



등록특허 10-2290592



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월19일
(11) 등록번호 10-2290592
(24) 등록일자 2021년08월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) *C07K 14/71* (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7017376
- (22) 출원일자(국제) 2013년12월02일
심사청구일자 2018년11월20일
- (85) 번역문제출일자 2015년06월29일
- (65) 공개번호 10-2015-0091138
- (43) 공개일자 2015년08월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/075290
- (87) 국제공개번호 WO 2014/083208
국제공개일자 2014년06월05일

(30) 우선권주장
12195156.0 2012년11월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (56) 선행기술조사문헌
Stumpp et al., Current Opinion in Drug Discovery and Development, 10(2), p.153-159 (2007)
Zahnd et al., Journal of Molecular Biology, 369(4), p.1015-1028, (2007)
WO2009068625 A2

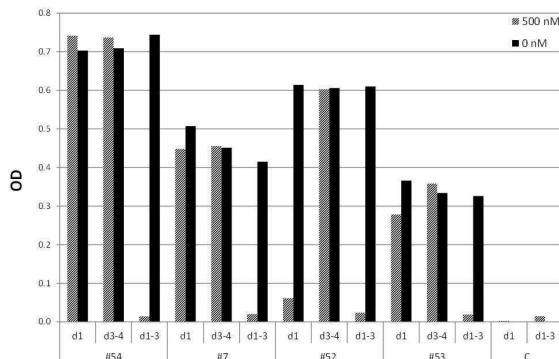
전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 HER2에 대항하는 적어도 두 개 이상의 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질

(57) 요약

본 발명은 적어도 제1 및 제2 반복 도메인을 포함하는 재조합 결합 단백질과 관련이 있으며, 두 개의 반복 도메인들은 HER2의 세포 밖 영역에 결합하고, 상기 반복 도메인들은 공유결합하게 링크되는 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도1a

(52) CPC특허분류

C07K 14/82 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/35 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2318/20 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질에 있어서,

적어도 하나의 제1 및 제2 안키린 반복 도메인을 포함하며, 상기 제1 및 제2 안키린 도메인은 각각 HER2의 세포 밖 영역에 결합하고, 상기 제1 안키린 반복 도메인은 HER2의 도메인 II에 결합하며, 상기 제2 안키린 반복 도메인은 HER2의 도메인 IV에 결합하며, 제1 및 제2 안키린 반복 도메인은 동일한 폴리펩타이드에 위치하고, 상기 제1 안키린 반복도메인은 제2 안키린 반복도메인의 N-말단에 위치하며,

(a) 상기 제1 안키린 반복 도메인은 (1) SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121 (2) SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121, 여기서 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 결실, (3) SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환 및 (4) SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121, 여기서 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 결실이고 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 및

(b) 상기 제2 안키린 반복 도메인은 (1) SEQ ID NOs: 74 내지 82, (2) SEQ ID NOs: 74 내지 82, 여기서 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 결실, (3) SEQ ID NOs: 74 내지 82, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환 및 (4) SEQ ID NOs: 74 내지 82, 여기서 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 결실이고 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 재조합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 안키린 반복 도메인은 HER2와 결합하는데 있어서 퍼투주맙과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하고, 및/또는

상기 제2 안키린 반복 도메인은 HER 2와 결합하는 데 있어서 트라스투주맙과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 및 제2 안키린 반복 도메인은 각각 PBS 내에서 10^{-7} M 이하의 Kd를 가지고 HER2의 세포 외 영역을 결합하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 단백질은 100nM 보다 작은 IC50 값을 가지고 BT474 세포의 자극 증식을 억제하고 및/또는

상기 재조합 단백질은 100nM 보다 작은 EC50 값을 가지고 BT474 세포에서 세포 자멸(apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1 및 제2 안키린 반복 도메인은 폴리펩타이드 링커로 연결되고,

상기 폴리펩타이드 링커는 SEQ ID NO:11의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서,

(i) 상기 제1 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO:115의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환되고, 및

(ii) 상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환된 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서,

(a) 상기 제1 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환되고; 및

(b) 상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 74 내지 82로 이루어진 그룹에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 두번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제1 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖고,

여기서 상기 포지션 1에서 G 및/또는 포지션 2에서 S는 결실(missing)되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제1안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖고,

여기서 두번째 마지막 포지션에서 L 및/또는 마지막 포지션에서 N은 A로 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 제1안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖고,

여기서 포지션 1에서 G 및/또는 포지션 2에서 S는 결실이며, 두번째 마지막 포지션에서 L 및/또는 마지막 포지션에서 N은 A로 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 갖고,

여기서 포지션 1에서 G 및/또는 포지션 2에서 S는 결실(missing)되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 갖고,

두번째 마지막 포지션에서 L 및/또는 마지막 포지션에서 N은 A로 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 갖고,

여기서 포지션 1에서 G 및/또는 포지션 2에서 S는 결실(missing)되며, 두번째 마지막 포지션에서 L 및/또는 마지막 포지션에서 N은 A로 치환되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 제1 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 115의 아미노산 서열을 갖고 및/또는 상기 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NO: 81의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 15

재조합 단백질에 있어서,

적어도 하나의 제1 및 제2 안키린 반복 도메인을 포함하며, 상기 제1 및 제2 안키린 반복 도메인은 각각 HER2의 세포 외 영역과 결합하고, 상기 안키린 반복 도메인은 공유 결합으로 연결되어 있으며, 상기 재조합 단백질은 SEQ ID NOs: 83 내지 98, 102, 103, 122, 123 및 136 내지 141로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 재조합 단백질은 SEQ ID NO: 87의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 재조합 단백질의 아미노산 서열을 암호화(encoding)하는 핵산.

청구항 18

제1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 따른 상기 재조합 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석액(diluent)을 포함하는 종양 질환 또는 암을 치료하기 위한 약학적 제제.

청구항 19

종양 질환 또는 암을 치료하기 위한 조성물에 있어서,

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 재조합 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 종양 질환 또는 암은 다음과 같은 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 특성으로 특징지어 지는 것을 특징으로 하는 조성물.

- (i) HER2 인코딩 유전자의 증폭,
- (ii) HER2 인코딩 유전자의 과다발현,
- (iii) HER2 인코딩 유전자 돌연변이 형태의 발현, 및
- (iv) 트라스투주맙 내성 종양에서 Her3 인코딩 유전자의 과다발현.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 종양 질환 또는 암은 다음과 같은 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

- (i) 유방암,
- (ii) 난소암,
- (iii) 위암(gastric cancer),
- (iv) 위암(stomach cancer),
- (v) 자궁암, 및
- (vi) 직장암.

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

발명의 분야

[0002] 본 발명은 인간상피증식인자수용체2(HER2)에 대한 결합 특이성을 갖는 적어도 두 개의 반복 도메인들을 포함하는 결합 단백질들, 뿐만 아니라 그러한 HER2 결합 단백질들을 암호화하는 핵산들, 질병의 치료에서 그러한 단백질들 및 그러한 단백질들의 용도를 포함하는 약학적 조성물들과 관련된다.

배경 기술

[0004] ErbB2로도 알려진 인간상피증식인자수용체 2 (HER2; 인간 HER2는 UniProtKB/Swiss-Prot 숫자 P04626를 가진다.)는 ERBB2 유전자에 의해 암호화되는 인간에서의 단백질이다. 이 유전자의 증폭 또는 과-발현은 특정 유형의 암의 발생 및 진행에서 중요한 역할을 보여주고 있고, 최근 중요한 생물 지표 및 질병 치료의 타겟이 되는 것으로 진화되고 있다. HER2는 ErbB 수용체들(Bublil, E.M. 및 Yarden, Y. Curr. Opin. Cell Biol. 19(2), 124-34, 2007)의 더 넓은 패밀리에 속하는 막관수용체(transmembrane receptor) 티로신 키나아제 (RTK)이다. ErbB 수용체 패밀리는 척추동물 전역에 걸쳐 유지되고 있고, 또한 패밀리 파운더(family founder) ErbB1(인간상피증식인자수용체(EGFR) 또는 HER1으로도 명명된; 인간 단백질에 대한 UniProtKB/Swiss-Prot 내의 P00533 숫자)과 더 최근에 확인된 수용체 HER3(ErbB3로도 명명된; 인간 단백질에 대한 UniProtKB/Swiss-Prot 내의 P21860 숫자) 및 HER4(ErbB4로도 불리는; 인간 단백질에 대한 UniProtKB/Swiss-Prot 내의 Q15303 숫자)를 포함한다. 모든 ErbB 수용체들은 광범위한 시퀀스와 도메인 호몰로지(domain homologies)를 공유하고, 모든 조합들 내에서 기능적인 동종이량체(functional homodimers)(예, ErbB1-ErbB1, HER2-HER2 및 HER4-HER4) 및 이종이량체(heterodimer)를 형성한다. 수용체 동종- 및 이종이량체화(heterodimerization)는 리간드 결합 또는 수용체 과발현 시에 발생하고, 이어서 자기인산화에 의해 세포내부 수용체 키나아제 도메인들을 활성화한다. 이것은 그리고 나서 다운스트림 세포 내(intracellular) 시그널링 및 생물학적 반응들을 촉발시킨다. 다른 ErbB-수용체와는 반대로, HER2는 어떠한 알려진 리간드를 갖지 않으며, 이량화(dimerize)할 수 있는데, 이것은 그것의 과발현 후에 강력하게 전달(pronounce)되고, 거기에서 이전 리간드 결합 없이 활성화된다. 중요하게도, HER3는 활성화 세포 내 키나아제 도메인을 갖지 않으며, 매우 강한 다운스트림 시그널링을 이끄는 다른 ErbB 수용체 패밀리 멤버를 가진 이종이량체화(heterodimerization)를 통해 활성화된다. 그러한 이종이량체화 및 HER3의 이종이량체화와 활성화는 HER3에 리간드 결합하거나 또는 HER2와 같은 파트너링 수용체가 강력하게 과발현될 때 발생한다.

[0005] 다른 모든 ErbB 수용체 패밀리 멤버 뿐만 아니라 HER2는, 순차적으로 I, II, III 및 IV으로 명명된 4개의 세포 외 도메인들로 구성되며, 도메인 IV는 세포 밖의 세포막과 가장 가깝고 도메인 I이 가장 멀다. 리간드-결합 조건에서, ErbB내의 도메인 I과 III은 도메인 II를 막는 분자 내 상호작용을 공유한다. 이합체화를 위해 두 개의 이웃하는 ErbB 수용체들의 도메인 II 사이의 상호작용이 요구되기 때문에, 이것은 수용체 동종-/이종이량체화 및

시그널링(signaling)을 방해한다(Burguess A.W., 등., Mol. Cell 12(3), 541-552, 2003). 리간드 결합은 도메인 I과 III 사이의 상호작용을 봉괴시키고, 그리고 나서, 테더드-투-익스텐디드(the tethered-to-extende) 수용체 구조적 변화를 야기하고, 도메인 II가 노출되도록 놓아둔다. 이것은 다른 연장된 ErbB 수용체들을 무차별적으로 이량화하고, 시그널링을 개시하도록 한다. 흥미롭게도, HER2는 연장된 형태에서 구성적으로(consitutively) 발견되는 유일한 ErbB 수용체 패밀리 멤버이다. ; 그러므로 도메인 II는 연속적으로 노출되고, 동종- 및 이종이량체화로 접근 가능하다.

[0006] ErbB 수용체 이량체화 및 자기인산화는 질병 뿐 아니라 정상 생리학에 관여하는 과다한(plethora) 키 다운스트림 시그널링 분자들의 활동을 이끈다. 그러한 활동적인 시그널링 분자들의 본성은 어느 정도 활동적인 ErbB 수용체 이량체들의 조성물에 의존한다. 예를 들어, HER1-HER1 및 HER2-HER2 동종이량체들은 다운스트림 세포 밖-신호조절-인산화효소(EPK) 시그널링 및 증식을 우선적으로 활성화하지만, HER2-HER3 이종이량체들은 또한 PI3K-시그널링 경로(다운스트림 키나아제 AKT의 활성을 포함하는) 및 그러한 세포 생존을 활성화한다. 사실, 종양 세포들(tumor cells) 내에서 HER2-HER3 시그널링에 의한 AKT 활성화는 생존을 촉진하고, 종양 세포(tumor cell)가 HER2 타겟팅 약품, 예를 들어 단일 클로날 항체 트라스투주맙(Berns K. 등., Cancer Cell 12, 395-402, 2007)에 저항하게 한다. 흥미롭게도, 이러한 세포들 내의 HER2-HER3 매개 PI3K-AKT 시그널링의 저해는 속도-제한되고, 세포 사멸의 결과를 가져온다. 세포 증식 및 생존을 제외하고, HER2 시그널링은 또한 혈관형성 및 이동과 같은 다른 프로세스를 인과적으로 연관되어 있다.

[0007] HER2는 모든 유방암의 약 20%에서 과발현된다. 그것들의 의학적인 관련성 때문에, HER2는 이에 대항하는 생물학제가, 즉 트라스투주맙(Herceptin®; Genentech), 첫 번째로 개발된 RTK가 되었다. 이 항체는 HER2의 도메인 IV에 결합하고, 아직 완벽하게 이해되지 않은 여러 메커니즘에 의해 HER2 시그널링을 억제한다. 이것들은 종양 세포들(tumor cells) 내에서 수용체 내제화의 유도를 포함하고, 이것은 감소된 HER2 발현 단계들 및 시그널링의 결과를 가져오며, 악화된 발암성의 표현형(attenuated tumorigenic phenotype)을 이끈다. 트라스투주맙은 수만 명의 유방암 여성의 삶을 변화시키고, 그들의 수명 및 삶의 질을 연장시킨다. 그러나, 트라스투주맙은 주로 항증식성 효과를 가지며, 종양들은 더 진행된 질병 단계에서는 그러한 치료로부터 벗어난다. 더 효과적인 치료들을 개발하기 위해서, 도메인 II 또는 HER2를 인식하는 새로운 항체, 즉 퍼투주맙(Omnitarg®, Perjeta®; Genentech)이 개발되었다. 트라스투주맙과 반대로, 이 항체는 HER2의 세포막 발현 레벨을 감소시키기 위해 개발된 것이 아니고, 수용체의 이량체화 도메인 II에 결합하고 막는 것에 의해 HER2 동종- 및 이종이량체 형성을 방해하기 위해 개발되었다. 퍼투주맙 치료는 단일 제제로서 생체 내 및 생체 밖에서 예상치 못한 낮은 치료상의 효과를 갖는다. 그럼에도 불구하고, 트라스투주맙과 그것의 혼합은 시너지 효과를 보여준다. 그러므로, 두 항체의 조합은 유방암 환자들을 위한 관리 요법이 표준이 될 것이다(Capelan M., 등., Ann. Oncol., 24, 273-82, 2013).

[0008] 트라스투주맙 및 퍼투주맙의 조합의 임상 전 및 임상의 성공은, HER2 내에서 도메인 II 와 IV의 이중 타겟팅이 강력한 항암 효과를 요구되는 컨셉을 이끈다. 이것은 도메인 II 및 IV에서 동시적으로 HER2에 타겟하기 위해 더 최근에 발생된 다른 분자들과 어려워진다. 예를 들면, the Danish company Symphogen은 임상 전 쥐 암 모델에서 몇몇의 높은 효용을(즉, 단독의 트라스투주맙보다 뛰어난) 보여주는 HER2의 도메인 II 및 IV에 대항하는 항체 혼합물을 개발하고 있다.

[0009] 유사하게, US2011/033460은 HER2의 도메인 I 및 도메인 IV를 결합하는 항체들의 조합이 DNA 합성 및 BT474 세포들의 생존 능력에 상승적인 효과들을 보인다는 것을 기술한다. 더구나, US2011/033460 또한 하나의 에피토프는 HER2의 도메인 I에 위치하고, 다른 에피토프는 HER2의 도메인 IV에 위치하는 두 개의 다른 HER2의 에피토프들을 결합하는 이중특이적 항체들을 또한 기술한다.

[0010] WO 2009/068625는 HER2에 결합하기 위해 트라스투주맙을 가지고 경쟁하는 제1 항체 도메인과, HER2의 상이한 에피토프 또는 부분에 결합하는 제2 항체 도메인을 포함하는 바이파라토pic 항체 구성체들의 개발을 다룬다. 흥미롭게도, 몇몇의 구성체들은 SKBR3 세포 증식의 적대적인 효과를 가지고, 반면에 다른 것들은 효능(agonistic)

효과를 가진다. 특별하게도, WO 2009/068625는 HER2에 결합하는데 있어서 트라스투주맙과 경쟁하는 제1 항체 도메인(즉, Her2의 결합 도메인 IV) 및 HER1에 결합하는데 있어서 퍼투주맙과 경쟁하는 제2 항체 도메인(즉, HER2의 결합 도메인 II)를 포함하는 바이파라토픽 항체 구성체들의 성장을 개시한다.

[0011] 구성체(construct)는, 여기서 구성체의 도메인 IV 결합 항체는 도메인 II 결합 항체 도메인에 N-말단하게 클론되어 있다, 맵 키나아제 활성화의 블로킹을 보여주고 있는데, 이러한 블로킹은 다른 방향(orientation)(즉, N-말단에 도메인 II 결합 항체 도메인 갖는)에서는 관찰되지 않는다.

[0012] 전체적으로, WO 2009/068625는 HER2를 타겟팅하는 다양한 바이파라토픽 항체 구성체들을 개시하고 있는데, 이들은 SKBR3 세포 증식(효능적 또는 길항적) 또는 세포 시그널링에 가변의 효과를 보이지만, 세포 독성 및 세포 자멸 효과들은 개시되지 않았다.

[0013]

[0014] 2가의 diabody 분자들 또는 HER2를 타겟하는 2가의 affibodies과 같은, 2가의 결합 단백질들이, 또한 기술되었다(Nielsen, U.B., 등., Cancer Res., 60, 6434-6440, 2000; Steffen, A-C., Cancer Biother. Radiopharmaceut. 20, 239-248, 2005). 그러한 분자들은 동일한 결합 도메인에 두 번 결합하여, 동일한 타겟 분자 상의 상이한 에피토프에 각각 결합하는 두 개의 결합 도메인들을 포함하는 바이파라토픽 분자들과는 상이하다.

[0015] 항체-유도 치료법 및 SMIs 대안으로서, 타겟 모듈에 특이하게 결합하는 것에 이용될 수 있고 그렇게 함으로써 길항제 역할을 하는 새로운 결합 단백질들 또는 결합 도메인들이 존재한다.(즉, Binz, H.K., Amstutz, P. 및 Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005) Fc를 보유하지 않는 결합 단백질들 또는 결합 도메인들의 하나의 그러한 새로운 분류는 디자인된 반복 단백질들 또는 디자인된 반복 도메인들에 기초한다.(WO 2002/020565; Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, 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).

[0016] WO 2002/020565는 어떻게 반복 단백질들의 커다란 라이브러리들이 형성될 수 있는지와, 그들의 일반적인 적용을 기재하고 있다. 그러한 디자인된 반복 도메인들은 반복 단백질들의 모듈의 특성(modular nature)을 이용(harness)하고, 디자인된 반복 도메인이 집합화(aggregation)하는 것을 막기 위해 도메인의 소수성 코어를 가리는 것에 의해 막기 위한 N-말단 및 C-말단 캡핑 모듈을 포함할 수 있다. (Forrer, P., Stumpp, M.T., Binz, H.K. 및 Pluckthun, A., FEBS letters 539, 2-6, 2003). 이러한 결합 단백질의 새로운 분류(class)는 디자인된 안키린 반복 단백질들(DARPins)을 포함한다. HER2에 결합하는 단일 특이적인 DARPins의 생성이 이전에 기술되었다. (예. Steiner, D., Forrer, P. 및 Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 382, 1211-1227, 2008; Zahnd, C., Pecorari, F., Straumann, N., Wyler, E. 및 Pluckthun, A., J. Biol. Chem. 281(46), 35167-35175, 2006).

[0017] 최근, HER2를 타겟하는 이중 특이 디자인된 안키린 반복 단백질이 기술되었다. (Jost, Ch., 등., 구조 21, 1-13, 2013). 저자는, 짧은 링커(긴 링커들은 작동을 잘 하지 못한다)에 의해 연결되는 두개의 안키린 반복 도메인들을 보여주는데, 하나는 Her2의 도메인 I과 타겟팅하고, 다른 하나는 HER2의 도메인 IV를 타겟팅하며, 이것은 Her2의 도메인 IV를 타겟하는 단독의 트라스투주맙과 비교해서, BT474 세포들 상에서 더 강한 세포 독성의 효과를 야기한다. 이 바이파라토픽 반복 단백질은 두 개의 Her2 분자 내부의 가교 결합에 의해 작동 한다; 즉, 그것은 2개의 막-결합 HER2 분자들을 연결하는데, 다른 EGFR 패밀리 멤버와 신호-능숙(signaling-competent) 이중합체를 형성할 수 없도록 뒤틀고, 다른 키나아제 이중합체화를 막아서, 관찰된 세포 독성 효과가 얻어지도록 이끈다.

[0018] 비록 HER2의 타겟팅을 보여주는 종래 기술이 암과 같은 질병의 치료에 유익하더라도, 높은 효험을 가지는 HER2를 타겟팅하는 결합 단백질을 생성해야하는 명백한 요구가 있다.

발명의 내용

[0019]

본 발명의 목적

[0020]

본 발명의 목적은 Her2에 새로운 길항제를 제공하는 것이다.

[0021]

본 발명의 다른 목적은 HER2-관련 세포 신호를 억제하는 새로운 메커니즘을 제공하는 것이다.

[0022]

본 발명의 다른 목적은 HER2-매개 세포 증식을 억제하거나 및/또는 세포,(예, 암 세포), 조직, 기관 또는 환자에 세포자멸을 유도하는 새로운 접근법을 제공하는 것이다.

[0023]

본 발명의 또 다른 목적은 바이파라토픽 반복 단백질들을 이용하여 Her2의 두 개의 도메인에 어드레스하는 단일 치료상의 접근을 제공한다.

[0024]

본 발명의 다른 목적은 암의 새로운 치료상의 선택권들을 제공하는 것이다.

[0025]

본 발명의 다른 목적은 좋은 약효를 가지고 및 /또는 부작용이 거의 없는 종양(neoplastic) 질병에 대항하는 치료법을 제공하는 것이다.

[0026]

본 발명의 또 다른 목적은 선행 기술로부터의 치료 요법들에 반응하거나, 또는 저항하는 종양(neoplastic) 질병에 대항하는 대안적인 치료법을 제공하는 것이다.

[0027]

발명의 요약

[0028]

이것들의 목적은 명세서 뿐 아니라 종속항이 더 바람직한 실시예를 제시하지만, 독립항의 대상에 의해 달성된다.

[0029]

본 발명은 도면 및 전술한 설명에서 상세하게 도시되고 기재되었지만, 그러한 도면 및 설명은, 예시적 또는 전형적인 및 제한적이지 않은 것으로 간주된다; 본 발명은 실시예들을 기재하는데 제한이 없다. 기재된 실시예들에서 다른 변형들은, 도면, 설명서, 및 첨부된 청구항들의 연구분야로부터 청구된 발명을 실시하는 이 기술의 숙련자들에 의해 이해되어질 수 있고, 영향 받을 수 있다. 청구항들에서, 단어 "포함한다"는 다른 요소 또는 단계를 제외하지 않으며, 부정관사 "a" 또는 "an"은 복수를 제외하지 않는다. 확실한 방법들이 서로 다른 종속항에서 인용된 단순한 사실은, 이러한 방법들이 유용하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 청구항에서 어떠한 인용 문헌의 표시가 범위를 제한하는 것으로써 해석되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1. HER2에 DARPin 도메인들의 결합.

1가 DARPin의 HER2 세포 밖 도메인 (도메인 I-IV)에 결합은 도 1a1b 1b에 도시된 것과 같이, 경쟁자로서 정체된 HER2 도메인들 (도메인 I, 도메인 III-IV 또는 도메인 I-III)을 이용하여 경쟁 ELISA에 의해 테스트되었다. 500nM 의 Her2 도메인 I 존재 하에, DARPin #51 및 DARPin #52는 HER2 (도메인 I-IV)와 더 이상 결합할 수 없는데, 이는 그들이 도메인 I에 위치된 에피토프와 결합하는 것을 나타낸다. 500nM의 Her2 도메인 I 뿐 아니라 500nM의 Her2 도메인 III-IV가 전체 길이의 Her2(도메인 I-IV)에 그들의 결합을 막을 수 없기 때문에, DARPin

#7, DARPin #53 및 DARPin #54는 도메인 II와 결합한다. 도 1.C는 단일공유결합의 DARPins이, 형성된 HER2-퍼투주맙 복합체에 결합할 수 있고, HER2 도메인 II상의 퍼투주맙보다 다른 애피토프에 결합하는 것을 보여준다. 아래에 DARPins의 정의를 보아라. OD, 620 nm에서의 광학농도(optical density)를 뺀 450 nM에서의 광학농도; C, 대조군 DARPin(control DARPin), HER2를 결합하지 않음; d1, HER2의 도메인 I; d1-3, HER2의 도메인 I-III; d3-4, HER2의 도메인 III-IV.

도 2. 1가 및 바이파라토픽 결합 단백질들에 의한 BT474 세포 증식의 억제

1가의 DARPins (즉 DARPin # 1 및 DARPin #18), 이를 1가의 DARPins의 비-공유결합 혼합물 및 상이한 방향에서 이러한 1가의 DARPins을 포함하는 바이파라토픽 결합 단백질(DARPin # 41 및 DARPin #49)들에 의한 BT474 증식의 억제가 테스트되었다. 도 2a는 바이파라토픽 DARPins의 다양한 농도에 의한 증식의 억제를 보여주며, 상응하는 피팅된 억제 커브들이 별개의 단일 실험에 대해 보여주고 있다. DARPin #41의 IC₅₀값은 약 2 nM로 측정된다. 뚜렷한 DARPins의 IC₅₀값들은 표 2에 목록화되었다. 도 2a에 그래프는 nM의 DARPins 농도, C에 대하여 도시된, 620nm에서의 OD를 제외한 450nm에서의 광학 농도를 보여준다. X 축은 로그 스케일로 보여준다. 도 2b는 바이파라토픽 DARPins, 1가의 DARPins 및 개별의 상응하는 단일공유 결합의 DARPins 양측 모두의 혼합물 100nM 농도에서 증식의 억제를 보여준다. OD는 Y-축에 도시된다. 증식의 억제는 낮은 OD에 의해 반영된다. 아래의 DARPins의 정의를 보아라. #41, DARPin #41; #49, DARPin #49; #18, DARPin #18; #1, DARPin #1; n.c., 음성 대조군.

도 3. 다양한 바이파라토픽 DARPins에 의한 BT474 세포 증식의 억제

상이한 N-말단 및/또는 C-말단 안키린 반복 도메인들을 포함하는 바이파라토픽 DARPins (#23, #24, #33, #37, #43, #44 및 #41)의 부분집합에 의한 BT474 증식의 억제를 보여준다. DARPins의 다양한 농도에 의한 증식의 억제 및 상응하는 피팅된 억제 커브들이 별개의 단일 실험에서 각각 보여지고 있다. 별개의 DARPins의 IC₅₀값은 표 2에 목록화된다. 도 3a는 DARPin #15을 가지는 바이파라토픽 DARPin의 억제를 보여주고, 도 3b는 C-말단에서 DARPin #18을 가지는 바이파라토픽 DARPins의 억제를 보여준다. 도 3c 및 3d는 N-말단에서 DARPin #51과 C-말단에서 DARPin #18을 가지는 바이파라토픽 DARPins의 억제를 보여주고, 도 3d는 N-말단에서 DARPin #51과 C-말단에서 DARPin #21을 가지는 바이파라토픽 DARPins의 억제를 보여준다. 그래프는 nM의 DARPins 농도, C에 대하여 도시된, 620nm에의 OD를 뺀 450nm에서의 OD를 보여준다. X 축은 로그 스케일을 보여준다. 아래의 DARPins의 정의를 보아라. #23, DARPin #23; #24, DARPin #24; #33, DARPin #33; #37, DARPin #37; #41, DARPin #41; #43, DARPin #43; #44, DARPin #44.

도 4. 상이한 셀 라인들에서 바이파라토픽 DARPin #41에 의한 세포 증식의 억제

DARPin #41과 트라스투주맙에 의한 NCI-N87 (도 4a)과 ZR75-30 (도 4b)과 4aMDA-MB175 (도 4c)의 증식의 억제가 테스트되었다. 다양한 농도의 DARPins에 의한 증식의 억제 및 상응하는 피팅된 억제 커브들은 각각 뚜렷한 단일 실험에서 보여진다. 다양한 셀라인들에서 IC₅₀값은 표 3에 목록화된다. 그래프는, nM으로 표시된 DARPins 농도인 C에 대하여 도시된, 620nm에의 OD를 뺀 450nm에서의 OD를 보여준다. X축은 로그 스케일로 표시된다. 아래 DARPins의 정의 및 문자들의 참조문헌을 보아라. #41, DARPin #41; T, 트라스트주맙

도 5. 상이한 셀 라인들에서 바이파라토픽 DARPin #41에 의한 세포 자멸의 유도

DARPin #41 및 트라스투주맙에 의한 BT474 세포들(도 5a) 및 NCI-N87 세포들(도 5b) 및 MDA-MB175 (도 6a)에서의 세포자멸의 유도가 테스트되었다. 다양한 농도의 DARPins에 의한 세포 자멸의 유도 및 상응하는 피팅된 억제 커브들이 각각 뚜렷한 단일의 실험에서 보여준다. 개별 셀라인들의 EC₅₀값들은 표 3에서 목록화된다. 도 5a에서의 그래프는, 트라스트주맙의 DARPins의 nM으로 표시된 농도, C에 대하여 도시된, 490 nm에서의 OD를 제외한 450nm에서의 OD를 보여준다.

도 5b 및 5c에서의 그래프는 DARPins 또는 트라스투주맙의 nM 농도, C에 대하여 도시된 상대적인 빛의 단위, RLU를 보여준다. X 축은 로그 스케일을 보여준다. 아래의 DARPins의 정의를 보아라. T, 트라스트주맙; #41, DARPin #41.

도 6. 세포 증식의 억제 및 세포 자멸의 유도에서 벤치마크와 DARPin #41의 효능의 비교

BT474 세포 내에서 증식의 억제(도 6a) 및 세포 자멸의 유도(도 6b)가 DARPin #41, 벤치마크 트라스투주맙 및 퍼투주맙, 100 nM 트라스투주맙와 퍼투주맙의 적정의 조합에 대해 테스트되었다. 도 6a는 DARPin의 다양한 농도에 의한 증식의 억제를 보여주고 있는데, 각각의 벤치마크 농도와 상응하는 피팅된 억제 커브들은 구별되는 단

일의 실험 각각에 대해 보여지고 있다. 개별 셀 라인에 대한 IC₅₀ 값은 표 3에 목록화된다. 그래프는 nM으로 표시되는 DARPin/벤치마크의 농도 C에 대하여 620 nm에서의 OD를 제외한 450nm에서 광학 농도, OD를 보여준다. X 축은 로그 스케일을 보여준다. 도 6b는 DARPin의 다양한 농도들에 의한 세포 자멸의 유도를 보여주고 있는데, 개별 벤치마크 농도와 상응하는 페팅된 활성화 커브들은 각각 구별되는 단일 실험에 대해 보여지고 있다. 구별되는 세포 라인들에 대한 EC₅₀ 값들은 표 3에서 목록화되었다. 그래프는 DARPin/벤치마크의 nM으로 표시된 농도, C에 대해 도시된 상대적인 빛의 단위, RLU를 보여준다. X 축은 로그 스케일로 표시되었다. 아래의 DARPin의 정의를 보아라. T, 트拉斯투주맙; #41, DARPin #41.

도 7. 바이파라토픽 결합 단백질의 상이한 포맷에 의한 BT474 세포 증식의 억제

N-말단에의 DARPin #1과 C-말단에의 DARPin #18로 구성된 바이파라토픽 DARPin의 상이한 포맷에 의한 BT474 증식의 억제를 보여준다.

도 7a는 긴 세럼 반감기(long serum half live)를 가지도록 설계된 바이파라토픽 DARPin의 다양한 농도에 의한 증식의 억제를 보여주며, 상응하는 적합한 억제 커브들이 개별 단일의 실험에서 대해 표시되어 있다. 바이파라토픽 DARPin #63은 그것의 C-말단 Cys 잔기에서 폐길화(PEGylated)되는 반면, 바이파라토픽 DARPin #64 및 #65은 세럼 알부민에 결합하는 안키린 반복 도메인을 포함한다. 도 7b는 HER2를 결합하는 반복 도메인들 사이의 상이한 링커들을 포함하는 바이파라토픽 DARPin의 다양한 농도에 의한 증식의 억제를 보여주고, 상응하는 페팅된 억제 커브들이 구별되는 단일 실험에 대해 나타나 있다. DARPin에 대한 IC₅₀ 값은 표 2에 목록화되었다. 그래프는 nM으로 표시된 DARPin의 농도, C에 대하여 도시된, 620nm에서의 OD를 제외한 450nm에서의 OD를 보여준다. X축은 로그 스케일로 표시되어 있다. 아래의 DARPin의 정의를 보아라. #66, 두개의 반복 도메인들 사이의 짧은 두개의 아미노산 긴 GS-링커를 포함하는 DARPin #66; #67, 두 개의 반복 도메인들 사이에 다섯개의 아미노산 긴 GS-링커를 포함하는 DARPin #67; #41, 두 개의 반복 도메인들 사이에 10개의 아미노산 긴 GS-링커를 포함하는 DARPin #41; #68, 두 개의 반복 도메인들 사이에서 24 아미노산 긴 PT-링커를 포함하는 DARPin #68.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 재조합 결합 단백질은 적어도 제1 및 제2 반복 도메인을 포함하고, 각각의 상기 반복 도메인은 HER2의 세포 외 영역과 결합하며, 상기 반복 도메인들은 공유결합으로 연결된 것을 특징으로 한다.

[0032]

놀랍게도, 재조합 결합 단백질로 HER2의 세포 외 영역에 결합하는 것은, 여기서 재조합 결합 단백질은 적어도 두 개의 공유결합으로 연결된 반복 도메인들을 포함하고 반복 도메인들은 HER2의 세포 외 영역에 특이성을 가짐, 위에서 설명한 HER2를 구별되고 개별적인 바인더(예, 트拉斯투주맙 및 페투주맙의 결합; 도 6)와 결합시키는 종래 기술 접근보다 비하여 유용하고 예상치 못한 효과들을 가지는 것으로 밝혀졌다.

[0033]

인간 HER2는 21개의 아미노산 신호 서열, 631개의 아미노산 세포 외 영역(예를 들어, 도메인 I 내지 IV를 포함하는 엑토도메인), 23개의 아미노산 세포막통과 영역, 및 580개의 아미노산 세포질 도메인을 가진 1255개의 아미노산으로 이루어진다.

[0034]

바람직하게는, 상기 재조합 결합 단백질에 의한 상기 HER2의 세포 외 영역의 결합은 HER2의 상기 세포 외 영역에 상기 반복 도메인들이 동시에 발생하는(simultaneous) 또는 공동으로 작용하는(concurrent) 결합이다. 또한 바람직하게는, 상기 반복 도메인들은 HER2의 세포 외 영역의 두 개의 다른 에피토프에 결합한다. 또한 바람직하게는, 상기 반복 도메인들은 HER2의 세포 외 영역의 두 개의 다른 및 겹치지 않는 에피토프에 결합한다.

[0035]

이러한 증가된 효과의 한 가지 이유는, 본 발명에 따른 재조합 결합 단백질이 HER2의 체외 영역에 지금까지 진술되지 않은 테더드 배치(tethered conformation)로 유도하기 때문일 수 있는데, 이것은 HER2의 세포 외 영역 위에 두 개의 다른 에피토프를 가진 본 발명의 바이파라토픽 결합 단백질의 분자 내 상호작용의 결과로 보여진다. (실시예 8); 즉, 결합 단백질의 두 개의 모든 반복 도메인은, 동일한 HER2 분자의 다른 에피토프에 동시에 결합하는 것으로 보이며, 그렇게 함으로써 HER2의 세포 외 영역을 이러한 새로운 테더드 배치 (tethered conformation)로 강제하는 것으로 보인다.

[0036]

그러한 테더드 배치(tethered conformation)는 종래 기술에 의해 서술되지 않았다. 중요하게도, 이러한 두 개

의 반복 도메인은 같은 결합 단백질에서 존재됨에 의해 연결되는 것을 필요로 한다; 즉, 두 개의 반복 도메인의 간단한 혼합률은 효과를 보여주지 못한다.(그림 2b) 게다가, HER2의 세포 외 영역에 그러한 결합 단백질의 2가 접합 (bivalent binding)은 증가된 결합활성(avidity), 즉, 목표물의 다른 에피토프에 동시적으로 (synchronous) 결합하는 조합 강도를 나타냄(exhibiting)에 의해 시너지있는 결합 효과를 상승시킬 수 있다. 결합활성(avidity)은 친화성(affinity)과 다른데, 이것은 단일 결합 상호작용의 효능(potency)에 상응한다. 결국, 이러한 HER2와 결합 단백질의 특이한 상호작용은 예시에서 보여준 것처럼 그러한 분자들에 의한 매우 효과적인 증식 억제 및 세포 자멸의 유도를 설명할 수 있다.

[0037] 이 이론에 따르면, 같은 단백질에서 두 개의 다른 반복 도메인들은 그들의 각각의 에피토프 결합에서 협조적으로 서로 도와주므로, 타겟 전체에 친화성(affinity)이 증가하도록 이끌어준다.

[0038] 제1 반복 도메인이 HER2의 그것의 에피토프에 결합하는 것은, 제2 반복 도메인이 HER2에 각각의 에피토프와의 결합을 용이하게 하는, 활동적으로(energetically) 및/또는 입체적으로 호의적인 위치에 가져다준다.

[0039] 예시들에서 보여주는 것과 같이 제1 및 제2 반복 도메인의 공유 결합은 그들의 생물학적 활성을 강화시키는 것처럼 보인다.

[0040] 본 발명에 따른 재조합 결합 단백질의 바람직한 실시예에서, 제1 반복도메인은 HER2의 도메인 II에 결합하고, 제2 반복 도메인은 HER2의 도메인 IV에 결합한다.

[0041] 용어 “도메인 II 결합”은 각각의 반복 도메인이 주로 HER2의 도메인 II와 결합한다는 것을 의미한다는 것을 이해하는 것이 중요하다. 이러한 정의는, 그러나, 상기 결합 도메인의 부분들이 다른 도메인들에 결합하거나, 또는 중첩(overlap)할 수 있는 것을 제외하는 것은 아니다. 이것은 용어 “도메인 IV 결합”에도 적용된다.

[0042] 본 발명에 따른 바이파라토픽 결합 단백질에 의한 HER2의 도메인 II 및 IV의 도메인의 동시적인(simultaneous) 표적화은, 종래 기술로부터 알려진 것을 뛰어 넘는 특별한 예상치 못한 효과를 갖는 것이다. 이러한 결합 단백질에 의한 증식 억제 및 세포 자멸의 유도에 관한 셀 반응들은 최신 기술의 항체들의 상태에 의해 얻어진 효과와 비교해봤을 때 훨씬 더 극적이다. 예를 들어, 그러한 반응들의 정도는 HER2의 도메인 IV 및 II 각각을 타겟으로 하는 트拉斯투주맙 및 퍼투주맙의 조합과 같은, 의학적 항체 벤치마크에 의해 유도된 것보다 우수하다고 증명되어 왔다.(도 4, 5 및 6) 흥미롭게도, HER2 의 도메인 I 및 도메인 IV를 결합하는 몇몇의 바이파라토픽 결합 단백질은 그러한 예상치 못한 효과들을 보여주지 않는다.(도 3c 및 도 3d).

[0043] 예를 들어, 실시예 3에서 보여준 것처럼, 반복 도메인과 결합하는 HER2의 세포 외 영역의 도메인을 결정하는 방법들은, 그 기술에서 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.(예. Jost 외., 인용문 중).

[0044] 출원인들의 연구결과들은 본 발명에 따른 바이파라토픽 결합 단백질을 갖는 HER 2의 도메인 II 및 IV와 바이파라토픽 결합 단백질의 동시적인(simultaneous) 표적화가, 현재 항체 표적화 접근에 대한 더 효과적인 대안일 수 있다는 점에서, HER 2-유도된 인간 암들의 치료를 위한 중요한 암시를 갖는다.

[0045] 본 발명에 따른 결합 단백질은 따라서 바람직하게는 바이파라토픽 결합 단백질이다, 즉, 그것은 같은 단백질 타겟(즉, HER2)에서 두 개의 다른 에피토프들, 또는 도메인들(예를 들어, 도메인 II 및 IV)를 인식하는 두 개의 안티젠 반복 도메인들을 포함한다. 그러나, 즉, 동일한 타겟 단백질 위의 세 개, 네 개 또는 더 많은 에피토프를 인식하는 안티젠 반복 도메인들을 포함하는 멀티파라토픽인 폴리펩타이드들은, 두 개의 바이- 또는 멀티파라토픽 및 다수 원자가(mutivalent) 즉, 하나 또는 더 많은 다른 목표 단백질을 인식하는 안티젠 반복 도메인들을 또한 포함하는 폴리펩타이드들로서, 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0046] HER2는, 여기에 사용된 것처럼, Neu, ErbB-2, CD340 (분화 클러스터 340, cluster of differentiation 340) 또

는 p185로 알려진 인간 상피 증식 인자 수용체 2와 관련된다. HER2는 표피 성장 인자 수용체(EGFR/ErbB) 군의 구성원이다. HER2는, 인간 내에서, ERBB2에 의해 암호화되는데, ERBB2인간 염색체 17 (17q12)의 긴 부분에 위치한 원암유전자로 알려져 있다. HER2는 UniProtKB/Swiss-Prot 넘버 P04626을 가진다.

[0047] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 제1 및 제2 반복 도메인들은 동일한 폴리펩타이드에 위치되는 반면에, HER2의 도메인 II를 타겟으로 하는 반복 도메인은 HER2의 도메인 IV를 타겟으로 하는 반복 도메인에 N-말단하게 위치된다.

[0048] 이러한 실시예들은 도 2a 및 해당 설명에서 보여준 예시이다. 발명자들은, 놀랍게도, HER2의 도메인 II를 타겟으로 하는 반복 도메인이 HER2의 도메인 IV를 타겟으로 하는 반복 도메인에 C-말단하게 위치하는 결합 단백질은, HER2의 도메인 II를 타겟으로 하는 반복 도메인이 HER2의 도메인 IV를 타겟으로하는 반복 도메인에 N-말단하게 위치하는 결합 단백질보다 상당히 효과적이지 못하다는 것을 보여주고 있다.

[0049] 바람직하게는, HER2의 도메인 II를 결합한 상기 제1 반복 도메인은 HER2와 결합하는데 있어서 퍼투주맙과 경쟁하지 않는다. 예를 들면, 도 1c는 그러한 반복 도메인들이 HER2의 결합하는데 있어서 퍼투주맙과 경쟁하지 않는 것을 보여준다. 같은 방식으로 바람직하게는, HER2의 도메인 IV와 결합한 상기 제2 반복 도메인이, HER2와 결합하는데 있어 트라스투주맙과 경쟁하지 않는다. 예를 들어, DARPins#18 내지 20의 반복 도메인들은 HER2와 결합하는데 있어서 트라스투주맙과 경쟁하지 않는다. 예를 들어, 실시예 3에서 보여준 것과 같이, 반복 도메인이 HER2와 결합하는데 있어, 트라스투주맙 또는 퍼투주맙과 경쟁하는지 아닌지 결정하는 방법은, 이 기술이 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0050] 이것이 의미하는 것은, 첫 번째 바람직한 실시예에서, 제1 반복 도메인은 퍼투주맙보다 HER2의 도메인 II의 다른 에피토프와 결합한다는 것이다. 이와 같이, 두 번째 바람직한 실시예에서는, 제2 반복 도메인은 트라스투주맙보다 도메인 IV의 다른 에피토프에 결합한다. 이론에 얹매이지 않고, 발명자들은 실험 섹션에서 보여준 적어도 몇몇의 효과들은, 이러한 사실들의 결과로 본다.

[0051] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 따르면, 상기 제1 반복 도메인은 안키린 반복 도메인, 또는 디자인된 안키린 반복 도메인이고, 상기 제2 반복 도메인은 안키린 반복 도메인, 또는 디자인된 안키린 반복 도메인이다.

[0052] 바람직하게는, 상기 안키린 반복 도메인 또는 디자인된 안키린 반복 도메인들은 70에서 300 사이의 아미노산들, 특히 90에서 200 사이의 아미노산들을 포함한다.

[0053] 또한 바람직하게는, 본 발명의 반복 도메인은 WO 2002/020565에서 기술된 안키린 반복 도메인 또는 디자인된 안키린 반복 도메인이다. Her2의 다른 도메인들에 바이파라토픽 결합 특이성을 가진, 디자인된 안키린 반복 도메인들의 예시들은 예시들에서 보여주고 있다.

[0054] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 제1 반복 도메인은 PBS에서 10^{-7} M 보다 작은 Kd를 가지고 HER2의 세포 외 영역에 결합하고, 상기 제2 반복 도메인은 PBS에서 10^{-7} M 보다 작은 Kd를 가지고 HER2의 세포 밖 영역에 결합한다.

[0055] Kd는 해리 상수이며 아래 본문에서 더 정의될 것이다. 10^{-7} M 보다 작은 Kd는 반복 도메인의 충분한 친화력을 그 것의 타겟에 제공하는 것이 요구된다. 바람직하게는 PBS에서 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M보다 작은, 또는, 가장 바람직하게는 10^{-11} M 보다 작은 Kd로 반복 도메인들이 그들의 타겟 도메인들과 결합한다.

- [0056] PBS에서 10^{-7} M 아래의 Kd를 갖는 Her2의 도메인 II 및/또는 도메인 IV를 결합하는 단백질을 포함하는 재조합 결합 단백질들은 실시예 2에서 보여준다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 결합 단백질은 100 nM 보다 작은 값의 반수 최대 억제 농도 (IC_{50})을 가지고 BT474 세포들의 자극 증식을 억제한다. 적합하게는, 상기 결합 단백질은 IC_{50} 이 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 nM보다 작은 값의 IC_{50} 을 가지고 BT474 세포들의 자극 증식을 억제한다. 또한 적합하게는, 상기 결합 단백질들은 적어도 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10%로 BT474 세포들의 자극 증식을 억제한다.
- [0058] BT474 세포들은 예를 들어, 실시예 4에서 보여진 바와 같이, 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려진 표준 수단에 의해서 증식을 억제하기 위한 본 발명의 결합 단백질의 기능적 역량을 측정하는 데에 사용될 수 있다. 바람직하게는, BT474, SKBR-3, NCI-N87M ZR75-30, HCC1419 또는 MDA-MB175 세포들은 실시예 5에서 보여지는 바와 같이, 증식을 억제하기 위한 본 발명의 조성물의 기능적 능력(functional capability)을 측정하는 데에 사용될 수 있다.
- [0059] 100 nM보다 작은 값의 IC_{50} 을 가지고 BT474 세포들의 자극 증식을 억제하는 재조합 결합 단백질은 실시예 4에서 밝혀지고, 논의된다.
- [0060] 다른 바람직한 실시예에 따르면, 상기 결합 단백질은 100 nM보다 작은 값의 반수 최대 유효 농도 (EC_{50})을 가지고 BT474 세포들에서 세포 자멸(apoptosis)을 유도한다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 nM 보다 작은 값의 EC_{50} 을 가지고 BT474 세포들에서 세포 자멸을 유도한다.
- [0061] BT474 세포들은 예를 들어, 실시예 5에서 보여진 것과 같이, 이 기술의 숙련된 당업자에게 알려진 표준 수단에 의한 세포 자멸을 유도하기 위해 본 발명의 결합 단백질들의 기능적 역량을 측정하는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, BT474, SKBR-3, NCI-N87, ZR75-30, HCC1419 또는 MDA-MB175 세포들은 예를 들어, 실시예 5에서 보여지는 것과 같이 세포 자멸을 유도하는 본 발명의 조성물의 기능적 역량을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0062] 100 nM보다 작은 값의 EC_{50} 을 가지고 BT474 세포들의 자극 증식을 유도하는 재조합 결합 단백질은 실시예 5에서 밝혀지고, 논의된다.
- [0063] 바람직한 실시예에 따르면, 상기 제1 및 제2 반복 도메인들은 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된다.
- [0064] 그 폴리펩타이드 링커는, 예를 들어, 융합되려는 각각의 도메인들의 인코딩 cDNAs의 단지 유전학적 융합에 의해 성취된다. 그러한 실시예들의 유형은 두 개의 다른 반복 도메인들을 가진 융합 웹타이드 단백질이라고 간주한다.
- [0065] 링커는 예를 들어, SEQ ID Nos: 7 내지 12에서 제시된 것처럼 아미노산 G 및 S, 또는 P 및 T 각각을 포함하는 올리고펩타이드를 구성할 수 있다. 다른 바람직한 실시예에 따르면, 아래에서 기술된 것처럼 “다중화 모이어티(multimerization moiety)”가 사용될 수 있다. 대체적으로, 두 개의 반복 도메인들은 서로, 예를 들어, 논펩타이드 기반의 화학적 링커들에 의해서, 연결될 수 있다.

- [0066] 바람직하게는, 재조합 결합 단백질 및/또는 반복 도메인은 pH 7.4의 PBS 내의 열 풀림(thermal unfolding)에서, 45°C를 초과하는, 더 바람직하게는 50°C를 초과하는, 더 바람직하게는 55°C를 초과하는, 매우 바람직하게는 60°C를 초과하는 중점 변성 온도 (T_m)을 가진다. 본 발명의 결합 단백질 또는 반복 도메인은 물리 생물학적 조건 하에서 규정된 secondary 및 tertiary 구조를 가진다. 그러한 폴리펩타이드의 열 풀림은 그것들의 tertiary 및 secondary 구조의 손실로 가져오는데, 예를 들어, 원편광 이색성 (circular dichroism, CD) 측정으로 추적가능하다. 열 풀림에 의한 결합 단백질 또는 반복 도메인의 중점 변성 온도는, 10°C에서 약 100°C로 온도가 천천히 증가함에 의해서 상기 단백질 또는 도메인의 가열 변성 시에 생리학적 완충용액 (physiological buffer) 내의 협동적 전이의 중간점에서의 온도에 상응한다.
- [0067] 열 풀림 시에 중점 변성 온도의 측정은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다. 이 열 풀림 시에 결합 단백질 또는 반복 도메인의 중점 변성 온도는 상기 폴리펩타이드의 열적 안정성을 보여준다.
- [0068] 또한 재조합 결합 단백질 및/또는 안키린 반복 도메인은 37°C의 PBS에서 5일 넘게, 적합하게는 10일 넘게, 더 바람직하게는 20일 넘게, 더 바람직하게는 40일 넘게, 및 가장 바람직하게는 100일 넘게 배양될 때, 바람직하게는 20 g/L까지, 바람직하게는 40 g/L 까지, 더 바람직하게는 60 g/L 까지, 더 바람직하게는 80 g/L 까지, 더 바람직하게는 100 g/L까지의 농도에서 불용성 덩어리(insoluble aggregates)를 5%(w/w) 미만으로 형성하는 재조합 결합 단백질 및/또는 안키린 반복 도메인이 바람직하다.
- [0069] 불용성 덩어리의 형성은, 불용성 덩어리의 형성 시에 강하게 증가하는 시각적인 침전의 나타남, 젤 여과 또는 동적인 광 산란에 의해 검출될 수 있다.
- [0070] 불용성 덩어리는 10분 동안 10' 000 x g에서 원심분리에 의해 단백질 샘플로부터 제거될 수 있다. 바람직하게는, 37°C의 PBS에서 상기 언급된 배양 조건 하에 재조합 단백질 및/ 또는 안키린 반복 도메인은 2% 미만, 더 바람직하게는 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1% 또는 매우 적합하게는 0.05% (w/w)보다 적게 불용성 덩어리를 형성한다.
- [0071] 불용성 덩어리들의 백분율은, 가용성 단백질로부터 불용성 덩어리들의 분리, 이어지는 표준 정량화 방법들에 의한 가용성 및 불용성 부분에서 단백질 양의 결정에 의해 정해질 수 있다.
- [0072] 또한 바람직하게는 재조합 결합 단백질 및/또는 안키린 반복 도메인은 37°C에서 1 또는 10시간동안 100 mM 디티오트레이톨 (DTT)를 포함하는 PBS 내에서 배양 시에 그들의 원초적인 3차원 구조를 잃지 않는다.
- [0073] 특정한 실시예에서, 본 발명은 2개의 안키린 반복 도메인들, 특별히 HER2에 결합을 포함하고, 상기 정의된 것처럼, 나타나는 또는 선호되는 중점 변성 온도 및 결집되지 않은 특성(non-aggregating)을 포함하는 재조합 결합 단백질에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 따르면, 다음이 규정된다.
- [0075] 상기 제1 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서, SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다. 및/또는
- [0076] · 상기 제2 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서 SEQ ID NOs: 74 내지 82로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다.
- [0077] 발명자는 이러한 반복 도메인들 중에서, 제1 반복 도메인은 HER2의 도메인 II와 결합하지만, 제2 반복 도메인은 HER2의 도메인 IV와 결합하는 증거를 가진다.
- [0078] 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서 SEQ ID NOs: 62 내지 67 및 115 내지 121로 이

루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다. 더 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서, SEQ ID NOS: 62, 115, 120, 및 121, 특히 SEQ ID NO: 115 및 120으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인과 경쟁한다. 또한 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은 HER와 결합함에 있어서, DARPins #1 내지 6 및 54 내지 60;의 그룹으로부터 선택된 결합 단백질, 더 바람직하게는, DARPins #1, 54, 59 및 60의 그룹으로부터 결합 단백질과; 특히, DARPins #54 및 60의 그룹으로부터 결합 단백질과 경쟁한다.

[0079] 더 바람직하게는, 상기 제2 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서, SEQ ID NOS: 79 내지 81, 특히 SEQ ID NO: 80 및 81로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복도메인과 경쟁한다. 또한 바람직하게는, 상기 제2 반복 도메인은 HER2와 결합함에 있어서, DARPins #18 내지 20;의 그룹으로부터 선택된 결합 단백질과, 특히 DARPins #19 내지 20의 그룹으로부터 선택된 결합 단백질과 경쟁한다.

[0080] 본 발명의 다른 더 바람직한 실시예에 따르면, 다음이 규정된다.

[0081] · 상기 제1 반복 도메인은 SEQ ID NOS: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지면서 적어도 70% 아미노산 서열 계체를 갖는 아미노산 서열을 포함하고,

[0082] · 제2 반복 도메인은 SEQ ID NOS: 74 내지 82로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지면서 적어도 70%의 아미노산 서열 계체를 갖는 아미노산 서열을 포함하고,

[0083] · 상기 안키린 반복 도메인 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 선택적으로 결실(missing)되며; 및

[0084] · 상기 안키린 반복 도메인의 두 번째 마지막 포지션의 L 및/또는 마지막 포지션의 N은 A로 선택적으로 치환되는 특징을 더 포함한다.

[0085] 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은 SEQ ID NOS: 62 내지 67 및 115 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지고, 적어도 70%의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노선 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은, SEQ ID NOS: 62, 115, 120, 및 121, 특히 SEQ ID NO: 115 및 120으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지고, 적어도 70% 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 제1 반복 도메인은 DARPins #1 내지 6 및 54 내지 60; 더 바람직하게는, DARPins #1, 54, 59 및 60의 그룹으로부터 결합 단백질을 가지고; 특히, DARPins #54 및 60의 그룹으로부터의 결합 단백질을 가지고. 적어도 70%의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0086] 더 바람직하게는, 상기 제2 반복 도메인은, SEQ ID NOS: 79 내지 81, 특히 SEQ ID NO: 80 및 81로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지고, 적어도 70%의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 또한 바람직하게는, 상기 제2 반복 도메인은 DARPins #18 내지 20으로 이루어진 그룹으로부터 결합 단백질을 가지고; 특히 DARPins #19 및 20의 그룹으로부터의 결합 단백질을 가지고 적어도 70%의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0087] 바람직하게는, 상기 안키린 반복 도메인은, SEQ ID NOS: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지고, 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 %의 아미노산 서열 개체를 포함한다.

[0088] 바람직하게는, 제2 안키린 반복 도메인은, SEQ ID NOS: 74 내지 82로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 안키린 반복 도메인을 가지고, 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0089] 또한 바람직하게는, 제1 안키린 반복 도메인은, SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인의 N-말단 및 C-말단 캡핑 모듈 사이에 존재하는 한 개, 두 개 또는 세 개의 안키린 반복 모듈을 가지고, 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 % 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0090] 또한 바람직하게는, 제2 안키린 반복 도메인은, SEQ ID NOs: 74 내지 82로 이루어진 그룹으로부터 선택된 안키린 반복 도메인의 N-말단 및 C-말단 캡핑 모듈 사이에 존재하는 한 개, 두 개 또는 세 개의 안키린 반복 모듈을 가지고, 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 %의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0091] 본 발명의 다른 적합한 실시예에 따르면, 다음이 규정된다.
- 상기 제1 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 62 내지 68, 72 및 114 내지 121로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,
 - 상기 제2 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 74 내지 82로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 여기에서
 - 상기 안키린 반복 도메인의 포지션 1에서의 G 및/또는 포지션 2에서 S는 선택적으로 결실(missing)되며;
 - 두 번째 마지막 포지션의 L 및/또는 상기 안키린 반복 도메인의 마지막 포지션의 N은 선택적으로 A에 의해 치환되는 특징을 더 포함한다.
- [0096] 바람직하게는, 제1 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 62 내지 67 및 115 내지 121, 더 바람직하게는 115, 120, 및 121; 특히, SEQ ID NO: 115 및 120로 이루어진 그룹으로부터 선택된다;
- [0097] 바람직하게는, 제2 안키린 반복 도메인은 SEQ ID NOs: 79 내지 81, 특히 SEQ ID NO: 80 및 81로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0098] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 따르면, 다음이 규정된다.
- 상기 제1 반복 도메인은 SEQ ID NO: 15 내지 18, 21 내지 23, 37, 38, 125, 126, 129, 130, 133 및 134 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 안키린 반복 모듈을 포함하는데, 여기에서 SEQ ID NO: 15 내지 18, 21 내지 23, 37, 38, 125, 126, 129, 130, 133 및 134의 9개까지의 아미노산 잔기들은 어떤 다른 아미노산 잔기들과 치환되는 특징, 및/또는
 - 상기 제2 반복 도메인은 SEQ ID NO: 46, 47, 51, 52, 55 및 56, 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 안키린 반복 모듈을 포함하는데, 여기에서 SEQ ID NO: 46, 47, 51, 52, 55 및 56의 9개까지의 아미노산 잔기들은 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환된다.
- [0101] 바람직하게는, 제1 안키린 반복 도메인의 그러한 안키린 반복 모듈은 SEQ ID NO: 15 내지 18, 125, 126, 129, 130, 133 및 134; 더 바람직하게는, 15, 125, 129 및 133; 및 훨씬 더 바람직하게는, 125 및 133으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0102] 바람직하게는, 제2 안키린 반복 모듈의 그러한 안키린 반복 모듈은 SEQ ID NO: 46, 47, 55 및 56; 더 바람직하게는, 55 및 56으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0103] 또한 바람직하게는, SEQ ID NO: 15 내지 18, 21 내지 23, 37, 38, 46, 47, 51, 52, 55, 56, 125, 126, 129, 130, 133 및 134의 반복 모듈에서 8개까지의 아미노산들은, 바람직하게는 7개까지, 더 바람직하게는 6개까지, 더 바람직하게는 5개까지, 훨씬 더 바람직하게는 4개까지, 더 바람직하게는 3개까지, 더 바람직하게는 2개까지, 그리고 가장 바람직하게는 1개의 아미노산에 의해 다른 아미노산과 치환된다.

- [0104] 바람직하게는, 아미노산들이 캡핑 모듈들, 반복 모듈들 또는 반복 도메인들, 반복 도메인들, 또는 결합 단백질들에서 치환될 때, 이러한 아미노산들은 A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 더 바람직하게는 A, D, E, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 치환된다.
- [0105] 또한 바람직하게는, 아미노산은 상동 아미노산(homologous amino acid)에 의해 치환된다; 즉, 아미노산은 비슷한 생물물리학 특성을 가진 결사슬(side chain)을 포함하는 아미노산에 의해 치환된다. 예를 들면, 음전하로 하전된 아미노산 D는 음전하를 하전된 아미노산 E에 의해 치환될 수 있고, 또는 L과 같은 소수성(hydrophobic)의 아미노산은 A, I 또는 V에 의해 치환된다. 폴리펩타이드에서 다른 아미노산에 의해 아미노산이 치환되는 기술은 이 기술에서 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0106] 바람직하게는, 본 발명에 따른 반복 모듈은 KDFQGITPLHIAATSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 16 및 서열들)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기에서 SEQ ID NO: 16의 9개까지의 아미노산 잔기들은 어떤 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며, 여기에서,
- 포지션 3의 F는 선택적으로 A에 의해 치환되고;
 - 포지션 4의 Q는 선택적으로 E에 의해 치환되고;
 - 포지션 5의 G는 선택적으로 S에 의해 치환되고;
 - 포지션 6의 I는 선택적으로 V에 의해 치환되고;
 - 포지션 11의 I는 선택적으로 L에 의해 치환되고;
 - 포지션 14의 T는 선택적으로 Q에 의해 치환되며; 및/또는
 - 포지션 15의 S은 N 및 W로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되는 것을 특징으로 한다.
- [0107] 이 그룹에서 하나의 매우 적합한 반복 모듈은 KDFQGVTPLHIAAQSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 125), SEQ ID NO: 129 또는 SEQ ID NO: 133으로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다.
- [0115] 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 안키린 반복 모듈은 KDITGETPLHHAADSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 18) 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 여기에서 SEQ ID NO: 18의 9개까지의 아미노산 잔기들은 어떤 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며,
- 포지션 3의 I는 선택적으로 V에 의해 치환되고;
 - 포지션 6의 E는 선택적으로 D에 의해 치환되고;
 - 포지션 11의 H는 선택적으로 L에 의해 치환되고;
 - 포지션 14의 D는 선택적으로 Q에 의해 치환되고;
 - 포지션 15의 S는 선택적으로 H에 의해 치환되며; 및/또는
 - 포지션 19의 E는 선택적으로 V에 의해 치환되는 것을 특징으로 한다.
- [0122] 이 그룹의 하나의 매우 바람직한 반복 모듈은 KDTGDTPLHLAAQGHGLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 126), SEQ ID NO: 130 또는 SEQ ID NO: 134로 이루어진 아미노산 서열을 포함한다.
- [0123] 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 안키린 반복 모듈은, KDWEGETPLHLAAHTGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 21) 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 여기에서 SEQ ID NO: 21에서 9개까지의 아미노산 잔기들은 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며,
- 포지션 3의 W는 F에 의해 선택적으로 치환되고;

- [0125] · 포지션 4의 W는 Q에 의해 선택적으로 치환되고;
- [0126] · 포지션 6의 T는 I, Y 및 V로 이루어진 그룹; 바람직하게는 T;로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고;
- [0127] · 포지션 11의 L은 I 및 V로 이루어진 그룹; 바람직하게는 I 및 V;로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고
- [0128] · 포지션 14의 H는 H, Q, Y 및 W;로 이루어진 그룹; 바람직하게는 H;로부터 선택된 아미노산에 의해 치환되며; 및/또는
- [0129] · 포지션 15의 T는 A 및 D로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 제거된 또는 치환되는 것을 특징으로 한다.

- [0130] 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 안키린 반복 모듈은 KDTVGTPLHYAAEDGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 22) 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산을 포함하고, 여기에서 SEQ ID NO: 22의 9개까지의 아미노산 잔기들은 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며,
- [0131] · 포지션 3의 T는 S, K, E 및 I로 이루어진 그룹으로 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고; 동등한 아미노산 분포;
 - [0132] · 포지션 4의 V는 Q, I 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고; 바람직하게는 Y;
 - [0133] · 포지션 6의 T는 Q, F, R 및 W로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고;
 - [0134] · 포지션 11의 Y는 L, E 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고; 바람직하게는 S
 - [0135] · 포지션 14의 E는 S, Q, Y 및 V로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되며; 및/또는
 - [0136] · 포지션 15의 D는 S, F 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고;
 - [0137] · 포지션 16의 G는 D에 의해 선택적으로 치환되는 것을 특징으로 한다.

- [0138] 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 상기 안키린 반복 모듈은 KDVEGWTPHYAASSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 38) 및 서열들을 포함하는 아미노산을 포함하고, 여기에서 SEQ ID NO: 38의 9개까지의 아미노산 잔기들은 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며, 여기에서
- [0139] · 포지션 6의 W는 Q에 의해 선택적으로 치환되고;
 - [0140] · 포지션 11의 Y는 L에 의해 선택적으로 치환되고; 및/또는
 - [0141] · 포지션 15에서 S는 Y에 의해 선택적으로 치환되는 것을 특징으로 한다.

- [0142] 또한 바람직하게는, 본 발명에 따른 안키린 반복 모듈은 KDWRGFTPLHYAAYLGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO: 46) 및 서열들로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, SEQ ID NO: 46의 9개까지의 아미노산 잔기들은 어떤 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환되며,
- [0143] · 포지션 3의 W는 W, T, V 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고; 바람직하게는, T 및 R
 - [0144] · 포지션 4의 R은 R, T 및 I;로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산에 의해 선택적으로 치환되고; 바람직하게는 I;
 - [0145] · 포지션 6의 F는 F 또는 H;에 의해 선택적으로 치환되고; 바람직하게는 F;

- [0146] · 포지션 11의 Y는 R에 의해 선택적으로 치환되고;
- [0147] · 포지션 14의 Y는 F에 의해 선택적으로 치환되고;
- [0148] · 포지션 15의 L은 V에 의해 선택적으로 치환되며; 및/또는
- [0149] · 포지션 17의 H는 Q에 의해 선택적으로 치환되는 것을 특징으로 한다.

[0150] 바람직하게는, SEQ ID N0s:16, 18, 28, 31, 21, 22, 38 및/또는 46 중 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 잔기들은 어떤 다른 아미노산 잔기들에 의해 치환된다.

[0151] 더욱이, 상기 결합 단백질은 폴리펩타이드를 포함하는 것이 특히 선호되는데, 여기에서 상기 폴리펩타이드는 제1 및 제2 안키린 반복 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 83 내지 98, 102, 103, 122, 123 및 136 내지 141로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드를 가지고, 적어도 70%의 아미노산 서열 개체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0152] 바람직하게는, 상기 폴리펩타이드는, SEQ ID N0s: 83 내지 98, 102, 103, 122, 123 및 136 내지 141로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드를 가지고, 적어도 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 %의 아미노산 서열 개체를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0153] 또한 바람직하게는, 그러한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 98, 102, 103, 122 및 123, 더 바람직하게는 85, 86, 87, 90, 91, 92, 102, 103, 122 및 123, 훨씬 더 바람직하게는 86, 87, 91 및 92; 및 가장 바람직하게는 86 및 87로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0154] 또 다른 바람직한 실시예에 따르면, 상기 제1 및 제2 안키린 반복 도메인들의 안키린 반복 모듈의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들은 안키린 반복 단위(unit)의 정렬에 상응하는 포지션에서 위치한 아미노산 잔기에 의해 치환된다.

[0155]

[0156] 본 발명의 다른 실시예는, 상기 기재에 따라 적어도 하나의 결합 단백질 또는 특이한 안키린 반복 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 모듈을 제공한다. 뿐만 아니라, 상기 뉴클레오티드 모듈을 포함하는 벡터가 고려된다.

[0157] 본 발명에 따른 모든 결합 구성들이 폴리펩타이드들 및 단백질들을 포함하는 것은 아니다. 다음 실시예는 그러한 것들만 관련된다. 이러한 이유로, 출원인은 여기의 모든 뉴클레오티드 문자들이 그들을 암호화할 수 있다는 것을 밝히는 것을 삼가는데 왜냐하면, 유전자 코드의 축퇴로 인해, 많은 뉴클레오티드 문자들은 하나 및 동일한 폴리펩타이드 및 단백질을 위해 암호화할 수 있기 때문이다.

[0158] 그러나, 주어진 뉴클레오티드 문자들이 주어진 폴리펩타이드 또는 단백질을 위해 암호화를 하는지 여부는 명백하고 (unequivocally) 분명하게 (unambiguously) 결정된다. 그러므로 본 발명의 실시예는 숙련된 당업자에게 명확하며, 그것의 범위는 매우 쉽게 결정된다.

[0159] 본 발명의 또 다른 실시예는, 다음의 적어도 하나를 억제하기 위해 상기 기술한 것을 따르는 결합 단백질의 용도를 제공한다.

- [0160] · HER2-수용체 이합체화,
- [0161] · HER2/HER3-이형 이합체,

- [0162] · HER2-수용체 자기인산화,
- [0163] · HER-수용체 매개 신호전달.
- [0164] · HER3-수용체 리간드 유도 인산화, 및/또는
- [0165] · HER3-수용체 매개 신호 전달
- [0166] HER2-수용체 이합체화(또한 “이형이합체”라고도 불린다)는 리간드와 독립적으로 HER2 과다발현 조직들에서 발생한다. 상기 이형이합체는, 예를 들어 증가된 세포 증식을 결국 이끌어낼 수 있는 내부세포 자기인산화로 이끈다.
- [0167] HER3는 내재적 키나아제 활성(activity)이 부족하기 때문에, HER2/HER3 이형이단위체(heterodimers)가 형성된 후에, HER3는 HER2-과다발현 유방암 내에서 인산화되고, 이것은 결국 예를 들어, 세포 자멸 억제를 야기한다.
- [0168] 상기 용도는 세포 외 또는 세포 내에서 일어날 수 있다. 위에서 말한 것처럼, 모든 이러한 프로세스들은 즉, 각각의 신호 전달 경로들의 활성(activating)에 의해 병원성 결과들을 가져온다. HER2 이합체화 및/또는 HER2/HER3-이형이합체에 의한 신호 전달 경로들은 미토겐-활성 단백질 키나아제(MAPK), 포스포이노시티드 3-키나아제 (PI3K/Akt), 포스포리파아제 C γ , 단백질 키아아제 C (PKC), 전사 신호 전달 인자 및 활성 인자 (STAT), 라스-맵 키나아제 경로 (Ras-Map kinase pathway) 및 mTOR 경로를 포함한다.
- [0169] 포스포이노시티드 3-키나아제 (PI3K/Akt) 경로는 예를 들어, 세포 자멸 차단(blocking)에 의해 세포 생존을 유지하는 임상 경로들 중 하나로 고려된다. 예를 들면, HER2/HER3-이형이합체에 의한 그것의 병적 활성 (pathologic activation)은 악성 증식으로 이끈다. (예, 실시예들을 보아라)
- [0170] 예를 들면 HER2-이형이합체에 의한 HER2의 병적 활성화는 악성 세포 이동, 침습, 증식 (예, 실시예를 보아라; Hynes NE. and Lane HA., Nat. Rev. Cancer., 5,341-54, 2005)을 가져올 수 있다.
- [0171] 본 발명의 또 다른 실시예는 상기 기재에 따르면 결합 단백질 또는 약학적 형성 또는 구성을 포함하며, 선택적으로 약학적으로 수용 가능한 운반체들 및/또는 희석제들을 제공한다.
- [0172] 약학적으로 수용 가능한 운반체 및/또는 희석제들은 종래 기술에 숙련된 당업자들에게 알려져 있고, 아래에서 더 자세하게 설명 한다.
- [0173] 더욱이, 하나 또는 그 이상의 상기 설명한 재조합 결합 단백질들, 특히 반복 도메인들을 포함하는 결합 단백질을 포함하는 진단 조성물이 고려된다.
- [0174] 약학적 제재는 위에서 설명한 것처럼 재조합 결합 단백질들 및 예를 들면, 레밍턴의 제약 과학 16판, 오솔, A. Ed. [1980] (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osoi, A. Ed. [1980])에서 언급한 것처럼 약학적으로 수용 가능한 운반체, 첨가제 또는 안정화제(stabilizer)를 포함한다.
- [0175] 숙련된 당업자에게 알려진 적합한 운반체들, 첨가제들, 안정화제들은 식염수(saline), 링거 용액(Ringer's solution), 엑스트로스 용액, 행크 용액(Hank's solution), 불활성유, 올레인산 에틸, 식염수(saline) 속 5% 엑스트로스, 등장성(isotonicity) 및 화학적 안정성을 강화시키는 물질들, 베퍼들 및 보존액들이다.
- [0176] 다른 적합한 운반체들은 단백질들, 다당류들, 폴리유산들, 폴리글리콜산, 아미노산 중합체들 및 아미노산 혼성 중합체들과 같은 조성물을 수용하는 개개인들에게 유해한 항체의 생산을 그것 스스로 유도하지 않는 어떠한 유도체를 포함한다.
- [0177]
- [0178] 세포 내 투여를 위해 사용된 제재는 무균(aseptic) 또는 살균(sterile)되어야 한다. 이것은 멸균 여과막 (sterile filtration membrane)을 통한 필터링에 의해 쉽게 이루어진다. 약학적 제재는 그 기술의 숙련된 기술자에게 알려진 지식 내의 어떠한 적합한 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0179] 더욱이, 본 발명의 다른 실시예에서, 약제로서 위 제시에 따른 적어도 하나의 결합 단백질, 조성물 또는 약학적 제재의 용도가 제공된다. 이와 같이, 환자들을 위한 전술한 청구항에 따른 결합 단백질, 조성물 또는 약학적 제재의 투여를 포함하는 프로세스가 제공된다. 두 경우 모두에서, 치료되기 위한 질병은 종양 질환, 바람직하게는 암에 선호된다.

[0180] 각 경우에서, 전술한 청구항에 따른 결합 단백질, 조성물 또는 약학적 제재의 효과적인 양은, 바람직하게는 질병 치료를 위해 환자들에게 투여된다.

[0181] 여기서 사용된 것과 같이, 용어 “종양성 질환(neoplastic disease)”은, 급격하게 증식하는 세포 성장 또는 종양에 의해 특성화된 세포들 또는 조직의 비정상적인 상태 또는 조건에 관련된다. 더 특별한 의미에서, 그 용어는 예를 들어 종양들 및/ 또는 백혈병의 암 프로세스(cancerous processes)에 관련된다.

[0182] 본 발명에 따른 결합 단백질들은 세포 자멸 및 항 항증식 효과들을 보여주었다(실시예 부분을 보아라). 종양성 질환이 종종 세포 자멸의 억제(suppression) 및/또는 증가된 증식에 의해 특징지어지기 때문에, 이러한 실험들로부터 본 발명에 따른 결합 단백질들이 종양성 질환들의 치료에 사용될 수 있다는 것이 추론될 수 있다.

[0183] 바람직하게는, 상기 종양성 질환은 적어도 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나에 의해 특징지어지는 질병이다.

[0184] · HER2 암호화 유전자의 증폭

[0185] · HER2 암호화 유전자의 과다 발현,

[0186] · HER2의 암호화 유전자의 변형된 형태의 발현, 및/또는

[0187] · 트라스트주맙 저항 종양들 내에서 Her3 암호화 유전자의 과다 발현

[0188] 인간들 내에서, HER2는 ERBB2유전자에 의해 암호화된다. 상기 선택사항들은, 현재 시중에, 현대 분자 진단(modern molecular diagnostics)의 수단에 의해 발견될 수 있는 ERBB2 유전자 내 변형에 속하는 것으로 생각할 수 있다.

[0189] 여기에서 사용된 것과 같이, 용어 "HER2 암호화 유전자의 발현"은 예를 들어, 면역조직화학(IHC)에 의해 검출되는 것처럼, HER2 수용체 단백질을 발현하는 세포들, 조직들 또는 기관들과 관련된다. 여기에서 사용된, 용어 "암호화 유전자의 증폭 또는 과다발현"은 세포, 조직 또는 기관의 HER2 수용체 단백질의 이상 수준의 발현으로 나타나는 것과 관련되며, 예로서 면역조직화학(IHC)에 의해 검출되는, 정상적인 세포, 조직 또는 기관의 발현의 수준과 관련된다.

[0190] 그러한 IHC 검출 실험들은, 임상 실험 평가 (CTA), 상업적으로 이용 가능한 LabCorp 4D 시험 및 그러한 IHC 검출 분석, 및 상업적으로 이용 가능한 DAKO HercepTest® (DAKO, Carpinteria, Calif.)를 포함하는 기술에서 알려져 있다. 후자 분석은 HER2 단백질의 과다발현을 포함하는 암들을 확인하기 위해 0 내지 3+ 세포 염색의 특정한 점수 범위를 이용한다. (0은 정상적인 발현, 3+는 가장 센 양성 발현을 제시.)

[0191] 그러므로, 1+, 2+, 또는 3+, 바람직하게는 2+ 또는 3+, 더 바람직하게는 3+ 범위의 HER2단백질의 과다 발현에 의해 특성화된 암을 포함하는 환자들이 본 발명의 치료 방법으로부터 효과를 볼 수 있다.

- [0192] 다르게, HER2 발현 및/또는 과다발현 점수들은 또한 동소 보합(In Situ hybridization), RT-PCT 및 다른 방법들에 의해 검출될 수 있다.
- [0193] 특히 바람직한 실시예에 따르면, 상기 종양 질병은 적어도 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나이다.
- [0194] · 유방암
- [0195] · 난소암
- [0196] · 위암(gastric cancer)
- [0197] · 위암(stomach cancer) 및/또는
- [0198] · 자궁암
- [0199] · 직장암
- [0200] 더욱이, 상기 사용은, 조정된 방식으로(in a coordinated fashion), 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 활성 물질의 투여에 의해서 바람직하게 보완된다.
- [0201] · 항신생물제
- [0202] · 내분비계 약물
- [0203] · 종양 백신
- [0204] · 면역 요법, 및/또는
- [0205] · 세포 요법
- [0206] 여기에서 사용된, 용어 "조정된 방식"은 주어진 투여법 아래에서 이행되는 협동-투여를 말한다.
- [0207] 이것은 다른 화합물에 동시적인 투여(synchronous administration) 뿐 아니라 시간차 투여(time-shifted administration)를 포함한다. (예를 들어, 화합물 A가 일단 주어지고, 화합물 B는 그 후에 여러 번 주어지고, 또는 그 반대로 주어지고, 또는 두 화합물들이 동시에 주어지고 둘 중 하나가 또한 다음 단계들에서 주어진다.)
- [0208] 여기에서 사용된, 용어 "항신생물제"는 항종양성 또는 항암 효과들을 가진 약물, 또는 약물의 혼합과 관련된다. 이것은 무엇보다도, 유사분열을 손상시키는 것, 효과적으로 패스트-다이빙 셀들(fast-diving cells)을 타겟팅하는 것, 또는 세포가 세포자멸을 겪는 것을 야기하는 것에 의해 작동하는 화학요법제에 적용된다. 화학요법제들의 대부분은 알킬화제들, 항대사물질들, 안트라사이클린, 식물(plant) 알칼로이드들, 토포이소머라제 억제제들, 및 다른 항종양제들로 나뉘질 수 있다.
- [0209]
- [0210] 바람직한 항신생물제들은 5-플루오로아실, 악티노마이신, 아드리아마이신, 암사크린, 아스라사이클린, 아자티오프린, 벤다무스틴, 블레오마이신, 카보플라틴, 클로람부실, 시스플라틴, 사이클로포스포아마이드, 다우노마이신, 독세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포사이드, 이타루비신, 이포스파마이드, 이리노테칸, 메클로레타민, 메르캅토퓨린, 메토트랙사트, 마이토마이신, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 폴리카마이신, 포도필로톡신, 테니포시드, 토포테칸, 발루비신, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빙크리스틴, 빙데신, 및/또는 비노렐빈이다.
- [0211] 면역 요법은, 암 세포들을 사멸하는 면역 반응을 자극하는 것을 바라며, 암 세포들로부터 단백질들을 분리(isolation) 및 그 단백질들에 대항하는 암 환자들의 암 세포들의 차후 면역(subsequent immunization)을 포함한다. 치료 상의 항암 백신 접종을 위한 다른 접근은, 환자에게 본연의(in situ) 면역 반응을 생성하는 것이다. 이것은 결과적으로, 환자 본연의 특이적 항-종양 백신을 제공하는 용해성 바이러스 복제를 따라 방출된 종양 암티젠을 위한 항-종양 면역 반응을 강화시킨다.

- [0212] 그러나 또 다른 접근은 암 발생에서 생리학적 역할을 하는 화합물을 가지고 환자들을 면역화하여, 인간 몸이 상기 화합물을 제거하는 것이다.
- [0213] 타겟 약물들은, 급격한 세포 분할을 단순히 방해하는 것(예. 전통적인 화학요법)보다는, 발암 및 종양 성장에 필요한 특이적 타겟 분자를 방해하는 것에 의해 암 세포들의 성장을 막는 약제의 형태이다. 타겟 치료요법의 주요 카테고리들은 작은 분자들 및 단일 클론 항체들이다.
- [0214] 이러한 정의에 해당되는 작은 분자들은, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 이마티닙, 제피티닙, 엘로티닙, 보르테조닙, Bcl-2 억제제들 (예. 오바토클락스, ABT-263, 및 고시풀), PARP 저해제들 (예. 이니피립, 올라파립), 야누스 키나아제 억제제들, PI3K 억제제들, 아파티닙, mTOR 억제제들 (예베로리 무스), AN-152, AKT-억제제들, HDAC inhibitors, 프로티좀 억제제들, [D-Lys(6)]- LHRH에 연결된 독소루비신]- LHRH, 페가타닙, 수니티닙, 소라페닙, 티보자닙 및 파조파닙을 포함하나, 한정되지 않는다. 이 정의에 해당되는 단일 클론 항체들은, 리툭시맙, 트라스트주맙, 트라스트주맙-TDM1, 퍼투주맙, 세툭시맙 및 베바시주맙을 포함하나, 한정되지 않는다.
- [0215] 여기서 사용된 내분비 약물들은, 호르몬 또는 호르몬 수용체들에 길항적이어서, 성장에 호르몬을 요구하는 암 형태들을 방해한다. 그러한 내분비 약물의 하나의 예는 가슴 조직에서 에스트로겐 유도체의 길항제인 타목시펜이다.
- [0216] 여기서 사용된 용어 "세포 요법"은 변형 또는 변형되지 않은, 세포 독성 림프구들 또는 수지상 세포들의 입양 전달(adoptive transfer)과 같은 세포-기반 치료법들과 관련된다.
- [0217] 여기서 사용된, 용어 "종양 백신들"은, a) 암-유발 바이러스들(구강(viral) 감염에 대항하는 다른 백신들과 유사한 활동 모드)로 감염을 막거나, b) 존재하는 암을 치료하거나 (치료상의 암 백신들) 또는 c) 암의 성장을 막거나, 또는 그것의 영향을 개선하는 (예방을 위한 암 백신들) 백신들 중 하나를 말한다.
- [0218] 그것에 추가 또는 대안적으로, 상기 사용은, 바람직하게는, 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 다른 치료에 의해 조정된 방식으로 보완된다.
- [0219] · 방사선 치료
 - [0220] · 수술, 및/또는
 - [0221] · 레이저 절제술(ablation)
- [0222] 더욱이, 인간 또는 동물 환자(subject)의 치료 방법은 위의 공지에 따른 사용을 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 치료 방법은 위에서 제시된 것 같은 지시(indication)과 관련된다. 그 방법은 이것들을 필요로 하는 인간 또는 동물들에게, 본 발명의 재조합 결합 단백질의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 것을 포함한다.
- [0223] 본 발명에 따른 재조합 결합 단백질 또는 안키린 반복 도메인은, 박테리오파지들(WO 1990/002809, WO 2007/006665)의 표면의 디스플레이, 박테리아 세포들 (WO 1993/ 010214). 리보좀 디스플레이(WO 1998/048008), 플라스미드 상의 디스플레이(WO 1993/008278) 또는 공유 결합의 RNA-반복 단백질 하이브리드 구조체들 (WO 2000/032823), 또는 단백질 상보적 측정에 의한 것과 같은 세포 내 발현 및 선택/ 스크리닝(WO 1998/341120)과 같은 여러 가지 방법들에 의해 수득될 수 있고 및/또는 더 발달(evolve)될 수 있다. 그러한 방법들은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있다.

- [0224] 본 발명에 따른 재조합 결합 단백질 또는 안키린 반복 도메인의 선택/ 스크리닝을 위해 이용되는 안키린 반복 단백들의 라이브러리는, 이 기술에 숙련된 당업자들에게 알려진 프로토콜들에 의해 얻을 수 있다.(WO 2002/020565, Binz, H.K., et al., J. Mol. Biol., 332, 489-503, 2003, 및 Binz 등., 2004, 인용). HER2의 세포 외 영역에 특이성을 가진 안키린 반복 도메인들의 선택을 위한 그러한 라이브러리의 사용은 실시예 1에 예시되어 있다. 더욱이, 본 발명의 안키린 반복 도메인들은 표준 재조합 DNA 기술들(예. WO 2002/020565, Binz 등., 2003, 인용. 및 Binz 등., 2004, 인용)을 사용한 본 발명에 따른 안키린 반복 모듈들 및 적합한 캡핑 모듈들 또는 캡핑 반복들(capping repeats) (Forrer, P., 등., FEBS letters 539, 2-6, 2003)로부터 모듈식으로 조립될 수 있다.
- [0225] 본 발명은 실시예들에서 기재된 바람직한 실시예들에 제한되지 않는다. 다른 출처들은 아래에 기재된 일반적인 개요들을 따라 사용되거나, 처리될 수 있다.
- [0226] 정의
- [0227] 용어 “단백질”은, 폴리펩타이드를 말하고, 여기에서 폴리펩타이드의 적어도 일부분은, 그들의 폴리펩타이드 사슬(들) 내 및/ 또는 사이의 secondary, tertiary, or quaternary 구조들을 형성하는 것에 의해, 정의된 3-차원 배열을 포함하거나, 획득할 수 있다. 만약 단백질이 두 개의 또는 그 이상의 폴리펩타이드들을 포함한다면, 각각의 폴리펩타이드 체인들은, 예를 들면 두 개의 폴리펩타이드들 사이의 이황화물 결합에 의해 비-공유 결합 또는 공유결합으로 연결될 수 있다.
- [0228] secondary 또는 tertiary 구조들을 형성하는 것에 의해, 정의된 3-차원 배열을 각각 포함하거나 요구할 수 있는 단백질의 부분은, “단백질 도메인”으로 칭한다. 그러한 단백질 도메인들은 이 기술에 숙련된 전문가들에게 잘 알려져 있다.
- [0229]
- [0230] 재조합 단백질, 재조합 단백질 도메인, 재조합 결합 단백질 및 유사한 것들에서 사용된 용어 “재조합”은, 관련 기술에서 숙련된 전문가에 의해 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술의 사용에 의해 생산된다. 예를 들면, 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 DNA 모듈은(예, 유전자 합성에 의해 생산된) 박테리아 발현 플라스미드(예. pQE30, Qiagen), 효모 발현 플라스미드 또는 포유류 발현 플라스미드에 복제화될 수 있다. 예를 들어, 그렇게 구축된 재조합 박테리아 발현 플라스미드가, 적합한 박테리아(예. 대장균(Escherichia coli)에 삽입되었을 때, 이 박테리아는 이 재조합 DNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드를 생산할 수 있다. 상용하게 생산되는 폴리펩타이드는 재조합 폴리펩타이드라고 불린다.
- [0231] 본 발명의 문맥에서, 용어 “폴리펩타이드”는 하나 또는 그 이상의 다수의 사슬들 즉, 둘 또는 그 이상의, 펩타이드 결합들을 통해 연결된 아미노산들을 포함하는 분자와 관련된다. 바람직하게는, 폴리펩타이드는 펩타이드 결합을 통해 연결된 8개 이상의 아미노산들을 포함한다.
- [0232] 용어 “폴리펩타이드 태그”는 폴리펩타이드/단백질;에 부착된 아미노산 서열과 관련되고, 여기에서 상기 아미노산 서열은 상기 폴리펩타이드/단백질의 정체, 검출, 또는 표적화를 포함하며, 또는 상기 아미노산 서열은 폴리펩타이드/단백질의 물리화학적 거동(behavior)을 향상시키는 특징을 포함하고, 또는 상기 아미노산 서열은 이펙터(effectector) 기능을 포함한다.
- [0233] 결합 단백질의 개별 폴리펩타이드 태그들, 모이어티들 및/또는 도메인들은 서로 직접적 또는 폴리펩타이드 링커들을 통해 연결될 수 있다. 이들 폴리펩타이드 태그들은 이 기술에 잘 알려져 있고, 이 기술에 숙련된 당업자들에게 충분히 이용가능하다. 폴리펩타이드 태그들의 예들은 소형 폴리펩타이드 서열들인데, 예를 들면, His (예. the His-tag of SEQ ID NO: 6), myc, FLAG, Strep-태그들 또는 상기 폴리펩타이드/단백질의 검출을 허용하는 효소들(예를 들면 효소 유사 알칼리성 포스파타제)의 모이어티들, 또는 표적화 (면역글로불린 또는 그의 단편들

과 같은) 및/또는 이펙터 분자들에 대해 사용할 수 있는 모이어티들이다.

[0234] 용어 “폴리펩타이드 링커”는 예를 들어, 폴리펩타이드 태그 및 단백질 도메인, 단백질 도메인 및 폴리에틸렌 글리콜 또는 두 개의 서열 태그들과 같은 비-폴리펩타이드 모이어티와 연결할 수 있는 아미노산 서열을 말한다. 그러한 부가적인 도메인들, 태그들, 비-폴리펩타이드 모이어티들 및 링커들은 관련 기술에 잘 알려진 당업자에게 알려져 있다. 예시의 목록은 특히 출원서 WO 2002/020565의 상세한 설명에 제공되어 있다. 그러한 링커들의 특별한 예시들은 다양한 길이의 글리신-세린-링커들 및 프롤린-트레오닌-링커들이다; 바람직하게는, 상기 링커들은 2 내지 24개 아미노산 사이의 길이를 갖고; 더 바람직하게는, 상기 링커들은 2 내지 16개 아미노산들의 길이를 갖는다. 글리신-세린-링커들의 예시들은 SEQ ID NO: 7 내지 10에서 제공받고, 프롤린-트레오닌-링커들의 예시는 SEQ ID NO: 11 및 12에서 제공받는다. 바람직하게는, SEQ ID NO: 11의 프롤린-트레오닌-링커들은 GS에 의해 선행되거나 및/또는 GS가 뒤따른다.

[0235] 용어 “폴리머 모이어티”는 단백질 폴리머 모이어티 또는 비-단백질 폴리머 모이어티를 말한다. “단백질 폴리머 모이어티”는 바람직하게 안정한 tertiary 구조를 형성하지 않는 폴리펩타이드이다. 단백질 폴리머 모이어티들의 실시예들은 XTEN® (Amunix에 등록된 상표; WO 2007/103515) 폴리펩타이드들, 또는 WO 2008/155134에서 기술된 프롤린, 알라닌 및 세린 잔기들을 포함하는 폴리펩타이드들이다. 그러한 단백질 폴리머 모이어티들은, 예를 들어, 표준 DNA 클로닝 기술들을 사용하여 유전자 융합 폴리펩타이드들(genetic fusion polypeptides)을 생성 및 이어지는 그들의 표준 발현 및 정제에 의해 본 발명의 반복 도메인에 공유결합으로 부착될 수 있다. “비-단백질성 폴리머 모이어티”는 폴리펩타이드들로부터 형성되지 않는다. 비-단백질성 폴리머 모이어티들의 예시들은 하이드록시에틸 스타치(HES), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌이다. 용어 “PEGylated”는, PEG 모이어티가 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드와 공유결합하게 부착하는 것이다. 본 발명의 폴리머 모이어티는 분자량이 폭넓게 변화한다. 바람직하게는, 상기 폴리머 모이어티는 폴리펩타이드 링커에 의해 반복 도메인에 연결된다.

[0236] 구체적인 실시예에서, 여기에 진술한 것과 같이 PEG 모이어티 또는 어떤 다른 비-단백질 폴리머는, 예를 들어, 반복 도메인의 N- 또는 C-말단에 웨타이드 링커를 통해 커플링(coupled)되는 시스테인을 가진 말레이미드 링커를 통해 카제인 티올과 커플링(coupled)될 수 있다.

[0237] 용어 “결합 단백질”은, 아래에 더 기재된 것과 같이, 하나 또는 그 이상의 결합 도메인들, 하나 또는 그 이상의 생물활성 화합물들 및 하나 또는 그 이상의 폴리머 모이어티들을 말한다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 4 개까지의 결합 도메인들을 포함한다. 더욱이, 어떤 그러한 결합 단백질은, 결합 도메인들, 다중화(multimerization) 모이어티들, 폴리펩타이드 태그들, 폴리펩타이드 링커들 및/또는 단일의 Cys 잔기가 아닌 추가적인 단백질 도메인들을 포함한다.

[0238] “다중화(multimerization) 모이어티들”的 실시예들은, 짹을 이루어 기능적 면역글로불린 Fc 도메인들을 제공하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역들(immunoglobulin heavy chain constant region), 및 루신 지퍼 또는 2개의 그러한 폴리펩타이드 사이에서 분자 간 이황화 결합을 형성하는 자유 티올(free thiol)을 포함하는 폴리펩타이드들이다.

[0239] 단일 Cys 잔기는 예를 들어, 이 기술에 숙련된 당업자에 의해 잘 알려져 있는 말레이미드 화학을 이용함으로써, 폴리펩타이드에 다른 잔기들을 결합(conjugate)시키는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 결합 단백질은 재조합 결합 단백질이다. 또한 바람직하게는, 결합 단백질의 결합 도메인들은 다른 타겟 특이성들을 보유한다.

[0240] 용어 “결합을 위한 경쟁(compete for binding)”은 동일한 타겟에 개별적으로 결합할 수 없지만, 동일한 타겟에 동시적으로 결합하는 본 발명의 2개의 다른 결합 도메인들의 불능(inability)을 의미한다. 그러므로, 그러한 2개의 결합 도메인들은 상기 타겟의 결합을 위해 경쟁한다. 바람직하게는, 상기 두 개의 경쟁하는 결합 단백질

은 상기 타겟에 중첩 또는 동일한 결합 에피토프에 결합한다. 두 개의 결합 단백질이 타겟에 결합을 위해 경쟁 하는지 여부를 측정하기 위한 경쟁 병소 감염 진단 테스트(ELISA) or 경쟁 SPR 측정기 (예. BioRad의 Proteon 측정도구 사용에 의해)와 같은 방법들은, 이 기술의 전문가에게 잘 알려져 있다.

[0241] 용어 “멀티파라토픽 결합 단백질”은 동일한 타겟 단백질에 위치하는 두 개의 또는 그 이상의 다른 에피토프들에 향하는(directed against) 결합 단백질을 의미한다. 예를 들어, HER2 타겟하는 멀티파라토픽 결합 단백질은 적어도 HER2의 제1 에피토프를 타겟하는 제1 결합 도메인, HER2의 다른 제2 에피토프에 타겟하는 제2 결합 도메인, 및 선택적으로 HER2의 다른 에피토프들에 타겟하는 추가의 결합 도메인을 포함한다.

[0242] 용어 “바이파라토픽 결합 단백질”은 동일한 타겟 단백질에 위치된 두개의 다른 에피토프들에 향하는(directed against) 결합 단백질을 의미한다. 예를 들어, HER2에 타겟하는 바이파라토픽 결합 단백질은 적어도 HER2에 제1 에피토프에 타겟하는 제1 결합 도메인 및 HER2에 다른 제2 에피토프에 타겟하는 제2 결합 도메인을 포함한다.

[0243] 상응하게, “바이파라토픽 DARPin”은, 제1 에피토프에 대한 제1 결합 도메인과, 동일한 타겟 분자의 다른 제2 에피토프에 대한 제2 결합 도메인을 포함한다.

[0244] 용어 “생물활성 화합물”은 상기 질병을 갖는 포유류에 적용되었을 때 질병을 변형하는 화합물을 말한다. 생물 활성 화합물은 길항(antagonistic) 또는 작용물질(agonistic) 특성을 포함할 수 있고, 또는 단백질성 생물활성 화합물 또는 비-단백질성 생물활성 화합물일 수 있다. 그러한 단백질성 생물활성 화합물은 예를 들어, 표준 DNA 클로닝 기술들, 유전자 융합 폴리펩타이드들을 생성하는 것에 의한 본 발명의 결합 도메인과 공유결합으로 부착될 수 있고, 이어서 그들의 표준 발현 및 정제될 수 있다. 그러한 비-단백질 생물 활성 화합물들은 화학적 수단에 의해, 예를 들어, 여기서 기술한 것과 같이, 결합 도메인의 N- 또는 C-말단에 웹타이드 링커를 통하여 결합(coupled)되는 시스테인을 가지고 말레이미드 링커를 통해 시스테인 티올에 커플링하는 것에 의해, 예를 들어, 본 발명의 결합 도메인에 공유 결합적으로 부착될 수 있다. 단백질성 생물활성 화합물의 예시들은 뚜렷한 타겟 특이성 (예. 그것을 결합하는 것에 의해 성장 인자를 중화하는 것), 사이토카인 (예. 인터루킨), 성장 인자들 (예, 인간 성장 호르몬), 항체 및 그들의 단편들(fragments), 호르몬들(예. GLP-1) 및 어떤 가능한 단백질성 약물을 포함한다. 비-단백질성 생물활성 화합물들의 예시들은, 톡신(예. ImmunoGen으로부터 DM1), 소 분자 표적화 GPCRs, 항생물질들 및 어떤 가능한 비-단백질성 약물을 포함한다.

[0245] 용어 “결합 도메인”은 단백질 스캐폴드(c)로써 동일한 “폴드(fold)” (3-차원의 배열)을 나타내는 단백질 도메인을 포함하고, 아래에서 정의된 것처럼, 미리 정해진 특성(predetermined property)을 가진다. 그러한 결합 도메인은 이 기술에 알려진 합리적인, 또는 가장 흔하게, 조합화학적 단백질 엔지니어링 기술들에 의해 얻어질 수 있다. (Binz 등., 2005, 인용.). 예를 들어, 미리 정해진 특성을 포함하는 결합 도메인은 (a)아래에서 더 정의된 것처럼 단백질 스캐폴드로써 동일한 폴드를 제공하는 것; 그리고 (b) 상기 다양한 컬렉션 스크리닝 및/또는 상기 미리 정해진 특성을 포함하는 적어도 하나의 단백질 도메인을 얻기 위한 상기 다양한 컬렉션으로부터 선택;의 단계를 포함하는 방법에 의해 수득될 수 있다. 단백질 도메인들의 다양한 컬렉션은 스크리닝 및/또는 사용된 선택 시스템에 따른 여러가지 방법들에 의해 제공될 수 있고, 및 과자 디스플레이 또는 리보솜 디스플레이 같은, 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려진 방법들의 사용을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 재조합 결합 도메인이다. 또한 바람직하게는, 상기 결합 도메인은 반복 단백질 또는 디자인된 반복 단백질이다.

[0246]

[0247] 따라서, 상기 사용된, 용어 “결합”은 주어진 타겟을 인식하고 결합하는 결합 도메인과 관련되지만, 다른 타겟을 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 의미에서 결합 도메인으로 자격을 갖춘 후보(candidate)에게는 PBS에서 10^{-7} M보다 작은 용해 상수가 요구된다.

[0248] 용어 "Kd"는 해리 상수와 관련되고, 복합물이 그들의 구성 분자들로 부서질때 더 작은 구성요소들로 가역적으로

분리하기(해리) 위한 더 큰 대상의 성향을 측정하는 구체적인 타입의 평형 상수이다.

[0249] 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 기반의 기술들(예. SPR 평형 분석) 또는 등온 적정 열량 측정법(isothermal titration calorimeter: ITC)과 같은 단백질-단백질 상호작용의 해리상수를 측정하는 방법들은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다. 만약 상이한 조건들(예, 염분 농도, pH) 하에 측정되었다면, 특정한 단백질-단백질 상호작용의 측정된 K_d 값들은 다양할 수 있다. 따라서, K_d 값의 측정은 바람직하게는 표준화된 단백질의 용액 및 PBS같은 표준화된 완충액을 사용하여 얻어진다.

[0250] 용어 “PBS”는 137 mM NaCl, 10 mM 인산염 및 2.7 mM KCl 을 포함하고 7.4의 pH를 가진 인산염 완충 수용액을 의미한다.

[0251] 용어 "단백질 스캐폴드"는 아미노산의 삽입; 치환 또는 결실에 매우 견딜 수 있는 노출된 표면 영역들을 가진 단백질을 의미한다; 본 발명의 결합 도메인들을 생성하는데 사용될 수 있는 단백질 스캐폴드의 예시들은 단일-사슬 Fv 또는 Fab 단편들, 황색포도상구균으로부터의 단백질 A, 큰흰나비로부터의 빌린 결합 단백질 또는 다른 리포칼린들, 안카린 반복 단백질들 또는 다른 반복 단백질들, 및 인간 파이브로네틴 같은 그들의 항체들 또는 단편들이다. 단백질 스캐폴드는 이 기술에 숙련된 당업자에게 알려져 있다.(Binz 등, 2005, 인용.; Binz 등., 2004, 인용.).

[0252] 용어 "타겟"은 핵산 분자, 폴리펩타이드 또는 단백질, 탄수화물 또는 기타 천연 산출 분자와 같은 개별 분자, 및 그러한 개별분자의 어떤 일부분을 포함하거나, 그러한 분자들의 둘 또는 그 이상의 복합체를 말한다. 타겟은 전체 세포 또는 조직 샘플일 수 있거나, 또는 어떤 비-천연 분자 또는 모이어티일 수 있다. 바람직하게는, 타겟은 예를 들면, 천연 또는 비-천연 인산화, 아세틸화, 또는 메틸화에 의해 변형된 화학적 변형들을 포함하는 천연 산출 또는 비-천연 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드들이다. 본 발명의 특별한 적용에서, 타겟은 HER2의 세포 외 영역이다.

[0253] 용어 “미리 측정된 특성(predetermined property)”은 타겟에 결합, 타겟을 블로킹, 타겟-매개 반응의 활성화, 효소 활성도, 및 관련된 다른 특성들과 같은 특성을 말한다. 원하는 특성의 유형에 따라, 당업자는 스크리닝을 실행하는 것을 위한 포맷 및 중요한 단계들 및/또는 원하는 특성을 얻기 위한 결합 도메인의 선택을 밝힐 수 있다. 바람직하게는, 상기 미리 측정된 특성은 타겟에 결합하는 것이다.

[0254] 반복 단백질들의 이하 정의들은 특히 출원서 WO 2002/020565에 기초한다. 특히 출원서 WO 2002/020565은 반복 단백질 모양들(feature), 기술들 및 적용들의 일반적인 서술을 더 포함한다.

[0255] 용어 "반복 단백질"은 하나 또는 그 이상의 반복 도메인들을 포함하는 단백질을 말한다. 바람직하게는, 각각의 상기 반복 단백질은 4개까지의 반복 도메인들을 포함한다. 더 바람직하게는, 각 상기 반복 단백질들은 2개 까지의 반복 도메인들을 포함한다. 매우 바람직하게는, 각 상기 반복 단백질들은 단지 하나의 반복 도메인을 포함한다. 더욱이, 상기 반복 단백질은 추가적인 비-반복 단백질 도메인들, 폴리펩타이드 태그들 및/또는 폴리펩타이드 링커들을 포함할 수 있다.

[0256] 용어 “반복 도메인”은 구조적인 단위들로서 두 개 또는 그 이상의 연속의 반복 단위들(도메인)을 포함하는 단백질 도메인을 말하는데, 여기에서 상기 구조적 단위들은 동일한 폴드를 포함하고, 긴밀하게 스택(stack)하여 조인트 소수성 코어를 갖는 고차나선형(superhelical) 구조를 생성한다. 바람직하게는, 반복 도메인은 N-말단 및/또는 C-말단의 캡핑 단위 (또는 모듈)을 더 포함한다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 N-말단 및/또는 C-말단 캡핑 단위들(또는 모듈들)은 캡핑 반복 서열(capping repeats)이다.

[0257]

용어 “디자인된 반복 단백질” 및 “디자인된 반복 도메인”은 각각, 특히 출원서 WO 2002/020565에 설명된 발명의 방법의 결과에 따라 얻어진 반복 단백질 또는 반복 도메인을 말한다. 디자인된 반복 단백질들 및 디자인된 반복 도메인들은 합성이며, 천연으로부터 생긴 것이 아니다. 그들은 상응하게 설계된 핵산을 발현시켜 얻은 각각 인간이 만든 단백질 또는 도메인이다. 바람직하게는, 발현은 박테리아 세포들과 같은 진핵 또는 원핵 세포들에서 실시되거나, 무세포(cell-free) 세포 내 발현 시스템을 사용하여 실시된다. 따라서, 디자인된 안키린 반복 단백질(즉, DARPin)은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는 본 발명의 재조합 결합 단백질에 상응한다.

[0258]

용어 “구조적 단위”는 서로 폴리펩타이드 사슬을 따라 서로 인접한 secondary 구조의 두 개 또는 그 이상의 세그먼트 사이에서의 3-차원 상호작용에 의해 형성되는 폴리펩타이드의 국소적으로 정렬된 부분(locally ordered part)을 말한다. 그러한 구조적 단위는 구조적 모티프를 나타난다. 용어 “구조적 모티프”는 적어도 하나의 구조적 단위에서 존재하는 secondary 구조 요소들의 3-차원 배열을 말한다. 구조적 모티프들은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다. 구조적 단위들 단독으로는 정의된 3-차원의 배열을 얻을 수 없다; 그러나 그들의 연속된 배열, 예를 들어 반복 도메인 중의 반복 모듈과 같은; 그들의 연속된 배열은 인접한 단위들의 상호 안정화를 유도하여 고차나선 구조를 이끈다.

[0259]

용어 “반복 단위”는 하나 또는 그 이상의 천연 산출 반복 단백질들을 포함하는 아미노산 서열을 말하는데, 여기에서 상기 “반복 단위들”은 다중 카피(copies)에서 발견되고, 단백질의 폴드를 결정하는 모든 상기 모티프에 공통되는 정의된 폴딩 토폴로지를 나타낸다. 그러한 반복 단위들은 Forrer 등., 2003, 인용에 의해 제시된 반복 도메인의 “반복 구조 단위들(반복서열)” 또는 Binz 등., 2004, 인용에 의해 기재된 반복 단백질의 “연속적인 상동 구조 단위들(반복서열)”에 상응한다. 그러한 반복 단위들은 프레임워크 잔기들과 상호작용 잔기들을 포함한다. 그러한 반복 단위들의 실시예들은 아르마딜로 반복 단위들, 로이신-풍부 반복 단위들, 안키린 반복 단위들, 테트라트리코펩타이드 반복 단위들, HEAT 반복 단위들, 및 로이신-풍부 변이체 반복 단위들이다. 두 개 또는 그 이상의 그러한 반복 단위들을 포함하는 천연 산출 단백질들은 “천연 산출 반복 단백질”이라고 말한다. 반복 단백질의 개별 반복 단위들의 아미노산 서열은 서로 비교했을 때, 상당한 수의 돌연변이들, 치환들, 부가들 및/또는 결실들을 가질 수 있으나, 여전히 실질적으로 반복 단위들의 일반적인 패턴, 또는 모티프를 유지한다.

[0260]

따라서, 용어 “안키린 반복 단위”는 예를 들면, Forrer 등., 2003, 인용에 의해 제시된 것처럼, 안키린 반복인 반복 단위를 의미할 것이다. 안키린 반복들은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이 용어 “안키린 반복 도메인”은 구조적 단위들로서 두 개 또는 그 이상의 연속적인 안키린 반복 단위들(모듈들)을 포함하는 반복 도메인을 말하며, 바람직하게는 N-말단 및/또는 C-말단 캡핑 단위(또는 모듈)이다.

[0261]

용어 “프레임워크 잔기”는 폴딩 토폴로지에 기여하는, 즉, 상기 반복 단위(또는 모듈)의 폴드에 기여하는, 또는 인접 단위(또는 모듈)과의 상호작용에 기여하는, 또는 반복 모듈의 상응하는 아미노산 잔기들을 말한다. 그러한 기여는 반복 단위(또는 모듈) 중에 다른 잔기들과 상호작용일 수 있고, 또는 폴리펩타이드 주체 형태에 영향일 수 있고, 이는 선형 폴리펩타이드들 또는 루프들을 형성하는 α -헬리스 or β -시트, 또는 아미노산 스트레이치들에서 발견된다.

[0262]

용어 “타겟 상호작용 잔기들”은 반복 단위들의 아미노산 잔기들, 또는 반복 모듈들의 상응하는 아미노산 잔기들을 말하며, 이들은 타겟 물질들과의 상호작용에 기여한다. 그러한 기여는 타겟 물질들과 직접적인 상호작용이거나, 또는 예를 들어 반복 단위(또는 모듈)의 폴리펩타이드 형태를 안정화 하는 것에 의해 다른 직접적으로 작용하는 잔기들 상에 대한 영향이, 직접작용성 잔기들과 상기 타겟의 상호작용을 허용하거나 향상하게 한다. 그러한 프레임워크 및 타겟 상호작용 잔기들은 X-선 결정학, NMR 및/또는 CD 분광학, 과 같은 물리화학적 방법들에 의해, 또는 구조적 생물학 및/ 또는 생물정보학의 전문가들에게 잘 알려진, 알려진 및 관계된 구조적 정보의 비교에 의한 구조적 데이터의 분석에 의해 확인할 수 있다.

- [0263] 바람직하게는, 반복 서열 모티프의 유도(deduction)에 사용되는 반복 단위들은 상동 반복 단위들이고, 여기에서 반복 단위들은 동일한 구조적 모티프를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 반복 단위들의 프레임워크 잔기들의 70% 이상은 서로 상동인 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 상기 반복 단위들의 프레임워크 잔기들의 80%이상이 상동이다. 매우 바람직하게는 상기 반복 단위들의 프레임워크 잔기들의 90% 이상이 상동이다. Fasta, Blast 또는 Gap과 같은 폴리펩타이드들 간 상동의 백분율을 측정하는 컴퓨터 프로그램들은 이 기술에 숙련된 당업자에게 알려져 있다. 더 바람직하게는, 반복 서열 모티프의 반복 단위들의 유도(deduction)에 이용되는 반복 단위들은 정의된 타겟에 선택된 반복 도메인들로부터 수득된 상동 반복 단위들이다.
- [0264] 용어 "반복 서열 모티프"는 하나 또는 그 이상의 반복 단위들 또는 반복 모듈들로부터 유래되는 아미노산 서열을 말한다. 바람직하게는, 상기 반복 단위들 또는 반복 모듈들은 동일한 타겟에 결합 특이성을 포함하는 반복 도메인으로부터 얻는다. 그러한 반복 서열 모티프들은 프레임워크 잔기 포지션들 및 타겟 상호작용 잔기 포지션들을 포함한다. 상기 프레임워크 잔기 포지션들은 반복 단위들(또는 모듈들)의 포지션들에 상응한다. 마찬가지로, 상기 타겟 상호작용 잔기 포지션들은 반복 단위들(또는 모듈들)의 타겟 상호작용의 위치에 상응한다. 반복 서열 모티프들은 고정된 포지션들 및 랜덤화된 포지션들을 포함한다. 용어 "고정된 포지션"은 반복 서열 모티프 중에서 아미노산 포지션을 말하고, 여기에서 상기 포지션은 특정한 아미노산으로 설정되었다. 가장 흔히, 그러한 고정된 포지션들은 특정 타겟에 특이적인 프레임워크 잔기들의 포지션들 및/또는 타겟 상호작용 잔기들의 포지션들과 상응한다. 용어 "랜덤화된 포지션"은 반복 서열 모티프 중에서 아미노산 포지션을 말하는데, 여기에서 두 개 또는 그 이상이 상기 아미노산 포지션에 허용되며, 예를 들어, 어떤 보통의 20개 천연 산출 아미노산이 허용되거나, 시스테인을 제외한 아미노산들, 또는 글리신, 시스테인 및 프롤린을 제외한 아미노산들과 같이, 20개의 천연 산출 아미노산들의 대부분이 허용된다. 가장 흔히, 그러한 랜덤화된 포지션들은 타겟 상호작용 잔기의 포지션에 상응한다. 그러나, 프레임워크의 몇몇의 포지션들은 또한 랜덤화될 수 있다.
- [0265] 용어 "풀딩 토폴로지"는 상기 반복 단위들 또는 반복 모듈들의 tertiary 구조를 말한다. 풀딩 토폴로지는 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. 예를 들어, 안키린 반복 단위/모듈은 β -turn으로 이루어지고, 이어서 두 개의 역평행 α -helices 및 loop는 다음의 반복 단위/모듈의 턴에 도달한다.
- [0266] 용어 "연속"은 반복 단위들 또는 반복 모듈들이 나란히(tandem) 배열된 배열을 말한다. 디자인된 반복 단백질들에서, 적어도 2, 대개는 약 2 내지 6, 바람직하게는 적어도 약 6, 흔히 20 또는 그 이상의 반복 단위들 (또는 모듈들)이 존재한다. 대부분의 경우에서, 반복 도메인의 반복 단위들 (또는 모듈들)은 고도의 서열 동일성(상응하는 위치들에서 동일 아미노산 잔기들) 또는 서열 유사성(아미노산 잔기가 상이하지만, 유사한 물리화학적 특성을 가짐)을 나타낼 것이고, 몇몇의 아미노산 잔기들은 강하게 보존되는 주요 잔기들(key residues)일 수 있다.
- [0267] 그러나, 반복 도메인의 상이한 반복 단위들 (또는 모듈들)아미노산 삽입 및/또는 결실, 및/또는 치환에 의한 고도의 서열 다양성은 반복 단위들(또는 모듈들)의 일반적인 풀딩 토폴로지가 유지될 수 있는 한 가능할 수 있다.
- [0268] X-선 결정학, NMR 또는 CD 분광학과 같은 이-화학적 수단에 의한 반복 단백질의 풀딩 토폴로지를 바로 측정하는 방법들은, 이 기술의 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다.
- [0269] 반복 단위 또는 반복 서열 모티프를 확인하고 결정하는 방법들 또는 상동 검색 (예. BLAST)와 같은 그러한 반복 단위들 또는 모티프들을 포함하는, 관련된 단백질들의 패밀리들을 확인을 위한 방법들은, 생물정보학의 분야에 잘 확립되어 있고, 이 기술의 전문가에게 잘 알려져 있다. 초기의 반복 서열 모티프를 정제하는 단계는 반복 공정을 포함할 수 있다.

- [0270] 용어 “반복 모듈들”은 천연 산출 반복 단백질들의 반복 단위들로부터 원래 유래한 디자인된 반복 도메인들의 반복된 아미노산 서열을 포함한다. 반복 도메인에 포함된 각 반복 모듈은 천연 발생 반복 단백질의 패밀리 또는 서브패밀리의 예를 들면, 아마딜로 반복 단백질들 또는 안키린 반복 단백질들의 패밀리의 하나 또는 그 이상의 반복 단위들로부터 유도된다. 더 바람직하게는, 반복 도메인에 포함된 각 반복 모듈은 예를 들면, 실시예 1에서 제시된 실시예에서, 타겟에서 선택된 반복 도메인들로부터 수득된 상동 반복 단위들로부터 유래된 반복 서열 모티프를 포함한다.
- [0271] 따라서, 용어 “안키린 반복 모듈”은 자연적으로 발생한 안키린 반복 단백질들의 반복 단위들로부터 유도된 반복 모듈을 의미한다. 안키린 반복 단백질들은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0272] “반복 모듈”은 상응하는 반복 모듈들(“고정된 포지션들”)의 모든 카페에 존재하는 아미노산 잔기들을 가진 포지션 및 상이한 아미노산 잔기들 또는 “랜덤화된” 아미노산 잔기들(“랜덤화된 포지션”)을 가진 포지션들을 포함할 수 있다.
- [0273] 용어 “캡핑 모듈”은 반복 도메인의 N- 또는 C-말단 반복 모듈 폴리펩타이드들을 말하는데, 여기에서 상기 캡핑 모듈은 상기 반복 모듈과 함께 고도의(tight) tertiary 상호작용(즉, tertiary 구조 상호작용)을 형성함으로써, 용매로부터 연속 반복 모듈과 접촉하지 않는 측에서 상기 반복 모듈의 소수성 코어를 차단하는 캡을 제공한다. 상기 N- 및/또는 C-말단 캡핑 모듈은 반복 단위 근처의 천연 산출 반복 단백질에서 찾을 수 있는 캡핑 단위 또는 다른 구조 단위이거나, 또는 그로부터 유도될 수 있다. “캡핑 단위”는 천연 산출 폴드된 폴리펩타이드를 말하는데, 여기에서 상기 폴리펩타이드는 반복 단위에 N- 또는 C-말단하게 융합되는 특정 구조적 단위로 정의되는 것을 특징으로 하고, 상기 폴리펩타이드는, 상기 반복 단위와의 tertiary 구조 상호작용을 형성함으로써, 상기 반복 단위의 소수성 코어를 일측에서 용매로부터 차단하는 캡을 제공한다. 바람직하게는 캡핑 모듈 및 캡핑 단위들은 캡핑 반복 서열이다. 용어 “캡핑 반복 서열”은, 상기 인접하는 반복 단위(또는 모듈)와 유사 또는 동일한 폴드를 갖거나 및/또는 상기 인접하는 반복 단위(또는 모듈)와 서열 유사성을 갖는 캡핑 모듈 또는 캡핑 단위를 말한다. 캡핑 모듈들 및 캡핑 반복서열들은 WO 2002/020565과 Interlandi 등., 2008 (인용)에 의해 기재되어 있다.
- [0274] N-말단 안키린 캡핑 모듈들 (예. N-말단 캡핑 리피트들)의 실시예들은 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 13, 14, 20, 26, 27 36, 40, 44, 45, 50, 54, 124, 128 및 132이고, 안키린 C-말단 캡핑 모듈 (예. C-말단 캡핑 리피트들)의 실시예들은 SEQ ID NO: 4, 5, 19, 24, 25, 33, 34, 35, 39, 43, 48, 49, 53 ,57, 127, 131 및 135이다.
- [0275] 예를 들어, SEQ ID NO: 13의 N-말단 안키린 캡핑 모듈은 포지션 1 내지 32로부터 아미노산에 의해 암호화되었고, SEQ ID NO: 19의 C-말단 캡핑 모듈은 포지션 99 내지 126으로부터 아미노산에 의해 암호화 된다.
- [0276] 본 발명에 따른 재조합 결합 단백질은 적어도 하나의 안키린 반복 도메인을 포함하는데, 여기에서 상기 안키린 반복 도메인은 HER2의 포유류 세포의 영역을 위한 결합 특이성을 포함한다.
- [0277] 상기 “타겟을 위한 결합 특이성을 갖는”, “타겟에 특이적으로 결합하는” 또는 “타겟 특이성” 및 유사한 것들은, 결합 단백질 또는 결합 도메인이 PBS 중에서 타겟에 대장균(E. coli) 말토오스 결합 단백질(MBP)과 같은 비관련 단백질에 비하여 더 낮은 해리 상수로 결합하는 것을 의미 한다. 바람직하게는, 타겟에 대한 PBS 중에서 해리 상수는, MBP에 대한 상응하는 해리 상수보다 적어도 10배, 더 바람직하게는 적어도 102배, 매우 더 바람직하게는 적어도 103배, 또는 가장 바람직하게는 적어도 104배 더 낮다.
- [0278] 용어 “컨센서스(consensus) 서열”은 아미노산 서열을 말하는데, 여기에서 상기 컨센서스 서열은 다수의 반복

단위들의 구조 및/또는 서열 정렬에 의해 수득된다. 두 개 또는 그 이상의 구조적 및/또는 서열 정렬된 반복 단위들의 사용과, 정렬 중에 갭을 허용하는 것은, 각 포지션에서 가장 빈번한 아미노산 잔기를 결정할 수 있다. 컨센서스 서열은 각 포지션에서 가장 빈번하게 나타나는 아미노산들을 포함할 수 있다. 두 개 또는 그 이상의 아미노산들이 각 단일 포지션에서 초과-평균으로 나타나는 경우, 컨센서스 서열은 그것들의 아미노산의 부분집합으로 포함될 수 있다. 상기 두 개 또는 그 이상의 반복 단위들은 단일 반복 단백질 중에 포함된 반복 단위들, 또는 두 개 또는 그 이상의 다른 반복 단백질들로부터 얻어진다.

[0279] 컨센서스 서열들 및 그들을 측정하는 방법들은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있다.

[0280] “컨센서스 아미노산 잔기”는 컨센서스 서열 중에 특정 포지션에서 발견된다. 만약 두 개 또는 그 이상, 예를 들어 세 개, 네 개, 다섯 개, 아미노산 잔기들이, 상기 두 개 또는 그 이상의 반복 단위들에 유사한 가능성을 가지고 발견된다면, 컨센서스 아미노산은 매우 빈번하게 발견되는 아미노산들 또는 상기 두 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기들의 혼합 중 하나일 수 있다.

[0281] 더 바람직하게는, 비-자연적으로 발생하는 캡핑 모듈들, 반복 모듈들, 결합 단백질들 또는 결합 도메인들이다.

[0282] 용어 “비-천연 산출”은 합성의 또는 천연으로부터가 아닌, 더 구체적으로는, 그 용어는 인간의 손으로부터 만들어진 것을 의미한다. 용어 “비-천연 산출 결합 단백질” 또는 “비-천연 산출 결합 도메인”은 상기 결합 단백질 또는 상기 결합 도메인이 합성 (예. 아미노산으로부터 화학적 합성) 또는 재조합 및 천연으로부터가 아닌 것을 의미한다. “비-천연 산출 결합 단백질” 또는 “비-천연 산출 결합 도메인”은 인공의 단백질 또는 도메인이고, 각각, 상응하게 디자인된 핵산들의 발현에 의해 수득된다. 바람직하게는, 발현은 진핵 또는 박테리아 세포, 또는 무-세포 세포 내 발현 시스템을 이용하는 것에 의해 발생한다. 더욱이, 그 용어는 서열 데이터베이스 중에서, 예를 들면, GenBank, EMBL-Bank 또는 Swiss-Prot 중에서, 비-인공 서열 엔트리로써 존재하지 않는 상기 결합 단백질 또는 상기 결합 도메인의 서열을 의미한다. 이러한 데이터베이스들과 다른 유사한 시퀀스 데이터베이스들은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0283] 본 발명에 따른 안키린 반복 도메인들, 바람직하게는 본 발명에 따른 안키린 반복 모듈 및 캡핑 모듈들의 일반적인 변형체들 및 유도체들:

[0284] 더 바람직하게는, N-말단 또는 C-말단 안키린 캡핑 반복을 포함하는 N-말단 또는 C-말단 안키린 캡핑 모듈은, 각각, 상기 캡핑 반복 내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들이, 안키린 캡핑 단위 또는 안키린 반복 단위에 상응하는 배열에 상응하는 포지션에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 치환된다.

[0285] 아미노산 치환은 20개의 가장 흔한 천연 산출 아미노산들 중 어떤 것에 의해, 바람직하게는 A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산들; 더 바람직하게는 A, D, E, H, I, K, L, Q, R, S, T, V, and Y로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산들에 의해 발생될 수 있다. 또한 바람직하게는 아미노산의 치환은 상종 아미노산에 의한다; 즉, 아미노산은 유사한 생물물리학 특성을 가진 결사슬을 포함하는 아미노산에 의해 치환된다. 예를 들면, 음전하 아미노산 D는 음전하 아미노산 E에 의해 치환되고, 또한 L과 같은 소수성 아미노산은 A, I, 또는 V에 의해 치환된다. 상동 아미노산에 의한 아미노산의 치환은 이 기술에 숙련된 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0286] SEQ ID NO: 4, 5, 19, 24, 25, 33, 34, 35, 39, 43, 48, 49, 53, 57, 127, 131 또는 135에 기초한 C-말단 캡핑 모듈 위의 어떠한 포지션 27 및 28 위치의 아미노산 A를 포함하는 C-말단 안키린 캡핑 모듈이 또한 선호된다.

- [0287] SEQ ID NO: 4, 5, 19, 24, 25, 33, 34, 35, 39, 43, 48, 49, 53, 57, 127, 131 또는 135에 기초한 C-말단 캡핑 모듈 위의 어떤 포지션 1 내지 26 으로부터 또는 포지션 1 내지 27로부터의 아미노산을 포함하는 C-말단 캡핑 모듈이 또한 선호된다.
- [0288] SEQ ID NO: 1, 2, 3, 13, 14, 20, 26, 27, 36, 40, 44, 45, 50, 54, 124, 128 또는 132의 포지션 1의 아미노산 G 및/또는 포지션 2의 S는 특성에 대한 명백한 영향없이, N-말단 안키린 캡핑 모듈로부터 제거될 수 있다. 이 두 개의 아미노산들은, 안키린 반복 도메인에 다른 아미노산 및 단백질을 연결하는 링커로서 역할을 한다. 본 발명은 또한 N-말단 안키린 캡핑 모듈들을 포함하는 그러한 안키린 반복 도메인들을 포함하며, 여기에서, 포지션 1의 G 및/또는 포지션 2의 S는 제거된다. 여기에서 정의된 안키린 반복 도메인에서 아미노산 포지션(예. “포지션 33”)들은, 거기에 맞추어 숫자 이동(number shift)을 가져온다, 예를 들어 “만약 아미노산이 결실 된다면, 포지션 33”은 “포지션 32”가 되고, 또는 “2개의 아미노산이 결실된다면, 포지션 33”은 “포지션 31”이 된다.
- [0289] 본 발명의 안키린 반복 도메인의 안키린 캡핑 모듈은, 이 기술에 숙련된 당업자에게 알려진 아미노산 서열의 조정, 돌연변이 생성 및 유전자 합성과 같은 기술들의 결합에 의한 안키린 캡핑 모듈에 의해 치환될 수 있다. 예를 들면, SEQ ID NO: 79의 C-말단 캡핑 반복은 (i) SEQ ID NO: 5을 가지고 서열 정렬에 의해 SEQ ID NO: 79 (예. 서열 포지션 99 내지 126)의 C-말단 캡핑 반복을 결정 (ii) SEQ ID NO: 79의 결정된 C-말단 캡핑 반복의 서열을 SEQ ID NO: 5의 서열로 대체 (iii) 치환된 C-말단 캡핑 모듈을 암호화하는 반복 도메인을 암호화하는 유전자의 생성 (iv) 대장균의 세포질에서 변형된 반복 도메인의 발현 (v) 변형된 반복 도메인을 표준 수단에 의해 정제하는 것에 의해 SEQ ID NO: 5의 C-말단 캡핑 반복 서열에 의해 치환될 수 있다. 다른 실시예로서, SEQ ID NO: 79의 N-말단 캡핑 반복은 (i) SEQ ID NO: 3을 가진 서열 정렬에 의해 SEQ ID NO: 79 (예. 서열 포지션 1 내지 32)의 N-말단 캡핑 반복 서열을 결정 (ii) SEQ ID NO: 79의 결정된 N-말단 캡핑 반복의 서열을 SEQ ID NO: 3의 서열로 대체 (iii) 치환된 N-말단 캡핑 모듈을 암호화하는 반복 도메인을 암호화하는 유전자의 생성 (iv) 대장균의 세포질에서 변형된 반복 도메인의 발현 (v) 표준 수단에 의한 변형된 반복 도메인을 정제하는 것에 의해 SEQ ID NO: 3의 N-말단 캡핑 반복 서열에 의해 교체될 수 있다.
- [0290] 더욱이, 본 발명의 안키린 반복 도메인은 N-말단 안키린 캡핑 모듈의 어셈블링에 의해 유전적으로 구축되고, 이어서 유전자 합성 수단에 의해(예. SEQ ID NO: 3의 N-말단 캡핑 반복) 하나 또는 그 이상의 반복 모듈들(예. SEQ ID NO: 79의 포지션 33내지 99로 부터 아미노산 잔기들을 포함하는 두 개의 안키린 반복 모듈) 및 C-말단 캡핑 모듈 (예. SEQ ID NO: 5)의 C-말단 캡핑 반복)이 따른다. 유전적으로 집합된 반복 도메인 유전자는 E.coli 내에서 위에서 기재된 것과 같이 발현될 수 있다.
- [0291] 아미노산 C, M 또는 N이 없는 아미노산 서열을 포함하는 재조합 결합 단백질, 반복 도메인, 반복 모듈, N-말단 캡핑 모듈 또는 C-말단 캡핑 모듈이 더 선호된다.
- [0292] 아미노산 N과, 여기에 따르는 G가 없는 아미노산 서열을 포함하는 재조합 결합 단백질, 결합 도메인, 결합 모듈, N-말단 캡핑 모듈 또는 C-말단 캡핑 모듈이 더 선호된다.
- [0293] 어떤 그러한 N-말단 또는 C-말단 캡핑 모듈을 포함하는 재조합 결합 단백질 또는 반복 도메인이 더 선호된다.
- [0294] 본 발명에 따른 안키린 반복 도메인을 포함하는 재조합 결합 단백질의 더 바람직한 실시예에서, 상기 반복 도메인의 N-말단 캡핑 모듈의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들은, N-말단 캡핑 단위의 배열에 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기들에 의해 치환된다. 바람직하게는, 아미노산 잔기들의 30% 까지 치환되고, 더 바

람직하게는 20%까지, 훨씬 더 바람직하게는 10%까지 아미노산 잔기들이 치환된다. 매우 바람직하게는 그러한 N-말단 캡핑 단위는 천연 산출 N-말단 캡핑 단위이다.

[0295] 본 발명에 따른 안키린 반복 도메인을 포함하는 재조합 결합 단백질의 더 바람직한 실시예에서, 상기 반복 도메인의 C-말단 캡핑 모듈의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들은, C-말단 캡핑 단위의 배열에 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 의해 치환된다. 바람직하게는, 아미노산 잔기들의 30% 까지 치환되고, 더 바람직하게는 20%까지, 훨씬 더 바람직하게는 10%까지 아미노산 잔기들이 치환된다. 매우 바람직하게는 그러한 C-말단 캡핑 단위는 천연 산출 C-말단 캡핑 단위이다.

[0296] 또 다른 특정 실시예에서, 아미노산 잔기들의 30%까지, 더 바람직하게는 20%까지, 및 매우 바람직하게는, 아미노산 잔기들의 10%까지 반복 단위들, N-말단 캡핑 단위들 또는 C-말단 캡핑 단위들에 상응하는 포지션들에 발견되지 않는 아미노산들과 치환된다.

[0297] 본 발명에 따른 안키린 반복 도메인을 포함하는, 재조합 결합 단백질의 더 바람직한 실시예에서, 상기 안키린 반복 도메인의 반복 모듈들의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들은, 반복 단위의 배열에 상응하는 포지션에서 발견되는 아미노산 잔기들에 의해 치환되는 상기 안키린 반복 도메인의 반복 모듈들의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들이다. 바람직하게는, 아미노산 잔기들의 30% 까지 치환되고, 더 바람직하게는, 20% 까지, 및 매우 바람직하게는, 아미노산 잔기들의 10%까지 치환된다. 가장 바람직하게는, 그러한 반복 단위들은 천연 산출 반복 단위이다.

[0298] 또 다른 특정 실시예에서, 30%까지의 아미노산 잔기들, 더 바람직하게는 20%까지, 및 매우 바람직하게는, 10%의 아미노산 잔기들은 반복 단위들에 상응하는 위치에서 발견되지 않은 아미노산과 치환된다.

[0299] 다른 실시예에서, 여기에서 제시된 단백질들 또는 도메인들을 결합하는 어떤 재조합 HER2는, 예를 들면, 이중-특이성 결합체, 생물활성 화합물, 라벨링 모이어티(예, 플루오레세인 또는 방사성 추적자 같은 형광성 라벨), 단백질 정제를 가능하게 하는 모이어티(예. His- 또는 strep-태그 같은 소형 웹타이드 태그), 상승된 치료적 효능을 위한 효과기 기능들을 제공하는 모이어티(예. 항체의존세포매개세포독성을 제공하는 항체의 Fc부분, 녹농균 엑소톡신 A (ETA)와 같은 독성 단백질 모이어티 또는, 메이탄시노이드 또는 DNA 알킬화제들과 같은 소형 분자 독성 작용제들) 또는 향상된 약물동태학을 제공하는 모이어티를 생성하기 위해 다른 타겟에 결합하는 모이어티를 포함하는 하나 또는 더 추가적인 모이어티들과 공유결합하게 되어있을 수 있다. 향상된 약물동태학은 인지된 치료상의 필요에 따라 평가될 수 있다. 종종 아마도 복용 후에 혈청 안에서 단백질이 이용가능하게 남아있는 시간을 증가시키는 것에 의해, 생물학적 이용 가능성을 향상시키거나 및/또는 복용 간격 시간을 증가하는 것이 바람직하다. 몇몇의 예시들에서, 시간에 걸쳐 단백질의 혈청 농도의 지속성을 향상시키는 것이 바람직하다.(예, 투여 직후 농도 와 다음 투여 직전 농도 사이의 단백질의 혈청 농도 차이를 감소).

[0300] 혈액으로부터 단백질의 서서히 감소되는 경향이 있는 모이어티들은, 히드록시에틸 전분 (HES), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 당류(예. 시알산), 우수한-내성의 단백질 모이어티 (예., Fc 단편들 또는 혈청 알부민), 항체 Fc 단편들 또는 혈청 알부민과 같은, 풍부한 혈청 단백질들을 위한 특이성 및 친화성을 가진 결합 도메인들 또는 웹타이드들을 포함한다. 혈청 알부민의 친화성을 가진 그러한 결합 도메인들 또는 반복 도메인들의 실시예들은 WO 2012/069654에 제공된다. 본 발명의 재조합 결합 단백질은 포유류(예. 쥐, 큰 쥐(rat) 또는 인간) 내에서 폴리웹타이드의 제거 속도를 비변형된 폴리웹타이드에 비해 3배 이상 감소시키는 모이어티와 접착될 수 있다.

[0301] 본 발명의 하나의 특이한 실시예는, HER2에 결합하는 제1 반복 도메인, HER2에 결합하는 제2 반복 도메인을 포함하고, 인간 혈청 알부민에 특이하게 결합하는 하나 또는 그 이상의 아키린 반복 도메인들을 더 포함하는 재조합 결합 단백질에 관련된다. HER2에 특이성을 가진 반복 도메인들의 실시예는 여기에 주어져 있고, 인간 혈청 알부민에 특이성을 가진 안키린 반복 도메인들은 WO 2012/069654에 기재되어 있다. 그러한 도메인들은 이 기술

에 숙련된 당업자에게 알려진 방법들에 의한 유전적 수단에 의한 폴리펩타이드 링커에 의해 연결될 수 있다.

[0302] 다른 바람직한 실시예는 재조합 결합 단백질인데, 여기에서 제1 반복 도메인 및 제2 반복 도메인은, HER2와 결합에 참여할 수 있는 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 내부 반복 모듈들을 포함하는 HER2를 위한 결합 특이성을 가진 안키린 반복 도메인들이다. 바람직하게는, 그러한 안키린 반복 도메인들은 N-말단 캡핑 모듈, 하나 내지 넷의 내부 반복 모듈들, 및 C-말단 캡핑 모듈을 포함한다. 바람직하게는 상기 캡핑 모듈들은 캡핑 반복 서열이다. 또한 바람직하게는, 상기 캡핑 모듈은 HER2에 결합하는데 참여할 수 있다.

[0303] 또한, 상기 진술된 어떠한 약제학적 구성은 질병의 치료에 대해 고려된다.

[0304] 본 발명은 치료의 방법을 더 제공한다. 그 방법은 환자들에게 그들의 필요를 위해서, 본 발명의 재조합 결합 단백질의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 것을 포함한다.

[0305] 더욱이, 환자들에게 그들의 필요에 의해 위에서 언급했던 약제학적 구성의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하는, 인간 포함 포유류에서 병리학적 상태를 치료하는 방법이 고려된다.

실시예

[0307] 아래에 공지된 모든 출발 물질들 및 시약들은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 상업적으로 입수 가능하거나, 공지의 기술로 준비될 수 있다.

원료

[0309] 화학 약품은 Fluka (스위스)로부터 구입했다. 올리고뉴클레오티드들은 Microsynth (스위스)에서 왔다. 특별히 다르게 언급하지 않는 한, DNA 중합효소들, 제한 효소 및 완충액들은 뉴잉글랜드 바이오랩 (USA) 또는 Fermentas(리투아니아)에서 왔다. 클로닝 및 단백질 생산 균주는 E. coli XL1-blue (스트라타진, USA) or BL21 (노바젠, USA) 이었다. 재조합 인간 HER2 엑토도메인(표준 수단에 의한 CHO 세포들에서 생산된 ErbB2 S22-N530-Flag 및 ErbB2 S22-E645-Flag)은 CSIRO Enquiries (호주)로부터 구입했다. 바이오티닐화 Her2 엑토도메인 (Biotinylated Her2 ectodomain)은 표준 바이오티닐레이션 시약들 및 방법들(피어스, 미국)을 이용하여 단백질의 비오틴 모이어티(biotin moiety)과 프라이머리 아민(primary amine)의 커플링을 통해 화학적으로 취득했다. 세포 라인들은 LGC/ATCC (프랑스/미국; Cat. No: BT474 -HTB-20, SKBR-3-HTB-30, NCI-N87 - CRL5822, ZR75-30 - CRL1504, HCC1419 -CRL2326, MDA-MB175 VII-HTB-25)로부터 구입했다. 세포 배양 배지는 인비트로젠 / 루비오 (스위스)로부터 왔다. 송아지 태아 혈청은 PAA로부터 왔다. 세포 증식의 검출을 위한 분석 시약, Cell Proliferation ELISA, BrdU (비색, colorimetric) (Cat. No. 1164722900)은 로제(ROCHE, 스위스)로부터 왔으며, 세포 자멸의 검출을 위한 분석 시약, Caspase Glo 3/7 (Cat. No. G8091)은 프로메가 및 스위스로부터 왔고, 세포 사멸 탐지 ELISAPLUS 시스템 (11 774 425 001)은 로제(ROCHE, 스위스)로부터 왔다. 세포 감염 시약, 리포펙타민 2000(11668027)은 인비트로젠 스위스로부터 왔다. FACS 분석은 벡톤-디킨슨(스위스)의 FACS Canto II 시스템 을 이용하여 분석을 시행하였다. DARPins의 Her2에 결합은 anti-Penta-His Alexa Fluor 647 conjugate (Cat. No. A21445; 루비오 스위스)을 이용하여 검출되었다. Accutase (Cat. No: L-11-007)는 PAA로부터 왔다. 트라스투주맙은 Kantonal Apotheke Zurich로부터 구입했고, 페투주맙은 에비트라 (Evitra, 스위스)에 의해 합성되었다. GFP-tagged Her2 (Cat. No. RG212583)를 위한 발현 벡터는 오리젠(Origene, USA)로부터 왔다.

분자 생물학

[0311] 별도 언급이 없는 한, 방법들은 기술된 프로토콜에 따라 수행된다. (Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis

T., 문자 클로닝: 실험실 메뉴얼, 콜드 스프링 하버 연구소 1989, 뉴욕).

[0312] 증식 분석

세포 증식에 DARPins의 영향들은 BrdU-labeling (BrdU, 세포 증식 ELISA, 로세)을 이용한 DNA 합성을 측정하는 것에 의해 결정되었다. 간단히 말해서, 100 ul 완전 배지에서 96 웰 플레이트에 well 당 10000 BT474 세포들을 심었고(seed), 24시간동안 배양되었다. DARPins 및 벤치마크들은 추가적인 72시간 동안 첨가되었다. 세포 표지 (cell labeling)를 위한 BrdU는 마지막 24시간 동안 첨가되었다. 표지된 (증식) 세포들은 제조자 프로토콜 (manufactures protocol)에 따라 검출되었다. 데이터는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하여 분석했고, y 축은 OD450-602 nm에 대하여 x축에 log[c]를 도시하였다. 데이터는 비선형 회귀 적합도 (non-linear regression fit), (log(길항제(antagonist)) vs. 반응(response) -- 가변 가능한 기울기(4개의 파라미터))을 이용해 피트(fitted)되었다.

[0314] 세포 자멸 분석

DARPins에 의한 세포 자멸의 유도는 Caspase 3/7-Glo 시스템 (프로메가, 스위스)을 이용해 Caspase3/7 활성화를 측정하는 것에 의해 결정되었다. 간단히 말해서, 100 ul 완전 배지에서 96 웰 플레이트에 well 당 10000 BT474 세포들을 심었고(seed), 24시간동안 배양되었다. DARPins 및 벤치마크들은 추가적인 24시간 동안 첨가되었다. Caspase Glo 시약은 제조업체 프로토콜에 따라 1시간 동안 첨가되었다. Caspase 3/7 활성화는 루시페라제 활성화를 측정하는 것에 의해 모니터 되었다.

[0316] 대안적으로, 세포 자멸의 유도는 세포 사멸 검출 ELISAPLUS 측정 시스템 (로세, 스위스)을 이용해 결정되었다. 그 분석은 제조업체 프로토콜에 따라 수행되었다. 세포 수 및 배양 시간은 Caspase Glo 판독과 유사했다.

[0317] 데이터는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용해 분석되었고, y축은 OD450/490 nm에 대하여 x축은 농도로 도시하였다. 데이터는 비선형 회귀 적합도 (non-linear regression fit), (log(대항물질(antagonist)) vs. 반응(response) - 가변 가능한 기울기(4개의 파라미터))을 이용해 피트(fitted)되었다.

[0318] 디자인된 안키린 반복 단백질 라이브러리(libraries)

[0319] 디자인된 안키린 반복 단백질 라이브러리(libraries)를 만드는 방법이 기술되었다(WO 2002/020565; Binz 등. 2003, 인용.; Binz 등. 2004, 인용). 그러한 방법들에 의해서, 무작위화된 안키린 반복 모듈들 및/또는 무작위화된 캡핑 모듈들을 포함하는 디자인된 안키린 반복 단백질 라이브러리들이 구성될 수 있다. 예를 들어, 그러한 라이브러리들은 고정된 N-말단의 캡핑 모듈(예, SEQ ID NO: 2의 N-말단 캡핑 모듈) 또는 SEQ ID NO: 60의 서열 모티프에 따른 무작위화된 N-말단의 캡핑 모듈, SEQ ID NO: 58 또는 59의 서열 모티프에 따른 하나 또는 그 이상의 무작위화된 반복 모듈들, 및 고정된 C-말단의 캡핑 모듈(예, SEQ ID NO: 5의 C-말단의 캡핑 모듈) 또는 SEQ ID NO: 61의 서열 모티프에 따른 C-말단의 캡핑 모듈에 기초하여 적절하게 접합된다. 바람직하게는, 그러한 라이브러리들은 반복 또는 캡핑 모듈들의 무작위화된 포지션에서 아미노산들 C, G, M, N (G 잔기의 앞에) 또는 P를 포함하지 않고 접합된다. 게다가, SEQ ID NO: 58 또는 59의 서열 모티프에 따른, 무작위화된 반복 모듈들은 포지션 10 및/또는 포지션 17에서 더 무작위화 될 수 있다; SEQ ID NO: 60의 서열 모티프에 따른, 무작위화된 N-말단의 캡핑 모듈은 포지션 7 및/또는 포지션 9에서 더 무작위화 될 수 있으며; SEQ ID NO: 61의 서열 모티프에 따른, 무작위화된 C-말단의 캡핑 모듈들은 포지션 10, 11 및/또는 17에서 더 무작위화될 수 있다.

[0320] 더욱이, 그러한 라이브러리들 내에서 그렇게 무작위화된 모듈들은, 무작위화된 아미노산 포지션들을 가지고 추가적인 폴리펩타이드 루프 삽입을 포함할 수 있다. 그러한 폴리펩타이드 루프 삽입들의 실시예들은 항체들 또는 신규로 생성되는 웹타이드 라이브러리들의 상보성 결정 영역(CDR) 루프 라이브러리들이다. 예를 들어, 그러한 루프 삽입은 인간 리보핵산가수분해효소 L의 N-말단 안키린 반복 도메인의 구조를 가이드로 이용하여, 디자인될 수 있다. (Tanaka, N., Nakanishi, M, Kusakabe, Y, Goto, Y., Kitade, Y, Nakamura, K.T., EMBO J. 23(30), 3929-3938, 2004) 두 개의 안키린 반복(repeats)의 보더 근처에 존재하는 베타-회전을 하며 10개의 아미노산들

이 삽입되는 이 안키린 반복 도메인과 유사하게, 안키린 반복 단백질들은 변형 가능한 길이(예, 1 내지 20 아미노산들)의 무작위화된 루프들(고정되고 무작위화된 위치)을 포함할 수 있는 안키린 반복 단백질들이 하나 또는 그 이상의 안키린 반복 도메인의 베타-회전(turn)으로 삽입된다.

[0321] 안키린 반복 단백질 라이브러리의 어떠한 그러한 N-말단 캡핑 모듈은 RILLAA 모티프 (예. SEQ ID NO: 65의 포지션 21 내지 26으로부터 존재하는) 대신에 바람직하게 RELLKA 또는 RILKAA 모티프를 소유하며, 안키린 반복 단백질 라이브러리의 어떤 그러한 C-말단 캡핑 모듈은 KLN 모티프 (예. SEQ ID NO: 65의 마지막 세 개의 아미노산들) 대신에 KAA 또는 KLA 모티프를 선호적으로 포함한다.

[0322] 그러한 안키린 반복 단백질 라이브러리의 디자인은 아마도 타겟에 상호작용하는 안키린 반복 도메인의 알려진 구조들에 의해 가이드될 것이다. 그들의 단백질 데이터 백그라운드(PDB) 유니크 어세션(unique accession) 또는 식별 부호들(PDB-IDs)에 의해 확인된, 그러한 구조들을 실시예들은, 1WDY, 3V31, 3V30, 3V2X, 3V20, 3UXG, 3TWQ-3TWX, 1N11, 1S70 및 2ZGD이다.

[0323] N2C 및 N3C 디자인된 안키린 반복 단백질 라이브러리들 같은, 디자인된 안키린 반복 단백질 라이브러리들의 실시예들이 기술되었다.(WO 2002/020565; Binz 등. 2003, 인용.; Binz 등. 2004, 인용.) N2C 및 N3C의 숫자는 N-말단 및 C-말단 캡핑 모듈 사이에 존재하는 무작위화된 반복 모듈의 수를 묘사한다.

[0324] 반복 단위들 및 모듈들 내부의 포지션을 정의하는데 사용되는 명명법은 하나의 아미노산 포지션에 의해 이동된 안키린 반복 모듈 및 안키린 반복 단위들의 보더의 변형(modification)을 가진 Binz 등. 2004 인용에 기초한다. 예를 들어, Binz 등 2004 (인용)의 안키린 반복 모듈의 포지션 1은 현재 공지의 안키린 반복 모듈의 포지션 2에 상응하고, Binz 등 2004 (인용)의 안키린 반복 모듈의 포지션 33은, 후술하는 현재 공지의 안키린 반복 모듈의 포지션 1에 상응한다.

[0325] 모든 DNA 시퀀스들은 시퀀싱에 의해 확인되었고, 모든 기재된 단백질의 측정된 분자량은 질량 스펙트럼에 의해 확인되었다..

0326] 실시예 1: HER2의 결합 특이성을 가지는 안키린 반복 도메인을 포함하는 결합 단백질들의 선택

[0327] 리보솜 디스플레이의 사용 (Hanes, J. and Pluckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997) HER2의 엑토도메인에 결합 특이성을 가진 많은 디자인된 반복 단백질들(DARPins)은 Binz 등. 2004 (인용.)에 의해 기술된 DARPin 라이브러리들로부터 선택되었다. 그들의 결합 특이성은, 수백개의 HER2-특이 결합 단백질들이 선택되었음을 지시하는 조추출물(crude extract) ELISA (아래를 보아라)에 의해 평가되었다. 선택된 클론의 HER2-특이적 증식의 억제 및 세포 자멸의 유도는, BT474 세포들의 증식을 억제하는 그들의 능력에 대해 바이파라토픽 DARPins을 테스트하는 것에 의해 측정되었다.

[0328] 예를 들면, SEQ ID NO: 62 내지 82, 112 내지 121의 안키린 반복 도메인들은 HER2의 결합 특이성을 가진 안키린 반복 도메인을 포함하는 선택된 결합 단백질들의 아미노산 서열들을 구성한다. HER2에 결합 특이성을 가진 그러한 안키린 반복 도메인들로부터 각각의(Individual) 안키린 반복 모듈들은 SEQ ID NO: 15 내지 18, 21 내지 23, 28 내지 32, 37, 38, 41, 42, 46, 47, 51, 52, 55, 56, 125, 126, 129, 130, 133 및 134에 제공되어 있다.

[0329] HER2에 결합 특이성을 가진 그러한 안키린 반복 도메인들의 각각의 캡핑 모듈들은 SEQ ID NO: 13, 14, 19, 20, 24 내지 27, 33 내지 36, 39, 40, 43 내지 45, 48 내지 50, 53, 54, 57, 124, 127, 128, 131, 132 및 135에 제공되어 있다.

[0330] 리보좀 디스플레이에 의한 HER2 특이적 안키린 반복 단백질들의 선택

[0331] HER2 특이적 안키린 반복 단백질들의 선택은 리보좀 디스플레이(Hanes and Pluckthun, 인용.)에 의해 수행되었으며, 타겟 단백질로서 인간 HER2를 이용하고, 위에서 기술한 디자인된 안키린 반복 단백질의 라이브러리와 확립된 프로토콜을 이용하였다.(Zahnd, C., Amstutz, P. and Pluckthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007) 각 선택 라운드 이후에 역전사 (RT)-PCR 사이클들의 수는, 바인더들의 부유(enrichment) 때문에 수득률을 조절하면서, 45에서 30으로 일정하게 감소되었다. 선택의 첫 번째 4개 라운드는 표준 리보좀 디스플레이 선택을 채용하였으며, 1라운드에서 4라운드로 갈수록 선택압력을 증가시키기 위해 타겟 농도 감소와 워싱 스트린전시(washing stringency) 증가를 이용하였다. 높은 친화성 항-HER2 DARpins를 강화하기 위하여, 표준 리보좀 디스플레이 선택(상기)의 네 번째 라운드로부터 결과물은, 증가된 선택 스트린전시(stringency)를 가지는(Zahnd, 2007, 인용) 오프-레이트(off-rate) 선택 라운드를 겪도록 했다. 마지막 표준 선택 라운드는 오프-레이트 선택된 결합 단백질들의 증폭 및 회복하기 위해 수행되었다.

[0332] 선택된 클론들은 조추출물 ELISA에 의해 보여지는 것과 같이 HER2에 특이적으로 결합한다

[0333] HER2의 엑토도메인에 특이적으로 결합한 각각 선택된 DARpins은, 표준 프로토콜을 이용한 DARPin 발현 세포들의 미정제 에스케리키아 추출물(crude Escherichia coli extracts)을 사용하여, 효소면역측정법(ELISA)에 의해 확인되었다. 리보좀 디스플레이에 의해 선택된 DARpins은 pQE30 (퀴아젠) 발현 백터에서 클론화되었고, E. coli XL1-Blue (스트라타진)로 변형시켰고, 그리고 나서 37°C에서 1 ml 성장 배지(1% 글루코즈와 100 µg/ml 암피실린을 포함하는 2YT)를 포함하는 96-딥-웰플레이트(싱글 웰 내부에 각 클론)에서 하룻밤동안 성장했다. 50 µg/ml 암피실린을 포함하는 1 ml의 새로운 2YT는 새로운 96-딥-웰 플레이트에서 100 µl의 하룻밤 배지로 접종되었다. 37° C에서 2시간 동안 배양 후에, 발현이 IPTG (1 mM 마지막 농도)로 유도되었고, 3시간 동안 유지되었다. 세포들이 수확되었고, 100 µl B-PERII (피어스)에서 혼탁(resuspend)되었고, 15분동안 상온에서 shaking하며 배양되었다. 그리고 나서 900 µl PBS-TC (PBS는 0.25% 카제인 가수분해물, 0.1% Tween 20®, pH 7.4로 보충되었다.)가 추가되었고, 세포 데bris(cell debris)는 원심분리로 제거되었다. 100 µl의 각각의 용해된 클론은 비오틴 모이어티를 통해 고정된 HER2 또는 무관한 MBP(unrelated MBP)를 포함하는 MaxiSorp plate 가 코트된(coated) Neutravidin의 웰(well)에 가해졌고, 상온에서 1시간 동안 배양되었다. PBS-T (PBS는 0.1% Tween 20®, pH 7.4로 보충되었다)로 면밀한 워싱(extensive washing) 후에, 그 플레이트는 단일 클론 홀스-라디쉬-라벨 항-RGS(His)₄ 항체 (34650, 퀴아젠)를 이용하여 표준 ELISA 방법들을 사용하여 성장되었다. 결합은 POD 기질(로세)에 의해 검사된다. 발색 성장은 405 nm에서 측정된다. 그러한 크루드 세포 추출물 ELISA에 의한 수백개의 클론들의 스크리닝은 HER2 특이성을 가진 백 개 이상의 다른 DARpins이 드러냈다. 이 결합 단백질들은 다른 분석을 위해 선택됐다. 엑토도메인 HER2에 특이적으로 결합하는 선택된 안키린 반복 도메인의 아미노산 서열의 예들은 SEQ ID NO: 62 내지 82 및 112 내지 121에 제공된다.

[0334]

[0335] HER2 결합 특이성을 가진 이들 안키린 반복 도메인들 및 HER2에 결합 특이성을 가지지 않는 음성 컨트롤 안키린 반복 도메인(i.e. SEQ ID NO: 111)은 아래에 기재된 것과 같이 간단한 단백질 정제를 가능하게 하는 N-말단 His-tag를 제공하는 발현 백터에 기초한 pQE (QIAgen, 독일)에 클론되었다. 따라서, 다음의 DARpins을 암호화하는 발현 백터들이 구축되었다.

[0336] DARPin #1 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 62);

[0337] DARPin #2 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 63);

[0338] DARPin #3 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 64);

[0339] DARPin #5 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 66);

[0340] DARPin #6 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 67);

[0341] DARPin #7 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 68);

- [0342] DARPin #8 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 69);
 [0343] DARPin #9 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 70);
 [0344] DARPin #10 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 71);
 [0345] DARPin #11 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 72);
 [0346] DARPin #12 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 73);
 [0347] DARPin #13 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 74);
 [0348] DARPin #14 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 75);
 [0349] DARPin #15 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 76);
 [0350] DARPin #16 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 77);
 [0351] DARPin #17 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 78);
 [0352] DARPin #18 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 79);
 [0353] DARPin #19 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 80);
 [0354] DARPin #20 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 81);
 [0355] DARPin #21 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 82);
 [0356] DARPin #50 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 111).
 [0357] DARPin #51 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 112);
 [0358] DARPin #52 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 113);
 [0359] DARPin #53 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 114);
 [0360] DARPin #54 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 115);
 [0361] DARPin #55 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 116);
 [0362] DARPin #56 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 117);
 [0363] DARPin #57 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 118);
 [0364] DARPin #58 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 119);
 [0365] DARPin #59 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 120);
 [0366] DARPin #60 (그의 N-말단에 융합된 His-tag (SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 121);

[0367] 선택된 바이파라토픽 안키린 반복 단백질들의 아미노산 서열의 예는 SEQ ID NO: 83 to 110, 122, 123, 및 136 내지 141에 제공되어 있다. 이들 바이파라토픽 DARPs는, 아래에서 기재된 것과 같이 단순한 단백질 정제를 가능하게 하는 N-말단 His-tag를 포함하는 발현 벡터에 기초한 pQE (QIAgen, 독일)에 클론되었다. 따라서, 다음의 DARPs를 암호화하는 발현 벡터들이 구축되었다.

- [0368] DARPin #22 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 83);
 [0369] DARPin #23 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 84);
 [0370] DARPin #24 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 85);
 [0371] DARPin #25 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 86);
 [0372] DARPin #26 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 87);

- [0373] DARPin #27 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 88);
- [0374] DARPin #28 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 89);
- [0375] DARPin #29 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 90);
- [0376] DARPin #30 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 91);
- [0377] DARPin #31 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 92);
- [0378] DARPin #32 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 93);
- [0379] DARPin #33 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 94);
- [0380] DARPin #34 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 95);
- [0381] DARPin #35 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 96);
- [0382] DARPin #36 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 97);
- [0383] DARPin #37 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 98);
- [0384] DARPin #38 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 99);
- [0385] DARPin #39 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 100);
- [0386] DARPin #40 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 101);
- [0387] DARPin #41 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 102);
- [0388] DARPin #42 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 103);
- [0389] DARPin #43 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 104);
- [0390] DARPin #44 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 105);
- [0391] DARPin #45 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 106);
- [0392] DARPin #46 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 107);
- [0393] DARPin #47 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 108);
- [0394] DARPin #48 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 109);
- [0395] DARPin #49 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 110)
- [0396] DARPin #61 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 122);
- [0397] DARPin #62 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 123);
- [0398] DARPin #63 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 136);
- [0399] DARPin #64 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 137);
- [0400] DARPin #65 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 138);
- [0401] DARPin #66 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 139);
- [0402] DARPin #67 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 140);
- [0403] DARPin #68 (그의 N-말단에 융합된 His-tag(SEQ ID NO: 6)를 갖는 SEQ ID NO: 141).

1가 DARPin의 고수준 및 용해성 발현

- [0404] 추가 분석을 위해, DARPin #1 내지 50은 *E. coli* BL21 또는 XL1-Blue 세포들에서 발현되었고, 표준 프로토콜을 사용한 그들의 His-tag를 이용하여 정제되었다. 1리터의 배양물(동일 배지)을 접종하기 위해, 25 ml의 정지상 하룻밤 배지(LB, 1% 글루코오스, 100 mg/l의 암피실린; 37°C)가 사용되었다. 600 nm에서 0.7의 흡수에서, 배양액은 0.5 mM IPTG에 의해 유도되고 또 37°C에서 4-5시간 동안 배양하였다. 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 얻어진 상충액에 부가하였다. 단백질을 제조자(QIAgen, 독일)의 지시에 따라서 Ni-니트릴로트리아세트산 컬럼(2.5 ml 컬럼 부피) 상에서 정제하였다. 다르게는, 6xHis-태그를 갖지 않는 DARPin 또는 선택된 반복 도메인을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제한 다음 당업자에게 공지된 표준 수지 및 수법에 따라서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. HER2에 대하여 결합 특이성을 갖는 200 ng 이하의 고용해성 DARPin은 SDS-15% PAGE로부터 추정되는 바와 같이 순도 >95%인 대장균 배양물 1리터로부터 정제될 수 있다. 이러한 정제된 DARPin은 추가 분석을 위해 사용된다.

[0406] 실시예 2: 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 HER-2에 대한 결합 특성을 가지는 DARPin의 특성 분석

관심을 끄는 정제된 HER2-결합 DARPin의 단백질 결합 동역학이 셋업을 이용한 ProteOn 어레이 시스템(BioRad)를 가지고 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석에 의해 측정되었고, 여기서 비오티닐화된 인간 HER2는 뉴트라비딘을 통해 고정화되었으며, 상호작용은 자유 1가 DARPin의 첨가하여(addition of free monovalent DARPin) 측정되었다. 해리상수 값의 측정은 표준 방법들을 따라 실행되었다.

인간 HER2 분자의 바이오티닐화된 엑토도메인은 코팅된 스트렙타비딘로의 결합을 통해 플로우셀에서 고정되었고, 다양하게 선택된 DARPin과의 상호작용이 분석되었다.

[0409] 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석

ProteOn 기구(BioRad)를 이용하여 SPR을 측정하고, 상기 측정은 당업자에게 알려진 표준 공정에 따라 수행하였다. 러닝 버퍼는 0.005% Tween 20®을 함유하는 PBS, pH 7.4이다. 뉴트라비딘이 약 8000 공명 단위(resonance units, RU)의 수준까지 GLC 칩 (BioRad) 상에 공유결합적으로 고정되었다. 그 후 뉴트라비딘 코팅된 칩 상에서 HER2의 고정화가 수행되었다.

이 후 DARPin HER2의 상호작용을 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 nM 농도(온-레이트 측정)의 DARPin의 연속적 희석을 포함하는 100 μl 러닝 버퍼 (0.005% Tween®을 포함하는 PBS)를 주입하고 이어서 100 μl/min (오프-레이트 측정)의 일정 유속에서 10분 내지 3시간까지 러닝 버퍼 흐름을 주어 측정하였다. 코팅되지 않은 참조 세포 및 참조 주입(즉, 러닝 버퍼만의 주입)의 신호들(즉: 공명 단위(RU) 값)을 HER2 주입 후 수득된 RU 트레이스로부터 제하였다.(이중-참조) 온-레이트 및 오프-레이트 측정으로부터 수득한 상기 SRP 트레이스로부터, DARPin HER2 상호작용에 상응하는 온- 및 오프-레이트가 결정될 수 있다.

그 결과는 표 1에 요약하였다. 해리 상수(Kd)를 평가된 온- 및 오프-레이트로부터 당업자들에게 알려진 표준 공정을 이용하여 계산하였다.

표 1

SPR에 의해 측정된 인간 HER2에 대한 선택된 DARPin의 용해 상수

DARPin#	Kd [M]
1	7.81E-11
2	8.75E-10
3	1.31E-11
4	1.86E-10
5	7.08E-11
6	2.92E-11
7	1.03E-09
8	4.83E-10
9	4.17E-10
10	1.03E-09
11	2.56E-10
12	1.41E-09
13	n.d.
14	1.88E-09
15	4.68E-10
16	2.67E-09
17	2.30E-09
18	3.35E-10
19	9.44E-10
20	2.58E-10
21	1.65E-09
51	1.3E-09
52	1.37E-10
53	1.46E-09
54	9.27E-12
55	8.73E-11
56	2.00E-09
57	6.04E-11
58	4.13E-11
59	3.33E-11
60	1.17E-11

n.d.: 측정되지 않음

[0413]

[0414] 실시예 3: 특이적 세포 밖 HER2 에피토프들을 결합하는 맵핑 반복 도메인

세포 밖 HER2 도메인들을 가진 반복 도메인의 상호작용은, X-선 결정학 또는 NMR 스펙트럼에 의한 복합체들의 4차 구조 분석 또는, 포텐셜 상호작용 잔기들의 알라닌 돌연변이분석을 이용함에 의한 또는 질량 스펙트럼 및 공유결합의 태깅(covalent tagging)을 이용함에 의한 에피토프 맵핑과 같은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 알려진 표준 방법에 의해 분석되었다. 더욱이, 이 기술에 전문가들에게 알려진 경쟁 효소-결합면역흡착측정법(ELISAs)과 같은 다양한 경쟁 측정법들(competition assays)이, 선택된 반복 단백질에 결합한 세포 밖 도메인을 확인하기 위해, 또는 다른 결합 단백질들과, 예를 들어 트拉斯투주맙 또는 퍼트주맙과 같은 항체들, HER2의 세포 밖 도메인들 상에서 오버랩핑 에피토프를 가지는지 확인하기 위해 실행되었다.

- [0416] HER2의 세포 밖 도메인들은 기재된바와 같이 (Jost 등., 인용.) 구입되거나 또는 생산되었다.
- [0417] 관심을 끄는 정제된 HER2-결합 DARPin의 경쟁은 셋업을 이용한 ProteOn 어레이 시스템(BionRad)을 가지고 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분석에 의해 측정되었고, 여기서 비오티닐화된 인간 ErbB2 S22-N530 및 ErbB2 S22-E645는 뉴트라비딘을 통해 고정화되었으며, 경쟁은 포화 (1 uM)된 제1 가 DARPin 및, 이어지는 제1 및 제2 DARPin (각각 100 nM)의 1:1 혼합물의 첨가에 의해 측정되었다. 제1 DARPin이 존재함에도 불구하고, 만약 제2 DARPin이 결합했다면, 제2 DARPin은 다른 에피토프에 결합한 것으로 간주된다.
- [0418] 예를 들어, 경쟁 ELISA (도 1a 및 1b) 데이터는 DARPin #54가 Her2안에서 도메인 II과 결합하고, DARPin #51은 HER2의 도메인 I과 결합하는 것을 시사한다. 앞서 DARPin #18은 HER2의 도메인 IV와 결합하는 것을 보여주었다.(Jost 등., 인용.) DARPin (20nM)은 45분 동안 상온에서 HER2 도메인 I, 도메인 I-III 또는 도메인 III-IV (각 케이스에서 500nM의 도메인 농도에서)을 가지고 PBS 안에서 미리 배양되었다. 혼합물은 F96 MaxiSorb Nunc (Cat. 442404) 플레이트 상에서 코팅된 20nM의 전장(full length) Her2에 첨가되었다. 결합된 DARPin은 제1 항체로서 단일클론의 마우스 anti RGS-His 항체 (Qiagen Cat.34650) 및 제2 항체로서 호스 래디시퍼옥시다아제(horse radish peroxidase (Pierce, Cat.31438))로 지정된 항-마우스 항체를 이용하여 구체적으로 검사되었다. 제1 항체(마우스 항 RGS-His 항체)는 그림 1b1c에서 묘사된 ELISA를 위해 단일클론의 마우스 항-DARPin 항체에 의해 대체되었다. 판독은 450 nm에서 이루어졌다. 모든 배양 단계들은 pH 7.4의 PBS를 이용하여 하룻밤동안 4° C에서 형성된 플레이트 코팅을 제외하고 450 rpm의 Heidolph Titramax 1000 쉐이커 상에서, 2시간 동안 상온에서 0.1% Tween 20® 및 0.25% 카제인을 포함하는 pH 7.4의 PBS 안에서 수행되었다.
- [0419]
- [0420] 이러한 결과들은 Flow Cytometry (FACS)에 의해서, 이를 DARPin의 Her2 과발현 세포들(BT474)로의 결합이 Her2의 재조합 도메인 I, 도메인 I-II-III 및 도메인 III-IV와 경쟁하는 것을 확인시켜 준다. DARPin (100 nM)은 25° C에서 30분 동안 개별 Her2 구성체(1 uM)와 함께 미리 배양된다. 이 혼합물은 20분 동안 얼음에서 세포들(100 ul의 100.000 세포들)에 가해졌다. 세포들에 결합하는 DARPin은 항-Penta-His 항체 (Qiagen Cat. No: 35370)로 라벨된 Alexa 647를 사용하여 모니터 되었다. 그 분석은 DARPin #51이 HER2의 도메인 I에 결합, DARPin #1이 HER2의 도메인 II에 결합 및 DARPin#18이 HER2의 도메인 IV에 결합을 확인해 주었다.
- [0421] 페루주맙과 함께 한 DARPin #1과 트拉斯투주맙과 함께한 DARPin #18의 경쟁은 또한 Flow Cyometry를 이용하여 테스트되었다. 이를 위해 BT474 세포들은 각각의 DARPin (1 uM)을 가지고 배양되기 전에 페트주맙, 각각의 트拉斯투주맙 (둘 다 1 uM)을 가지고 미리 배양되었다. DARPin을 세포들에 결합하는 것은 항-Penta-His 항체 (Qiagen Cat. No: 35370)로 라벨된 Alexa 647를 이용하여 모니터 되었고, 페루주맙 EH는 트拉斯투주맙의 결합은 항-인간-IgG 항체(Invitrogen Cat. No: A-21089)로 라벨된 Alexa 546을 이용하여 모니터 되었다. 이 실험은 페루주맙 또는 트拉斯투주맙이 BT474 세포들에 의해 발현된 HER2에 결합을 가지고 경쟁하지 않는다는 것을 보여준다.
- [0422] 이 결과는 또한 ELISA(도 1c) 관찰될 수 있는데, 여기서 페트주맙(20nM에서 F96 MaxiSorb Nunc (Cat. 442404) 상에 코팅된)이 각각의 DARPin (20nM)으로 배양되기 전에 20nM Her2 (도메인 I-III)으로 미리 배양되었다.
- [0423] Her2-페루주맙 복합체에 DARPin의 특이적 결합은 단일클론 마우스 항 RGS-His 항체 (Qiagen, Cat.34650) 및 호스 래디시퍼옥시다아제(horse radish peroxidase, (Pierce, Cat.31438))로 라벨된 항-마우스 항체를 이용하여 검사되었다.(상온에서 45분동안 미리 혼합된). 모든 배양 단계들은 2시간 동안 플레이트 코팅을 제외하고 450 rpm에서 Heidolph Titramax 1000 쉐이커 상의 상온에서 수행되었고, 4° C에서 하룻밤동안 수행되었다. PBS, 0.1% Tween 20®, pH7.4, 0.25% 카제인이 차단제(blocking agent)로 사용되었다. 이 분석법 (DARPin #7, DARPin #52, DARPin #53, 및 DARPin #54)에서 테스트된 모든 N-말단 DARPin 들은 페루주맙의 존재 하에 Her2를 결합하는 것이고, 이는 그들 모두 항체보다는 상이한 에피토프에 결합하는 것을 보여준다.
- [0424] 전반적인 각 실험들은 SEQ ID NO: 62 내지 68, 72, 및 114 내지 121에 의해 암호화된 1가 반복 도메인들이, HER2의 도메인 II에 결합하고, SEQ ID NO: 69-71, 73, 112 및 113에 의해 암호화된 1가 반복 도메인들은 HER2의 도메인 I에 결합하며, SEQ ID NO: 74 내지 82에 의해 암호화된 1가 반복 도메인은 HER2의 도메인 IV에 결합

하는 것을 보여준다. HER2(SEQ ID NO: 62 내지 68, 72, 및 114 내지 121)의 domain II에 결합하는 1가 반복 도메인들은 HER2에 결합하여 있어 퍼투주맙과 경쟁하지 않는다. HER2의 도메인 IV에 결합하는 단가 반복 도메인 중에서, SEQ ID NO: 77, 78 및 82에 의해 암호화되는 반복 도메인들은 HER2와 결합하기 위해 트拉斯투주맙과 경쟁하며, 반면에 SEC ID NO: 74 내지 76 및 79 내지 81에 의해 암호화되는 반복 도메인들은 트拉斯투주맙과 경쟁하지 않는다.

[0425] 실시예 4: 바이파라토픽 Her2-결합 DARPins은 Her2-과발현 암 세포들의 성장을 막는다.

1가 DARPins, DARPins 및 바이파라토픽 Her2-결합 DARPins의 혼합물은 BT474 세포 증식의 억제에 대해 테스트되었다. 도 2는 1가 DARPin 및 1가 DARPin의 혼합물이 BT474 증식을 막을 수 없는 것을 보여준다. 반대로, 바이파라토픽 DARPins의 부분집합(subset)은 증식 억제를 유도한다(도 2 및 표 2). 흥미롭게도, HER2의 DARPins 반복 도메인 IV는 분자의 C-말단에 위치되어야만 한다(도 2). 바이파라토픽 포맷에서 1가 DARPins의 다중 조합(Multiple combinations)들은 증식억제 바이파라토픽 DARPins를 가져온다. 그러나 모든 조합들이 BT474 증식을 90-100% (도 3)으로 막을 수 있는 것은 아니다. 이것은 특정 DARPin 조합들의 순위를 허용한다. 이 결과들은 바이파라토픽 포맷에서 HER2 내의 확실한 에피토프들의 뚜렷한 부분 집합을 타겟팅하는 것이 효능을 성취하는 열쇠라는 것을 말해준다.

[0427] 트拉斯투주맙에 의한 HER2 수용체 내재화(internalization) 및 열화(degradation)의 유도는 종양 세포 증식(도 3 및 5)의 잠재적인 억제를 유도하기에 충분하지 않다. DARPin #41 및 DARPin #43 둘다 Her2의 열화를 트拉斯투주맙과 유사하게 유도하지만, DARPin #41과 같은 DARPins만 종양 세포 증식을 억제한다.

[0428] 실험들은 방법 섹션에서 기술된 것과 같이 수행된다. 예제적 결과들은 표 2에 요약되었다. IC₅₀ 값들은 이 기술에 잘 알려진 숙련자에게 알려진 표준 절차들을 이용하여 상기 기술된 것과 같이 수득된 적정 곡선들로부터 계산된다. 도 2 및 3에서 DARPin #41에 대한 적정 곡선들의 예시가 주어졌다.

표 2

BTB474 세포 증식의 다양한 DARPins에 의한 억제 활성

DARPins # 또는 항체	IC50[nM]	% 활성도 vs. DARPins # 41
32	3.29	48.0
22	4.03	60.1
27	4.57	37.8
35	4.63	63.0
38	3.30	99.3
33	4.47	65.3
23	2.99	97.3
28	5.15	82.5
36	2.56	68.8
34	3.88	95.1
24	1.97	99.9
29	1.33	95.0
37	2.19	94.8
40	2.76	91.2
42	3.77	100
45	1.55	100
46	3.34	100
41	4.01	100
47	n.i.	6.8
43	n.i.	n.i.
44	n.i.	n.i.
48	n.i.	n.i.
49	n.i.	n.i.
21	n.i.	n.i.
12	n.i.	n.i.
1	n.i.	n.i.
18	n.i.	n.i.
64	2.31	100
65	4.07	100
63	1.77	100
68	5.35	100
67	4.87	100
66	4.06	100
64	2.31	100
trastuzumab	3.05	52
pertuzumab	n.i.	n.i.

n.i.: 관찰된 억제가 없음

[0429]

실시예 5: 바이파라토pic Her2-타겟팅 DARPins은 다양한 Her2 과발현 세포 라인들의 증식을 억제하고, 세포 자멸을 유도한다.

[0430]

바이파라토pic DARPin #41의 효능(potency)이 테스트되었다. DARPin은 IHC 3+ 내지 1+ 의 범위에서 셀라인 과발현 Her2에서 증식을 억제하였으며, 와일드 타입 HER2 레벨을 발현하는 세포에서는 억제하지 못했다.(도 4; 표 3) 또한 DARPin은 목록화된 셀라인에서 24시간 배양 내에서, 왕성하게 세포자멸을 유도한다. (도 5, 표 3)

[0432]

실험예들은 방법 섹션에서 언급된 것처럼 수행된다. 실험 결과들은 표 3에서 요약된다. IC₅₀ 및 EC₅₀ 값들은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려진 표준 절차들을 사용하여 위에 언급된 것처럼 얻어진 적정 곡선으로부터 측정된다. 실시예 적정 곡선들은 도 4 및 도 5에서 세 개의 상이한 셀 라인들 상의 DARPin #41에 대해

주어진다. IC₅₀ 및 EC₅₀은 테스트된 DARPin 및 셀라인에 의존하며, 0.2-10 nM 사이의 범위이다. 예를 들어, 그것은 DARPin #41, #45 및 #46이 BT474, MDA-MB175 및 NCI-N87 세포에서 세포 자멸을 유도하는 것을 보여주었다. (표 3) 유사 결과들이 본 발명의 다른 바이파라토픽 결합 단백질을 사용하여 얻어졌다.

표 3

다양한 상이한 셀라인들에서 DARPin #41의 효능

셀 라인	Her2 상태	증식의 억제 IC ₅₀ [nM]	세포 자멸의 유도 EC ₅₀ [nM]
BT474	IHC 3+	0.98	0.69
SKBR-3	IHC3+	1.75	n.a.
NCI-N87	IHC2+	0.94	0.26
ZR75-30	IHC3+	0.60	n.a.
HCC1419	IHC 3+	3.17	n.a.
MDA-MB175	IHC 1+	3.42	5.94
MCF7	IHC 0 / wt	n.i.	n.i.

n.i.: 관찰된 억제가 없음

n.a.: 분석하지 않음

[0433]

[0434] 실시예 6: 바이파라토픽 Her2-타겟팅 DARpins은 현재 표준 치료 요법과는 대조적으로, 증식을 억제하고, BT474 세포 안에서 세포자멸을 유도한다.

[0435]

바이파라토픽 DARPin #41의 효능은 Her2 양성 유방암 치료를 위해 승인된 약제들, 트拉斯투주맙 및 페투주맙과 비교되었다. DARPin은 효율적으로 증식을 억제하고, 트拉斯투주맙, 페투주맙 또는 트ラ스트주맙 및 페투주맙의 혼합과 대조적으로 세포자멸을 유도한다. (도 6)

[0436]

실험들은 방법 색션들에서 제시된 것과 같이 수행된다. 실시예 결과들은 도 6에서 보여준다. IC₅₀ 및 EC₅₀ 값들은 (표 3)이 기술에서 숙련된 당업자들에게 알려진 표준 절차들을 사용하여 위에서 제시한 것처럼 얻어진다. 유사 결과들은 본 발명의 다른 바이파라토픽 결합 단백질을 이용하여 얻어진다.

[0437]

실시예 7: 다양한 DARPin 포맷들의 생성

[0438]

예시로서, 바이파라토픽 DARPin #41의 상이한 포맷들의 효능은 BT474 세포 증식의 억제 내에서 DARPin #41과 비교되었다(도 7, 표 2). 인간 세럼 알부민 결합 DARPin (DARPin #41, #63, #64, #65)의 N- or C-말단에 PEGylation 또는 융합은 효능에 영향을 주지 않았다. (도 7a). 더욱이 DARPin 모이어티들 사이의 다양한 링커들은 효능에 영향을 주지 않았다 (도 7b). IC₅₀ 값은 1.5 - 5.5 nM 사이의 범위이다. 상응하는 결과들은 수득된 바이파라토픽 DARpins #41, #66, #67, #68의 상응하는 포맷들을 사용하여 얻었다. 전체적으로, 이것은 바이파라토픽 DARpins이 효능의 손실없이 그들의 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 변형될 수 있다는 것을 (세럼 알부민 결합 도메인들에 PEGylation 또는 융합과 같은, 이 기술에 숙련된 당업자에게 알려진 방법에 의해) 명확히 제시한다. 더구나, 이러한 실험들은 바이파라토픽 구성체 내에서 HER2에 결합하는 두 개의 반복 도메인들 사이에서 링커가 바이파라토픽 구성체의 효능에 상당히 영향을 주지 않고, 적어도 2 내지 24 아미노산들이 변경될 수 있다는 것을 제시한다.

[0439] 실시예 8: DARPin/Her2 상호작용 맵핑

[0440] HER2 엑토도메인과 본 발명의 바이파라토픽 DARpins의 상호작용은 용액(즉 pH 7.4 PBS)에서 이들 두 개의 분자들에 의해 형성된 복합체의 화학적 가교, 이어지는 프로테아제로 복합체의 소화(digest), 질량스펙트럼에 의한 결과 웨타이드의 분석에 의해 더 분석된다. 이러한 실험에서, DARPin 영역은 HER2 영역에 공유결합적으로 가교될 수 있는데, 이는 이들이 후자에 인접했을 때만 가능하다. HER2에 상응하는 웨타이에 공유결합적으로 가교되는 DARPin으로부터의 질량스펙트럼 분석에 의한 웨타이드들의 검출은, 그러한 웨타이드들이 HER2/DRAPin 복합체 내에 가까이 있다는 것을 보여준다. 그러한 근접 분석 방법들은 이 기술에 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있으며(예., Birch, C., 등., Anal. Chem., 82, 172-179, 2010), 서비스로서 다양한 회사에 의해 제공될 수 있다(예., CovalX AG, Zurich, Switzerland).

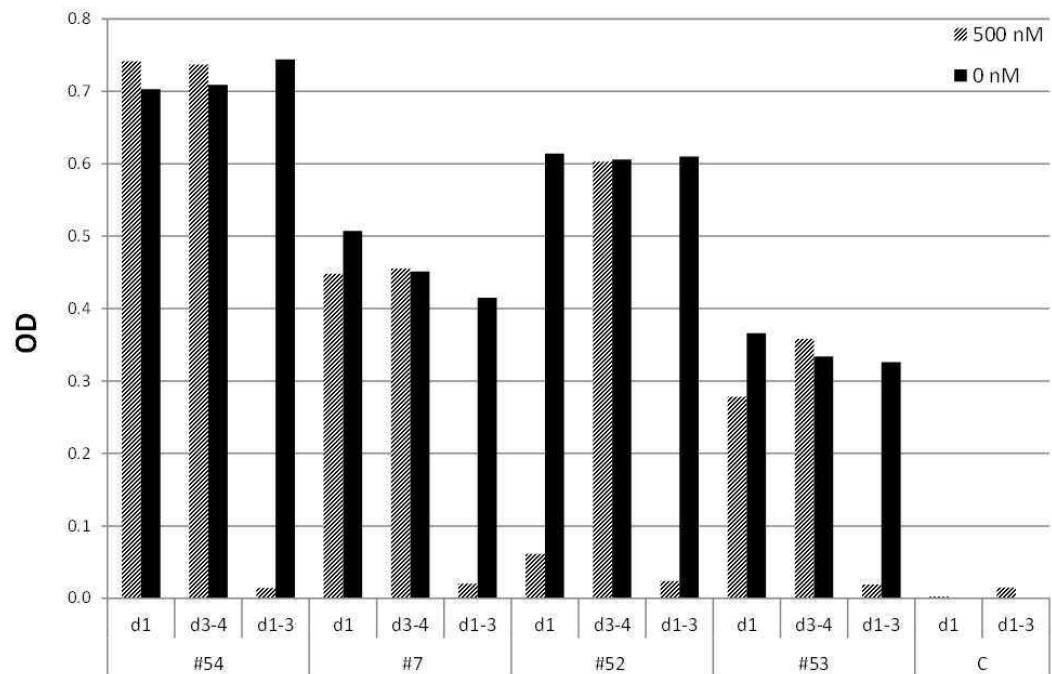
[0441] 예를 들어, 그러한 실험에서 HER2의 도메인 II 및 도메인 IV를 결합하는 바이파라토픽 DARPin #41은 HER2과 1:1로 복합체를 형성할 수 있다는 것이 발견되었다. 놀랍게도, C-말단 반복 도메인 (HER2의 도메인 IV에 결합하는)과 HER2의 도메인 I 사이의 공유 가교들이 관찰되었는데, 이는 비록 도메인 IV와 결합하지만, 복합체에서 HER2의 도메인 I과 가깝게 위치하는 이를 반복 도메인을 나타내는 것이다. 이와 같은 가교는 종래 기술(예, Bublil and Yarden, 인용)에서 기재하는 바와 같이 HER2가 컨포메이션 상태라면 나타나지 않을 것으로 예상된다. 중요하게는, HER2 엑토도메인이 도메인 IV와 단독으로 결합하는 C-말단 반복 도메인을 가지는 복합체에서 분석되었을 때, 그러한 HER2의 도메인 I의 가교들이 발견되지 않을 수 있고, 이는 HER2 및 도메인 IV에 결합하는 단량체의 반복 도메인에 의해 형성된 복합체의 경우에, 반복 도메인이 도메인 I에 근접하지 않는 것을 나타낸다. 그러므로 HER2에 3차원 도메인 배열들은, HER2의 도메인 IV에 결합하는 개별 반복 도메인을 가지고 형성된 복합체와 본 발명의 바이파라토픽 결합 단백질을 가지고 형성된 복합체에서 달라야만 한다.

[0442] 흥미롭게도, HER2의 엑토도메인의 알려진 구조들은, 2개의 반복 도메인들 사이의 2 내지 24개의 아미노산 범위에서 짧은 링커들을 고려할 때, 본 발명의 바이파라토픽 결합 단백질의 반복 도메인들 두 개 모두가 동일한 HER2 분자에 동시에 결합하는 것을 허용하지 않는다. 이것은 HER2가 양쪽 반복 도메인들의 동시 결합을 허용하는 아직 알려지지 않은 형태일 것이라는 것을 말해준다.

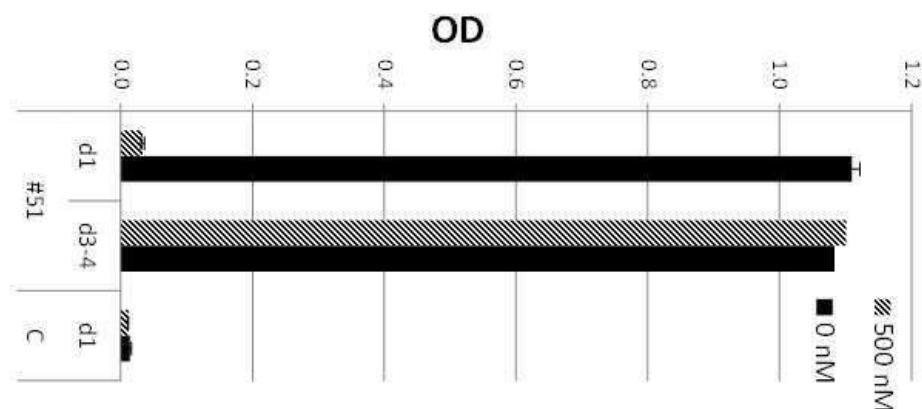
[0443] 전체적으로, 그러한 실험들은 본 발명의 바이파라토픽 결합 단백질들이 HER2 엑토도메인과 분자간 상호작용을 할 수 있다는 것을 말해주며, 종래의 기술에서 알려지지 않은 새로운 컨포메이션으로 HER2 엑토도메인을 고정한다는 것을 말해준다. 즉, 입체 구조 배열에서 도메인 I과 도메인 IV를 브릿징하여 반복도메인(HER2의 도메인 IV에 결합)과 도메인 I간에 관찰된 가교가 발생하도록 하는 것이다. 따라서, HER2의 이 새로운 컨포메이션은 분자간에 HER2의 도메인 II 및 도메인 IV에 동시에 결합하는 본 발명의 바이파라토픽 결합 단백질에 의해 안정화될 것이다.

도면

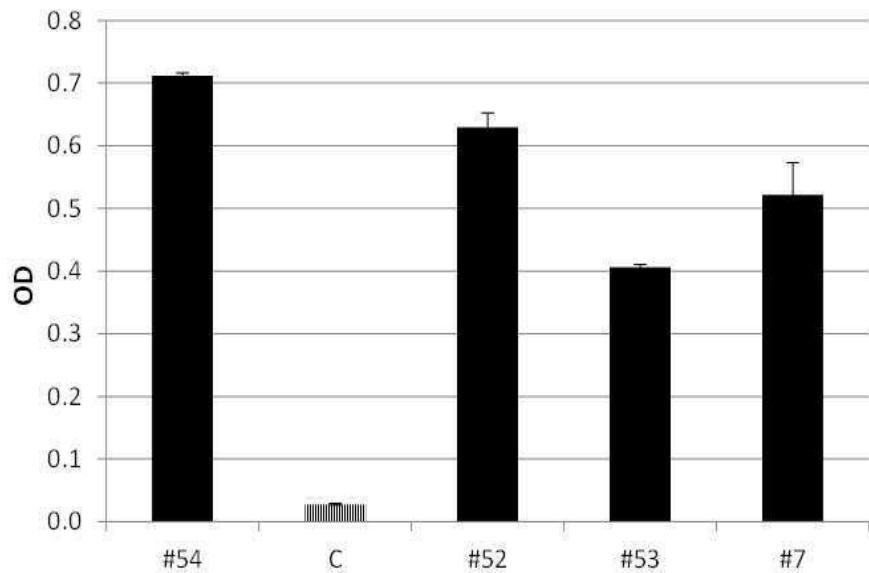
도면 1a



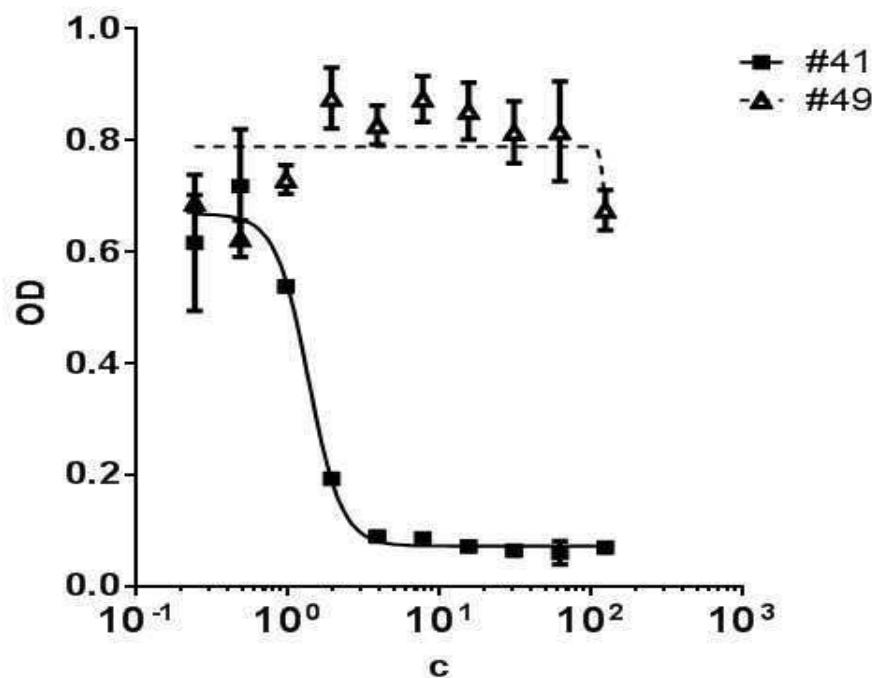
도면 1b



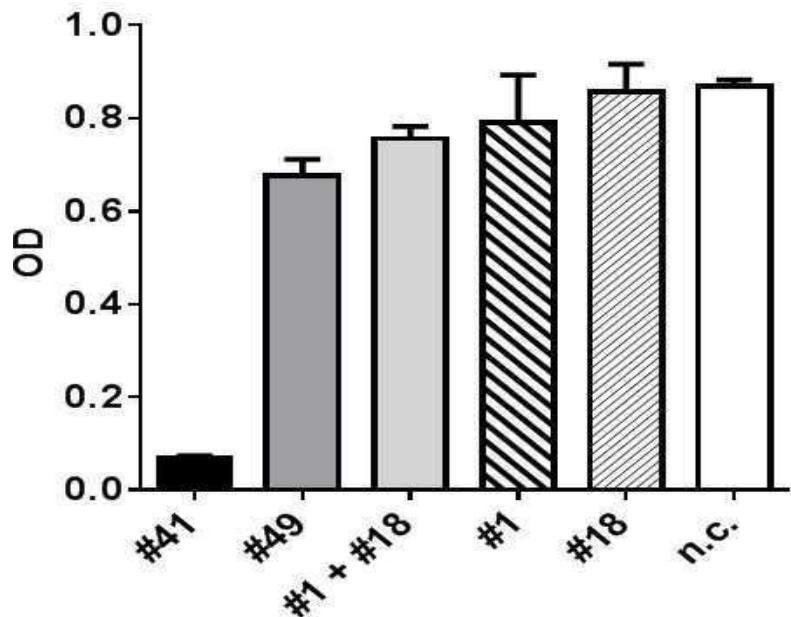
도면1c



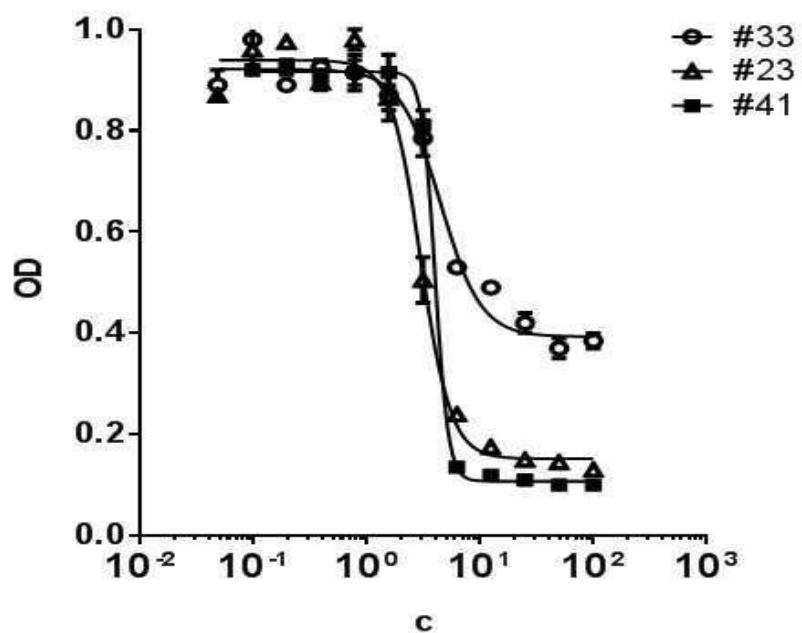
도면2a



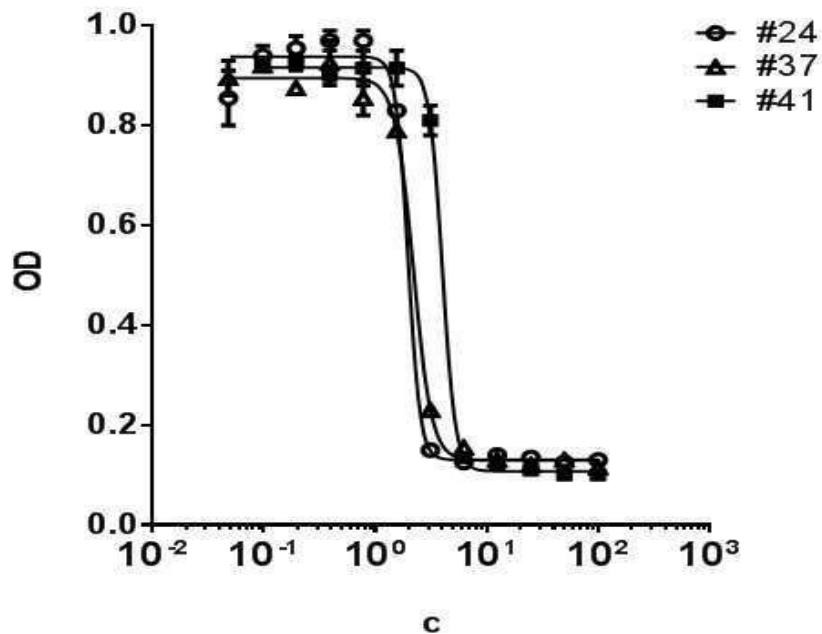
도면2b



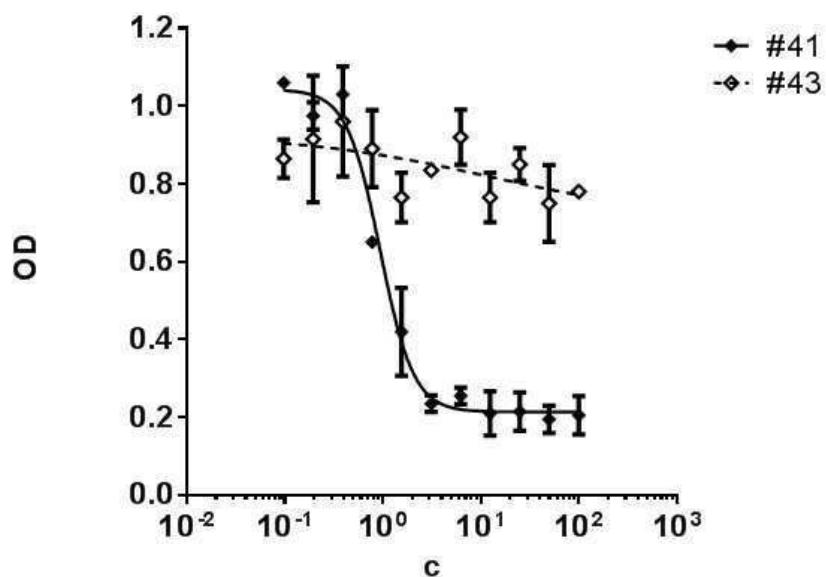
도면3a



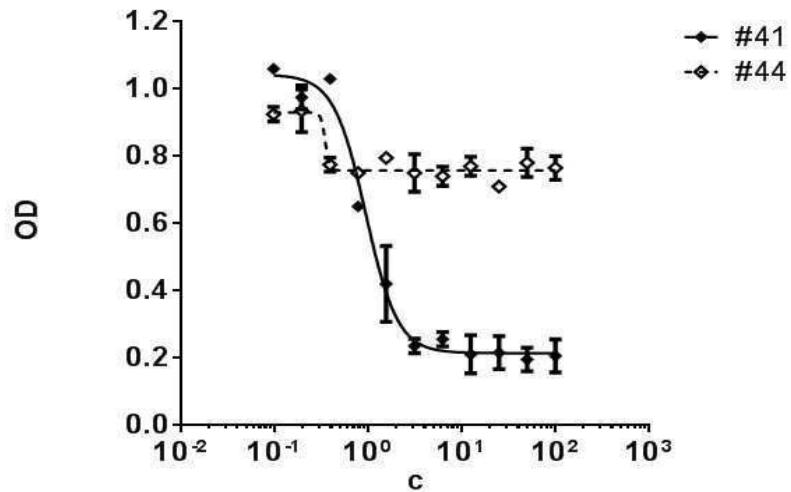
도면3b



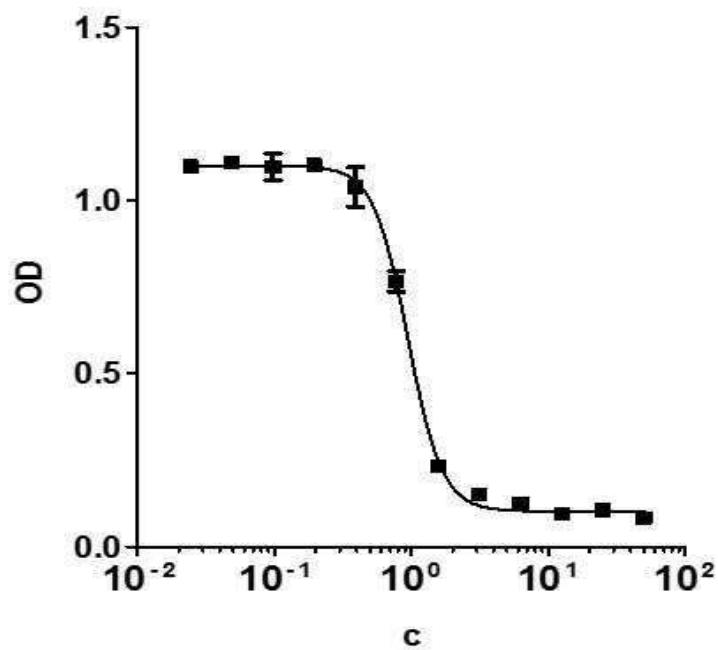
도면3c



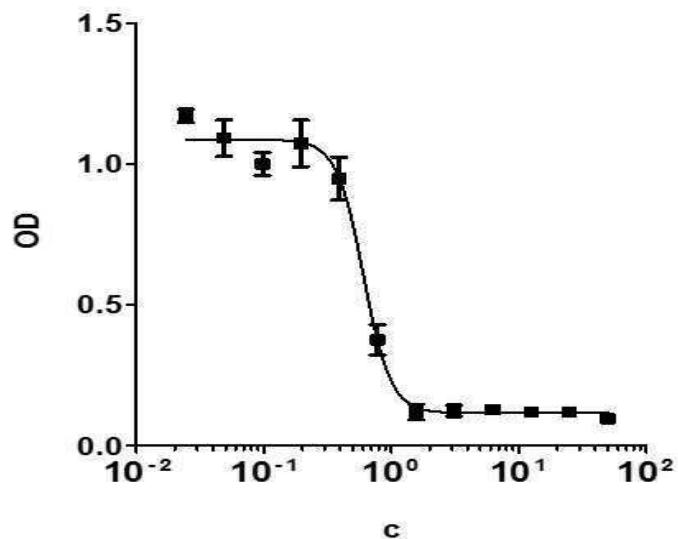
도면3d



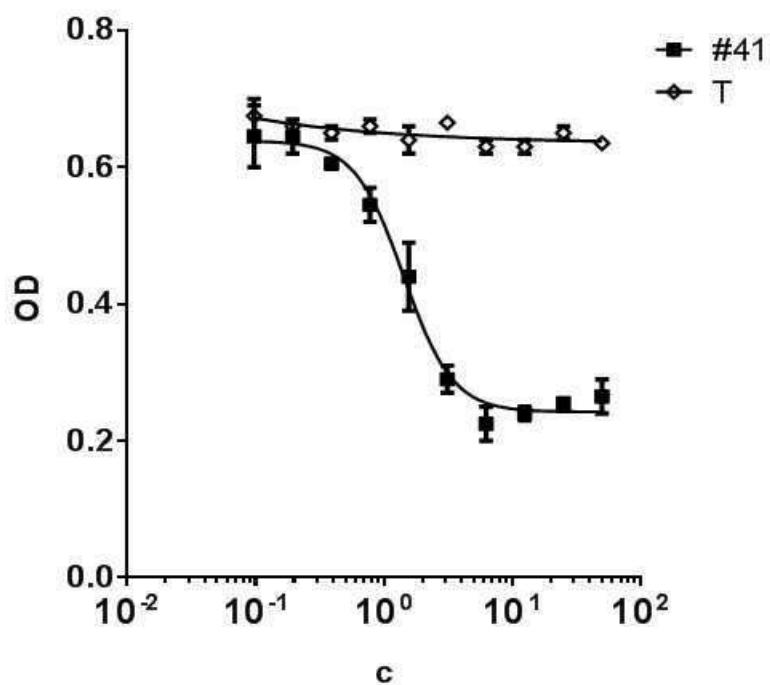
도면4a



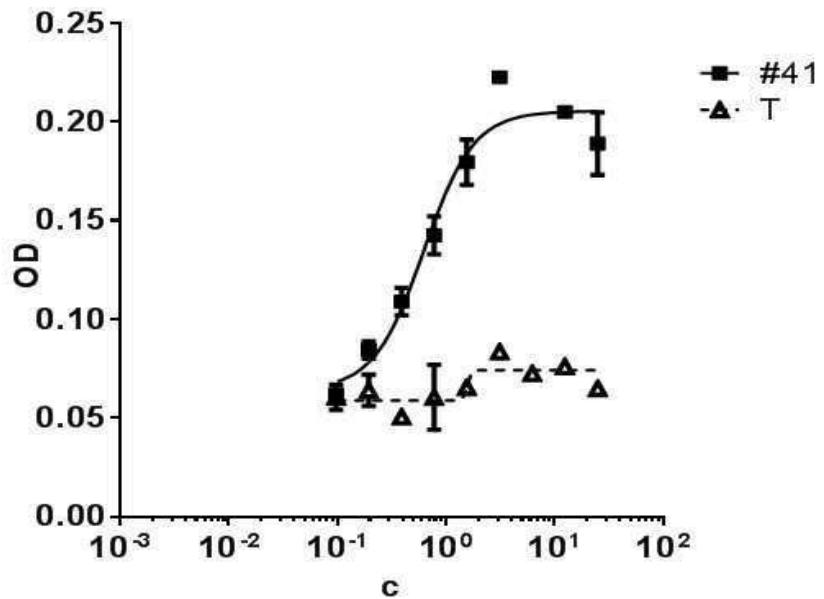
도면4b



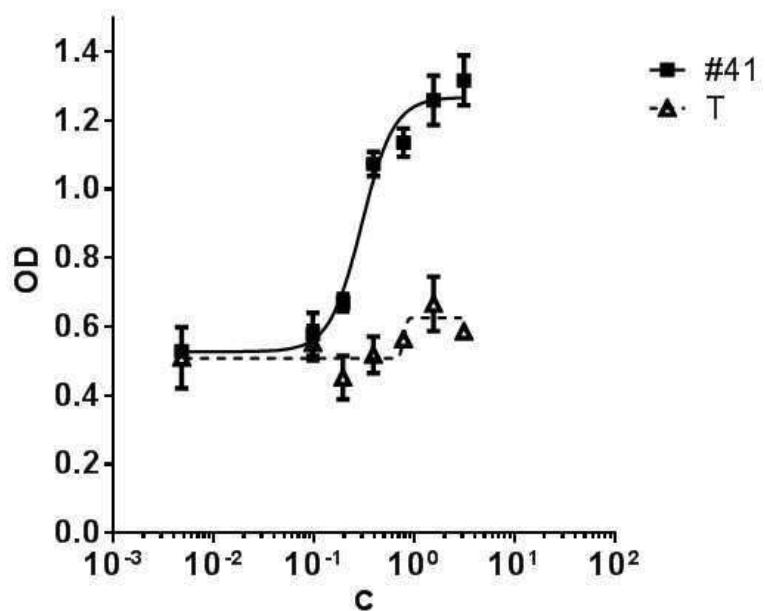
도면4c



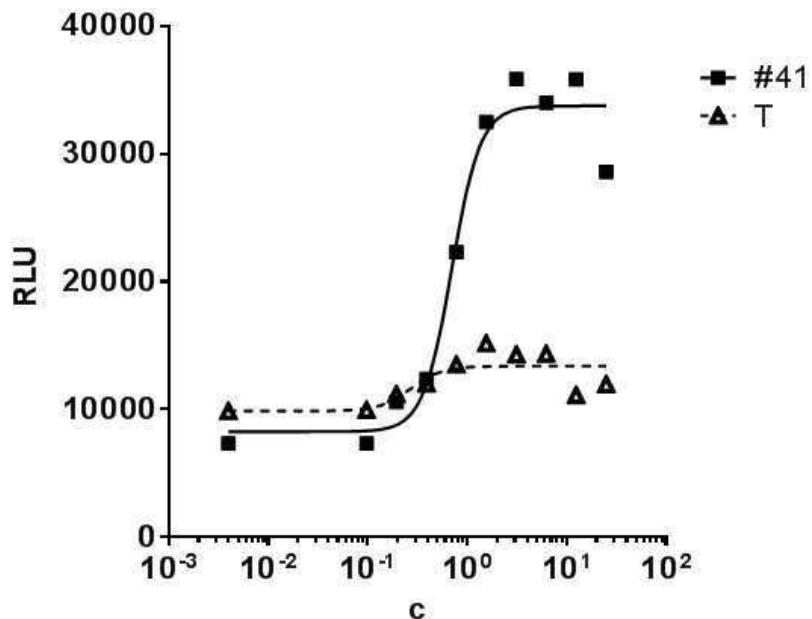
도면5a



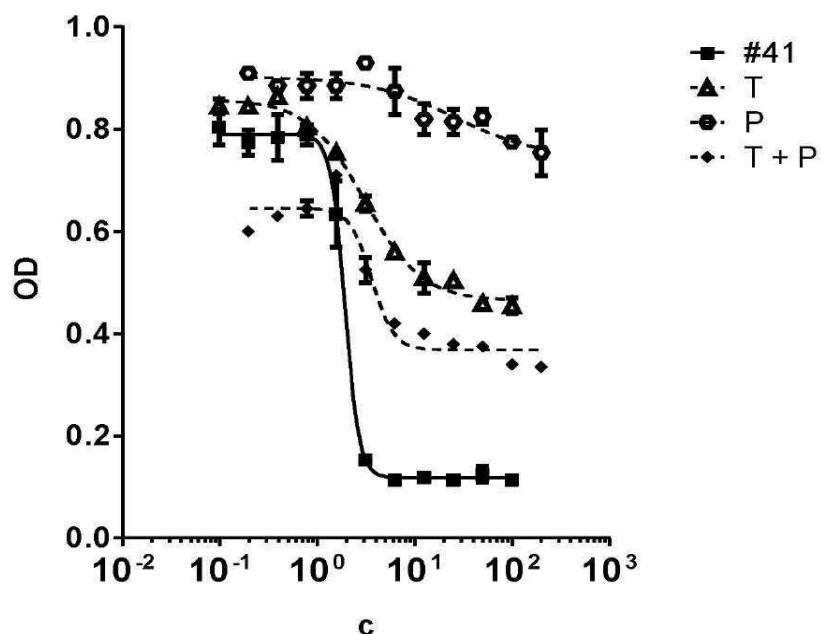
도면5b



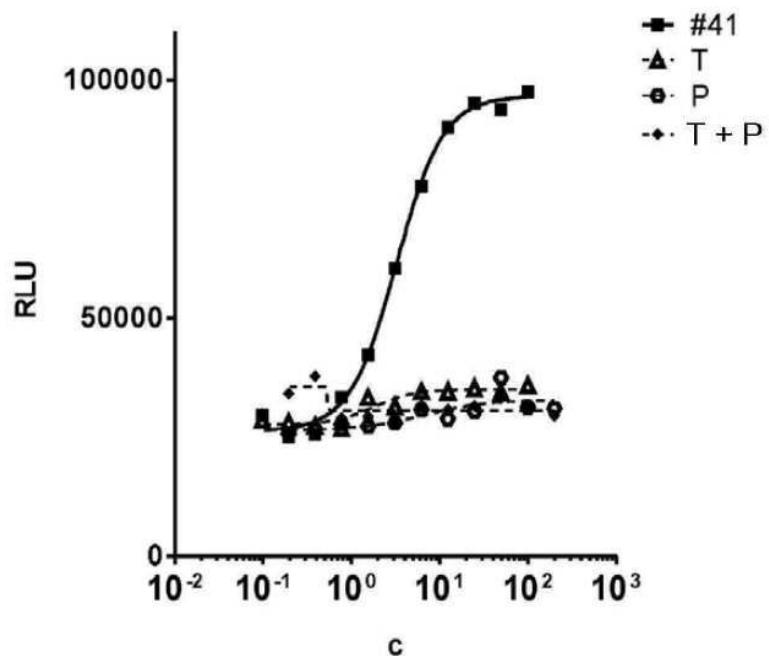
도면5c



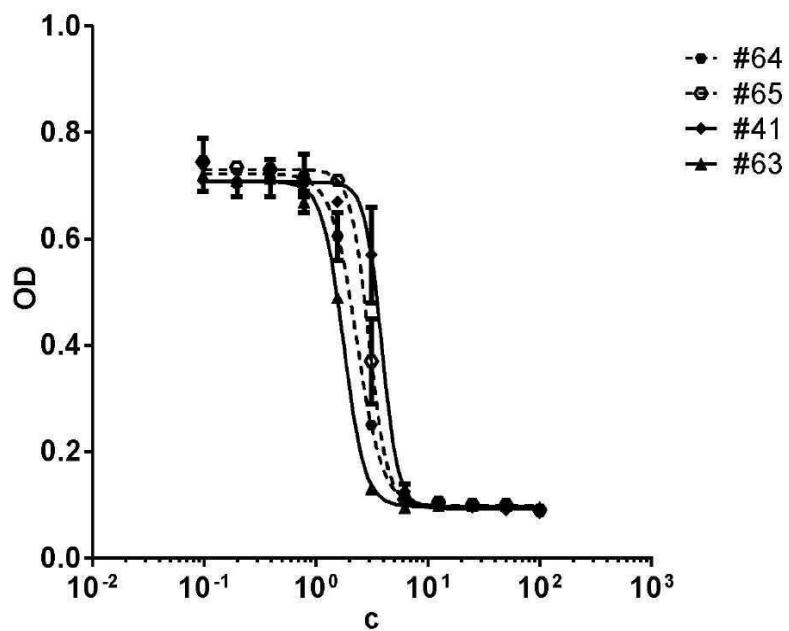
도면6a



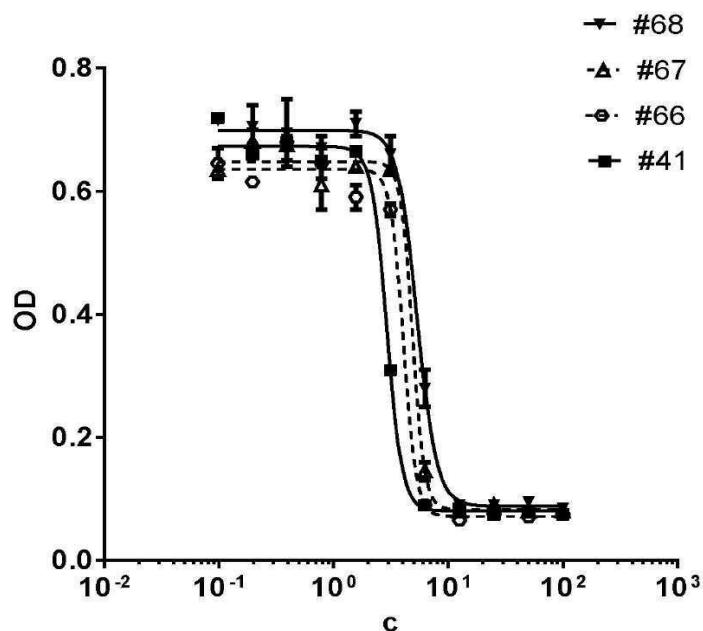
도면6b



도면7a



도면7b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Molecular Partners

<120> Binding proteins comprising at least two binding domains against
HER2

<130> MD41080

<160> 141

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Capping module

<400> 1

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

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 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> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Capping module

<400> 2

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

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Capping module

<400> 3

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

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Capping module

<400> 4

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> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Capping module

<400> 5

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 Leu Asn

20 25

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> His-tag

<400> 6

Met Arg Gly Ser His His His His His

1 5 10

<210> 7

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GS-linker

<400> 7

Gly Ser

1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GS-linker

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GS-linker

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> GS-linker

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PT-linker

<400> 11

Pro Thr Pro Thr Pro

1 5

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> PT-linker

<400> 12

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr

1 5 10 15

Pro Thr Pro Thr

20

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 13

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys Ser Gln

1 5 10 15

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

20

25

30

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 14

Gly Ser Asp Leu Gly Val Asn Leu Leu Trp Ala Ala Thr Arg 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

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 15

Lys Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 16

Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr Ser 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> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 17

Lys Asp Phe Glu Gly Val Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Trp 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> 18

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 18

Lys Asp Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp Ser 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> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 19

Gln Asp Lys Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala Trp Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25
----	----

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 20

Gly Ser Asp Leu Gly Trp Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala His 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
----	----	----

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 21

Lys Asp Trp Glu Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Thr 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> 22

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 22

Lys Asp Thr Val Gly Thr Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Glu 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> 23

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 23

Lys Asp Glu Tyr Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln Phe Asp

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> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 24

Gln Asp Trp Val Gly Gln Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala Trp Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	
----	----	--

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 25

Gln Asp Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	
----	----	--

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 26

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

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 27

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ser His 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

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 28

Lys Asp Trp Tyr Gly Lys Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Leu 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> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 29

Lys Asp Phe Phe Gly Ile Thr Pro Leu His Gln Ala Ala Trp Gly His

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 30

Lys Asp Asp Phe Gly Thr Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Asp 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> 31

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 31

Lys Asp Glu Asp Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala 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> 32

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 32

Lys Glu Glu Asp Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Thr His 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> 33
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 33

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

<210> 34
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 34

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

<210> 35
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 35

Gln Asp Trp Tyr Gly Thr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Trp Trp Gly
 1 5 10 15

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

20 25

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 36

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ser Arg 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

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 37

Lys Asp Phe Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Ser 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> 38

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 38

Lys Asp Val Glu Gly Trp Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Ser 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> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 39

Gln Asp Asn His Gly Ala Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Gln Trp Gly

1 5 10 15

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

20 25

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 40

Gly Ser Asp Leu Gly Asn Lys Leu Leu Ile Ala Ala Ser Val 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

<210> 41

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 41

Lys Asp Glu Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Trp 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> 42
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> AR module (M1.1b)
<400> 42

Lys Asp Val Lys Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala 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> 43
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 43

Gln Asp Asn Asp Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Tyr Gly

1	5	10	15
His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
20	25		

<210> 44
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> N-Cap module (Nr)
<400> 44

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Asn Ala Ala Val Cys Gly Gln

1	5	10	15
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Val Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala			

20 25 30

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> N-Cap module (Nr)
<400> 45

Gly Ser Asp Leu Gly Thr Lys Leu Leu Asp Ala Ala Thr Tyr 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

<210> 46
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> AR module (M1.1b)
<400> 46

Lys Asp Trp Arg Gly Phe Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Tyr Leu 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> 47
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> AR module (M1.1b)
<400> 47

Lys Asp Thr Ile Gly His Thr Pro Leu His Arg Ala Ala Phe Val Gly

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

Ala

<210> 48
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 48

Gln Asp Thr Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Trp Thr Gly
1 5 10 15

His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
20 25

<210> 49
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> C-Cap module (Cr)
<400> 49

Gln Asp Asp Tyr Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Asn Ser Gly
1 5 10 15

His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
20 25

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> N-Cap module (Nr)
<400> 50

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Gln Ala Ala Asn Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

<210> 51

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 51

Lys Asp Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Arg 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

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 52

Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Leu 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> 53

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 53

Gln Asp Thr Ala Gly Gln Thr Pro Ala Asp Leu Ala Asp Asp Gly

1 5 10 15

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

20 25

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> N-Cap module (old)

<400> 54

Gly Ser Asp Leu Gly 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

<210> 55

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (old)

<400> 55

Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His 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> 56

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR module (old)

<400> 56

Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile 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> 57

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C-Cap module (old)

<400> 57

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25
----	----

<210> 58

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR sequence motif

<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> 58

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> 59
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> AR sequence motif
<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> (11)..(11)
<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

<400> 59
Lys Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Xaa Ala Ala Xaa Xaa 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> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220><223> AR sequence motif

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 60

Gly Ser Asp Leu Gly Xaa Lys Leu Leu Xaa Ala Ala Xaa Xaa 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
----	----	----

<210> 61

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR sequence motif

<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

<400> 61

Gln Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

<210>	62	20	25
<211>	126		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220><223>	AR domain (one-domain)		
<400>	62		
Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His			
65	70	75	80
Gly His Leu Val Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val			
85	90	95	
Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp			
100	105	110	
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
115	120	125	
<210>	63		
<211>	126		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220><223>	AR domain (one-domain)		
<400>	63		
Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln			

20	25	30	
Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr Ser 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala			
100	105	110	
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
115	120	125	
<210> 64			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> AR domain (one-domain)			
<400> 64			
Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys Ser 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 Phe Gln Ser Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His			
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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp			

100	105	110
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn		
115	120	125
<210> 65		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> AR domain (one-domain)		
<400> 65		
Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln		
1	5	10
Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala		
20	25	30
Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His		
65	70	75
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val		
85	90	95
Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Lys Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp		
100	105	110
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn		
115	120	125
<210> 66		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> AR domain (one-domain)		
<400> 66		
Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala			
100	105	110	

Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
115	120	125	
<210> 67			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> AR domain (one-domain)			
<400> 67			

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 68

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 68

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Glu Gly Tyr Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Asp 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 Ser Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Tyr 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 Asp Ala Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

<210> 69

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 69

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala His Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Trp Tyr Gly Thr Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Val Ala 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 Asp Phe Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr His

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 Trp Gln Gly Gln Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Gln

100 105 110

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

115 120 125

<210> 70

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 70

Gly Ser Asp Leu Gly His Lys Leu Leu Glu Ala Ala Val 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 Trp Tyr Gly Lys Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Leu 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 Glu Asp Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 71

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 71

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ser His 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 Phe Phe Gly Ile Thr Pro Leu His Gln Ala Ala Trp Gly His

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gln Asp Trp Tyr Gly Thr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Trp Trp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 72

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 72

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ser Arg 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 Phe Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Ser 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 Val Glu Gly Trp Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Tyr

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 Asn His Gly Ala Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Gln

100 105 110

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

115 120 125

<210> 73

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 73

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 Phe Tyr Gly Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly

35 40 45

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

50 55 60
Ala His Asp Trp Asn Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr

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

100 105 110
His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp

115 120 125
Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile

130 135 140
Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn

145 150 155
<210> 74

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 74

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Asn Ala Ala Val Cys Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Trp Arg Gly Phe Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Tyr Leu Gly

35 40 45

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

50 55 60
Ala Gln Asp Thr Ala Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Trp Thr

65 70 75 80
Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn

<210> 75
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> AR domain (one-domain)
 <400> 75
 Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ile Ala Ala Thr Val 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 Thr Ile Gly His Thr Pro Leu His Arg Ala Ala Phe Val Gly
 35 40 45
 Gln Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 Ala Gln Asp Asp Tyr Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asn Ser
 65 70 75 80
 Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 85 90
 <210> 76
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> AR domain (one-domain)
 <400> 76
 Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Val Ala Ala Thr Ser 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 Arg Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Arg Ala Ala Phe Val Gly
 35 40 45

50	55	60	
Ala Gln Asp Asp Phe Gly His Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu			
65	70	75	80
Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
85	90		
<210> 77			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> AR domain (one-domain)			
<400> 77			
Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Gln Ala Ala Asn Leu 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 Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Arg 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 Glu Tyr Gly Val Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Leu			
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 Glu Ser Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu			
100	105	110	
His Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
115	120	125	
<210> 78			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> AR domain (one-domain)			

<400> 78

Gly Ser Asp Leu Gly Leu Lys Leu Leu Gln Ala Ala Asn Leu 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 Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Arg 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 Glu Tyr Gly Val Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Leu

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 Thr Ala Gly Gln Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 79

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 79

Gly Ser Asp Leu Gly 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 Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Ala 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 Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 80

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> AR domain (one-domain)

<400> 80

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 Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Ala 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 Gly

100 105 110

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

115 120 125

<210> 81

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 81

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 Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 82

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 82

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

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

35	40	45
----	----	----

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

Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp
 115 120 125
 Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
 130 135 140
 Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 145 150 155

<210> 83

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 83

Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Ile Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

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

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

35	40	45
----	----	----

Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

50	55	60
----	----	----

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Glu Ile Val Glu
 85 90 95
 Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly
 100 105 110
 Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala
 115 120 125
 Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Gln Ala Ala Asn Leu Gly Gln
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala Thr Gly Ala Asp Val Asn Ala
 165 170 175
 Lys Asp Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu His Trp Ala Ala Arg Arg Gly
 180 185 190
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn
 195 200 205
 Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Leu
 210 215 220
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val
 225 230 235 240
 Asn Ala Gln Asp Glu Ser Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu
 245 250 255
 His Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn
 260 265 270
 <210> 84
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> AR domain (two-domain)
 <400> 84
 Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Ile Lys
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys Ser Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

50 55 60

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp

65 70 75 80

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Glu Ile Val Glu

85 90 95

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly

100 105 110

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

115 120 125

Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Asp Arg Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Arg Ala Ala Phe Val Gly

180 185 190

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

195 200 205

Ala Gln Asp Asp Phe Gly His Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu

210 215 220

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

225 230 235

<210>

85

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 85

Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Ile Lys

1 5 10 15

Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys Ser Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

50 55 60

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp

65 70 75 80

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Glu Ile Val Glu

85 90 95

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly

100 105 110

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

115 120 125

Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

<210> 86

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 86

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala
 225 230 235 240
 Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala
 245 250 255
 Ala Gly Ala Gly Asn Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala
 260 265 270

<210> 87

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 87

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala

180 185 190

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

195 200 205

Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ala

<210> 88

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 88

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala
 100 105 110
 Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu
 130 135 140
 Gln Ala Ala Asn Leu Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala
 145 150 155 160
 Thr Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu
 165 170 175
 His Trp Ala Ala Arg Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu
 180 185 190
 Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro
 195 200 205
 Leu His Leu Ala Ala Ser Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
 210 215 220
 Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Ser Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu His Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val
 245 250 255
 Leu Gln Lys Leu Asn

260

<210> 89

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 89

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu

130 135 140

Val Ala Ala Thr Ser Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala

145 150 155 160

Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Arg Ile Gly Phe Thr Pro Leu

165 170 175

His Arg Ala Ala Phe Val Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

180 185 190

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Asp Phe Gly His Thr Pro

195

200

205

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

210

215

220

Gln Lys Leu Asn

225

<210> 90

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 90

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala

100

105

110

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

115

120

125

Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu

130

135

140

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

145 150 155 160

Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu

210 215 220

Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr

225 230 235 240

Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile

245 250 255

Leu Gln Lys Leu Asn

260

<210> 91

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 91

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp 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 Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala			
100	105	110	
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Gly			
115	120	125	
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
130	135	140	
Gly Ser Gly Ser Asp Leu Gly Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala			
145	150	155	160
Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val			
165	170	175	
Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala			
180	185	190	
His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp			
195	200	205	
Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala			
210	215	220	
Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala			
225	230	235	240
Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp Ile Ala			
245	250	255	
Ala Gly Ala Gly Asn Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala			
260	265	270	
<210> 92			
<211> 274			
<212> PRT			
<213> Artificial			

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 92

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr 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 Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp Ser		
65	70	75
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val		
85	90	95
Asn Ala Gln Asp Lys Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala		
100	105	110
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser		
115	120	125
Pro Thr		
130	135	140
Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala		
145	150	155
Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala		
165	170	175
Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala		
180	185	190
Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly		
195	200	205
Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu		
210	215	220
Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys Ala		
225	230	235
Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Pro Ala Asp		
245	250	255
Ile Ala Ala Gly Ala Gly Asn Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys		
260	265	270

Ala Ala

<210> 93

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 93

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ser Arg 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 Phe Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Ser 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 Val Glu Gly Trp Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Tyr

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 Asn His Gly Ala Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Gln

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

His Trp Ala Ala Arg Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

180	185	190
-----	-----	-----

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro
 195 200 205
 Leu His Leu Ala Ala Ser Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

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

Leu Gln Lys Leu Asn
 260

<210> 94

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 94

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ser Arg 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 Phe Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Ser 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 Val Glu Gly Trp Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Tyr

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

Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu

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

195	200	205
Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu		
210	215	220
Gln Lys Leu Asn		

225
<210> 95
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> AR domain (two-domain)
<400> 95

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ser Arg 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 Phe Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Arg Ser 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 Val Glu Gly Trp Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Tyr		
65	70	75
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val		

85	90	95	
Asn Ala Gln Asp Asn His Gly Ala Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Gln			
100	105	110	
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly			
115	120	125	
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu			
130	135	140	
Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala			
145	150	155	160
Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu			
165	170	175	
Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu			
180	185	190	
Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro			
195	200	205	
Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu			
210	215	220	
Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr			
225	230	235	240
Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile			
245	250	255	
Leu Gln Lys Leu Asn			
260			
<210> 96			
<211> 261			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> AR domain (two-domain)			
<400> 96			
Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Glu Gly Tyr Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Asp 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 Ser Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Tyr Ser		
65	70	75
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val		
85	90	95
Asn Ala Gln Asp Asp Ala Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala		
100	105	110
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly		
115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu		
130	135	140
Gln Ala Ala Asn Leu Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala		
145	150	155
Thr Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Ser Ile Gly Gln Thr Pro Leu		
165	170	175
His Trp Ala Ala Arg Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu		
180	185	190
Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro		
195	200	205
Leu His Leu Ala Ala Ser Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		
210	215	220
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Ser Gly Glu Thr		
225	230	235
Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu His Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val		
245	250	255
Leu Gln Lys Leu Asn		
260		
<210		

> 97

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 97

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Glu Gly Tyr Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Asp 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 Ser Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Tyr 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 Asp Ala Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu

130 135 140

Val Ala Ala Thr Ser Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala

145 150 155 160

Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Arg Ile Gly Phe Thr Pro Leu

165 170 175

His Arg Ala Ala Phe Val Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

180 185 190

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Asp Phe Gly His Thr Pro

195 200 205

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

210 215 220

Gln Lys Leu Asn

225

<210> 98

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 98

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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 Phe Glu Gly Tyr Thr Pro Leu His Val Ala Ala Tyr Asp 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 Ser Gln Gly Arg Thr Pro Leu His Glu Ala Ala Tyr 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 Asp Ala Gly Glu Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu

165 170 175

Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu
 180 185 190
 Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro
 195 200 205
 Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu
 210 215 220
 Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr
 225 230 235 240
 Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile
 245 250 255
 Leu Gln Lys Leu Asn
 260
 <210
 > 99
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> AR domain (two-domain)
 <400> 99

Gly Ser Asp Leu Gly His Lys Leu Leu Glu Ala Ala Val 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 Trp Tyr Gly Lys Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Leu 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 Glu Asp Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr
 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 Asn Asp Gly Phe Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp
 100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

His Trp Ala Ala Arg Arg Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

180 185 190

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Val Thr Pro

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Gln Lys Leu Asn

260

<210> 100

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 100

Gly Ser Asp Leu Gly His Lys Leu Leu Glu Ala Ala Val 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 Trp Tyr Gly Lys Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Leu 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 Glu Asp Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu

130 135 140

Val Ala Ala Thr Ser Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala

145 150 155 160

Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Arg Ile Gly Phe Thr Pro Leu

165 170 175

His Arg Ala Ala Phe Val Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

180 185 190

Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Asp Phe Gly His Thr Pro

195 200 205

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

210 215 220

Gln Lys Leu Asn

225

<210> 101

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 101

Gly Ser Asp Leu Gly His Lys Leu Leu Glu Ala Ala Val 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 Trp Tyr Gly Lys Thr Pro Leu His Phe Ala Ala Gly Leu 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 Glu Asp Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr			
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 Asn Asp Gly Phe Thr Pro Ala Asp Leu Ala Asp			
100	105	110	
Ser Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly			
115	120	125	
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Leu Leu			
130	135	140	
Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala			
145	150	155	160
Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu			
165	170	175	
Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu			
180	185	190	
Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro			
195	200	205	
Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu			
210	215	220	
Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr			
225	230	235	240
Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile			
245	250	255	

Leu Gln Lys Leu Asn

260

<210> 102

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 102

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

1 5 10 15

Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50 55 60

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr

65 70 75 80

Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val

85 90 95

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265

<210> 103

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 103

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

1 5 10 15

Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50 55 60

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr

65 70 75 80

Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val

85 90 95

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Asp Trp Arg Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Leu Asn Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

<210> 104

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 104

Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Asn Lys

1 5 10 15

Leu Leu Ile Ala Ala Ser Val Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

20	25	30
Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Thr Gly Trp Thr		
35	40	45
Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Trp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		
50	55	60
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Lys Gly Gln		
65	70	75
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val Glu		
85	90	95
Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Asn Asp Gly		
100	105	110
Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg Tyr Gly His Glu Asp Ile Ala		
115	120	125
Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
130	135	140
Arg Ser Asp Leu Gly Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gln		
145	150	155
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala		
165	170	175
Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly		
180	185	190
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn		
195	200	205
Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile		
210	215	220
Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val		
225	230	235
Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly		
245	250	255
Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn		
260	265	270
<210> 105		

<211> 303

<212> PRT

<213> Artificial

<220><

223> AR domain (two-domain)

<400> 105

Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Asn Lys

1 5 10 15

Leu Leu Ile Ala Ala Ser Val Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Trp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

50 55 60

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Lys Gly Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Asn Asp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Asn Asp Trp Arg Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Leu Asn

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

<210> 106

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 106

Gly Ser Asp Leu Gly 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 Phe Tyr Gly Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala His Asp Trp Asn Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr

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

100 105 110

His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
 115 120 125
 Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
 130 135 140
 Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu
 165 170 175
 Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met
 180 185 190
 Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu
 210 215 220
 Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr
 225 230 235 240
 Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val
 245 250 255
 Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys
 260 265 270
 Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu
 275 280 285
 Ile Leu Gln Lys Leu Asn
 290
 <210> 107
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> AR domain (two-domain)
 <400> 107
 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 Phe Tyr Gly Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala His Asp Trp Asn Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp Ile His Gly His Thr Pro

195 200 205

Leu His Leu Ala Ala Ala Met Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

210 215 220

Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Asn Asp Trp Arg Gly Phe Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Thr Asp Thr Ala Gly Asn

260	265	270
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Phe Gly His Leu Glu Ile Val Glu		
275	280	285
Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly		
290	295	300
Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala		
305	310	315
Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn		
325		
<210> 108		
<211> 270		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> AR domain (two-domain)		
<400> 108		
Gly Ser Asp Leu Gly Asp Lys Leu Leu Gln Ser Asp Leu Gly Ile Lys		
1	5	10
Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys Ser Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu		
20	25	30
Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Gln Ser Val Thr		
35	40	45
Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		
50	55	60
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp		
65	70	75
Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Glu Ile Val Glu		
85	90	95
Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly		
100	105	110
Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala		
115	120	125

Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

130	135	140
Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Val Ala Ala Ala Gln Gly Gln		
145	150	155
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala		
165	170	175
Lys Asp Gln Gln Gly Ala Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Trp Lys Gly		
180	185	190
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn		
195	200	205
Ala Lys Asp Leu Ser Gly Asp Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Trp Phe		
210	215	220
Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val		
225	230	235
Asn Ala Gln Asp Thr Glu Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Leu		
245	250	255
Tyr Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn		

260	265	270
<210> 109		
<211> 294		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> AR domain (two-domain)		
<400> 109		
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln		
1	5	10
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala		
20	25	30
Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly		
35	40	45
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn		

50	55	60
Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile		
65	70	75
Gly His Leu Glu Ile Ala 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 Gly		
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 Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu		
130	135	140
Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala		
145	150	155
Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Tyr Gly Ile Thr Pro Leu		
165	170	175
His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu		
180	185	190
Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Trp Asn Gly Trp Thr Pro		
195	200	205
Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		
210	215	220
Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ile Asp Asn Ala Gly Lys Thr		
225	230	235
Pro Leu His Leu Ala Ala Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val		
245	250	255
Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys		
260	265	270
Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu		
275	280	285
Ile Leu Gln Lys Leu Asn		
290		
<210> 110		

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

><223> AR domain (two-domain)

<400> 110

Gly Ser Asp Leu Gly 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 Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile

65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Ala 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 Gly

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 Ser Arg Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu

130 135 140

Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His

180 185 190

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

195 200 205

Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp

245 250 255

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

260 265

<210> 111

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AR domain (one-domain) Negative Control

<400> 111

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

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 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> 112

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 112

Gly Ser Asp Leu Gly Asn Lys Leu Leu Ile Ala Ala Ser Val 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 Glu Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Trp 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 Val Lys Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr

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 Asn Asp Gly Tyr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Arg

100 105 110

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

115 120 125

<210> 113

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 113

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala His Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Trp Tyr Gly Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Val Ala 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 Asp Phe Gly Thr Thr Pro Leu His Ala Ala Ala Asp Tyr

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 114

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 114

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Lys 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 Trp Glu Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala His Ala 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 Ile Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Ser Ala Ala Val Tyr

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 Trp Tyr Gly Thr Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Trp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 115

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 115

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

<210> 116
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> AR doamin (one-domain)

<400> 116

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Ile Ala Ala Ser His Gly Gln

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

Lys Asp Phe Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 117

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 117

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

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Thr Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 118

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 118

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Gln 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 Phe Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 119

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 119

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

<210> 120
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> AR domain (one-domain)
<400> 120

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 121

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (one-domain)

<400> 121

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 122

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 122

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His			
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 Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp			
100	105	110	
Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser			
115	120	125	
Pro Thr			
130	135	140	
Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Glu Ala Ala			
145	150	155	160
Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Glu Leu Leu Lys Ala Gly Ala			
165	170	175	
Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala			
180	185	190	
Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Ala Gly			
195	200	205	
Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu			
210	215	220	
Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys Ala			

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ala

<210> 123

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 123

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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 Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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 Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His

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

100 105 110

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

115 120 125

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala

180 185 190

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

195 200 205

Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ala

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 124

Gly Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Lys 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

<210> 125

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 125

Lys Asp Phe Gln Gly Val Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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> 126

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 126

Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His 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> 127

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 127

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

<210> 128

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 128

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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

<210> 129

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 129

Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Thr Asn 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> 130

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 130

Lys Asp Ile Thr Gly Glu Thr Pro Leu His His Ala Ala Asp Ser 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> 131

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 131

Gln Asp Lys Ala Gly Val Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Ala Trp Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25		
----	----	--	--

<210> 132

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-Cap module (Nr)

<400> 132

Gly Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg 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
----	----	--	----

<210> 133

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 133

Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser 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> 134

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR module (M1.1b)

<400> 134

Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His 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> 135

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Cap module (Cr)

<400> 135

Gln Asp Glu Arg Gly Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly

1	5	10	15
His Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu Gln Lys Leu Asn			
20	25		

<210> 136

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 136

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

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

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50	55	60
----	----	----

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

 Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu
 115 120 125
 Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg
 130 135 140
 Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp
 145 150 155 160
 Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys
 165 170 175

 Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His
 180 185 190
 Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 195 200 205
 Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly
 210 215 220
 His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn
 225 230 235 240

 Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn
 245 250 255
 Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Gly
 260 265 270
 Ser Gly Gly Ser Cys
 275
<210> 137
<211> 414
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (three-domain)

<400> 137

Gly Ser Asp Leu Gly 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 Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

165 170 175

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

180 185 190

Pro Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val

195 200 205

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp

210 215 220

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu

225	230	235	240
Val Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly			
245	250	255	
Trp Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala			
260	265	270	
Glu Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser			
275	280	285	
Arg Ser Asp Leu Gly Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln			
290	295	300	
Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala			
305	310	315	320
Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly			
325	330	335	
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn			
340	345	350	
Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile			
355	360	365	
Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val			
370	375	380	
Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly			
385	390	395	400
Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn			
405	410		
<210> 138			
<211> 417			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> AR domain (three-domain)			
<400> 138			
Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu			
1	5	10	15
Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu			

20	25	30
Ala Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Gln Gly Ile Thr Pro		
35	40	45
Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu		
50	55	60
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr		
65	70	75
Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val		
85	90	95
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp		
100	105	110
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu		
115	120	125
Val Leu Gln Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg		
130	135	140
Ser Asp Leu Gly Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp		
145	150	155
Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys		
165	170	175
Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr Leu Ala Thr Ala His Gly His		
180	185	190
Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala		
195	200	205
Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly		
210	215	220
His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn		
225	230	235
Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn		
245	250	255
Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Leu Asn Lys Leu Gly		
260	265	270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Asn Ala Lys Asp Tyr Phe Ser His Thr Pro Leu His Leu Ala Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asn

<210> 139

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 139

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

1 5 10 15

Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50 55 60
Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr

65 70 75 80
Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val

85 90 95
Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp

100 105 110
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Ala Asp Trp Gly His Glu Asp Ile Ala Glu

115 120 125
Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu

130 135 140
Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn

145 150 155 160
Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Leu Tyr

165 170 175
Leu Ala Thr Ala His Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys

180 185 190
Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe Thr Pro Leu

195 200 205
His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu Val Leu Leu

210 215 220
Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala

225 230 235 240
Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu

245 250 255
Gln Lys Ala Ala

260
<210> 140

<211> 263

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 140

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

1 5 10 15

Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50 55 60

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr

65 70 75 80

Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val

85 90 95

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp

100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys

130 135 140

Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu

145 150 155 160

Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Glu Tyr Gly Leu Thr

165 170 175

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

180 185 190

Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Ala Ile Gly Phe

195 200 205

Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu Ile Ala Glu

210 215 220

Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly

225 230 235 240

Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala

245 250 255

Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala

260

<210> 141

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AR domain (two-domain)

<400> 141

Gly Ser Asp Leu Gly Ala Lys Leu Leu Ser Asp Leu Gly Val Lys Leu

1 5 10 15

Leu Trp Ala Ala Ala Arg Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Leu His Ile Ala Ala Gln Ser Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu

50 55 60

Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Val Thr Gly Asp Thr

65 70 75 80

Pro Leu His Leu Ala Ala Gln His Gly His Leu Val Ile Val Glu Val

85 90 95

Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Glu Arg Gly Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Ser Asp Leu

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

210 215 220
Ile Gly Phe Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Phe Ile Gly His Leu Glu
225 230 235 240
Ile Ala Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp
245 250 255
Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Gly Asn Gly Asn Glu
260 265 270
Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
275 280