 연장될 수 있음이 기재되었다(예를 들어 WO 1991/001743호). 약물의 생체내 반감기의 이러한 변형은 이들의 약동학(PK) 및/또는 약역학(PD) 특성을 긍정적으로 변형할 수 있을 것이다. 이는 새롭고 효과적인 치료제 및 질병 치료 방법의 개발에서 중요한 이슈이다. 따라서 생활성 화합물의 PK 및/또는 PD를 변형하는 새로운 방법 기술이 요청되고 있다.
- [0005] 항체 이외에, 표적 분자를 특이적으로 결합하기 위해 사용될 수 있는 신규 결합 단백질 또는 결합 도메인이 존재한다(예를 들어 Binz, H.K., Amstutz, P. and Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005). 결합 단백질 또는 결합 도메인의 이러한 신규한 1개 종류는 설계된 반복 단백질 또는 설계된 반복 도메인을 기본으로 한다(WO 2002/020565호; Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Bri and, C., Forrer, P., Grutter, M.G., and Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004; Stumpp, M.T., Binz, H.K and Amstutz, P., Drug Discov. Today 13, 695-701, 2008). WO 2002/020565호는 얼마나 큰 반복 단백질 라이브러리가 작성될 수 있는지와 이들의 일반적 적용을 기재한다. 그럼에도 불구하고, WO 2002/020565호는 SA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인의 선택이나 SA에 특이적으로 반응하는 반복 도메인의 구체적인 반복 서열 모티프를 개시하고 있지 않다. 또한, WO 2002/020565호는 SA에 대한 반응 특이성을 갖는 반복 도메인이 다른 분자의 PK 또는 PD를 조절하기 위해 사용될 수 있을 것이라는 것을 제시하지 않고 있다. 이들 설계된 반복 도메인은 반복 단백질의 모듈 성질을 한정하고 또 소망하는 반복 도메인이 도메인의 소수성 코어를 차단하는 것에 의한 응집으로부터 방지하기 위하여 N-말단 및 C-말단 캡핑(capping) 모듈을 보유한다(Forrer, P., Stumpp, M.T., Binz, H.K. and Pluckthun, A., FEBS letters 539, 2-6, 2003). 이들 캡핑 모듈은 천연 구아닌-아데닌-결합 단백질(GA-결합 단백질)의 캡핑 반복서열(capping repeats)을 기본으로 한다. 설계된 안키린 반복 도메인의 열적 및 열역학적 안정성이 GA-결합 단백질로부터 유도된 C-말단 캡핑 반복서열을 개선하는 것에 의해 더욱 증가될 수 있음이 밝혀졌다(Interlandi, G., Wetzel, S.K, Settanni, G., Pluckthun, A. and Caflisch, A., J. Mol. Biol. 375, 837-854, 2008; Kramer, M.A, Wetzel, S.K., Pluckthun, A., Mittl, P.R.E, and Grutter, M.G., J. Mol. Biol. 404, 381-391, 2010). 상기 저자들은 상기 캡핑 모듈에 총 8개의 돌연변이를 도입하였고 또 3개

의 구별되는 아미노산을 부가하는 것에 의해 그의 C-말단 헬릭스를 연장하였다. 그럼에도 불구하고, C-말단 캡핑 모듈에서 이들 변화의 도입은 이러한 돌연변이된 C-말단 캡핑 모듈을 갖는 설계된 반복 도메인의 원하지 않는 이량체화의 경향을 초래하였다. 따라서, 안키린 반복 도메인의 더욱 최적화된 C-말단 캡핑 모듈 또는 C-말단 캡핑 반복서열의 생성이 필요로 되고 있다.

- [0006] 현재 이용되는 방법을 이용하여 PK 및/또는 PD를 조절하기 위해 SA를 표적화하는 것은 언제나 효과적인 것은 아니다. SA를 하이재킹(hijacking)하는 것에 의해 분자의 PK 및/또는 PD를 조절하는 것은 복잡하고 완전히 이해되지 않는 것이 점점 분명해지고 있다.
- [0007] 전체적으로, 암 및 기타 병리학적 상태를 치료하기 위하여 치료성 관련 분자 또는 폴리펩티드의 PK 및/또는 PD를 개선할 수 있는 SA(혈청 알부민)에 대한 특이성을 갖는 개선된 결합 단백질에 대한 필요성이 존재한다.
- [0008] 본 발명의 기술적 과제는 SA에 대한 결합 특이성을 갖고 암 및 기타 병리학적 상태의 치료 개선을 위해 치료성 관련 분자의 PK 및/또는 PD(pharmacodynamic)를 조절할 수 있는 반복 도메인과 같은 신규 결합 단백질을 확인하는 것이다. 상기 기술 과제의 해결은 특허청구범위에 특징화된 실시양태를 제공하는 것에 의해 달성된다.

발명의 내용

[0009] **발명의 요약**

- [0010] 본 발명은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대하여 결합 특이성을 갖고, 또 상기 안키린 반복 도메인은 서열번호:49, 50, 51 및 52로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 안키린 반복 모듈 및 서열번호:49, 50,51 및 52 중의 9 개 이하의 아미노산이 임의 아미노산에 의해 교환되어 있는 서열을 포함한다.
- [0011] 다른 실시양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이고, 상기 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖고 또 상기 안키린 반복 도메인이 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택된 1개의 안키린 반복 도메인과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 안키린 반복 도메인의 위치 1의 G 및/또는 위치 2의 S가 경우에 따라 결실(missing)된다.
- [0012] 특히, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 결합 단백질에 관한 것이고, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 결합하기 위하여 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다.
- [0013] 또한 본 발명은 생활성 화합물을 포함하는 결합 단백질, 특히 비변형 생활성 화합물의 종말 혈장 반감기 (temrinal plasma half-life)와 비교하여 포유류에서 적어도 2배 더 높은 종말 혈장 반감기를 갖는 생활성 화합물을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명은 또한 본 발명의 결합 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 하나 이상의 상술한 결합 단백질 또는 핵산 분자를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명은 본 발명의 결합 단백질을 사용하여 병리학적 상태를 치료하는 방방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1. SEC에 의한 선택된 DARPin의 안정성 분석

크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 용출 프로파일은 40°C에서 28일간 PBS 중에서 30 mg/ml(~ 2 mM)로 배양하기 전 (도 1a), 후(도 1b)에 또는 -80°C에서 1개월간 저장한 후(도 1c) xSA에 대한 특이성을 갖는 DARPin의 실시예 이어 Superdex 200 컬럼 5/150(도 1a 또는 도 1b) 또는 Superdex 200 10/300GL(도 1c)에 의해 분석한다. 모든 샘플은 실시예 1에 기재된 바와 같이 발현되고 정제되었다. SEC 분석의 경우, 샘플은 500 μM의 농도로 희석되었다. 분자 질량 표준 아프로티닌(AP) 6.5 kDa, 탄산 무수화효소(CA) 29 kDa 및 콘알부민(CO) 75 kDa은 화살표로 표시한다.

xSA, 포유류 혈청 알부민; A, 280 nm에서 흡수율; t, 체류 시간(분);
 DARPin #19(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:19);
 DARPin #20(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:20);

DARPin #21(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:21);
 DARPin #22(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:22);
 DARPin #27(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:27);
 DARPin #28(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:28);
 DARPin #29(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:29);
 DARPin #30(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:30);
 DARPin #43(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:43);
 DARPin #44(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:44);
 DARPin #45(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:45);
 DARPin #46(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:46);
 DARPin #47(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:47);
 DARPin #48(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:48).

도 2. 선택된 DARPin의 열적 안정성.

xSA에 대한 특이성을 갖는 DARPin의 열적 변성으로부터 트레이스(traces) (pH 7.2의 PBS(도 2a) 및 pH 5.8의 MES 완충액(도 2b))(250 mM(2-N-모르폴리노)-에탄술폰산 pH 5.5)에 존재하는 염료 SYPRO 오렌지의 형광 세기의 증가에 이어), 150 mM NaCl를 pH 7.41 내지 4(v/v)의 PBS와 혼합하여 pH를 5.8로 조정하였다).

F, 상대적 형광 단위(RFU), 515-535 nm에서 여기, 515-535 nm에서 검출; T, 온도(°C); DARPin의 정의: 상기 참조.

도 3. 마우스에서 선택된 DARPins의 혈장 클리어런스(plasma clearance).

MSA(마우스 혈청 알부민) 및 대조군 DARPin에 대한 특이성을 갖는 DARPin의 혈장으로부터 클리어런스를 마우스에서 평가하였다. (도 3a) MSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin #32(하기 참조)와 대비한 MSA에 대한 결합 특이성을 갖는 1개만의 반복 도메인을 포함하는 DARPin. (도 3b) 2개의 단백질 도메인(그 중의 하나가 A에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin#32와 대비한 MSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인임)을 포함하는 DARPin.

DARPin은 ^{99m}Tc-카르보닐 화합물을 사용하여 His-태그를 통하여 라벨링되며 또 마우스에서 정맥에 주사된다. 주사된 마우스의 혈중 방사능활성(radioactivity)은 주사한 후 상이한 시점에서 측정하여 ^{99m}Tc의 방사능활성 분해에 대해 보정된 주사 투여량의 비율(%ID)로 나타내었다. 상기 피팅된 곡선은 상이한 시점에서 측정된 방사능활성의 비선형 회귀(non-linear regression)의 결과를 도시한다 - 2상 분해(그래파드 프리즘). 각 데이터 점은 그룹당 2마리 마우스의 평균을 나타낸다. % ID, ^{99m}Tc의 방사능활성 분해에 대해 보정된 % 주사된 투여량; t, 시간(hr);

DARPin #18(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:18);

DARPin #23(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:23);

DARPin #25(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:25);

DARPin #32(xSA에 대하여 결합 특이성을 갖지 않는 음성 대조군 DARPin, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:32);

DARPin #33(2개의 반복 도메인을 포함하는 DARPin, 1개는 xSA에 대한 결합 특이성을 가짐, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:33);

DARPin #35(2개의 반복 도메인을 포함하는 DARPin, 1개는 xSA에 대한 결합 특이성을 가짐, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:35);

DARPin #36(2개의 반복 도메인을 포함하는 DARPin, 1개는 xSA에 대한 결합 특이성을 가짐, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:36).

도 4. 필리핀 원숭이(cynomolgus monkeys)에서 선택된 DARPin의 혈장 클리어런스.

CSA(필리핀 원숭이 혈청 알부민)에 대한 특이성을 갖는 DARPin 및 혈장으로부터의 대조군 DARPin의 클리어런스를 필리핀 원숭이에서 평가하였다. (도 4a) DARPin #26은 CSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin #32와 비교하였다. (도 4b) DARPin #24, 34 및 17은 CSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin #32와 비교하였다. 하기 DARPin을 t = 0 시간에서 0.5 mg/ml(DARPin #26, DARPin #24, DARPin #17 및 DARPin #32) 농도로 또는 1 mg/ml(DARPin #34)의 농도로 정맥 주사하였다. 원숭이의 혈장 중의 DARPin의 농도는 주사한 후 상이한 시점에서 ELISA에 의해 측정하였다. 이 곡선은 상이한 시점에서 측정된 농도의 비선형 회귀의 결과를 도시한다 - 2상 분해(그래프드 프리즘). 제2상으로부터, DARPin의 종말 혈장 반감기를 측정할 수 있다. 각 단일 데이터 지점은 동일 혈청 샘플의 2개의 독립적인 ELISA 측정의 평균을 나타낸다.

C, DARPin 농도(nM); t, 시간(hr);

DARPin #17(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:17);

DARPin #24(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:24);

DARPin #26(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:26);

DARPin #32(xSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 음성 대조군 DARPin, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:32);

DARPin #34(2개의 반복 도메인을 포함하는 DARPin, 1개는 xSA에 대한 결합 특이성을 가짐, 그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:34).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 상세한 설명

[0018] 본 발명에 따른 결합 도메인은 포유류 혈청 알부민(xSA)에 대하여 특이적이다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 도메인은 마우스, 래트, 개, 토끼, 원숭이 또는 인간 기원의 혈청 알부민에 대하여 특이적이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 도메인은 인간 기원의 혈청 알부민(HSA)에 대하여 특이적이다.

[0019] 용어 "단백질"은 폴리펩티드를 지칭하며, 상기 폴리펩티드의 적어도 일부는 그의 폴리펩티드 사슬(들) 내에 및/또는 사이에 이차, 삼차, 또는 사차 구조를 형성하는 것에 의해 소정의 삼차원 배열을 갖거나 또는 습득할 수 있다. 단백질이 2 이상의 폴리펩티드를 포함하면, 상기 개별 폴리펩티드 사슬은 비 공유적으로 또는 공유적으로, 예를 들어 2개 폴리펩티드 사이의 디설피드 결합에 의해 결합될 수 있다. 이차 또는 삼차 구조를 형성하는 것에 의해 소정의 삼차원 배열을 갖거나 또는 습득할 수 있는 단백질의 일부를 "단백질 도메인"이라 칭한다. 이러한 단백질 도메인은 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0020] 재조합 단백질, 재조합 단백질 도메인, 재조합 결합 단백질 등에서 사용된 바와 같은 용어 "재조합"은 상기 폴리펩티드가 당업자에게 잘 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하는 것에 의해 제조될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 DNA 분자(예를 들어 유전자 합성에 의해 제조됨)는 세균성 발현 플라스미드(예를 들어 pQE30, Qiagen), 효모 발현 플라스미드 또는 포유류 발현 플라스미드에 클로닝(cloned)될 수 있다. 예컨대, 이러한 작성된 재조합 세균성 발현 플라스미드가 적절한 세균(예를 들어 대장균(*Escherichia coli*))에 삽입되면, 상기 세균은 상기 재조합 DNA에 의해 코딩된 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 상응하게 제조된 폴리펩티드를 재조합 폴리펩티드라 칭한다.

[0021] 본 발명의 내용에서, 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통하여 결합된 다수의, 즉 2 이상의 아미노산의 하나 이상의 사슬로 이루어진 분자에 관한 것이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 펩티드 결합을 통하여 결합된 8개 이상의 아미노산으로 이루어진다.

[0022] 용어 "폴리펩티드 태그"는 폴리펩티드/단백질에 부착된 아미노산 서열을 지칭하며, 상기 아미노산 서열은 상기 폴리펩티드/단백질의 정제, 검출, 또는 표적화에 유용하거나, 또는 상기 아미노산 서열은 폴리펩티드/단백질의 이화학적 거동을 향상시키거나, 또는 상기 아미노산 서열은 이펙터(effector) 기능을 보유한다. 결합 단백질의 개별 폴리펩티드 태그, 부분 및/또는 도메인은 서로 직접적으로 또는 폴리펩티드 링커를 통하여 연결될 수

있다. 이들 폴리펩티드 태그는 모두 당해 분야에 공지되어 있고 또 당업자에 의해 충분히 입수될 수 있다. 폴리펩티드 태그의 예는 소형 폴리펩티드 서열, 예컨대, His(예를 들어 서열번호:15의 His-태그), myc, FLAG, 또는 Strep-tags 또는 상기 폴리펩티드/단백질의 검출을 허용하는 효소(예컨대 효소 유사 알칼리성 포스파타제)의 부분, 또는 표적화(면역글로불린 또는 그의 단편과 같은) 및/또는 이펙터 분자에 대해 사용될 수 있는 부분이다.

[0023] 용어 "폴리펩티드 링커"는 폴리에틸렌 글리콜 또는 2개의 서열 태그와 같은 예컨대, 2개의 단백질 도메인, 폴리펩티드 태그 및 단백질 도메인, 단백질 도메인 및 비-폴리펩티드 부분을 결합할 수 있는 아미노산 서열을 지칭한다. 이러한 부가적 도메인, 태그, 비-폴리펩티드 부분 및 링커는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 그 예는 특허 출원 WO 2002/020565호의 상세한 설명에 제공되어 있다. 이러한 링커의 특별한 예는 다양한 길이의 글리신-세린-링커 및 프롤린-쓰레오닌-링커이다; 바람직하게는, 상기 링커는 2 내지 24개 아미노산 사이의 길이를 갖고; 더욱 바람직하게는, 상기 링커는 2 내지 16개 아미노산 사이의 길이를 갖는다. 글리신-세린-링커의 일례는 서열번호:16에 제공되어 있다.

[0024] 용어 "중합체 부분"은 단백질성 중합체 부분 또는 비단백질성 중합체 부분을 지칭한다. "단백질성 중합체 부분"은 바람직하게는 안정한 삼차 구조를 형성하지 않는 한편 실온(RT)의 인산 완충염수(PBS) 중에 약 0.1 mM의 농도로 1개월간 저장할 때, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 결정되는 바와 같이 10% 이하, 바람직하게는 5% 이하, 또한 바람직하게는 2% 이하, 더욱 더 바람직하게는 1% 이하; 가장 바람직하게는 검출 불가량의 올리고머 또는 응집물을 형성하는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 단백질성 중합체 부분은 구상 단백질을 SEC에 대한 분자량 표준으로 사용할 때 이들의 효과적인 분자량에 비하여 더 높은, SEC에서 겔보기 분자량에서 실시한다. 바람직하게는, SEC에 의해 측정된 상기 단백질성 중합체 부분의 겔보기 분자량은 이들의 아미노산 서열로부터 산출된 이들의 유효 분자량에 비하여 1.5x, 2x 또는 2.5x 배 더 높다. 또한 바람직하게는, SEC에 의해 측정된 상기 단백질성 중합체 부분의 겔보기 분자량은 이들의 분자 조성으로부터 산출된 유효 분자량보다 2x, 4x 또는 8x 배 더 높다. 바람직하게는, 상기 단백질성 중합체 부분의 아미노산의 50% 초과, 70% 초과 또는 90% 초과는 원편광 이색성(Circular Dichroism: CD) 측정에 의해 결정되는 바와 같이 RT에서 PBS 중의 약 0.1 mM의 농도에서 안정한 이차 구조를 형성하지 않는다. 가장 바람직하게는, 상기 비단백질성 중합체는 랜덤 코일 형태의 전형적인 근 UV CD-스펙트럼을 나타낸다. 이러한 CD 분석은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 또한 바람직한 것은 50개 이상, 바람직하게는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 개 이상 또는 가장 바람직하게는 800개 이상의 아미노산으로 이루어진 단백질성 중합체 부분이다. 단백질성 중합체 부분의 예는 XTEN®(Amunix의 등록상표; WO 2007/103515호) 폴리펩티드, 또는 WO 2008/155134호에 기재된 바와 같이 프롤린, 알라닌 및 세린 잔기를 포함하는 폴리펩티드이다. 이러한 단백질성 중합체 부분은 표준 DNA 클로닝 기술을 이용한 유전자 융합 단백질의 생성에 의해 예컨대 본 발명의 결합 도메인에 공유적으로 부착된 다음 이어 표준 발현 및 정제된다.

[0025] 본 발명의 중합체 부분은 분자량에서 다양할 수 있다(즉, 약 1 kDa 내지 약 150 kDa). 바람직하게는, 상기 중합체 부분은 적어도 2, 더욱 바람직하게는 적어도 5, 10, 20, 30, 50, 70, 또는 가장 바람직하게는 적어도 100 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직하게는, 상기 중합체 부분은 폴리펩티드 링커에 의해 결합 도메인에 연결된다.

[0026] 비단백질성 중합체 부분의 예는 히드록시에틸 녹말(HES), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌이다. 용어 "페길화(PEGylated)"는 PEG 부분이 예컨대 본 발명의 폴리펩티드에 공유적으로 부착되는 것을 의미한다.

[0027] 특정 실시양태에서, PEG 부분 또는 임의의 다른 비단백질성 중합체는 예를 들어, 말레이미드 링커를 통하여 시스테인 티올에 결합되며, 상기 시스테인은 펩티드 링커를 통하여 본 명세서에 기재된 바와 같이 결합 도메인의 N- 또는 C-말단에 결합된다.

[0028] 용어 "결합 단백질"은 이하에 상세하게 설명되는 바와 같이 하나 이상의 결합 도메인, 하나 이상의 생활성 화합물 및 하나 이상의 중합체 부분을 포함하는 단백질을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 4개 이하의 결합 도메인을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 2개 이하의 결합 도메인을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 오직 하나의 결합 도메인을 포함한다. 또한, 이러한 결합 단백질은 결합 도메인이 아닌 부가적 단백질 도메인, 다량화 부분, 폴리펩티드 태그, 폴리펩티드 링커 및/또는 단일 Cys 잔기를 포함할 수 있다. 다량화 부분의 예는 짝을 이루어 기능적 면역글로불린 Fc 도메인을 제공하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역, 및 로이신 지퍼 또는 2개의 폴리펩티드 사이에 분자간 디설피드 결합을 형성하는 자유 티올을 포함하는 폴리펩티드이다. 상기 단일 Cys 잔기는 예컨대, 당업자에게 잘 공지된 말레이미드 화학을 이용함으로써 다

른 부분을 폴리펩티드에 결합시키는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 재조합 결합 단백질이다. 또한 바람직하게는, 결합 단백질의 결합 도메인은 상이한 표적 특이성을 보유한다.

- [0029] 용어 "결합 도메인"은 단백질 스캐폴드(scaffold)로서 동일 "폴딩"(3차원 배열)을 나타내고 또 이하에 정의된 바와 같은 소정의 특성을 갖는 단백질 도메인을 의미한다. 이러한 결합 도메인은 당업자에게 공지된 수법인 이성적인, 또는 가장 흔히, 조합적 단백질 엔지니어링 수법에 의해 얻을 수 있다(Binz et al., 2005, loc. cit.). 예컨대, 소정 특성을 갖는 결합 도메인은 (a) 이하에 더욱 자세하게 정의된 단백질 스캐폴드로서 동일 폴딩을 나타내는 단백질 도메인의 다양한 콜렉션(collection)을 제공하는 단계; (b) 상기 다양한 콜렉션을 스크리닝하고 및/또는 상기 다양한 콜렉션을 선택하여 소정 특성을 갖는 적어도 하나의 단백질 도메인을 얻는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다. 상기 단백질 도메인의 다양한 콜렉션은 이용된 스크리닝 및/또는 선택 시스템에 따른 몇 개 방법에 의해 제공될 수 있고 또 파아지 디스플레이 또는 리보솜 디스플레이와 같은 당업자에게 잘 공지된 방법을 이용하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 재조합 결합 도메인이다.
- [0030] 용어 "단백질 스캐폴드"는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실이 평장이 용인가능한 노출된 표면 면적을 갖는 단백질을 의미한다. 본 발명의 결합 도메인을 생성하기 위해 사용될 수 있는 단백질 스캐폴드의 예는 단일-사슬 Fv 또는 Fab 단편과 같은 항체 또는 그의 단편, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터 얻은 단백질 A, 피에리스 브라씨카에(*Pieris brassicae*)로부터의 빌린(billin) 결합 단백질 또는 기타 리포칼린, 안키린 반복 단백질 또는 기타 반복 단백질, 및 인간 피브로넥틴이다. 단백질 스캐폴드는 당업자에게 공지되어 있다(Binz et al., 2005, loc. cit.; Binz et al., 2004, loc. cit.).
- [0031] 용어 "소정 특성"은 표적에 대한 결합, 표적의 차단, 표적-매개된 반응의 활성화, 효소 활성, 및 관련된 추가의 특성과 같은 특성을 지칭한다. 소망하는 특성의 유형에 따라서, 당업자는 소망하는 특성을 갖는 결합 도메인을 스크리닝 및/또는 선택을 실시하기 위한 포맷과 필요한 단계를 확인할 수 있을 것이다. 바람직하게는, 상기 소정 특성은 표적에 대한 결합이다.
- [0032] 이후 반복 단백질에 대한 정의는 특허출원 WO 2002/020565호에 기재된 것을 기초로 한다. 특허 출원 WO 2002/020565호는 또한 반복 단백질 특징, 수법 및 적용의 일반적 기재를 함유한다.
- [0033] 용어 "반복 단백질"은 하나 이상의 반복 도메인을 포함하는 단백질을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 반복 단백질 각각은 4개 이하의 반복 도메인을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 반복 단백질 각각은 2개 이하의 반복 도메인을 포함한다. 가장 바람직하게는, 반복 단백질 각각은 오직 하나의 반복 도메인을 포함한다. 또한, 상기 반복 단백질은 부가적인 비-반복 단백질 도메인, 폴리펩티드 태그 및/또는 폴리펩티드 링커를 포함할 수 있다.
- [0034] 용어 "반복 도메인"은 2 이상의 연속 반복 단위(모듈)를 구조 단위로 포함하는 단백질 도메인을 지칭하며, 상기 구조 단위는 동일한 폴딩을 갖고, 또 긴밀하게 스택(stack)하여 조인트 소수성 코어를 갖는 예컨대 초나선 구조를 생성한다. 바람직하게는, 반복 도메인은 N-말단 및/또는 C-말단 캡핑 단위(또는 모듈)를 더 포함한다. 더 더욱 바람직하게는, 상기 N-말단 및/또는 C-말단 캡핑 단위(또는 모듈)는 캡핑 반복서열이다.
- [0035] 용어 "설계된 반복 단백질" 및 "설계된 반복 도메인"은 특허 출원 WO 2002/020565호에 설명된 발명의 과정의 결과로서 각각 얻어지는 반복 단백질 또는 반복 도메인을 지칭한다. 설계된 반복 단백질 및 설계된 반복 도메인은 합성이고 또 천연으로부터 생긴 것이 아니다. 이들은 상응하게 설계된 핵산을 발현시켜 얻은 각각 인간이 만든 단백질 또는 도메인이다. 바람직하게는, 발현은 세균성 세포와 같은 진핵생물 또는 원핵생물 세포에서 실시되거나, 또는 무세포(cell-free) 시험관내(in vitro) 발현 계를 이용하는 것에 의해 실시된다. 따라서, 설계된 안키린 반복 단백질(즉 DARPIn)은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 본 발명의 결합 단백질에 상응한다.
- [0036] 용어 "구조 단위"는 폴리펩티드 사슬을 따라 서로 가까이 있는 2차 구조의 2 이상의 절편 사이의 3차원 상호작용에 의해 형성된 폴리펩티드의 국소적으로 정돈된 부분(locally ordered part)을 지칭한다. 이러한 구조 단위는 구조적 모티프를 나타낸다. 용어 "구조적 모티프"는 적어도 하나의 구조 단위에 존재하는 2차 구조 요소의 3차원 배열을 지칭한다. 구조적 모티프는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 구조 단위 단독은 소망하는 3차원 배열을 얻을 수 없다; 그러나, 예컨대 반복 도메인 중의 반복 모듈과 같은 이들의 연속 배열은 인접한 단위의 상호안정화를 유도하여 초나선 구조를 초래한다.
- [0037] 용어 "반복 단위"는 하나 이상의 천연 산출 반복 단백질의 반복 서열 모티프를 포함하는 아미노산을 지칭하며, 상기 "반복 단위"는 다수의 카피(copies)로 발견되며, 또 단백질의 폴딩을 결정하는 모든 상기 모티프와 공통되는 소정의 폴딩을 나타낸다. 이러한 반복 단위는 Forrer et al., 2003, loc. cit 에 의해 기재된 바와 같은 반

복 단백질의 반복 구조 단위(반복서열) 또는 Binz et al, 2004, loc. cit.에 의해 기재된 바와 같은 반복 단백질의 연속적 상동 구조 단위(반복서열)에 상응한다. 이러한 반복 단위는 프레임워크(framework) 잔기 및 상호작용 잔기를 포함한다. 이러한 반복 단위의 예는 아르마딜로(armadillo) 반복 단위, 로이신-풍부 반복 단위, 안키린 반복 단위, 테트라트리코펩티드 반복 단위, HEAT 반복 단위, 및 로이신-풍부 변이체 반복 단위이다. 2 이상의 이러한 반복 단위를 함유하는 천연 산출 단백질을 "천연 산출 반복 단백질"이라 칭한다. 반복 단백질의 개별적 반복 단위의 아미노산 서열은 서로에 비교할 때 현저한 갯수의 돌연변이, 치환, 부가 및/또는 결실을 가질 수 있는 한편, 여전히 실질적으로 상기 반복 단위의 일반적 패턴 또는 모티프를 유지할 수 있다.

[0038] 용어 "안키린 반복 단위"는 예컨대, Forrer et al., 2003, loc. cit.에 의해 기재된 바와 같이 안키린 반복서열(repeats)인 반복 단위를 의미할 것이다. 안키린 반복서열은 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0039] 용어 "프레임워크 잔기"는 폴딩 위상기하에 기여하는, 즉 반복 단위(또는 모듈)의 폴딩에 기여하는 또는 인접 단위(또는 모듈)와의 상호작용에 기여하는 반복 단위의 아미노산 잔기 또는 반복 모듈의 상응하는 아미노산 잔기에 관한 것이다. 이러한 기여는 반복 단위(또는 모듈) 중의 다른 잔기와의 상호작용, 또는 α -헬릭스 또는 β -시트에서 발견되는 것과 같은 폴리펩티드 주쇄 형태, 또는 선형 폴리펩티드 또는 루프를 형성하는 아미노산 스트레치에 영향을 준다.

[0040] 용어 "표적 상호작용 잔기"는 반복 단위의 아미노산 잔기, 또는 반복 모듈의 상응하는 아미노산 잔기를 지칭하며, 이들은 표적 물질과의 상호작용에 기여한다. 이러한 기여는 표적 물질과의 직접적 상호작용이거나, 또는 예를 들어 반복 단위(또는 모듈)의 폴리펩티드의 형태를 안정화하는 것에 의해 다른 직접적으로 작용하는 잔기 상에 대한 영향이 상기 직접작용성 잔기와 상기 표적의 상호작용을 허용하거나 또는 향상하게 한다. 이러한 프레임워크 및 표적 상호작용 잔기는 X-선 결정학, NMR 및/또는 CD 스펙트럼과 같은 이화학적 방법에 의해, 또는 구조 생물학 및/또는 생물정보학의 당업자에게 잘 공지된 관련된 구조적 정보와 대조하는 것에 의한 구조 분석에 의해 확인될 수 있다.

[0041] 바람직하게는, 반복 서열 모티프의 유도를 위해 사용된 반복 단위는 상동 반복 단위이며, 상기 반복 단위는 동일한 구조적 모티프를 포함하고 또 상기 반복 단위의 프레임워크 잔기의 70% 이상은 서로 상동이다. 바람직하게는, 상기 반복 단위의 프레임워크 잔기의 80% 이상이 상동이다. 가장 바람직하게는, 상기 반복 단위의 프레임워크 잔기의 90% 이상이 상동이다. Fasta, Blast 또는 Gap 과 같은, 폴리펩티드 사이의 상동성 %를 결정하는 컴퓨터 프로그램은 당업자에게 공지되어 있다. 또한 바람직하게는, 반복 서열 모티프의 유도를 위해 사용된 반복 단위는 예컨대 실시예 1에 기재된 바와 같은 표적 상의 선택된 반복 도메인으로부터 얻고 동일 표적 특이성을 갖는 상동 반복 단위이다.

[0042] 용어 "반복 서열 모티프"는 하나 이상의 반복 단위 또는 반복 모듈로부터 유도되는 아미노산 서열을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 반복 단위 또는 반복 모듈은 동일 표적에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인으로부터 얻는다. 이러한 반복 서열 모티프는 프레임워크 잔기 위치 및 표적 상호작용 잔기 위치를 포함한다. 상기 프레임워크 잔기 위치는 반복 단위(또는 모듈)의 프레임워크 잔기의 위치에 상응한다. 마찬가지로, 상기 표적 상호작용 잔기 위치는 반복 단위(또는 모듈)의 표적 상호작용 잔기의 위치에 상응한다. 반복 서열 모티프는 고정된 위치 및 임의위치를 포함한다. 용어 "고정된 위치"는 반복 서열 모티프 중의 아미노산 위치를 지칭하며, 상기 위치는 특정 아미노산에 설정된다. 가장 흔히, 이러한 고정된 위치는 특정 표적에 대하여 특이적인 프레임워크 잔기의 위치 및/또는 표적 상호작용 잔기의 위치에 상응한다. 용어 "임의 위치"는 반복 서열 모티프 중의 아미노산 위치를 지칭하며, 2 이상의 아미노산은 상기 아미노산 위치에서 허용되며, 예컨대 보통의 20개 천연 산출 아미노산이 허용되거나, 또는 시스테인을 제외한 아미노산, 또는 글리신, 시스테인 및 프롤린을 제외한 아미노산과 같이 20개 천연 산출 아미노산의 대부분이 허용된다. 가장 흔히, 이러한 임의의 위치는 표적 상호작용 잔기의 위치에 상응한다. 그러나, 프레임워크 잔기의 일부 위치는 임의적일 수 있다.

[0043] 용어 "폴딩 위상기하학"은 상기 반복 단위 또는 반복 모듈의 3차 구조를 지칭한다. 폴딩 위상기하학은 α -헬릭스 또는 β -시트의 적어도 일부를 형성하는 아미노산의 스트레치(stretches)에 의해, 또는 선형 폴리펩티드 또는 루프를 형성하는 아미노산 스트레치에 의해, 또는 α -헬릭스 또는 β -시트 및/또는 선형 폴리펩티드/루프의 조합에 의해 결정될 것이다.

[0044] 용어 "연속"은 반복 단위 또는 반복 모듈이 탄뎀(tandem)으로 배열된 배열을 지칭한다. 설계된 반복 단백질에는, 적어도 2개, 보통 약 2 내지 6개, 특히 적어도 약 6개, 흔히 20개 이상의 반복 단위(또는 모듈)가 존재한다. 대부분의 경우에서, 반복 도메인의 반복 단위(또는 모듈)는 고도의 서열 동일성(상응하는 위치에서 동일 아미노산 잔기) 또는 서열 유사성(아미노산 잔기가 상이하지만, 유사한 이화학적 특성을 가짐)을 나타낼

것이고 또 상기 아미노산 잔기의 일부는 강하게 보존되는 주요 잔기일 수 있다. 그러나, 반복 도메인의 상이한 반복 단위(모듈) 사이에서 아미노산 삽입 및/또는 결실, 및/또는 치환에 의한 고도의 서열 다양성도 반복 단위(또는 모듈)의 일반적 폴딩 위상기하학이 유지되는 한 가능할 수 있다.

- [0045] X-선 결정학, NMR 또는 CD 분광학과 같은 이화학적 수단에 의해 반복 단백질의 폴딩 위상기하학을 직접적으로 결정하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 반복 단위 또는 반복 서열 모티프를 확인하고 결정하는 방법 또는 반복 단위 또는 모티프와 같은 것을 포함하는 관련 단백질의 패밀리를 확인하는 상동성 확인 방법(BLAST 등)같은 방법은 생명정보학 분야에서 잘 확립되어 있고, 당업자에게 잘 공지되어 있다. 초기 반복 서열 모티프를 정제하는 단계는 반복적 공정을 포함할 수 있다.
- [0046] 용어 "반복 모듈"은 천연 산출 반복 단백질의 반복 단위로부터 원래 유래한 설계된 반복 도메인의 반복된 아미노산 서열을 지칭한다. 반복 도메인에 포함된 각 반복 모듈은 천연 산출 반복 단백질의 패밀리 또는 서브패밀리(subfamily), 예를 들어 아르마딜로 반복 단백질 또는 안키린 반복 단백질의 패밀리의 하나 이상의 반복 단위로부터 유도된다.
- [0047] "반복 모듈"은 상응하는 반복 모듈("고정된 위치")의 모든 카피에 존재하는 아미노산 잔기를 갖는 위치 및 상이한 아미노산 잔기 또는 "임의의" 아미노산 잔기를 갖는 위치("임의 위치")를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 결합 단백질은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하며, 상기 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민(xSA)에 대한 결합 특이성을 갖는다.
- [0049] 용어 "표적에 대한 결합 특이성을 갖는", "표적에 대하여 특이적으로 결합하는" 또는 "표적 특이성" 등은 결합 단백질 또는 결합 도메인이 PBS 중에서 표적에 대장균(*E. coli*) 말토오스 결합 단백질(MBP)과 같은 비관련 단백질에 비하여 더 낮은 해리 상수로 결합하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 표적에 대한 PBS 중에서의 해리상수는 MBP에 대한 상응하는 해리 상수에 비하여 적어도 10배, 더욱 바람직하게는 10^2 배, 더 더욱 바람직하게는 10^3 배, 또는 가장 바람직하게는 10^4 배 더 낮다.
- [0050] 본 발명의 결합 단백질은 항체 또는 Fab 또는 scFv 단편과 같은 그의 단편이 아니다. 항체 및 그의 단편은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0051] 또한 본 발명의 결합 도메인은 항체에 존재하는 것과 같은 면역글로불린 폴드 및/또는 피브로넥틴 유형 III 도메인을 포함하지 않는다. 면역글로불린 폴드는 2개의 β -시트에 배열된 약 7개의 항-평행 β -스트랜드의 2층 샌드위치로 이루어진 보통의 모든 β -단백질 폴드이다. 면역글로불린 폴드는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예컨대, 면역글로불린 폴드를 포함하는 이러한 결합 도메인은 WO 2007/080392호 또는 WO 2008/097497호에 기재되어 있다.
- [0052] 특히 본 발명은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이고, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖고 또 상기 안키린 반복 도메인은 서열번호:49, 50, 51 및 52로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및 서열번호:49, 50, 51 및 52 중의 9개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된 서열을 갖는 안키린 반복 모듈을 포함한다.
- [0053] 바람직하게는, 서열번호:49, 50, 51 및 52 중의 8개 이하의 아미노산이 다른 아미노산에 의해 교환되고, 더욱 바람직하게는 서열번호:49, 50, 51 및 52 중의 아미노산 중 7개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게는 6개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게는 5개 이하의 아미노산, 더 더욱 바람직하게는 4개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게는 3개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게는 2개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게는 1개 이하의 1 아미노산, 및 가장 바람직하게는 0개의 아미노산이 교환된다.
- [0054] 바람직하게는, 서열번호:49, 50, 51 및 52 중의 아미노산이 교환되면, 이들 아미노산은 A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는 A, D, E, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한 바람직하게는, 아미노산의 치환은 상동 아미노산에 의해 실시된다; 즉 아미노산은 유사한 생리학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산에 의해 교환된다. 예컨대, 음으로 하전된 아미노산 D는 음으로 하전된 아미노산 E에 의해 치환될 수 있거나, 또는 L과 같은 소수성 아미노산은 A, I 또는 V에 의해 치환될 수 있다. 상동 아미노산에 의한 치환은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0055] 바람직한 결합 단백질은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하며, 상기 반복 도메인은 PBS 중에서 10^{-4} M 미만의 해리 상수(Kd)로 xSA와 결합한다. 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 PBS 중에서 10^{-4} M 미만, 더욱 바람

직하게는 $10^{-5}M$, $10^{-6}M$, $10^{-7}M$ 미만 또는 가장 바람직하게는 $10^{-8}M$ 의 Kd로 xSA에 결합한다.

- [0056] 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance: SPR)을 기본적인 기술(예를 들어 SPR 평형 분석) 또는 아이소서멀 적정 열량측정계(isothermal titration calorimeter: ITC)와 같은 단백질-단백질 상호작용의 해리상수를 결정하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 특정 단백질-단백질 상호작용의 측정된 Kd 값은 상이한 조건(예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정된다면 다양할 수 있다. 따라서, Kd 값의 측정은 표준화된 단백질 용액 및 PBS와 같은 표준화된 완충액을 사용하여 바람직하게 실시된다.
- [0057] PBS 중에서 $10^{-4}M$ 미만의 Kd로 xSA에 결합하는 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질은 실시예에 나타내어져 있다.
- [0058] 본 발명의 결합 단백질의 안키린 반복 도메인은 xSA와 결합한다. 바람직한 것은 인간 혈청 알부민(HSA)과 결합하는 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질이다.
- [0059] 또한 바람직한 것은 70 내지 300개 아미노산, 특히 100 내지 200개 아미노산을 포함하는 결합 도메인이다.
- [0060] 더욱 바람직한 것은 자유 Cys 잔기를 갖지 않는 결합 단백질 또는 결합 도메인이다. "자유 Cys 잔기"는 디설피드 결합의 형성에 관여하지 않는다. 더욱 더 바람직한 것은 Cys 잔기를 갖지 않는 결합 단백질 또는 결합 도메인이다.
- [0061] 본 발명의 결합 도메인은 안키린 반복 도메인 또는 바람직하게는 WO 2002/020565호에 기재된 바와 같은 설계된 안키린 반복서열 도메인(Binz et al., 2004, loc. cit.)이다. 설계된 안키린 반복서열 도메인의 예는 실시예에 제시되어 있다.
- [0062] 다른 실시양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖고 또 상기 안키린 반복 도메인은 서열번호: 17 내지 31 및 서열번호: 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 안키린 반복 도메인의 위치 1 및/또는 S에 있는 G는 경우에 따라 결실(missing)된다.
- [0063] 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질 중의 이러한 안키린 반복 도메인은 서열번호: 21, 27 및 46; 바람직하게는 27 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 상술한 바와 같이, 상기 안키린 반복 도메인은 PBS 중에서 $10^{-4}M$ 미만의 해리상수(Kd)로 xSA와 결합한다. 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 PBS 중에서 $10^{-4}M$ 미만, 더욱 바람직하게는 $10^{-5}M$, $10^{-6}M$, $10^{-7}M$ 미만, 또는 가장 바람직하게는 $10^{-8}M$ 의 Kd로 xSA와 결합한다.
- [0064] 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질 중의 이러한 안키린 반복 도메인은 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인 내의 임의의 반복 단위 또는 임의의 위치와 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0065] 바람직하게는, 70% 아미노산 서열 동일성 대신, 본 발명의 결합 단백질 중의 이러한 안키린 반복 도메인은 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0066] 특정 실시양태에서, 서열번호:49, 50, 51 및 52의 안키린 반복 모듈에서 9개 아미노산의 치환에 의해 정의되거나 또는 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성에 의해 정의된 포유류 혈청 알부민에 대한 결합 특이성을 갖는 결합 단백질은, 포유류 혈청 알부민에 결합하지 않는 상응하는 결합 단백질, 예컨대 서열번호:32의 안키린 반복 도메인과 비교하여 포유류에서 적어도 5배 더 높은 종말 혈장 반감기를 갖는다. 이러한 바람직한 결합 단백질에서, 인간 중의 최소의 종말 혈장 반감기는 적어도 1일, 더욱 바람직하게는 적어도 3일, 더 더욱 바람직하게는 적어도 5일이다.
- [0067] 다른 실시양태에서, 본 발명은 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 안키린 반복 도메인은 안키린 반복 서열 모티프 $X_1DX_2X_3X_4X_5TPLHLAAX_6X_7GHLX_8IVEVLLKX_9GADVNA$ (서열번호:53)를 갖는 반복 모듈을 포함하며, 이때
- [0068] $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8$ 및 X_9 는 서로 독립적으로 A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

- [0069] 바람직하게는 X_1 은 A, D, M, F, S, I, T, N, Y 및 K로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는 K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0070] X_2 는 E, K, D, F, M, N, I 및 Y로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는 I, E 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0071] X_3 은 W, R, N, T, H, K, A 및 F로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는 W, R 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0072] X_4 는 G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0073] X_5 는 N, T 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0074] X_6 은 N, V 및 R로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0075] X_7 은 E, Y, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진; 더욱 바람직하게는 E, Y 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0076] X_8 은 E 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0077] X_9 는 S, A, Y, H 및 N로 이루어진 군, 더욱 바람직하게는 Y 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또
- [0078] 경우에 따라 서열번호:53에서 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0079] 특히, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 $X_1DX_2X_3GX_4TPLHLAAX_5X_6GHLEIVEVLLKX_7GADVNA$ (서열번호:10)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,
- [0080] X_1 은 A, D, M, F, S, I, T, N, Y, 및 K로 이루어진 군; 바람직하게는 K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0081] X_2 는 E, K, D, F, M, N, I 및 Y로 이루어진 군; 바람직하게는 I, E 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0082] X_3 은 W, R, N, T, H, K, A 및 F로 이루어진 군; 바람직하게는 W, R 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고
- [0083] X_4 는 N, T 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0084] X_5 는 N, V 및 R로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0085] X_6 은 E, Y, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진 군; 바람직하게는 E, Y 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0086] X_7 은 S, A, Y, H 및 N로 이루어진 군; 바람직하게는 Y 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또
- [0087] 경우에 따라 서열번호:10 중의 X로 표시되는 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0088] 다른 실시양태에서, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 $X_1DYFX_2HTPLHLAARX_3X_4HLX_5IVEVLLKX_6GADVNA$ (서열번호:11)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,
- [0089] X_1 은 D, K 및 A로 이루어진 군, 바람직하게는 K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;

- [0090] X₂는 D, G 및 S로 이루어진 군; 바람직하게는 G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0091] X₃은 E, N, D, H, S, A, Q, T 및 G로 이루어진 군; 바람직하게는 Q, D 및 N로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는 Q 및 N로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0092] X₄는 G 및 D로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0093] X₅는 E, K 및 G로 이루어진 군, 바람직하게는 E 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0094] X₆은 H, Y, A 및 N로 이루어진 군; 바람직하게는 H, A 및 Y로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는 A 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또
- [0095] 경우에 따라 서열번호:11 중의 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의 아미노산에 의해 교환될 수 있다.
- [0096] 다른 실시양태에서, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄X₅GHLEIVEVLLKX₆GADVNA (서열번호:54)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,
- [0097] X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군; 바람직하게는 S 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0098] X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0099] X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0100] X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0101] X₅는 N, D, Q, S, A, T 및 E로 이루어진 군; 바람직하게는 D 및 Q로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0102] X₆은 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군; 바람직하게는 A 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또
- [0103] 경우에 따라 서열번호:54에서 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0104] 특히, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 X₁DFX₂G X₃TPLHLAAX₄DGHLEIVEVLLKX₅GADVNA (서열번호:12)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,
- [0105] X₁은 F, S, L 및 K로 이루어진 군; 바람직하게는 S 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0106] X₂는 V 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0107] X₃은 R 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0108] X₄는 S 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0109] X₅는 A, H, Y, S 및 N로 이루어진 군; 바람직하게는 A 및 H로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고; 또
- [0110] 경우에 따라 서열번호:12 중의 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0111] 안키린 반복 도메인이 서열번호:12의 안키린 반복 서열 모티프를 갖는 반복 모듈을, 서열번호:11의 안키린 반복 서열 모티프를 갖는 반복 모듈 뒤에 포함하는 결합 단백질이 바람직하다.
- [0112] 다른 실시양태에서, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 X₁DX₂X₃GTTPHLAAVYGHLEX₄VEVLLKX₅GADVNA (서열번호:13)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,

- [0113] X₁은 K, A, D, M, F, S, I, T, N, 및 Y로 이루어진 군; 바람직하게는 K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0114] X₂는 E, K, D, F, M, N 및 Y로 이루어진 군; 바람직하게는 E, D 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0115] X₃은 R, N, T, H, K, A 및 F로 이루어진 군; 바람직하게는 R 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0116] X₄는 I 및 M로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0117] X₅는 H, Y, K, A 및 N로 이루어진 군; 바람직하게는 K 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
또
- [0118] 경우에 따라 서열번호:13 중의 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0119] 다른 실시양태에서, 본 발명은 안키린 반복 도메인이 안키린 반복 서열 모티프 X₁NETGYTPLHLADSSGHX₂EIVEVLLKX₃X₄X₅DX₆NA (서열번호:14)를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로,
- [0120] X₁은 Q 및 K로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0121] X₂는 L 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0122] X₃은 H, N, Y 및 A로 이루어진 군; 바람직하게는 H 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0123] X₄는 G 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며;
- [0124] X₅는 A, V, T 및 S로 이루어진 군; 바람직하게는 S 및 A로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이고;
- [0125] X₆은 V 및 F로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 잔기이며; 또
- [0126] 경우에 따라 서열번호:14 중의 X로 표시된 위치 이외에서 5개 이하의 아미노산이 임의의 아미노산에 의해 교환된다.
- [0127] 안키린 반복 도메인이 서열번호:13의 안키린 반복 서열 모티프를 갖는 반복 모듈 뒤에 서열번호: 14의 안키린 반복 서열 모티프를 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질이 바람직하다.
- [0128] 용어 "캡핑 모듈(capping module)"은 반복 도메인의 N- 또는 C-말단 반복 모듈에 융합된 폴리펩티드를 지칭하며, 상기 캡핑 모듈은 상기 반복 모듈과 긴밀한 삼차 상호작용(즉, 삼차 구조 상호작용)을 형성함으로써, 연속 반복 모듈과 접촉하지 않는 측에서 상기 반복 모듈의 소수성 코어를 용매로부터 차단하는 캡을 제공한다. 상기 N- 및/또는 C-말단 캡핑 모듈은 캡핑 단위 또는 반복 단위에 인접하는 천연 산출 반복 단백질에서 발견되는 기타 구조 단위이거나, 또는 그로부터 유도될 수 있다. 용어 "캡핑 단위"는 천연 산출 폴딩된 폴리펩티드를 지칭하며, 상기 폴리펩티드는 반복 단위에 N- 또는 C-말단적으로 융합된 특정 구조 단위를 정의하며, 상기 폴리펩티드는 상기 반복 단위와의 삼차 구조 상호작용을 형성함으로써, 상기 반복 단위의 소수성 코어를 일측에서 용매로부터 차단하는 캡을 제공한다. 바람직하게는, 캡핑 모듈 또는 캡핑 단위는 캡핑 반복서열이다. 용어 "캡핑 반복서열"은 상기 인접하는 반복 단위(또는 모듈)와 유사 또는 동일한 폴딩을 갖거나 및/또는 상기 인접하는 반복 단위(또는 모듈)와 서열 유사성을 갖는 캡핑 모듈 또는 캡핑 단위를 지칭한다. 캡핑 모듈 및 캡핑 반복서열은 WO 2002/020565호 및 Interlandi et al., 2008(loc. cit.)에 기재되어 있다. 예컨대, WO 2002/020565호는 아미노산 서열 GSDLGKLLLEAARAGQDDEVIRLMANGADVNA(서열번호:1)을 갖는 N-말단 캡핑 모듈(즉, 캡핑 반복서열) 및 아미노산 서열 QDKFGKTFADISIDNGNEDLAEILQKLN (서열번호:2)을 갖는 C-말단 캡핑 모듈(즉, 캡핑 반복서열)을 기재한다. Interlandi et al., 2008(loc. cit.)은 아미노산 서열 QDKFGKTPFDLAIREGHEDIAEVLQKAA (서열번호:3) 및 QDKFGKTPFDLAIDNGNEDIAEVLQKAA (서열번호:4)을 갖는 C-말단 캡핑 모듈을 기재한다.
- [0129] 예컨대, 서열번호:17의 N-말단 캡핑 모듈은 위치 1 내지 32 아미노산에 의해 코딩되며, 또 서열번호: 17의 C-

말단 캡핑 모듈은 위치 99 내지 126 아미노산에 의해 코딩된다.

- [0130] 바람직한 N-말단 캡핑 모듈은 서열 모티프
- [0131] $X_1LX_2KKLLEAARAGQDDEVIRILX_3AX_4GADVNA$ (서열번호:5)를 포함한다:
- [0132] 식 중에서, X_1 은 아미노산 잔기 G, A 또는 D이고;
- [0133] X_2 는 아미노산 잔기 G 또는 D이며;
- [0134] X_3 은 아미노산 잔기 L, V, I, A 또는 M; 바람직하게는, L 또는 M이고; 또
- [0135] X_4 는 아미노산 잔기 A, H, Y, K, R 또는 N; 바람직하게는, A 또는 N이다.
- [0136] N-말단 캡핑 반복서열을 포함하는 N-말단 캡핑 모듈과 같은 것이 더욱 바람직하며, 상기 캡핑 반복서열 중의 아미노산 잔기의 하나 이상은 상응하는 캡핑 단위 또는 반복 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다.
- [0137] 바람직한 C-말단 캡핑 모듈은 서열 모티프
- [0138] $X_1DKX_2GKTX_3X_4DX_5X_6X_7DX_8GX_9EDX_{10}AEX_{11}LQKAA$ (서열번호:6)를 포함한다:
- [0139] 식 중에서, X_1 은 아미노산 잔기 Q 또는 K이고;
- [0140] X_2 는 아미노산 잔기 A, S 또는 F; 바람직하게는, S 또는 F이며;
- [0141] X_3 은 아미노산 잔기 A 또는 P이고;
- [0142] X_4 는 아미노산 잔기 A 또는 F이며;
- [0143] X_5 는 아미노산 잔기 I 또는 L이고;
- [0144] X_6 는 아미노산 잔기 S 또는 A이며;
- [0145] X_7 는 아미노산 잔기 I 또는 A이고;
- [0146] X_8 은 아미노산 잔기 A, E 또는 N; 바람직하게는, A 또는 N이며;
- [0147] X_9 는 아미노산 잔기 N 또는 H이고;
- [0148] X_{10} 은 아미노산 잔기 L 또는 I이며;
- [0149] X_{11} 은 아미노산 잔기 I 또는 V이고; 또
- [0150] X_4 가 F이고, X_7 이 I 이며 또 X_8 가 N 또는 E이면, X_2 는 F가 아니다.
- [0151] 더욱 바람직한 C-말단 캡핑 모듈은 서열 모티프 $X_1DKX_2GKTX_3ADX_4X_5X_6DX_7GX_8EDX_9AEX_{10}LQKAA$ (서열번호:7) 를 포함한다:
- [0152] 식 중에서,
- [0153] X_1 은 아미노산 잔기 Q 또는 K이고;
- [0154] X_2 는 아미노산 잔기 A, S 또는 F; 바람직하게는, S 또는 F이며;
- [0155] X_3 은 아미노산 잔기 A 또는 P이고;
- [0156] X_4 는 아미노산 잔기 I 또는 L이며;
- [0157] X_5 는 아미노산 잔기 S 또는 A이고;

- [0158] X₆은 아미노산 잔기 I 또는 A이며;
- [0159] X₇은 아미노산 잔기 A, E 또는 N; 바람직하게는, A 또는 N이고;
- [0160] X₈은 아미노산 잔기 N 또는 H이며;
- [0161] X₉는 아미노산 잔기 L 또는 I이고; 또
- [0162] X₁₀은 아미노산 잔기 I 또는 V임.
- [0163] 더욱 바람직한 C-말단 캡핑 모듈은 서열 모티프
- [0164] X₁DKX₂GKTX₃ADX₄X₅ADX₆GX₇EDX₈AEX₉LQKAA (서열번호:8)를 포함한다:
- [0165] 식 중에서,
- [0166] X₁은 아미노산 잔기 Q 또는 K이고;
- [0167] X₂는 아미노산 잔기 A, S 또는 F; 바람직하게는, S 또는 F이며;
- [0168] X₃은 아미노산 잔기 A 또는 P이고;
- [0169] X₄는 아미노산 잔기 I 또는 L이며;
- [0170] X₅는 아미노산 잔기 S 또는 A이고;
- [0171] X₆는 아미노산 잔기 A, E 또는 N; 바람직하게는, A 또는 N이며;
- [0172] X₇은 아미노산 잔기 N 또는 H이고;
- [0173] X₈은 아미노산 잔기 L 또는 I이며; 또
- [0174] X₉는 아미노산 잔기 I 또는 V임.
- [0175] 바람직하게는, 서열번호:6, 7 또는 8의 서열 모티프를 포함하는 이러한 C-말단 캡핑 모듈은 상기 서열 모티프의 위치 3에 상응하는 위치에서 아미노산 잔기 A, I 또는 K; 바람직하게는, I 또는 K를 갖는다.
- [0176] 또한 바람직하게는, 서열번호:6, 7 또는 8의 서열 모티프를 포함하는 이러한 C-말단 캡핑 모듈은 상기 서열 모티프의 서열 14에 상응하는 위치에서 아미노산 잔기 R 또는 D를 갖는다.
- [0177] 바람직한 C-말단 캡핑 모듈은 아미노산 서열 QDKSGKTPADLAADAGHEDIAEVLQKAA (서열번호:9)을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이다.
- [0178] 서열번호:9의 아미노산 서열을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 더욱 바람직하고, 이때 위치 1에서의 아미노산 잔기가 Q 또는 K이고;
- [0179] 위치 4에서의 아미노산 잔기가 S 또는 F이며;
- [0180] 위치 9에서의 아미노산 잔기가 A 또는 F이고;
- [0181] 위치 13에서의 아미노산 잔기가 A 또는 I이며;
- [0182] 위치 15에서의 아미노산 잔기가 A, E 또는 N이고; 또
- [0183] 상기 C-말단 캡핑 모듈은 서열번호:2, 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0184] 서열번호:9 또는 2와 정렬시 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 더욱 바람직하다. 바람직하게는, 정렬시 서열번호: 9의 위치 4에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 S이고, 정렬시 서열번호: 9의 위치 9에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 A이며, 정렬시 서열번호: 9의 위치 13에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 A이고, 및/또는 정렬시 서열번호: 9의 위치 15에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 A이다. 또한 바람

직하게는, 정렬시 서열번호: 9의 위치 9에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 A이고 및/또는 정렬시 서열번호: 9의 위치 13에 상응하는 위치에서의 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기는 A이다. 또한 바람직하게는, 상기 C-말단 캡핑 모듈은 28개 아미노산을 포함한다.

- [0185] 서열번호:2 또는 9의 아미노산 서열을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 더욱 바람직하며, 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기의 하나 이상은 상응하는 C-말단 캡핑 반복서열 또는 캡핑 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산에 의해 교환되며 또 위치 4에서의 아미노산 잔기가 S이고; 위치 9에서의 아미노산 잔기가 A이며; 위치 13에서 아미노산 잔기가 A이고; 및/또는 위치 15에서의 아미노산 잔기가 A이다.
- [0186] 바람직하게는, 상기 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 잔기의 30% 이하가 교환되며, 더욱 바람직하게는, 20% 이하, 더 더욱 바람직하게는, 10% 이하의 아미노산 잔기가 교환된다. 또한 바람직하게는, 이러한 C-말단 캡핑 모듈은 천연 산출 C-말단 캡핑 반복서열이다.
- [0187] 서열번호:9를 기본으로 하는 상기 C-말단 모듈의 위치 1 내지 25 또는 위치 1 내지 26의 아미노산을 포함하는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0188] 아미노산 N에 이어 G를 포함하지 않는 아미노산 서열을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0189] 서열번호:9를 기본으로 하는 상기 C-말단 캡핑 모듈 또는 서열번호:9 자체와 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0190] 서열번호:2 또는 9와 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하고, 또 상기 C-말단 캡핑 모듈은 위치 9에서 아미노산 A를 갖고; 바람직하게는, 상기 C-말단 캡핑 모듈은 위치 9 및 13에서 아미노산 A를 갖고; 더욱 바람직하게는, 상기 C-말단 캡핑 모듈은 위치 9, 13 및 15에서 아미노산 A를 가지며; 및 가장 바람직하게는, 상기 C-말단 캡핑 모듈은 위치 9, 13 및 15에서 아미노산 A를 갖고 또 위치 4에서 아미노산 S를 갖는다.
- [0191] 위치 14에서 아미노산 R을 갖지 않고 및/또는 위치 15에서 아미노산 E를 갖지 않는 C-말단 캡핑 모듈과 같은 것이 더욱 바람직하다.
- [0192] 서열번호:2, 3 또는 4과 동일한 아미노산 서열을 갖지 않는 이러한 C-말단 캡핑 모듈도 또한 바람직하다.
- [0193] 서열번호:9를 기본으로 하는 아미노산 서열을 갖고, A, L, R, M, K 및 N로 이루어진 군; 더욱 바람직하게는, A, L, R 및 K로 이루어진 군; 및 가장 바람직하게는, K, A 및 L로 이루어진 군으로부터 선택된 위치 26, 27 및 28에서의 아미노산을 갖는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0194] 반복 도메인의 캡핑 모듈은 조합 수법에 의해, 예컨대 당업자에게 공지된 아미노산 서열의 정렬, 돌연변이 및 유전자 합성에 의해 본 발명의 캡핑 모듈에 의해 교환될 수 있다. 예컨대, 서열번호:17의 C-말단 캡핑 반복서열은 (i) 서열번호:9와의 서열 정렬에 의해 서열번호:17의 C-말단 캡핑 반복서열(즉 서열 위치 99 내지 126)을 결정하고, (ii) 서열번호:17의 결정된 C-말단 캡핑 반복서열의 서열을 서열번호:9의 서열로 치환하며, (iii) 교환된 C-말단 캡핑 모듈을 코딩하는 반복 도메인을 코딩하는 유전자의 생성, (iv) 상기 변형된 반복 도메인을 대장균(*E. coli*)의 세포질에서 발현하고 또 (v) 상기 변형된 반복 도메인을 표준 수단에 의해 정제하는 것에 의해 서열번호: 9의 C-말단 캡핑 반복서열에 의해 교체될 수 있다.
- [0195] 또한, 본 발명의 반복 도메인은 N-말단 캡핑 모듈(즉 서열번호:1의 N-말단 캡핑 반복서열)을 조립하고, 이어 하나 이상의 반복 모듈(즉 서열번호:17의 위치 33 내지 98로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 반복 모듈) 및 C-말단 캡핑 모듈(즉 서열번호:9의 C-말단 캡핑 반복서열)을 유전자 합성 수법에 의해 유전자적으로 작성할 수 있다. 상기 유전자적으로 조립된 반복 도메인 유전자는 상기 기재한 바와 같이 대장균(*E. coli*)에서 발현될 수 있다.
- [0196] 상기 안키린 반복 도메인 또는 설계된 안키린 반복서열 도메인이 서열번호:6, 7 또는 8의 서열 모티프와 함께 C-말단 캡핑 모듈을 포함하고, 상기 캡핑 모듈은 위치 3에서의 아미노산 I를 가지며 또 상기 반복 모듈 앞에는 서열번호:12의 안키린 반복 서열 모티프를 갖는 반복 모듈이 존재하는 결합 도메인이 또한 바람직하다.
- [0197] 아미노산 C, M 또는 N를 제외한 아미노산 서열을 갖는 결합 단백질, 반복 도메인, N-말단 캡핑 모듈 또는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0198] 아미노산 N에 이어 G를 제외한 아미노산 서열을 갖는 결합 단백질, 반복 도메인, N-말단 캡핑 모듈 또는 C-말단

캡핑 모듈이 또한 바람직하다.

- [0199] 상기 캡핑 반복서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 캡핑 단위 또는 반복 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 치환된 C-말단 캡핑 반복서열을 포함하는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 바람직하다.
- [0200] 이러한 N-말단 또는 C-말단 캡핑 모듈을 포함하는 결합 단백질이 더욱 바람직하다.
- [0201] 이러한 C-말단 캡핑 모듈의 아미노산 서열의 예는 서열번호:19, 21, 27, 28, 38, 40 및 42 중의 위치 99 내지 126의 아미노산 서열이다. 실시예 6은 반복 도메인의 열적 안정성이 그의 C-말단 캡핑 모듈을 본 발명의 캡핑 모듈에 의해 치환하는 것에 의해 증가될 수 있음을 나타낸다.
- [0202] 용어 "표적"은 핵산 분자, 폴리펩티드 또는 단백질과 같은 개별 분자, 탄수화물, 또는 이러한 개별 분자의 일부를 포함하는 기타 천연 산출 분자 또는 이러한 분자의 2 이상의 복합체를 지칭한다. 상기 표적은 전체 세포 또는 조직 샘플일 수 있거나, 또는 표적은 비천연 분자 또는 부분일 수 있다. 바람직하게는, 상기 표적은 천연 산출 또는 비천연 산출 폴리펩티드이거나 또는 예컨대 천연 또는 비천연 인산화, 아세틸화 또는 메틸화에 의해 변형된 화학적 변형을 함유하는 폴리펩티드이다. 본 발명의 특정 용도에서, 상기 표적은 xSA이다.
- [0203] 용어 "xSA"는 마우스, 래트, 토끼, 개, 돼지, 원숭이 또는 인간으로부터 얻은 혈청 알부민과 같은 포유류 혈청 알부민을 지칭한다. 용어 "MSA"는 마우스 혈청 알부민(UniProtKB/Swiss-Prot primary 수탁번호 P07724)을 지칭하고, 용어 "CSA"는 필리핀원숭이 (즉 마카카 파스시쿨라리스(*macaca fascicularis*)) 혈청 알부민(UniProtKB/Swiss-Prot primary 수탁번호 A2V9Z4)을 지칭하며 또 용어 "HSA"는 인간 혈청 알부민(UniProtKB/Swiss-Prot primary 수탁번호 P02768)을 지칭한다.
- [0204] 용어 "콘센서스(consensus) 서열"은 상기 콘센서스 서열이 다수의 반복 단위의 구조적 및/또는 서열 정렬에 의해 얻어지는 아미노산 서열을 지칭한다. 2 이상의 구조적 및/또는 서열 정렬된 반복 단위를 사용하고, 또 상기 정렬에 갭을 허용하여, 각 위치에서 가장 흔한 아미노산 잔기를 결정할 수 있다. 상기 콘센서스 서열은 각 위치에서 나타나는 가장 흔한 아미노산을 포함하는 서열이다. 2 이상의 아미노산이 단일 위치에서 평균 이상으로 나타나는 경우, 상기 콘센서스 서열은 이들 아미노산의 서브셋을 포함할 수 있다. 상기 2 이상의 반복 단위는 단일 반복 단백질에 포함된 반복 단위로부터 또는 2 이상의 상이한 반복 단백질로부터 취할 수 있다.
- [0205] 콘센서스 서열 및 이들을 결정하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0206] "콘센서스 아미노산 잔기"는 콘센서스 서열 중의 특정 위치에서 발견되는 아미노산이다. 2 이상의, 예를 들어 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 잔기가 상기 2 이상의 반복 단위 중에서 유사한 확률로 발견되는 경우, 상기 콘센서스 아미노산은 가장 흔히 발견되는 아미노산 또는 상기 2 이상의 아미노산 잔기의 조합 중의 하나일 수 있다.
- [0207] 또한 바람직한 것은 비-천연 산출 캡핑 모듈, 반복 모듈, 결합 단백질 또는 결합 도메인이다.
- [0208] 용어 "비-천연 산출"은 합성이거나 또는 천연으로부터 얻은 것이 아니라는 것을 의미하며, 더욱 자세하게는, 상기 용어는 인간의 손으로 제조된 것을 의미한다. 용어 "비-천연 산출 결합 단백질" 또는 "비-천연 산출 결합 도메인"은 상기 결합 단백질 또는 상기 결합 도메인이 합성(즉 아미노산으로부터 화학 합성에 의해 생성)이거나 또는 재조합이고 또 천연으로부터 얻은 것이 아닌 것을 의미한다. "비-천연 산출 결합 단백질" 또는 "비-천연 산출 결합 도메인"은 상응하게 설계된 핵산의 발현에 의해 얻은 인간이 제조한 단백질 또는 도메인이다. 바람직하게는, 상기 발현은 진핵생물 또는 세균성 세포 중에서 실시되거나, 또는 무세포 시험관내 발현 계를 이용하여 실시된다. 또한 상기 용어는 상기 결합 단백질 또는 상기 결합 도메인의 서열이 예컨대 GenBank, EMBL-Bank 또는 Swiss-Prot에 등록된 서열 데이터베이스 중의 비-인공 서열 엔트리로서 존재하지 않는 것을 의미한다. 이들 데이터베이스 및 다른 유사한 서열 데이터베이스는 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0209] 본 발명은 결합 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 결합 도메인은 안키린 반복 도메인이고 또 xSA에 특이적으로 반응하며 또 상기 결합 단백질 및/또는 결합 도메인은 PBS 중에서 열적 언폴딩(unfolding)시 40°C 이상의 중점 변성 온도(midpoint denaturation temperature: T_m)를 갖고 또 PBS중 37°C에서 1일간 배양될 때 10 g/L 이하의 농도로 5%(w/w) 미만의 불용성 응집물을 형성한다.
- [0210] 용어 "PBS"는 137 mM NaCl, 10 mM 포스페이트 및 2.7 mM KCl를 함유하고 pH 7.4를 갖는 포스페이트 완충 수용액을 의미한다.
- [0211] 바람직하게는, 상기 결합 단백질 및/또는 결합 도메인은 pH 7.4의 PBS 중에서 언폴딩할 때 또는 pH 5.8의 MES

완충액 중에서 언폴딩할 때 45℃ 이상, 더욱 바람직하게는 50℃ 이상, 더욱 바람직하게는 55℃ 이상, 및 가장 바람직하게는 60℃ 이상의 중점 변성 온도(Tm)를 갖는다. 본 발명의 결합 단백질 또는 결합 도메인은 생리학적 조건하에서 소정의 이차 및 삼차 구조를 보유한다. 이러한 폴리펩티드의 열적 언폴딩은 그의 삼차 및 이차 구조의 소실을 초래하며, 이는 예컨대 원편광 이색성(CD) 측정에 의해 실시될 수 있다. 열적 언폴딩시 결합 단백질 또는 결합 도메인의 중점 변성 온도는 온도를 10℃에서부터 약 100℃로 서서히 증가시키는 것에 의해 상기 단백질 또는 도메인의 열 변성시 생리학적 완충액 중에서 협동 전이의 중점에서 온도에 상응한다. 열적 언폴딩시 중점 변성 온도의 측정은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 열적 언폴딩시 결합 단백질 또는 결합 도메인의 상기 중점 변성 온도는 상기 폴리펩티드의 열적 안정성의 지표이다.

[0212] PBS 중 37℃에서 5일 이상, 바람직하게는 10일 이상, 더욱 바람직하게는 20일 이상, 더욱 바람직하게는 40일 이상, 및 가장 바람직하게는 100일 이상 배양될 때 20 g/L 이하, 바람직하게는 40 g/L 이하, 더욱 바람직하게는 60 g/L 이하, 더 더욱 바람직하게는 80 g/L 이하 및 가장 바람직하게는 100 g/L 이하의 농도에서 5%(w/w) 미만의 불용성 응집물을 형성하는 결합 단백질 및/또는 결합 도메인이 또한 바람직하다. 불용성 응집물의 형성은 가시적 침전의 출현, 겔 여과 또는 불용성 응집물의 형성시 강하게 증가하는 다이내믹 광 산란에 의해 검출될 수 있다. 불용성 응집물은 10'000 x g에서 10분간 원심분리하는 것에 의해 단백질 샘플로부터 제거될 수 있다. 바람직하게는, 결합 단백질 및/또는 결합 도메인은 PBS 중 37℃에서 상술한 배양 조건하에서 2% 미만, 더욱 바람직하게는 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1% 미만, 또는 가장 바람직하게는 0.05%(w/w) 미만의 불용성 응집물을 형성한다. 불용성 응집물의 퍼센트는 용해성 단백질로부터 불용성 응집물을 분리한 다음 용해성 및 불용성 분획 중에서 단백질 양을 표준 정량방법에 의해 측정하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0213] 100 mM 디티오트레이톨(DTT)을 함유하는 PBS 중, 37℃에서 1 또는 10시간 배양할 때 그의 천연 3차원 구조를 상실하지 않는 결합 단백질 및/또는 결합 도메인이 또한 바람직하다.

[0214] 일개의 특정 실시양태에서 본 발명은 결합 도메인이 안키린 반복 도메인이고, xSA에 특이적으로 반응하며 또 상기 정의한 바와 같은 나타내고 바람직한 중점 변성 온도 및 비응집 특성을 가지며 또 상기 결합 단백질이 xSA와 같은 혈청 단백질에 대하여 반응하지 않는 결합 도메인에 비교하여 포유류에서 적어도 5-배 더 높은 종말 혈장 반감기를 갖는 결합 단백질에 관한 것이다.

[0215] 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 xSA와 같은 혈청 단백질에 결합하지 않는 결합 도메인과 비교하여 포유류에서 적어도 10-배, 더욱 바람직하게는 적어도 20-배, 40-배, 100-배, 300-배, 또는 가장 바람직하게는 적어도 10³-배 더 높은 종말 혈장 반감기를 갖는다.

[0216] 또한 바람직하게는, xSA와 반응하지 않는 상기 결합 도메인은 10⁻⁴M 초과, 더욱 바람직하게는 10⁻³M 초과 또는 가장 바람직하게는 10⁻²M 초과인 xSA에 대한 결합력 Kd로 표시된다.

[0217] 더욱 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 반복 도메인이고 또 서열번호:32의 반복 도메인에 비하여 또는 DARPin #32, DARPin #41 또는 DARPin #42에 비하여 포유류에서 적어도 5-배, 더욱 바람직하게는 적어도 10-배, 20-배, 40-배, 100-배, 300-배, 또는 가장 바람직하게는 적어도 10³ 배 더 높은 (즉 더 긴) 종말 혈장 반감기를 갖는다.

[0218] 바람직한 결합 단백질은 인간에서 1일 초과, 더욱 바람직하게는 3, 5, 7, 10, 15일 초과 또는 가장 바람직하게는 20일 초과인 종말 혈장 반감기를 갖는 HSA에 대하여 결합 특이성을 갖는 결합 도메인을 포함한다.

[0219] 결합 도메인의 종말 혈장 반감기는 당업자에게 잘 공지된 에세이법에 의해 측정될 수 있다(Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A., J. Vet. Pharmacol. Ther. 27(5), 427-439, 2004). 종말 혈장 반감기의 측정 예는 실시예에 제시되어 있다.

[0220] 본 발명의 결합 단백질 또는 결합 도메인과 같은 약물의 "종말 혈장 반감기"는 슈도(pseudo)-평형에 도달한 후 포유류에 적용된 약물의 혈장 농도의 절반에 도달하는데 필요한 시간을 지칭한다. 상기 반감기는 포유류에 투여된 약물의 용량의 절반을 제거하는데 필요한 시간으로 정의되지 않는다.

[0221] 일개의 특정 실시양태에서 본 발명은, 안키린 반복 도메인이고, xSA에 특이적으로 결합할 수 있고 또 생활성 화합물을 포함하는 결합 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이다.

[0222] 용어 "생활성 화합물"은 질병을 갖는 포유류에 적용될 때 질병을 변형하는 화합물을 지칭한다. 생활성 화합물은 길항특성 또는 작용물질 특성을 가질 수 있고 또 단백질성 생활성 화합물 또는 비단백질성 생활성 화합물일 수

있다.

- [0223] 이러한 단백질성 생활성 화합물은 표준 DNA 클로닝 기술을 이용하여 유전자 융합 폴리펩티드를 생성하는 것에 의해 예컨대 본 발명의 결합 도메인에 공유결합적으로 부착될 수 있고, 이어 표준 발현 및 정제될 수 있다. 예컨대, DARPin #36은 인간 성장인자(즉 생활성 화합물)에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인에 이어, HSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인을 포함한다.
- [0224] 이러한 비단백질성 생활성 화합물은 화학적 수단에 의해, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 말레이미드 링커를 통하여 시스테인 티올에 커플링될 수 있고, 시스테인은 펩티드 링커를 통하여 결합 도메인의 N- 또는 C-말단에 결합되는 예컨대 본 발명의 결합 도메인에 공유결합적으로 부착될 수 있다.
- [0225] 단백질성 생활성 화합물의 예는 뚜렷한 표적 특이성(예를 들어 결합되는 것에 의해 성장인자를 중화시키는)을 갖는 결합 도메인, 사이토카인(예를 들어 인터루킨), 성장인자(예를 들어 인간 성장 호르몬), 항체 및 그의 단편, 호르몬(예를 들어 GLP-1) 및 기타 가능한 단백질성 약물을 포함한다.
- [0226] 비단백질성 생활성 화합물의 예는 독소(예를 들어 ImmunoGen으로부터의 DM1), 소 분자 표적화 GPCR, 항생물질 및 기타 가능한 비단백질성 약물을 포함한다.
- [0227] 일개의 특정 실시양태에서 본 발명은 xSA에 특이적으로 결합하는 안키린 반복 도메인을 포함하고 또 생활성 화합물을 더 포함하는 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 결합 단백질은 비변형 생활성 화합물의 종말 반감기와 비교하여 포유류에서 적어도 2배 더 높은 종말 반감기를 갖고, 상기 더 높은 종말 반감기는 상기 반복 도메인에 의해 상기 결합 단백질로 부여된다.
- [0228] 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 비변형 생활성 화합물에 비하여 포유류에서 적어도 5-배, 더욱 바람직하게는 적어도 10-배, 20-배, 40-배, 100-배, 300-배, 또는 가장 바람직하게는 적어도 10³배 더 높은 종말 혈장 반감기를 갖는다.
- [0229] 다른 바람직한 실시양태는 xSA에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 포함하는 재조합 결합 단백질로서, 상기 결합 도메인은 안키린 반복 도메인 또는 설계된 안키린 반복서열 도메인이다. 이러한 안키린 반복 도메인은 xSA에 대한 결합에 관여하는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 내부 반복 모듈을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 안키린 반복 도메인은 N-말단 캡핑 모듈, 2 내지 4개의 내부 반복 모듈, 및 C-말단 캡핑 모듈을 포함한다. 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 안키린 반복 도메인 또는 설계된 안키린 반복서열 도메인이다. 또한 바람직하게는, 상기 캡핑 모듈은 캡핑 반복서열이다.
- [0230] 특히, 본 발명은 본 명세서에서 상기 정의한 바와 같은 결합 단백질에 관한 것으로, 상기 안키린 반복 도메인은 포유류 혈청 알부민에 결합하기 위하여 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48; 바람직하게는 서열번호: 17 내지 31; 더욱 바람직하게는 서열번호:19, 21, 27 및 28, 특히 서열번호:19 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다.
- [0231] 서열번호: 17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 안키린 반복 도메인의 위치 1에서의 G 및/또는 위치 2에서의 S가 경우에 따라 상실되는 결합 단백질이 가장 바람직하다.
- [0232] 또한 바람직하게는 상기 반복 도메인은 xSA에 결합하기 위하여 DARPins #17 내지 31 및 43 내지 48로 이루어진 군으로부터 선택된 결합 단백질과 경쟁한다. 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 xSA에 결합하기 위하여 DARPin #19, 21, 27, 28, 45, 46, 47 및 48로 이루어진 군으로부터 선택된 결합 단백질과 경쟁한다. 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 xSA에 결합하기 위하여 결합 단백질 DARPin #19, 45, 46, 48 또는 27과 경쟁하고; 더 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 xSA에 결합하기 위하여 결합 단백질 DARPin #46 또는 27과 경쟁한다.
- [0233] 용어 "결합하기 위해 경쟁한다"는 것은 본 발명의 2개의 상이한 결합 도메인이 동일 표적에 대하여 동시에 결합할 수 없음을 의미하는 한편, 양쪽은 모두 동일 표적에 개별적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 따라서, 이러한 2개의 결합 도메인은 상기 표적에 결합하기 위하여 경쟁한다. 바람직하게는, 상기 2개 경쟁하는 결합 도메인은 상기 표적 상의 중복되는 또는 동일한 결합 에피토프(epitope)에 결합한다. 2개 결합 도메인이 표적에 결합하기 위하여 경쟁하는지 여부를 결정하기 위하여 경쟁 효소-결합된 면역 흡착 에세이(competition Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay: ELISA) 또는 경쟁 SPR 측정(예를 들어 바이오라드사로부터 입수한 Proteon instrument를 이용하는 것에 의해)과 같은 방법이 당업자에게 잘 공지되어 있다.

- [0234] 다른 바람직한 실시양태는 서열번호:17 내지 31의 반복 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 xSA에 대하여 결합 특이성을 갖는 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질이다. 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 서열번호:19, 21, 27 또는 28의 반복 도메인이다. 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 서열번호:19의 반복 도메인이다. 또한 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 서열번호:21의 반복 도메인이다. 또한 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 서열번호:27의 반복 도메인이다. 또한 더욱 바람직하게는, 상기 반복 도메인은 서열번호:28의 반복 도메인이다.
- [0235] 또한 바람직한 것은 xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인이 반복 도메인의 상기 군의 반복 도메인과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 결합 단백질이다. 바람직하게는, 상기 아미노산 서열 동일성은 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%이다.
- [0236] 또한 바람직한 것은 xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인이 반복 도메인의 상기 군의 반복 도메인의 반복 모듈과 적어도 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는 반복 모듈을 포함하는 결합 단백질이다. 바람직하게는, 상기 아미노산 서열 동일성은 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%일 수 있다.
- [0237] 또한 바람직한 것은 xSA에 대하여 결합 특이성을 갖는 상기 반복 도메인 2 이상을 포함하는 결합 단백질이다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 2 또는 3개의 상기 반복 도메인을 포함한다. 상기 2 이상의 반복 도메인은 동일하거나 또는 상이한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0238] 본 발명에 따른 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질의 또한 바람직한 실시양태에서, 상기 반복 도메인의 반복 모듈의 하나 이상의 아미노산 잔기는 반복 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 교환된다. 바람직하게는, 아미노산 잔기의 30% 이하가 교환되며, 더욱 바람직하게는, 20% 이하, 및 더 더욱 바람직하게는, 상기 아미노산 잔기의 10% 이하가 교환된다. 가장 바람직하게는, 이러한 반복 단위는 천연 산출 반복 단위이다.
- [0239] 본 발명에 따른 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질의 또한 바람직한 실시양태에서, 상기 반복 도메인의 N-말단 캡핑 모듈의 하나 이상의 아미노산 잔기는 N-말단 캡핑 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 교환된다. 바람직하게는, 30% 이하의 아미노산 잔기가 교환되며, 더욱 바람직하게는, 20% 이하, 더 더욱 바람직하게는, 10% 이하의 아미노산 잔기가 교환된다. 가장 바람직하게는, 이러한 N-말단 캡핑 단위는 천연 산출 N-말단 캡핑 단위이다.
- [0240] 본 발명에 따른 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질의 또한 바람직한 실시양태에서, 상기 반복 도메인의 C-말단 캡핑 모듈의 하나 이상의 아미노산 잔기는 C-말단 캡핑 단위의 정렬시 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 교환된다. 바람직하게는, 30% 이하의 아미노산 잔기가 교환되며, 더욱 바람직하게는, 20% 이하, 더 더욱 바람직하게는, 10% 이하의 아미노산 잔기가 교환된다. 가장 바람직하게는, 이러한 C-말단 캡핑 단위는 천연 산출 C-말단 캡핑 단위이다.
- [0241] 다른 특별한 실시양태에서, 30% 이하의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는, 20% 이하, 및 더 더욱 바람직하게는, 10% 이하의 아미노산 잔기는 반복 단위, N-말단 캡핑 단위 또는 C-말단 캡핑 단위의 상응하는 위치에서 발견되지 않는 아미노산에 의해 교환된다.
- [0242] 다른 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 xSA 결합 단백질 또는 도메인은 예컨대, 상이한 표적에 결합하여 이중 특이성 결합체를 생성하는 부분, 생활성 화합물, 라벨링 부분(예를 들어 플루오레세인, 또는 방사능활성 트레이서와 같은 형광 라벨), 단백질 정제(예를 들어 His- 또는 strep-태그와 같은 소 펩티드 태그)를 용이하게 하는 부분, 개선된 치료 효능을 위해 이펙터 기능을 제공하는 부분(예를 들어 항체-의존적 세포-매개된 세포독성을 제공하기 위한 항체의 Fc 부분, 슈도모나스 아에루기노사 외독소(*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A(ETA))와 같은 독성 단백질 부분 또는 메이탄시노이드(maytansinoid) 또는 DNA 알킬화제와 같은 소분자 독성제 또는 개선된 약동학을 제공하는 부분을 비롯한 하나 이상의 부가적 부분에 공유적으로 결합될 수 있다. 개선된 약동학은 인지된 치료 필요에 따라서 평가될 수 있다. 흔히 투여한 후 단백질이 혈청 중에서 유용하게 존재하는 시간을 증가시키는 것에 의해 생체이용율을 증가시키고 및/또는 투여 사이의 시간을 증가시키는 것이 바람직하다. 일부 예에서, 시간 경과에 따라 단백질의 혈청 농도의 연속성을 향상시킬 필요가 있다(예를 들어, 투여 직후의 농도와 다음 투여 직전의 농도 사이의 단백질의 혈청 농도에서 차이가 감소).
- [0243] 다른 실시양태에서, 본 발명은 특정 결합 단백질, 특정 N-말단 캡핑 모듈 또는 특정 C-말단 캡핑 모듈을 코딩

하는 핵산 분자에 관한 것이다. 또한, 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터도 고려된다.

- [0244] 또한, 하나 이상의 상술한 결합 단백질, 특히 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질, 또는 특정 결합 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및 경우에 따라 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 고려된다. 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제는 당업자에게 공지되어 있고 또 이하에 자세하게 설명된다. 또한, 하나 이상의 상술한 결합 단백질, 특히 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질을 포함하는 진단 조성물이 고려된다.
- [0245] 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 결합 단백질 및 예컨대 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]에 기재된 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 당업자에게 공지된 적합한 담체, 부형제 또는 안정화제는 생리적 염수, 링거액, 텍스트로오스 용액, 헵크 용액, 고정 오일, 에틸 올레에이트, 식염수 중의 5% 텍스트로오스, 등장성 및 화학적 안정성을 향상시키는 물질, 완충액 및 보존제이다. 다른 적합한 담체는 단백질, 다당류, 폴리락틱산, 폴리글리콜산, 중합성 아미노산 및 아미노산 공중합체와 같이, 조성물을 수용하는 개인에게 유해한 항체 생산을 유도하지 않는 담체를 포함한다. 약학적 조성물은 또한 항암제 또는 항혈관신생제와 같은 부가적 활성제를 포함하는 조합 제제(combination formulation)일 수 있다.
- [0246] 생체내 투여에 사용될 제제는 무균 또는 멸균이어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통하여 여과하는 것에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0247] 상기 약학적 조성물은 당업자의 지식 내에서 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 비경구 투여이다. 비경구 투여에서, 본 발명의 약물은 상기 정의된 바와 같은 약학적으로 허용되는 부형제와 조합되어 용액, 현탁액 또는 에멀전과 같은 단위 투여량 주사 형태로 제제화될 수 있다. 투여량 및 투여 모드는 치료될 개인 및 특정 질병에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 상기 약학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질이 1 μg /kg 내지 20 mg/kg, 더욱 바람직하게는 10 μg /kg 내지 5 mg/kg, 가장 바람직하게는 0.1 내지 2 mg/kg의 투여량이 되도록 투여된다. 바람직하게는, 상기 약학적 조성물은 볼루스(bolus) 투여량으로도 투여된다. 연속 주입도 이용될 수 있고 또 삼투압 미니펌프를 통한 연속적 피하 전달도 포함한다. 만약 그렇다면, 상기 약학적 조성물은 5 내지 20 μg /kg/분, 더욱 바람직하게는 7 내지 15 μg /kg/분 사이의 투여량으로 주입될 수 있다.
- [0248] 또한, 상술한 약학적 조성물은 질병의 치료용으로 고려된다.
- [0249] 본 발명은 또한 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 결합 단백질을 투여하는 것을 포함한다.
- [0250] 또한, 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 상술한 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 인간을 비롯한 포유류에서 병리학적 상태를 치료하는 방법도 고려된다.
- [0251] 본 발명에 따른 결합 단백질은 박테리오파지(WO 1990/002809호, WO 2007/006665호) 또는 세균성 세포(WO 1993/010214호)의 표면 상에서의 디스플레이, 리보솜 디스플레이(WO 1998/048008호), 플라즈미드 상에서의 디스플레이(WO 1993/008278호)와 같은 몇 가지 방법에 의해 또는 공유결합 RNA-반복 단백질 하이브리드 작제물(WO 2000/032823), 또는 단백질 상보성 에세이(WO 1998/341120호)에 의한 것과 같은 세포간 발현 및 선택/스크리닝을 이용하는 것에 의해 얻을 수 있거나 및/또는 더욱 발전될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0252] 본 발명에 따른 결합 단백질의 선택/스크리닝을 위해 사용된 안키린 반복 단백질의 라이브러리는 당업자에게 공지된 수순에 따라서 얻을 수 있다(WO 2002/020565호, Binz, H.K., et al., J. Mol. Biol., 332, 489-503, 2003, and Binz et al., 2004, loc. cit). xSA 특이적 DARPin의 선택을 위한 라이브러리의 이용은 실시예 1에 제공되어 있다. 유사하게, 상기에서 제공된 바와 같은 안키린 반복 서열 모티프는 xSA 특이적 DARPin의 선택 또는 스크리닝을 위해 사용될 수 있는 안키린 반복 단백질의 라이브러리를 작성하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 반복 도메인은 본 발명에 따른 반복 모듈 및 적절한 캡핑 모듈 또는 캡핑 모듈 또는 캡핑 반복서열 (Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003)로부터 표준 재조합 DNA 기술(예를 들어 WO 2002/020565호, Binz et al., 2003, loc. cit. 및 Binz et al., 2004, loc. cit)을 이용하여 모듈방식(modularly)으로 조립될 수 있다.
- [0253] 본 발명은 실시예에 기재된 특정 실시양태에 한정되지 않는다. 다른 공급원도 사용될 수 있고 또 이하에 개략적으로 기재한 방식에 따라 처리될 수 있다.

[0254] **실시예**

[0255] 이하에 기재된 모든 출발 물질 및 시약은 당업자에게 공지되어 있고 또 상업적으로 구입가능하거나, 또는 공지 수법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0256] **원료**

[0257] 화학물질은 Fluka(스위스)로부터 입수하였다. 올리고뉴클레오티드는 Microsynth(스위스)로부터 입수하였다. 특별히 다르게 언급하지 않는 한, DNA 중합효소, 제한효소 및 완충액은 뉴잉글랜드 바이오랩(USA) 또는 Fermentas(리투아니아)로부터 구입하였다. 클로닝 및 단백질 생산 균주는 대장균(E.coli) XL1-블루(스트라타진, USA) 또는 BL21(노바젠, USA)이었다. 정제된 혈청 알부민 및 상이한 종으로부터의 혈청은 예를 들어 Sigma-Aldrich(스위스) 또는 Innovative Research(USA)로부터 구입하였다. 상이한 종의 바이오티닐화된 혈청 알부민은 표준 바이오티닐화 시약 및 방법(pierce, USA)을 이용하여 정제된 혈청 알부민의 일차 아민에 바이오틴 부분을 커플링하는 것에 의해 화학적으로 얻을 수 있다.

[0258] **분자 생물학**

[0259] 특별히 다르게 언급하지 않는 한, 기재된 수순에 따라서 방법을 실시하였다(Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York).

[0260] **설계된 안키린 반복서열 단백질 라이브러리**

[0261] N2C 및 N3C 설계된 안키린 반복서열 단백질 라이브러리가 기재되어 있다(WO 2002/020565호; Binz et al. 2003, loc. cit.; Binz et al. 2004, loc. cit.). N2C 및 N3C 중의 디지털은 N-말단과 C-말단 캡핑 모듈 사이에 존재하는 임의의 반복 모듈의 갯수를 기재한다. 반복 단위 및 모듈 내부 위치를 정의하기 위해 사용된 명명법은 Binz et al. 2004, loc. cit.를 기본으로 하며, 안키린 반복 모듈 및 안키린 반복 단위의 경계가 1개 아미노산 위치만큼 이동한 변형을 갖는다. 예컨대, Binz et al. 2004(loc. cit.)의 안키린 반복 모듈의 위치 1은 본 발명의 안키린 반복 모듈의 위치 2에 상응하며 또 따라서 Binz et al. 2004, loc. cit.의 안키린 반복 모듈의 위치 33은 본 발명의 하기 안키린 반복 모듈의 위치 1에 상응한다.

[0262] 모든 DNA 서열은 서열분석에 의해 확인하였고 또 모든 기재된 단백질의 계산된 분자량은 질량 분광분석법에 의해 확인하였다.

[0263] **실시예 1: xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질의 선택**

[0264] 리보솜 디스플레이(Hanes, J. and Pluckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997)를 이용하여, xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 다수 설계된 안키린 반복 단백질(DARPin)은 Binz et al. 2004(loc. cit.)에 의해 기재된 N2C 또는 N3C DARPin 라이브러리로부터 선택하였다. 특이적(xSA; 즉 MSA, HSA 또는 CSA) 및 비특이적(MBP, 대장균 말토오스 결합 단백질) 표적에 대한 선택된 클론의 결합은 조 추출물 ELISA에 의해 평가하며, 이는 xSA 결합 단백질이 성공적으로 선택되는 것을 나타낸다. 서열번호:17 내지 31의 반복 도메인은 xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인을 포함하는 선택된 결합 단백질의 아미노산 서열을 구성한다. 선택된 결합체의 서열 분석은 특정의 선택된 결합체 패밀리에 고유한 특이적 안키린 반복 서열 모티프를 나타내었다. xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인에 존재하는 이러한 안키린 반복 서열 모티프는 서열번호:11 내지 14에 제공되어 있다.

[0265] **리보솜 디스플레이에 의한 혈청 알부민 특이적 안키린 반복 단백질의 선택**

[0266] 혈청 알부민 특이적 안키린 반복 단백질의 선택은 HSA, CSA 또는 MSA를 표적 단백질로 사용하는 리보솜 디스플레이(Hanes and Pluckthun, loc. cit.), 기재(WO 2002/020565호, Binz et al., 2003, loc. cit. and Binz et al., 2004, loc. cit)되고 또 확립된 수순(Zahnd, C., Amstutz, P. and Pluckthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007)에 의해 실시된다. 리보솜 디스플레이 선택 방법은 HSA, CSA 또는 MSA(뉴트라에비딘 또는 스트렙트에비딘 상에 고정화된 HSA 또는 MSA의 바이오티닐화된 변이체 포함) 상에서 확립된 수순(Binz et al. 2004, loc. cit.)을 이용하여 N2C 및 N3C DARPin 라이브러리에 의해 실시된다. 각 선택 이후 역전사(RT)-PCR 주기의 회수는 일정하게 40에서 30으로 감소되었고, 결합체의 농축으로 인하여 수율로 조정되었다. HSA, CSA 또는 MSA 상에서의 4회의 선택은 단일 클론의 ELISA 및 SPR 측정에 의해 드러나는 바와 같이 마이크로몰 내지 나노몰-친화성 DARPin의 수율을 얻었다. 특정 DARPins의 친화성은 당업자에게 공지된 방법에 의해 친화성 돌연변이를 이용하여 더욱 개선되었다(예를 들어 상기 기재된 바와 같이 예러나기 쉬운 PCR 및 상기 기재한 바와 같이 개선된 결합체에 대한 선택 및 스크리닝에 의해 DARPin 클론의 다양화하는 것에 의해).

[0267] **선택된 클론은 조 추출 ELISA에 의해 나타난 바와 같은 특이적으로 혈청 알부민에 결합한다**

[0268] 개별 선택된 DARPin 특이적으로 결합하는 xSA는 표준 수법을 이용하여 DARPin 발현 세포의 조 대장균 추출물을 사용한 효소결합된 면역흡착 에세이(ELISA)에 의해 확인하였다. 리보솜 디스플레이에 의해, 선택된 클론을 pQE30(Qiagen) 발현 벡터에 클로닝하고, 대장균 XL1-Blue(Stratagene)로 형질전환한 다음 1 ml 성장 배지(1% 글루코오스 및 100 µg/ml 암피실린을 함유하는 2YT)를 함유하는 96-딤-웰 플레이트(각 클론/단일 웰) 중에서 37 °C에서 철야로 성장시켰다. 50 µg/ml 암피실린을 함유하는 새로운 2YT 1 ml를 새로운 96-딤-웰 플레이트 중의 철야 배양물 100 µl에 의해 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양한 후, IPTG(1 mM 최종 농도)에 의해 발현을 유도하고 또 3시간 동안 계속하였다. 세포를 수집하고, 100 µl B-PERII(Pierce)에 재현탁하며 또 실온에서 진탕 하면서 15분간 배양하였다. 이어, 900 µl PBS-TC(0.25% 카제인 가수분해물, 0.1% Tween 20®)에 의해 보충된 PBS pH 7.4)를 부가하고 또 세포 부서러기는 원심분리에 의해 제거하였다. 100 µl의 각 용해된 클론을 xSA 또는 바이오틴 부분에 고정화된 비관련 MBP를 함유하는 뉴트라에비딘 코팅된 MaxiSorp 플레이트 웰에 적용하고 또 실온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS-T(0.1% Tween 20®)에 의해 보충된 PBS pH 7.4)에 의해 광범위하게 세척한 후, 상기 플레이트는 일차 항체로 모노클로날 항-RGS(His)₄ 항체(34650, Qiagen) 및 이차 시약으로 알칼리성 포스파타제(A3562, 시그마 제조)에 의해 콘주게이트된 폴리클로날 염소 항-마우스 항체를 사용한 표준 ELISA 과정을 이용하여 전개시켰다. 디소듐 4-니트로페닐 포스페이트(4NPP, Fluka)를 알칼리성 포스파타제에 대한 기질로 사용하는 것에 의해 결합을 검출하였다. 발색은 405 nm에서 측정하였다. 이러한 조 세포 추출물 ELISA에 의한 수백개 클론의 스크리닝은 xSA에 대한 특이성을 갖는 백개 이상의 상이한 DARPin을 나타내었다. 이들 결합 단백질은 다음 분석을 위해 선택하였다. xSA에 대하여 특이적으로 결합하는 선택된 반복 도메인의 아미노산 서열의 예는 서열번호:17 내지 31, 37 내지 40, 및 43 내지 48에 제공되어 있다.

[0269] **xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 선택된 반복 도메인으로부터 반복 서열 모티프 유도**

[0270] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 선택된 반복 도메인의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 서열분석 도구에 의해 더 분석되었다(WO 2002/020565호; Forrer et al., 2003, loc. cit.; Forrer, P., Binz, H.K., Stumpp, M.T. and Pluckthun, A., ChemBioChem, 5(2), 183-189, 2004). 그럼에도 불구하고, 천연 산출 반복 모티프를 사용하여 반복 서열 모티프를 유도하는 WO 2002/020565호와 대조적으로, 상기 반복 서열 모티프는 xSA에 대해 결합 특이성을 갖는 선택된 반복 도메인의 반복 단위로부터 유도되었다. 따라서 공통되는 반복 서열 모티프를 포함하는 선택된 반복 도메인의 패밀리가 결정되었다. xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 반복 도메인에 존재하는 이러한 반복 서열 모티프는 서열번호:11 내지 14에 제공되어 있다.

[0271] **DARPin의 고수준 및 용해성 발현**

[0272] 더욱 분석하기 위하여, 상기 기재된 바와 같은 조 세포 추출물 ELISA에서 특이적 xSA 결합을 나타내는 선택된 클론은 대장균 BL21 또는 XL1-Blue 세포 중에서 발현시키고 또 표준 수법을 이용하여 이들의 His-태그를 이용하여 정제하였다. 25 ml의 정지상 철야 배양물(LB, 1% 글루코오스, 100 mg/l의 암피실린; 37°C)을 사용하여 1 리터의 배양물(동일 배지)을 접종하였다. 600 nm에서 0.7의 흡수에서, 배양액은 0.5 mM IPTG에 의해 유도되고 또 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 상기 배양물은 원심분리하고 또 생성한 펠릿을 40 ml의 TBS500(50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8)에 재현탁하고 또 초음파처리하였다. 용균물을 재원심분리하고, 또 글리세롤(10%(v/v) 최종 농도) 및 이미다졸(20 mM 최종 농도)을 부가하여 상층액을 얻었다. 단백질을 제조자(QIAGEN, 독일)의 지시에 따라서 Ni-니트릴로트리아세트산 킬럼(2.5 ml 킬럼 부피) 상에서 정제하였다. 다르게는, 6xHis-태그를 갖지 않는 DARPin 또는 선택된 반복 도메인을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제한 다음 당업자에게 공지된 표준 수치 및 수법에 따라서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 혈청 알부민에 대하여 결합 특이성을 갖는 200 mg 이하의 고용해성 DARPin은 SDS-15% PAGE로부터 추정되는 바와 같이 순도 >95%로 대장균 배양물 1리터로부터 정제될 수 있다. 이러한 정제된 DARPin은 더욱 특징화하기 위해 사용될 수 있다.

[0273] 실시예 2: xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin의 안정성 분석 및 크기 배제 크로마토그래피

[0274] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin #19 내지 22 및 DARPin #27 내지 30은 상기 기재한 바와 같은 이들의 His-태그를 이용하여 균질에 가깝게 정제하고 PBS 중, 40°C에서 30 mg/ml(~2 mM)로 28일 동안 저장하였다(안정성 연구). 제0일(도 1a) 및 제28일(도 1b) 샘플을 취하고, 500 µM으로 희석하며 또 크기배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 분석하여 시간 경과에 따른 겔보기 분자량 및 안정성을 평가하였다(즉 이들의 응집, 다량화 또는 분해 경향).

[0275] 다른 실험에서(도 1c), xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin #19 및 43 내지 48은 상기 기재한 바와 같이 이

들의 His-태그를 이용하여 균질에 가깝게 정제하고 또 PBS 중, -80℃에서 약 100 mg/ml로 28일간 저장하고, 500 μM로 희석하며 또 특징화(즉, 이들의 응집, 다량화 또는 분해 경향)를 위하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 하였다. 분명히, 제1 분석 시리즈(이하 참조)에 비하여 더 큰 컬럼을 이용하였다.

[0276] **크기 배제 크로마토그래피(SEC)**

[0277] Superdex 200 5/150 컬럼(도 1a 및 도 1b) 또는 Superdex 200 10/300GL 컬럼(도 1c)(GE Healthcare)을 이용하여 20℃에서 HPLC 시스템(Agilent 1200 series)을 사용하여 분석적 SEC를 실시하였다. 상기 Superdex 200 5/150 컬럼은 3.0 ml의 베드 부피(*bed volume*)를 가졌고 또 1.08 ml의 보이드 부피를 가졌다(블루 텍스트란을 사용하여 실험적으로 결정됨). Superdex 200 10/300GL 컬럼은 24 ml의 베드 부피, 및 약 8 ml의 보이드 부피를 가졌다. 상기 측정은 당업자에게 공지된 표준 과정에 따라서 실시하였다. 0.2 ml/min의 유동속도 및 15 바의 최대 압력(Superdex 200 5/150) 또는 0.6 ml/min 및 18 bar의 최대 압력(Superdex 200 10/300GL)을 사용하여 PBS를 실시하였다. 단백질 샘플을 PBS에서 약 20-500 μM로 희석하고, 여과하며(0.22 μm), 또 20-100 μl의 희석 샘플을 분리용 컬럼에 주입하였다. 단백질 샘플의 용출 프로파일은 280 nm에서 흡수율을 관독하는 것에 의해 기록하였다. 6.5 kDa의 분자량을 갖는 아프로티닌(AP, 29 kDa의 분자량을 갖는 탄산 무수화효소(CA) 및 75 kDa의 분자량을 갖는 콘알부민(CO)을 표준 단백질로 사용하여 검량 곡선을 얻으며, 그로부터 샘플 단백질의 겔보기 분자량이 결정될 수 있다.

[0278] 그 결과를 도 1에 도시한다. DARPin #19-22 및 27-30은 안정성 연구의 제0일 및 제28일에서 뚜렷한 SEC 크로마토그램(즉, 뚜렷한 용출 프로파일)을 나타낸다. 따라서, 에세이 조건하에서 단량체인 모든 DARPin 용출물 및 DARPin #19-23 및 27-30은 PBS 중 40℃에서 적어도 1개월간 안정하다(즉, 이들의 용출 프로파일은 어떠한 응집, 다량화 또는 분해 경향을 나타내지 않았다).

[0279] **실시예 3: xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin의 열적 안정성**

[0280] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin의 열적 안정성은 형광계 열적 안정성 에세이(Niesen, F.H., Nature Protocols 2(9): 2212-2221, 2007)에 의해 분석하였다. 따라서, 단백질(즉 DARPin과 같은)이 언폴딩하는 온도는 단백질이 언폴딩함에 따라 노출되는 단백질의 소수성 부분에 대한 친화성을 갖는 염료(예를 들어 시프로 오렌지(SYPRO orange); 인비트로젠, 카탈로그 번호 S6650)의 형광 증가에 의해 측정된다. 그에 따라 얻어진 형광 전이 중점(낮은 형광 세기에서부터 더 높은 형광 세기 까지)에서의 온도는 분석된 단백질의 중점 변성 온도(*T_m*)에 상응한다.

[0281] **형광계 열적 안정성 에세이**

[0282] 시프로 오렌지를 형광 염료로 사용한 DARPin의 열적 변형은 실시간 PCR 도구(즉 CFX96 광학 시스템(BioRad)과 조합된 C1000 열적 사이클러(BioRad))를 이용하여 측정하였다. DARPin은 1x SYPRO Orange(5'000x SYPRO Orange 스톡 용액으로부터 희석됨, Invitrogen)를 함유하는 PBS pH 7.4 또는 MES 완충액 pH 5.8 중의 80 μM 농도로 제조하고 또 이러한 단백질 용액 또는 완충액 단독 50 μl를 백색의 96-웰 PCR-플레이트(Bio-Rad)에 부가하였다. 상기 플레이트는 Microseal 'B' Adhesive Seals(Bio-Rad)을 이용하여 밀봉하고 또 20℃에서 95℃까지 0.5℃씩 증분하고, 각 온도 증가 이후 25초의 유지 단계를 포함하는 실시간 PCR 도구에서 가열하며 또 상기 DARPin의 열적 변형은 각 온도 증가에서 샘플의 상대적 형광 단위의 측정 이후에 실시한다. 상기 플레이트의 웰에서 상대적 형광 단위는 실시간 PCR 도구(즉 여기는 515-535 nm에서 실시하였고 또 검출은 560-580 nm에서 실시하였다)의 채널 2개를 이용하여 측정하였고, 또 상기 완충액 만으로 얻은 상응하는 값을 뺐다. 분석된 DARPin에 대한 얻은 열적 변형 전이 중점, *T_m* 값이 결정될 수 있다.

[0283] PBS pH7.4 또는 MES-완충액 pH 5.8 중에서 DARPin의 열적 변형의 결과 이후 SYPRO Orange의 형광 세기의 증가는 도 2 및 도 3에 도시되어 있다. 측정된 열적 변형 전이는 분석된 xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 모든 DARPin이 40℃(pH 7.4 및 pH 5.8 양쪽 모두에서) 이상의 *T_m* 값을 가짐을 나타내었다.

[0284] **실시예 4: 표면 플라즈몬 공명 분석에 의한 xSA 에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin 의 특징화**

[0285] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin을 이들의 His-태그를 통하여 유동 세포 중에서 코팅된 α-RGS-His 항체(Qiagen, cat. no. 34650)에 고정하고, 또 인간, 필리핀 원숭이(*cyno*), 마우스, 래트, 토끼 및 개 혈청 알부민과 고정화된 DARPin의 상호작용을 분석하였다.

[0286] **표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석**

[0287] SPR은 ProteOn 도구(BioRad)를 이용하여 측정하였고 또 그 측정은 당업자에게 공지된 표준 수법에 따라 실시하

였다. 0.01% Tween 20® 항-RGS-His 항체를 함유하는 실시 완충액은 PBS, pH 7.4를 약 2000 공명 단위(RU) 수준으로 GLC 칩(BioRad) 상에 공유적으로 고정화시켰다. 항체 코팅된 칩 상의 DARPin의 고정화는 150 μ l의 1 μ M DARPin 용액을 300 s(유동 속도 = 30 μ l/분)로 주입하는 것에 의해 실시하였다. 상이한 종의 혈청 알부민과의 상호작용은 400, 200, 100, 50 nM 농도의 분명한 혈청 알부민을 함유하는 100 μ l 실시완충액(0.01% Tween®를 함유하는 PBS) 부피를 60초 이내에 주입한 다음 (온-레이트(on-rate) 측정), 10 내지 30분(유동 속도 100 μ l/min)(오프-레이트(off-rate) 측정) 동안 실시 완충액을 주입하는 것에 의해 측정하였다. 코팅되지 않은 참조 세포 및 참조 주사(즉, 실시 완충액 만을 주사)의 신호(즉, 공명 단위(RU) 값)는 혈청 알부민(이중 참조)을 주사한 후 얻어진 RU 트레이스로부터 뺐다. 온-레이트 및 오프-레이트 측정으로부터 얻은 SRP 트레이스로부터, 상응하는 DARPin 혈청 알부민 상호작용의 온- 및 오프-레이트를 결정할 수 있다.

[0288] 상기 결과는 표 1 및 표 2에 요약되어 있다. 해리 상수(Kd)는 추정된 온- 및 오프 레이트로부터 당업자에게 공지된 표준 과정을 이용하여 산출였고 또 약 3 내지 약 300 nM인 것으로 밝혀졌다. 인간 및 필리핀 원숭이 혈청 알부민은 분석된 모든 DARPin에 의해 결합하였고, 토끼, 마우스, 래트 및 개 혈청 알부민은 이들 DARPin의 서브세트에 의해서만 결합하였다.

표 1

[0289]

	Kd [nM] (인간)	Kd [nM] (cyno)	Kd [nM] (마우스)	Kd [nM] (래트)	Kd [nM] (토끼)	Kd [nM] (개)
DARPin #29	15	7	n.b.	n.b.	17	n.b.
DARPin #20	27	110	124	242	n.b.	185
DARPin #27	11	6	n.b.	n.b.	19	n.b.
DARPin #22	13	74	68	109	n.b.	81
DARPin #28	6	3	n.b.	n.b.	9	n.b.
DARPin #19	14	63	56	91	n.b.	77
DARPin #21	26	110	142	266	n.b.	180
DARPin #30	7	4	n.b.	n.b.	8	n.b.

다양한 DARPin 혈청 알부민(각 컬럼 명칭에 나타난 바와 같이 상이한 종으로부터 얻음) 상호작용에 대한 해리 상수는 SPR.(n.b. = 결합 관찰되지 않음)을 사용하는 것에 의해 측정하였다.

표 2

[0290]

	Kd [nM](인간)
DARPin #43	30
DARPin #44	39
DARPin #45	35
DARPin #46	43
DARPin #47	96
DARPin #48	68

다양한 DARPin 인간 혈청 알부민 상호작용에 대한 해리 상수는 SPR을 이용하는 것에 의해 측정하였다.

[0291] 실시예 5: xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin의 종말 혈장 반감기

[0292] 마우스 및 필리핀 원숭이(*Macaca fascicularis*, "cyno"라고 약칭)에서 DARPin의 종말 혈장 반감기는 당업자에게 공지된 표준 과정(Toutain, et al., loc. cit.)에 따라서 결정하였다. 특정 양의 DARPin을 포유동물에 정맥 주사하고 또 혈장으로부터 DARPin 제거율은 그의 혈장 농도에 따라 시간 경과에 따라 실시하였다. DARPin 농도는 초기에는 슈도-평형에 도달할 때까지(알파 기) 감소한 다음 혈장 중의 DARPin 농도가 지수적으로 감소(베타-상)한다. 상기 베타 상으로부터, DARPin 종말 혈장 반감기가 산출될 수 있다.

[0293] 마우스에서 DARPin 혈장 클리어런스의 측정

[0294] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin의 혈장 클리어런스를 평가하기 위하여, 시험 단백질을 방사능라벨링하고 또 천연 Balb/c 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 다음 DARPin을 주사하였다: DARPin #19, DARPin #21,

DARPin #23, DARPin #25, DARPin #18, DARPin #32, DARPin #35, DARPin #36, DARPin #33, DARPin #34, DARPin #37, DARPin #38, DARPin #43, DARPin#44, DARPin#45, DARPin#46, DARPin#47 및 DARPin#48. DARPin은 ^{99m}Tc-카르보닐 복합체를 사용하여 앞서 기재한 바와 같이 방사능라벨링시켰다(Waibel, R., et al., Nature Biotechnol. 17(9), 897-901, 1999). PBS(pH 7.4)에 400 μM로 희석하기 1시간 전에 DARPin(40 μg)을 ^{99m}Tc-카르보닐(0.8-1.6 m Ci)과 함께 배양하였다. 각 마우스에는 라벨링된 DARPin 용액(10 μg 단백질 및 0.2 - 0.4 m Ci에 상응함) 100 μl를 정맥 주사하였다. 상기 마우스의 혈액 샘플은 초기 주사 후 1시간, 4시간, 24시간, 및 48시간에서 수집하고 또 상기 샘플의 방사능활성을 측정하였다. 특정 시점에서 측정된 방사능활성의 정도는 그 시점에서 혈장 중에 존재하는 DARPin 양의 직접적 측정이다. % 주사 투여량은 ^{99m}Tc의 방사능활성 분해에 대해 보정된 주사된 샘플의 전체 방사능활성에 대한 특정 시점에서 측정된 마우스(18 g 마우스에 대한 1.6 ml)의 전혈의 전체 방사능활성의 백분율이다.

[0295] MSA에 대하여 결합 특이성을 갖는 DARPin은 xSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin #32와 비교하면 마우스에서 강하게 증가된 종말 혈장 반감기를 갖는다(도 4). DARPin#19, DARPin#21, DARPin#23, DARPin#33, DARPin #37, DARPin #43, DARPin#44, DARPin#45, DARPin#46, DARPin#47 및 DARPin#48은 마우스에서 약 2- 2.5일의 종말 혈장 반감기를 가졌다.

[0296] 필리핀 원숭이에서 DARPin 혈장 클리어런스의 측정

[0297] PBS에 의해 희석된 DARPin을 필리핀 원숭이의 머리 정맥에 볼루스(bolus) 주사하였다. 다음 DARPin을 주사하였다: DARPin #26(0.5 mg/kg), DARPin #24(0.5 mg/kg), DARPin #17(0.5 mg/kg), DARPin #34(1 mg/kg), 및 DARPin #32(0.5 mg/kg). 주사한 후 상이한 시점에서, 동물의 대퇴부 정맥으로부터 수집한 혈액으로부터 혈장을 생성하였다. 혈장 샘플 중에서 DARPin의 농도는 당업자에게 공지된 표준 수순 및 공지된 DARPin 농도에 의한 적절한 DARPin 표준 곡선을 이용하여 샌드위치 ELISA법에 의해 결정하였다.

[0298] 필리핀 원숭이의 혈장 샘플을 항-DARPin 특이적 토끼 모노클로날 항체에 의해 코팅된 MaxiSorp ELISA 플레이트 상에서 PBS-C(0.25% 카제인을 함유하는 PBS, pH 7.4)에 연속적으로 희석하였다. PBS-T(0.1% Tween 20®이 보충된 PBS, pH 7.4)에 의해 광범위하게 세척한 후, 상기 플레이트는 꽃양배추 피옥시다제 HRP(Qiagen)에 의해 라벨링된 모노클로날 항-RGS(His)4 항체를 사용하여 전개하였다. BM-Blue POD 기질(Roche Diagnostics)을 사용하는 것에 의해 결합을 검출하였다. 반응은 50 μl의 1M H₂SO₄를 부가하는 것에 의해 중지되었고 또 450 nm에서 흡수율(및 620 nm에서 흡수율을 빼기)을 측정하였다. 혈장 샘플 중의 DARPin 농도는 원숭이 혈청(GraphPad Prism)에 희석된 DARPin의 표준 곡선 상에서 단일지수 회귀(mono-exponential regression)를 실시하는 것에 의해 산출하였다. DARPin의 혈장 종말 반감기는 주사 한지 240 시간 까지 결정된 농도 값 상에 비-선형 회귀(2상 분해)를 실시하는 것에 의해 산출하였다. 제2 (베타) 상의 반감기는 종말 혈장 반감기에 상응한다.

[0299] xSA에 대한 결합 특이성을 갖는 DARPin은 xSA에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 DARPin #32에 비하여 필리핀 원숭이에서 증가된 종말 혈장 반감기를 가졌다(도 5, 표 3). DARPin#19, DARPin#21, DARPin #43, DARPin#44, DARPin#45, DARPin#46, DARPin#47 및 DARPin#48은 필리핀 원숭이에서 약 10 내지 15일의 종말 혈장 반감기를 가졌다.

표 3

[0300] **표 3:** 필리핀 원숭이(cyno)에서 DARPin의 종말 혈장 반감기의 평가

	t _{1/2} [h]
DARPin #32	0.2
DARPin #26	129
DARPin #34	111
DARPin #17	40
DARPin #24	126
DARPin #19	288
DARPin #21	384
DARPin #28	144
약동학 변수 추정값 t _{1/2} : 종말 혈장 반감기	

[0301] 실시예 6: 개선된 C-말단 캡핑 모듈을 갖는 DARPin의 더 높은 열적 안정성

[0302] DARPin의 열적 안정성은 실시예 3에 기재된 바와 같은 형광계 열적 안정성 에세이에 의해 분석하였다. 다르게는, DARPin의 열적 안정성은 CD 분광측정기에 의해, 즉 당업자에게 잘 공지되어 있는 222 nm에서 원편광 이색성(CD) 신호를 따르는 것에 의한 열 변성 측정에 의해 분석하였다. 샘플의 CD 신호는 PBS pH 7.4 중의 0.02 mM 농도의 단백질을 1°C/분의 온도 램프를 이용하여 20°C에서 95°C까지 서서히 가열하는 동안 Jasco J-715 도구 (Jasco, Japan)로 222 nm에서 기록하였다. 이는 언폴딩시 222 nm에서 CD 신호에서 강한 변화를 나타내는 알파 헬릭스로 주로 이루어지기 때문에 DARPin의 변성을 실시하기에 효과적인 수단이다. DARPin에 대한 측정된 CD 신호 트레이스의 관찰된 전이의 증점은 그의 T_m 값에 상응한다.

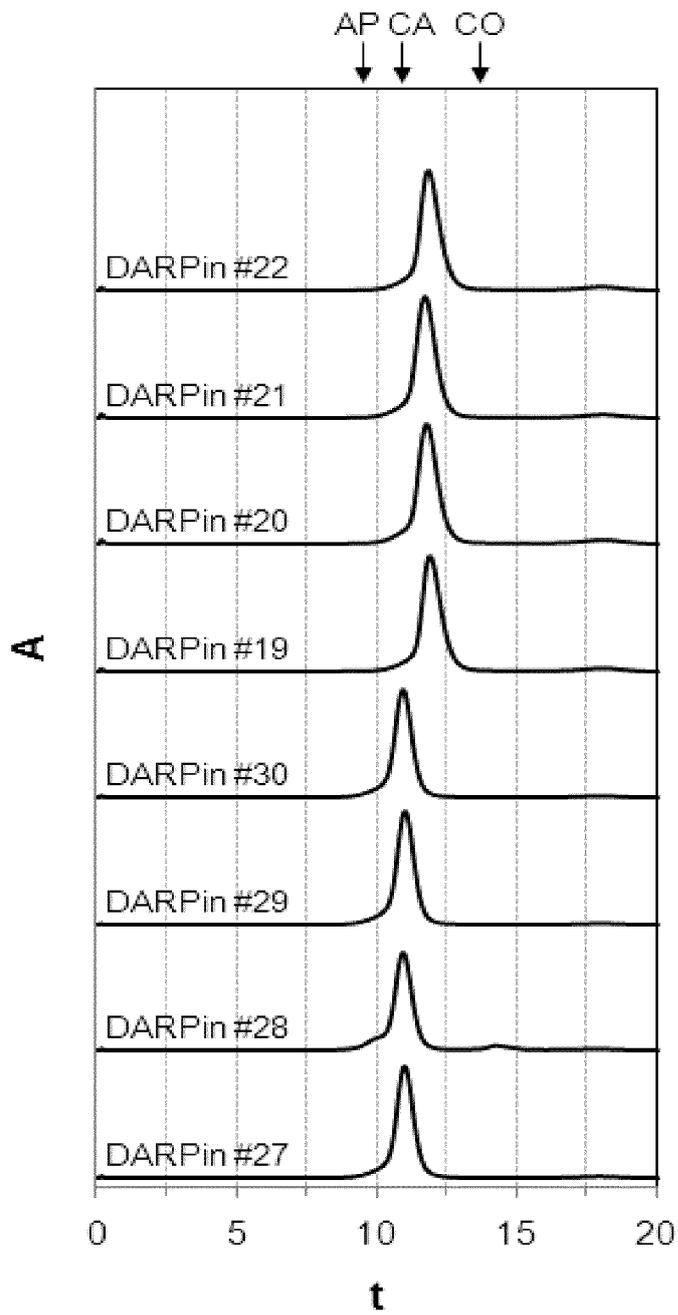
[0303] DARPin #37(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호:37)의 열적 안정성은 형광계 열적 안정성 에세이를 이용하여 DARPin #38(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호: 38)의 열적 안정성과 비교하였다. 이들 2개 DARPin은 이들의 반복 도메인의 C-말단 캡핑 모듈을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 보유한다. DARPin #37이 아닌 DARPin #38의 반복 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같이 개선된 C-캡핑 모듈을 포함한다. DARPin #37 및 DARPin #38에 대해 측정된 PBS pH 7.4에서 T_m 값은 각각 약 63°C 및 약 73°C이었다. DARPin #37 및 DARPin #38에 대해 측정된 MES 완충액 pH 5.8에서의 T_m 값은 각각 약 54.5°C 및 약 66°C이었다.

[0304] DARPin #39(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호: 39)의 열적 안정성은 형광계 열적 안정성 에세이를 이용하여 DARPin #40(그의 N-말단에 융합된 His-태그(서열번호:15)를 갖는 서열번호: 40)의 열적 안정성과 비교하였다. 이들 2개의 DARPin은 이들의 반복 도메인의 C-말단 캡핑 모듈을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 보유한다. DARPin #39가 아닌 DARPin #40의 반복 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같이 개선된 C-캡핑 모듈을 포함한다. DARPin #39 및 DARPin #40에 대해 측정된 MES 완충액 pH 5.8에서의 T_m 값은 각각 약 51°C 및 약 55°C이었다.

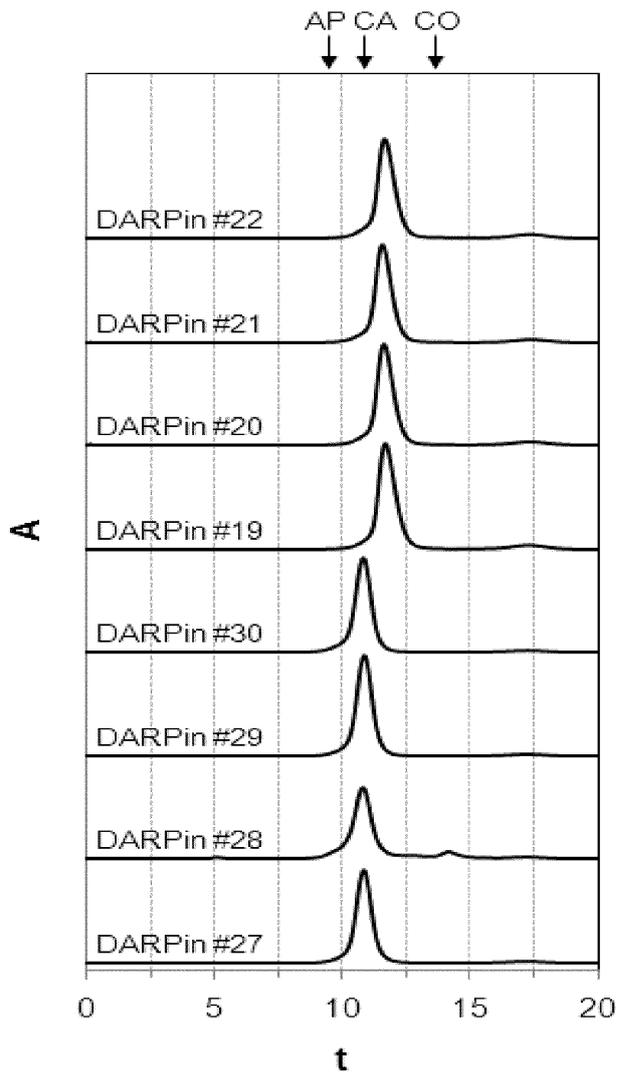
[0305] DARPin #41(서열번호:41)의 열적 안정성은 CD 분광학을 이용하여 DARPin #42(서열번호:42)의 열적 안정성과 비교하였다. 이들 2개의 DARPin은 그의 반복 도메인의 C-말단 캡핑 모듈을 제외하고는 동일한 아미노산 서열을 보유한다. DARPin #41이 아닌 DARPin #42의 반복 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같이 개선된 C-캡핑 모듈을 포함한다. DARPin #41 및 DARPin #42에 대해 측정된 PBS pH 7.4에서의 T_m 값은 각각 약 59.5°C 및 약 73°C이었다.

도면

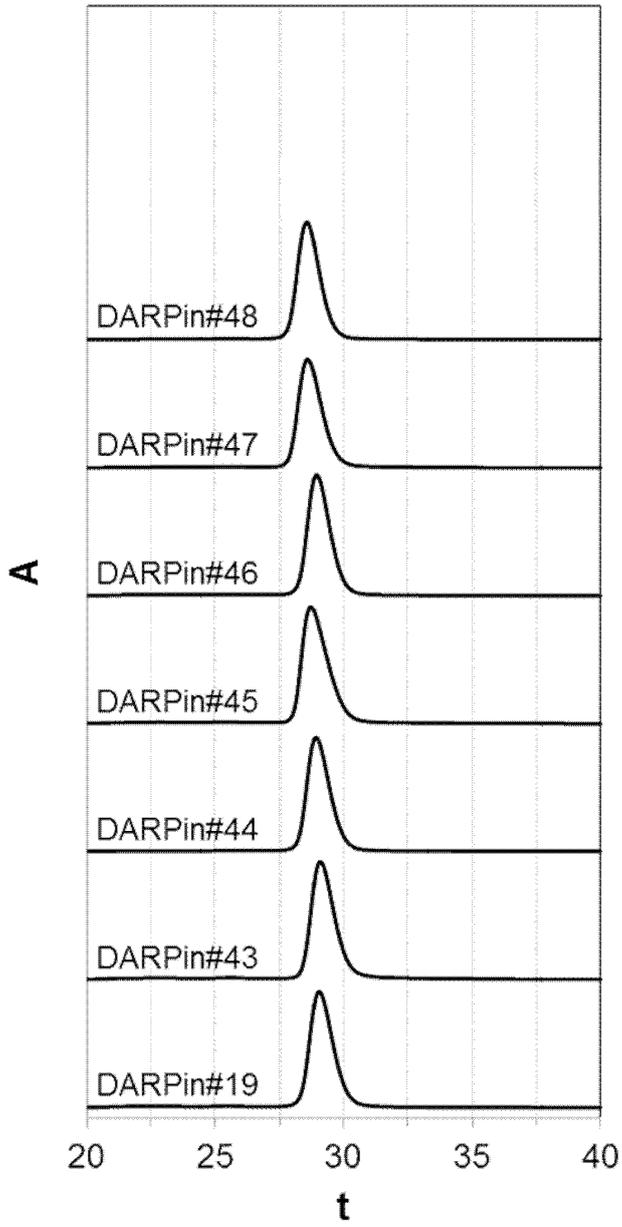
도면1a



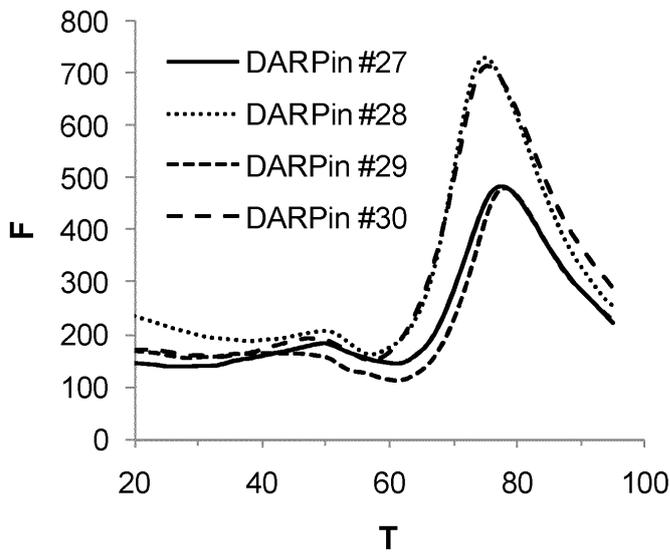
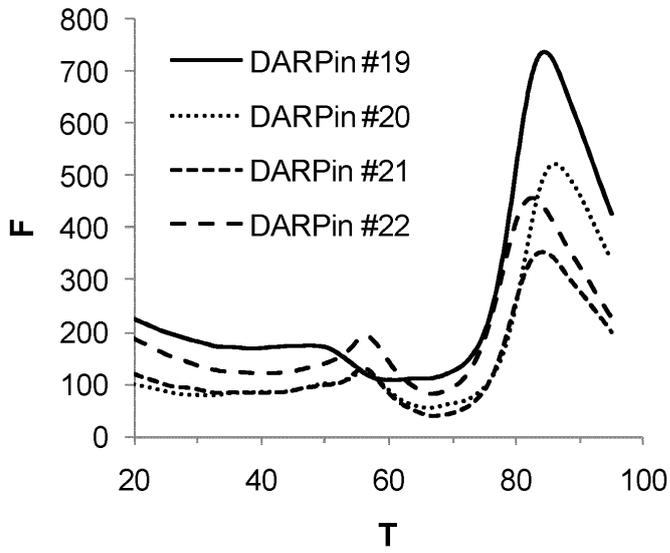
도면1b



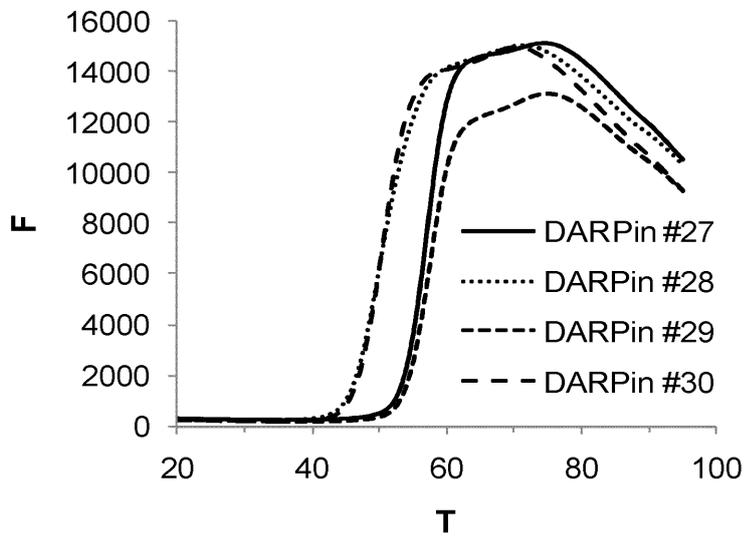
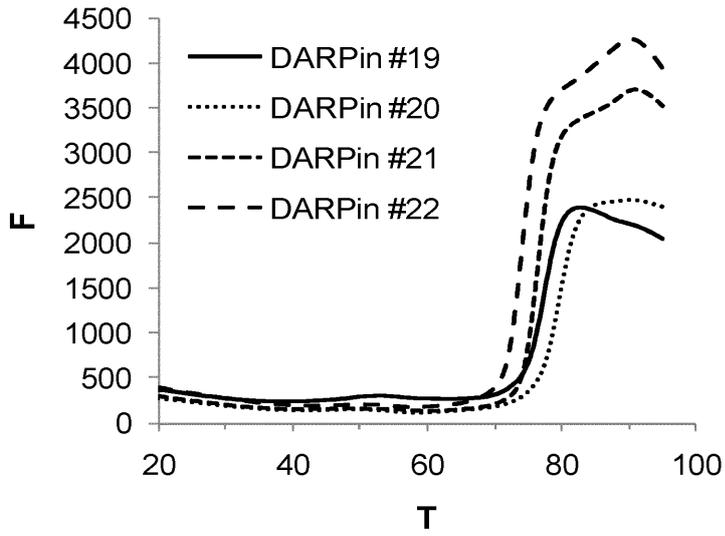
도면1c



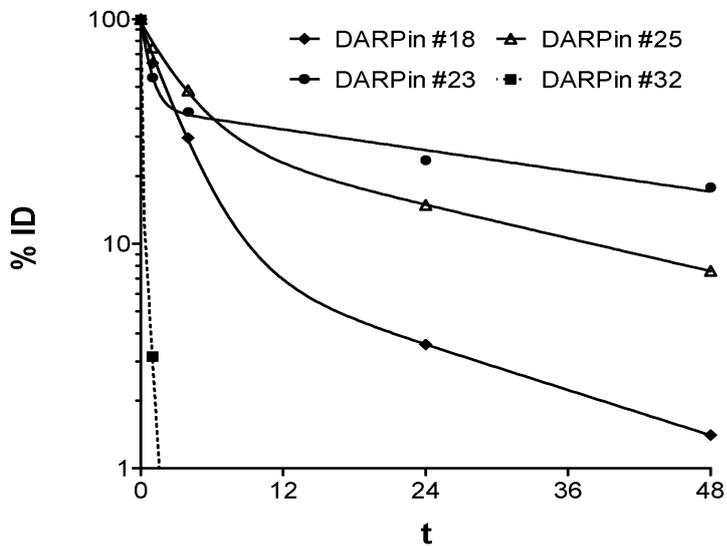
도면2a



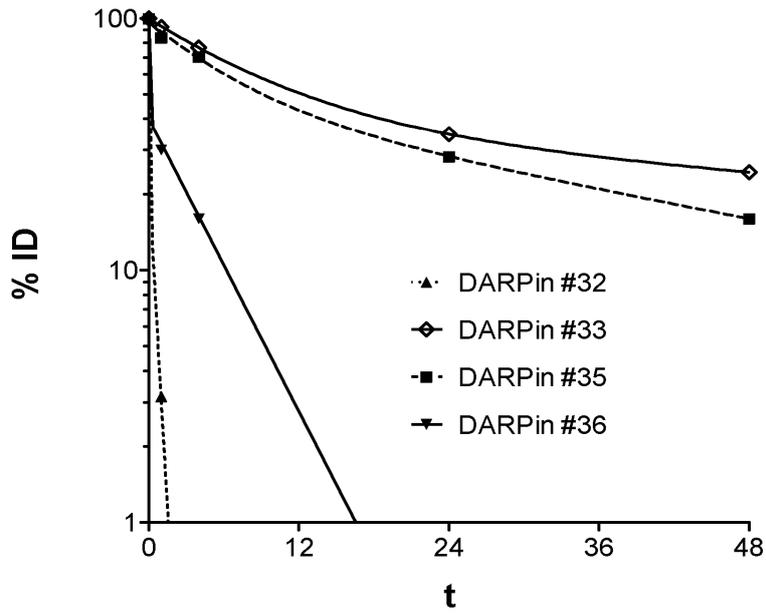
도면2b



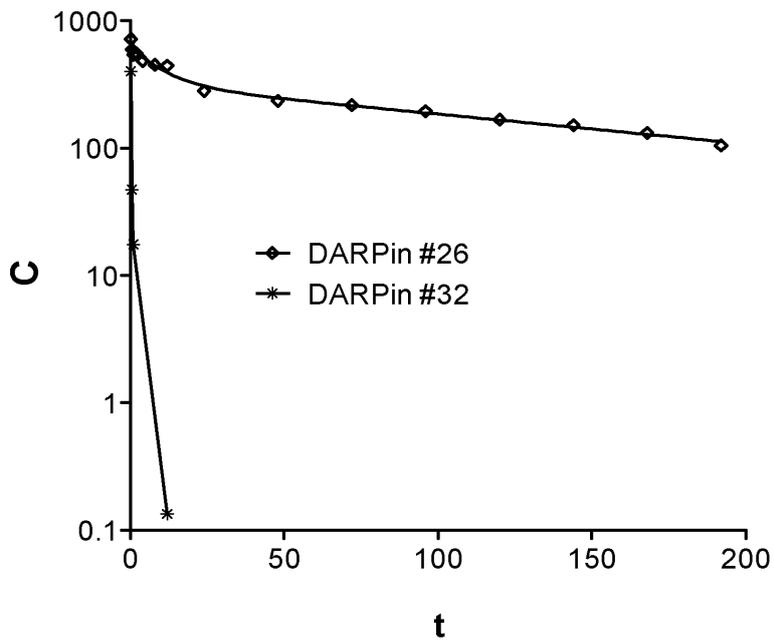
도면3a



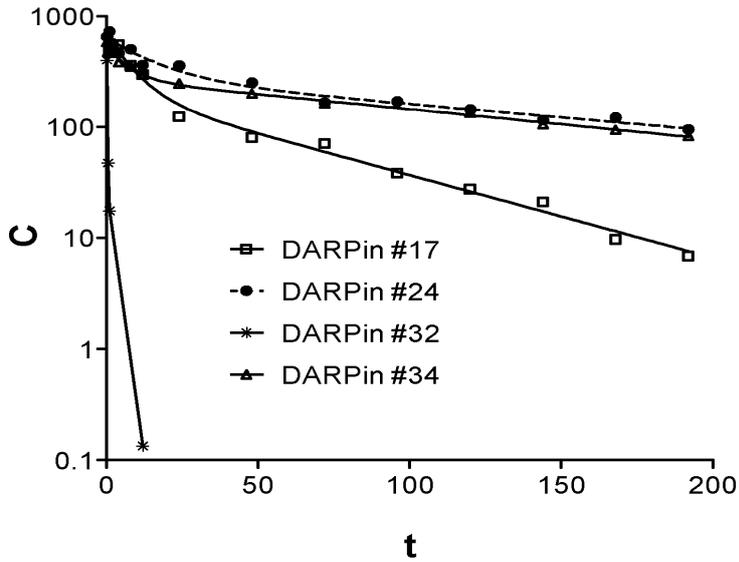
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Molecular Partners AG
- Steiner, Daniel
- Binz, Hans Kaspar
- Gulotti-Georgieva, Maya
- Merz, Frieder W.
- Phillips, Douglas
- Sonderegger, Ivo

- <120> Designed repeat proteins binding to serum albumin
- <130> P393A
- <150> EP10192711.9
- <151> 2010-11-26
- <160> 54
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 32
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly
 1 5 10 15
 Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Pro Phe Asp Leu Ala Ile Arg Glu Gly
 1 5 10 15
 His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
 20 25

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

Xaa Leu Xaa Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp

1 5 10 15

Glu Val Arg Ile Leu Xaa Ala Xaa Gly Ala Asp Val Asn Ala

20 25 30

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 6
 Xaa Asp Lys Xaa Gly Lys Thr Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Gly
 1 5 10 15
 Xaa Glu Asp Xaa Ala Glu Xaa Leu Gln Lys Ala Ala
 20 25

<210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

Xaa Asp Lys Xaa Gly Lys Thr Xaa Ala Asp Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Gly

1 5 10 15

Xaa Glu Asp Xaa Ala Glu Xaa Leu Gln Lys Ala Ala

20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

 <222> (11)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 8

Xaa Asp Lys Xaa Gly Lys Thr Xaa Ala Asp Xaa Xaa Ala Asp Xaa Gly

1 5 10 15

Xaa Glu Asp Xaa Ala Glu Xaa Leu Gln Lys Ala Ala

20 25

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Ala Gly

1 5 10 15

His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala

 20 25

<

210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 10

Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly

1 5 10 15

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn

 20 25 30

Ala

<210> 11

<211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223>
 > Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 11
 Xaa Asp Tyr Phe Xaa His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Xaa Xaa

1	5	10	15
His	Leu	Xaa	Ile
Val	Glu	Val	Leu
Leu	Lys	Xaa	Gly
Ala	Asp	Val	Asn
	20	25	30
Ala			

<210> 12
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 12

Xaa Asp Phe Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Asp Gly
 1 5 10 15
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 Ala

<210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(20)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222>

> (27)..(27)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 13

Xaa Asp Xaa Xaa Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly

1 5 10 15

His Leu Glu Xaa Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn

 20 25 30

Ala

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(29)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 14

Xaa Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser Gly

1 5 10 15

His Xaa Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Asn

20 25 30

Ala

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 15

Met Arg Gly Ser His His His His His His
 1 5 10

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 17

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Ala Asp Tyr Phe Gly His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asp Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

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

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 19

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 20

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125
 <210> 21
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 21
 Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 22

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

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

1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala

20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly

35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn

50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val

85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp

100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 23

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

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

1 5 10 15

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

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 24

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

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

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

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

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Ala Phe Glu Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

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

 100 105 110
 Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

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

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 28

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala

20 25 30

Lys Asp Glu Arg Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly
 35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Ser Ala Asp Val

85 90 95

Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 29

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Glu Arg Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly
 35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Glu Arg Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly
 35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Ser Ala Asp Val

85 90 95

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

100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 31

<211> 157

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

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

1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala

20 25 30

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

35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn

50 55 60

Ala Leu Asp His Trp Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Met Trp

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val

85 90 95

Asn Ala Leu Asp Asn Asn Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Gly Tyr Gly

100 105 110

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn

115 120 125

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

130 135 140
 Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 145 150 155
 <210> 32
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 32
 Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala

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

 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110
 Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125
 <210> 33
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 33
 Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln

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

 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

 Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly
 145 150 155 160
 Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn
 165 170 175
 Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Glu
 180 185 190
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 195 200 205

 Asn Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg
 210 215 220
 Glu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp
 225 230 235 240
 Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
 245 250 255

Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 260 265 270

<210> 34

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Ala Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn

50 55 60

Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly
 145 150 155 160

Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn
 165 170 175

Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Glu

115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly
 145 150 155 160

Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn
 165 170 175

Ala Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn
 180 185 190

Gly His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 195 200 205

Asn Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn
 210 215 220

Asp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp
 225 230 235 240

Val Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala
 245 250 255

Asp Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 260 265 270

<210> 36

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

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

1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Arg Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly
 35 40 45

His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn

<210> 37

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Ala Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 38

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Ala Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Ser Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Asn Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125
 <210> 39
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 Ala Asp Glu Arg Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly
 35 40 45
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Gln Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Ser Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 40

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

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

50 55 60

Ala Gln Asn Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Asp Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Ser Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Asn Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 41

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asp Leu Gly Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile
 20 25 30

Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr
 35 40 45

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

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly
 65 70 75 80

Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala
 85 90 95

Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 100

<210> 42

<211> 103

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Asp Leu Gly Lys
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile
 20 25 30

Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Lys Asp Gly Tyr
 35 40 45

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

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Ser Gly
 65 70 75 80

Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Asn Gly His Glu Asp Ile Ala
 85 90 95

Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
 100

<210> 43

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 44

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

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

1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125
 <210> 45
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45
 His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 46

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 46

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

50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 47

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 47

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp
 100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 115 120 125

<210> 48

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly
 35 40 45

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60

Ala Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp
 65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 85 90 95

Asn Ala Gln Asp Ile Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala Ala Asp

100 105 110

Ala Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

115 120 125

<210> 49

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Arg Asn Gly

1 5 10 15

His Leu Lys Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn

20 25 30

Ala

<210> 50

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

Lys Asp Phe Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asn Asp Gly

1 5 10 15

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn

20 25 30

Ala

<210> 51

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

Lys Asp Glu Arg Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Val Tyr Gly
 1 5 10 15
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 Ala

<210> 52

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

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

<210> 53

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 53

Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly

1 5 10 15

His Leu Xaa Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn

 20 25 30

Ala

<210> 54

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

Xaa Asp Phe Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly

1 5 10 15

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn

 20 25 30

Ala