



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104918959 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201380062520. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 02

C07K 16/32(2006. 01)

(30) 优先权数据

12195156. 0 2012. 11. 30 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/075290 2013. 12. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/083208 EN 2014. 06. 05

(71) 申请人 分子组合公司

地址 瑞士苏黎世-施利伦

(72) 发明人 乌尔丽克·菲德勒

伊格纳西奥·多拉多

海克·施特罗贝尔

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 邓云鹏

权利要求书3页 说明书38页

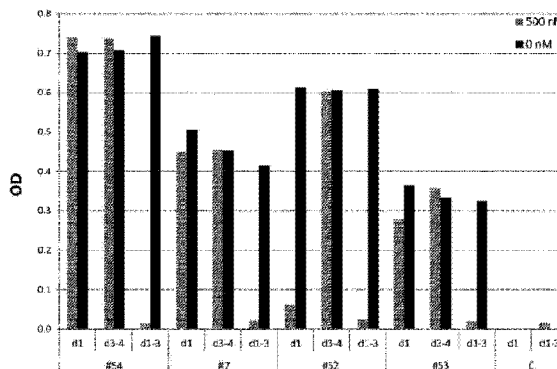
序列表109页 附图10页

(54) 发明名称

包含至少两个针对 HER2 的重复序列结构域的结合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及重组结合蛋白,其至少包含第一和第二重复序列结构域,其中所述 2 个重复序列结构域中的每一个均结合 HER2 的胞外区,并且其中所述重复序列结构域通过共价键连接。



1. 一种重组结合蛋白,其包含至少第一和第二重复序列结构域,其中该第一和第二重复序列结构域中的每一个均结合至 HER2 的胞外区域,并且其中所述重复序列结构域通过共价键连接。

2. 根据权利要求 1 所述的结合蛋白,其特征在于,所述第一重复序列结构域结合 HER2 的结构域 II 并且所述第二重复序列结构域结合 HER2 的结构域 IV。

3. 根据权利要求 1-2 中任意一项所述的结合蛋白,其特征在于,所述第一和第二重复序列结构域位于相同的多肽上,并且其中靶向 HER2 的结构域 II 的重复序列结构域位于靶向 HER2 的结构域 IV 的重复序列结构域的 N 端。

4. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,结合 HER2 的结构域 II 的所述第一重复序列结构域不与帕妥珠单抗竞争结合至 HER2。

5. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,结合 HER2 的结构域 IV 的所述第二重复序列结构域不与曲妥珠单抗竞争结合至 HER2。

6. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,所述第一重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域,并且所述第二重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域。

7. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,所述第一重复序列结构域以低于 10^{-7} M 的 Kd 结合 HER2 的胞外区域,并且所述第二重复序列结构域以低于 10^{-7} M 的 Kd 结合 HER2 的胞外区域。

8. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白以小于 100nM 的 IC_{50} 值抑制 BT474 的受激增殖。

9. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白能以低于 100nM 的 EC_{50} 值诱导 BT474 细胞凋亡。

10. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于,所述第一和第二重复序列结构域通过多肽接头连接。

11. 根据前述任何一项权利要求所述的结合蛋白,其特征在于:

所述第一重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs:62-68、72 和 114-121 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2 ;和 / 或

所述第二重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs:74-82 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2。

12. 根据权利要求 10 所述的结合蛋白,其特征在于:

所述第一重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:62-68、72 和 114-121 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70% 氨基酸序列一致性的氨基酸序列 ;和 / 或

所述第二重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:74-82 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70% 氨基酸序列一致性的氨基酸序列,并且其中进一步地,

在所述锚蛋白重复序列结构域的位置 1 的 G 和 / 或位置 2 的 S 可选地缺失 ;以及在所述锚蛋白重复序列结构域的倒数第二位置的 L 和 / 或最后位置的 N 可选地被 A 替换。

13. 根据权利要求 10 至 12 中任意一项所述的结合蛋白,其特征在于:

所述第一重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:62-68、72 和 114-121 的锚蛋白重复序列结构域,和 / 或

所述第二重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:74-82 的锚蛋白重复序列结构域，并且其中进一步地，在所述锚蛋白重复序列结构域的位置 1 的 G 和 / 或位置 2 的 S 可选地缺失；以及在所述锚蛋白重复序列结构域的倒数第二位置的 L 和 / 或最后位置的 N 可选地被 A 替换。

14. 根据权利要求 10 至 13 中任意一项所述的结合蛋白，其特征在于，其中：

所述第一重复序列结构域包含锚蛋白重复序列模块，该锚蛋白重复序列模块具有选自 SEQ ID NO:15-18、21-23、37、38、125、126、129、130、133、134 的氨基酸序列，其中在 SEQ ID NO:15-18、21-23、37、38、125、126、129、130、133、134 中多达 9 个氨基酸被任何其它氨基酸残基取代，和 / 或

所述第二重复序列结构域包含锚蛋白重复序列模块，该锚蛋白重复序列模块具有选自 SEQ ID NO:46、47、51、52、55 和 56 的氨基酸序列，其中在 SEQ ID NO:46、47、51、52、55 和 56 中多达 9 个氨基酸被任何其它氨基酸残基取代。

15. 根据权利要求 10 至 14 中任意一项所述的结合蛋白，其特征在于，所述锚蛋白重复序列模块具有选自 KDFQGITPLHIAATSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO:16) 的氨基酸序列，其中在 SEQ ID NO:16 中多达 9 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代，并且其中

在位置 3 的 F 可选地被 A 替换；

在位置 4 的 Q 可选地被 E 替换；

在位置 5 的 G 可选地被 S 替换；

在位置 6 的 I 可选地被 V 替换；

在位置 11 的 I 可选地被 L 替换；

在位置 14 的 T 可选地被 Q 替换；和 / 或

在位置 15 的 N 可选地被选自 S 和 W 的氨基酸，最优选被 S，替换。

16. 根据权利要求 10 至 14 中任意一项所述的结合蛋白，其特征在于，所述锚蛋白重复序列模块具有选自 KDITGETPLHHAADSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO:18) 的氨基酸序列，其中在 SEQ ID NO:18 中多达 9 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代，并且其中

在位置 3 的 I 可选地被 V 替换；

在位置 6 的 E 可选地被 D 替换；

在位置 11 的 H 可选地被 L 替换；

在位置 14 的 D 可选地被 Q 替换；

在位置 15 的 S 可选地被 H 替换；和 / 或

在位置 19 的 E 可选地被 V 替换。

17. 根据权利要求 10 至 15 中任意一项所述的结合蛋白，其特征在于，所述结合蛋白包含多肽，所述多肽与选自 SEQ ID NO:83-98、102、103、122、123 和 136-141 的多肽具有至少 70%，优选 90%，的氨基酸序列一致性。

18. 一种药物制剂，其包含根据前述权利要求所述的结合蛋白或组合物。

19. 根据前述权利要求所述的至少一种结合蛋白、组合物或药物制剂用于治疗癌症的用途。

20. 一种方法，包括向患者进行根据前述权利要求所述的结合蛋白、组合物或药物制剂

的给药,以治疗癌症。

21. 根据权利要求 19 或 20 所述的用途或方法,其中在所述用途或方法中,疾病具有选自下组的至少一种特征:

HER2 编码基因的扩增,

HER2 编码基因的过度表达,

HER2 编码基因的突变形式的表达,和 / 或

在抗曲妥珠单抗的肿瘤中 HER3 编码基因的过度表达。

22. 根据权利要求 19-21 中所述的用途或方法,其中在所述用途或方法中,疾病为选自下组的至少一种疾病:

乳腺癌,

卵巢癌,

胃肿瘤,

胃癌,

子宫癌,和 / 或

结肠直肠癌。

包含至少两个针对 HER2 的重复序列结构域的结合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及包含至少两个对人表皮生长因子受体 2(HER2) 具有结合特异性的重复序列结构域的结合蛋白质以及编码这种结合蛋白质的核酸,含有这种蛋白质的药物组合物和这种蛋白质在疾病治疗中的用途。

背景技术

[0002] 人表皮生长因子受体 2(HER2;人 HER2 的 UniProtKB/Swiss-Prot 编号为 P04626) 也称为 ErbB2,是由人 ERBB2 基因编码的蛋白质。该基因的扩增或过度表达表现出在某些类型的癌症的发生和发展起重要作用,并且近年来,该基因已经进展成为疾病治疗的重要生物标记和目标。HER2 是跨膜受体酪氨酸激酶 (RTK),其属于较广泛的 ErbB 受体家族 (Bubli1, E. M. 和 Yarden, Y. Curr. Opin. Cell Biol. 19(2), 124-34, 2007)。ErbB 受体家族在脊椎动物中是保守的,并且包括家族奠基者 ErbB1(也称为表皮生长因子受体 (EGFR) 或 HER1;该人蛋白质在 UniProtKB/Swiss-Prot 中的编号为 P00533) 以及最近识别的受体 HER3(也称为 ErbB3;该人蛋白质在 UniProtKB/Swiss-Prot 中的编号为 P21860) 和 HER4(也称为 ErbB4;该人蛋白质在 UniProtKB/Swiss-Prot 中的编号为 Q15303)。所有的 ErbB 受体共享广泛的序列和结构域同源性,并且形成功能性同源二聚体(例如, ErbB1-ErbB1, HER2-HER2 和 HER4-HER4) 以及所有组合的异源二聚体。受体同源和异源二聚化在配体结合或受体过度表达时发生并且转而通过自身磷酸化激活受体激酶结构域。这接着触发下游胞内信号传导和生物反应。与其它 ErbB 受体相反,HER2 不具有任何已知的配体,并且能二聚化,在其过度表达之后,二聚化是非常明显的并且在之前没有配体结合的情况下被激活。重要的是,HER3 没有活化的胞内激酶结构域并且通过与其它 ErbB 受体家族成员的异源二聚化激活,导致非常有效的下游信号传导。HER3 的这种异源二聚化和激活在配体结合至 HER3 时或如果合作的受体,比如 HER2 极大地过度表达而发生。

[0003] HER2 以及其它 ErbB 受体家族成员由 4 个胞外结构域组成,该 4 个胞外结构域被顺序命名为 I、II、III 和 IV,其中结构域 IV 离胞外细胞膜最近并且结构域 I 离胞外细胞膜最远。在配体被剥夺条件下,ErbB 受体中的结构域 I 和 III 共享分子间的相互作用,该分子间的相互作用封闭结构域 II。这防止受体同源/异源二聚化和信号传导,因为二聚化需要两个邻近的 ErbB 受体的结构域 II 之间的相互作用 (Burguess A. W., 等人, Mol. Cell 12(3), 541-552, 2003)。结合配体破坏结构域 I 和 III 之间的相互作用,然后导致非激活态-激活态受体构象变化并且使结构域 II 暴露。这造成该受体混杂从而与其它激活态 ErbB 受体二聚化并且开始信号传导。有趣的是,HER2 是唯一的组成处于激活态构象的 ErbB 受体家族成员,因此,结构域 II 被持续暴露并可进行同源和异源二聚化。

[0004] ErbB 受体二聚化和自身磷酸化导致参与正常生理以及疾病的过多的、关键的下游信号传导分子的激活。这种被激活的信号传导分子的性质在一定程度上取决于活化的 ErbB 受体二聚体的组合物。例如,HER1-HER1 和 HER2-HER2 同源二聚体优选激活下游胞外信号调节激酶 (ERK) 信号传导和增殖,而 HER2-HER3 异源二聚体也激活 PI3K 信号传导通路(包括

下游激酶 AKT 的激活), 并由此使细胞存活。事实上, 在肿瘤细胞中 AKT 被 HER2-HER3 信号传导激活促进肿瘤细胞存活并且使肿瘤细胞抵抗 HER2 靶向药物, 如单克隆抗体曲妥珠单抗 (Berns K. 等人, *Cancer Cell* 12, 395-402, 2007)。有趣的是, 在这些细胞中抑制 HER2-HER3 介导的 PI3K-AKT 信号传导变成速率限制, 并导致细胞死亡。除了细胞增殖和存活, HER2 信号传导还有原因地参与其它过程, 比如血管生成和迁移。

[0005] HER2 在约 20% 的所有乳腺癌中过度表达。由于其临床相关性, HER2 成为第一 RTK, 针对该第一 RTK 研发了靶向生物制剂, 即曲妥珠单抗 (**Herceptin®**; Genentech)。该抗体结合 HER2 的结构域 IV 并通过尚未完全了解的几种机制抑制 HER2 信号传导。这包括在肿瘤细胞中诱导受体内在化, 导致降低 HER2 表达水平和信号传导, 并导致致瘤表型减毒。曲妥珠单抗已经改变了数以万计的乳腺癌妇女的生活, 扩展了她们的寿命和生活质量。然而, 曲妥珠单抗主要具有抗增殖作用并且在疾病晚期阶段肿瘤可能逃避这样的治疗。在研发更有效的治疗的尝试中, 产生了新抗体, 其识别 HER2 的结构域 II, 即帕妥珠单抗 (**Omnitarg®**, **Perjeta®**; Genentech)。与曲妥珠单抗相比, 该抗体不是开发成降低 HER2 的膜表达水平, 而是通过结合至和阻断受体二聚化结构域 II 干扰 HER2 同源二聚体和异源二聚体的形成。帕妥珠单抗在体外和体内作为单一试剂具有意想不到的低治疗功效; 然而, 其与曲妥珠单抗的组合显示协同效应。因此, 两种抗体的组合可以成为乳腺癌患者的标准护理治疗 (Capelan M., 等人, *Ann. Oncol.*, 24, 273-82, 2013)。

[0006] 曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的组合的临床前和临床成功造成这样的观点: 良好的抗肿瘤功效需要双重靶向 HER2 结构域 II 和 IV。这与最近产生的同时靶向 HER2 的结构域 II 和 IV 的其它分子一致。例如, 丹麦公司 Symphogen 正在研发的针对 HER2 的结构域 II 和 IV 的抗体混合物在临床前小鼠肿瘤模型已经显示出一些更高的功效 (即优于单独的曲妥珠单抗)。

[0007] 同样地, US2011/033460 描述了结合 HER2 的结构域 I 和结构域 IV 的抗体的组合在 DNA 合成和 BT474 细胞的存活能力上显示协同效应。此外, US2011/033460 还描述了结合 HER2 的两种不同表位的双特异性抗体, 其中一个表位位于 HER2 的结构域 I 并且另一表位位于 HER2 的结构域 IV。

[0008] WO 2009/068625 报道双特异性抗体 (biparatopic antibody) 构建体的研发, 该抗体构建体包含第一抗体结构域和第二抗体结构域, 第一抗体结构域与曲妥珠单抗竞争结合至 HER2, 该第二壳体结构域结合 HER2 的不同表位或一部分。有趣的是, 一些构建体具有 SKBR3 细胞增殖的拮抗作用, 而另一些具有激动作用。特别是, WO 2009/068625 报道双特异性抗体构建体的研发, 该抗体构建体包含第一抗体结构域和第二抗体结构域, 其中该第一抗体结构域与曲妥珠单抗竞争结合 HER2 (即, 结合 HER2 的结构域 IV), 该第二抗体结构域与帕妥珠单抗竞争结合 HER2 (即, 结合 HER2 的结构域 II)。构建体, 其中结合结构域 IV 的抗体结构域克隆到结合结构域 II 的抗体结构域的 N 端, 显示出阻断图谱激酶激活, 而在其它取向 (即, 结合结构域 II 的抗体结构域在 N 端) 没有观察到这样阻断。总之, WO 2009/068625 描述了靶向 HER2 的多种双特异性抗体构建体, 其在 SKBR3 细胞增殖或细胞信号传导上可变地扩大效果 (激动或拮抗), 但没有对细胞毒性和凋亡作用进行描述。

[0009] 也描述了二价结合蛋白质, 如二价双抗体分子或靶向 HER2 的二价亲和体

(Nielsen, U. B., 等人, *Cancer Res.*, 60, 6434-6440, 2000 ;Steffen, A-C., *Cancer Biother. Radiopharmaceut.* 20, 239-248, 2005)。这样的分子结合两倍的相同的结合域,因此与包含 2 个结合结构域(每个结合结构域结合至相同靶向分子上的不同表位)的双特异性分子不同。

[0010] 作为抗体衍生的疗法和 SMI 的替代,新的结合蛋白或结合结构域可用于特异性结合靶分子(例如, Binz, H. K., Amstutz, P. 和 Plückthun, A., *Nat. Biotechnol.* 23, 1257-1268, 2005),并因此充当拮抗剂。一种不具有 Fc 的这类新型结合蛋白或结合结构域基于设计的重复序列蛋白或设计的重复序列结构域(WO 2002/020565 ; Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grütter, M. G., 和 Plückthun, A., *Nat. Biotechnol.* 22, 575-582, 2004 ;Stumpp, M. T., Binz, H. K 和 Amstutz, P., *Drug Discov. Today* 13, 695-701, 2008)。

[0011] WO2002/020565 描述了如何构建重复序列蛋白的大文库及其一般应用。这些设计的重复序列结构域利用重复序列蛋白的模块化性质,并且可以具有 N 端和 C 端加帽模块,以防止设和 Plückthun, A., *FEBS letters* 539, 2-6, 2003)。该新型结合蛋白包括设计的锚蛋白重复序列蛋白(DARPin)。之前描述了结合至 HER2 的单特异性 DARPin 的产生(例如, Steiner, D., Forrer, P. 和 Plückthun, A., *J. Mol. Biol.* 382, 1211-1227, 2008 ; Zahnd, C., Pecorari, F., Straumann, N., Wyler, E. 和 Plückthun, A., *J. Biol. Chem.* 281(46), 35167-35175, 2006)。

[0012] 最近,描述了设计的双特异性锚蛋白重复序列蛋白,其靶向 HER2 (Jost, Ch., 等人, *Structure* 21, 1-13, 2013)。作者表示通过短接头(长接头不能达到同样好的效果)连接使两个锚蛋白重复序列结构域(一个靶向 HER2 的结构域 I 并且另一靶向 HER2 的结构域 IV)结合相比单独的靶向 HER2 的结构域 IV 的曲妥珠单抗在 BT474 细胞上导致更强的细胞毒性作用。该特异性重复序列蛋白通过 2 个 HER2 分子的分子内交联而起作用,即,其连接两个膜结合型 HER2 分子,使其扭曲,从而使其不能与任何 EGFR 家族成员形成能进行信号传导的二聚体,防止任何激酶的二聚化,并因此导致所观察到的细胞毒性作用。

[0013] 即使现有技术表明 HER2 的靶向有利于疾病,例如癌症的治疗,还明确需要产生较高效地靶向 HER2 的结合蛋白。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提供 HER2 的新拮抗剂。

[0015] 本发明的另一个目的是提供抑制 HER2 相关的细胞信号传导的新机制。

[0016] 本发明的另一目的是提供一种在细胞(例如,肿瘤细胞)、组织、器官或患者中抑制 HER2 介导的细胞增殖和/或诱导凋亡的新方法。

[0017] 本发明的另一目的是提供利用双特异性重复序列蛋白处理 HER2 的两个结构域的唯一治疗方法。

[0018] 本发明的另一目的是提供癌症治疗的新选择。

[0019] 本发明的另一目的是提供针对肿瘤疾病的治疗,该治疗具有良好的功效和/或副作用小。

[0020] 本发明的另一目的是提供一种针对肿瘤疾病的可供选择的治疗,该治疗不会(或

仅部分地)对现有技术的疗法有反应,或有抗性。

[0021] 发明概要

[0022] 这些目的通过独立权利要求的主题实现,从属权利要求以及说明书进一步公开优选的实施例。

[0023] 虽然附图和前面的描述更详细地展示和描述了本发明,这些展示和描述被认为是解说或示例而非限制,本发明不限于已公开的实施例,在实践本发明时,本领域技术人员可以从附图、公布和权利要求的学习中明白并实现公布的实施例的其它变形。在权利要求中,术语“包含”不排除其它元件或步骤,并且不定冠词“一”或“一个”不排除多个。在仅凭某些措施被记载在相互不同的从属权利要求中并不表示这些措施的组合不能被有利地使用。权利要求的任何附图标记不能解释为限制本发明的范围。

附图说明

[0024] 图 1. DARPIn 与 HER2 结合

[0025] 如图 1A 和 1B 所示,利用纯化的 HER2 结构域(结构域 I、结构域 III-IV 或结构域 I-III)作为竞争者通过竞争 ELISA 测试单价 DARPIn 与 HER2 胞外结构域(结构域 I-IV)的结合。存在 500nM Her2 结构域 I 的情况下,DARPIn#51 和 DARPIn#52 不可以结合 HER2(结构域 I-IV),表明其结合在结构域 I 上的表位。DARPIn#7、DARPIn#53 和 DARPIn#54 结合结构域 II,因为 500nM Her2 结构域 I 或 500nM Her2 结构域 III-IV 都不能防止其结合至全长 Her2(结构域 I-IV)。图 1C 展示了单价 DARPIn 可以结合在预先形成的 HER2-帕妥珠单抗复合体上并且,与帕妥珠单抗结合 HER2 结构域 II 相比,结合 HER2 上的不同的表位。参下文 DARPIn 的定义。OD,在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD ;C 对照 DARPIn,其不结合 HER2 ;d1, HER2 的结构域 I ;d1-3, HER2 的结构域 I-III ;d3-4, HER2 的结构域 III-IV。

[0026] 图 2. 单价和双特异性结合蛋白对 BT474 细胞增殖的抑制作用

[0027] 测试单价 DARPIn(即,DARPIn#1 和 DARPIn#18)、这些单价 DARPIn 的非共价混合物和包含在不同取向的这些单价 DARPIn 的双特异性结合蛋白(DARPIn#41 和 DARPIn#49)对 BT474 增殖的抑制。图 2A 展示了不同浓度的双特异性 DARPIn 对增殖的抑制作用并且对不同的单个实验展示了相应的抑制拟合曲线。接着计算 DARPIn#41 的 IC_{50} 值为约 2nM。表 2 列举了不同的 DARPIn 的 IC_{50} 值。图 2A 展示了 OD,在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD 针对 C、DARPIn 浓度(nM)绘图。X 轴以对数标度显示。图 2B 展示了双特异性 DARPIn 的浓度为 100nM 的双特异性 DARPIn、单价 DARPIn 二者的混合物和单独的相应的单价 DARPIn 对增殖的抑制。OD 绘制在 Y 轴。低 OD 反映抑制增殖。参见下文对 DARPins. #41、DARPIn#41 ;#49、DARPIn#49 ;#18、DARPIn#18 ;#1、DARPIn#1 的定义 ;n. c. 负对照。

[0028] 图 3. 各种双特异性 DARPIn 对 BT474 细胞增殖的抑制

[0029] 该图展示了包含不同 N 端和 / 或 C 端锚蛋白重复序列结构域的双特异性 DARPIn(#23, #24, #33, #37, #43, #44 和 #41) 分组对 BT474 增殖的抑制。对于各不同的单个试验展示了不同浓度的 DAPRin 对增殖的抑制作用以及相应的抑制拟合曲线。表 2 列举了不同 DAPRin 的 IC_{50} 值。图 3A 展示了具有 DARPIn#15 的双特异性 DARPIn 的抑制作用并且图 3B 展示了 DARPIn#18 在 C 端的双特异性 DARPIn 的抑制作用。图 3C 和 3D 展示了 DARPIn#51 在 N 端和 DARPIn#18 在 C 端的双特异性 DARPIn 的抑制作用,并且图 3D 展示了 DARPIn#51

在 N 端和 DARPin#21 在 C 端的双特异性 DARPin 的抑制作用。曲线图展示了 OD, 在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD, 针对 C、DARPin 浓度 (nM) 绘图。X 轴以对数标度显示。参见下文对 DARPins. #23、DARPin#23 ;#24、DARPin#24 ;#33、DARPin#33 ;#37、DARPin#37 ;#41、DARPin#41 ;#43、DARPin#43 ;#44、DARPin#44 的定义。

[0030] 图 4. 在不同的细胞系中双特异性 DARPin#41 对细胞增殖的抑制

[0031] 测试 DARPin#41 和曲妥珠单抗对 NCI-N87(图 4A) 和 ZR75-30(图 4B) 以及 MDA-MB175(图 4C) 增殖的抑制作用。对于各不同的单个试验展示了不同浓度的 DARPin 对增殖的抑制作用以及相应的抑制拟合曲线。表 3 列举了不同细胞系的 IC₅₀ 值。曲线图展示了 OD, 在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD, 针对 C、DARPin 浓度 (nM) 绘图。X 轴以对数标度显示。参见下文对 DARPin 和相关分子 #41、DARPin#41 ;T、曲妥珠单抗的定义。

[0032] 图 5. 在不同细胞系中双特异性 DARPin#41 对凋亡的诱导

[0033] 测试在 BT474 细胞(图 5A) 和 NCI-N87 细胞(图 5B) 以及 MDA-MB175(图 5C) 中 DARPin#41 和曲妥珠单抗对凋亡的诱导。对于各不同的单个试验展示了不同浓度的 DARPin 对凋亡的诱导以及相应的抑制拟合曲线。表 3 列举了不同细胞系的 EC₅₀ 值。图 5A 的曲线图展示了 OD, 在 450nm 的光密度减去 490nm 的 OD, 针对 C、曲妥珠单抗或 DARPin 浓度 (nM) 绘图。图 5B 和 5C 的曲线图展示了 RLU, 相对光度单位针对 C、曲妥珠单抗或 DARPin 浓度 (nM) 绘图。X 轴以对数标度显示。参见下文对 DARPin ;T、曲妥珠单抗 ;#41、DARPin#41 的定义。

[0034] 图 6. 比较 DARPin#41 和基准对细胞增殖的抑制作用和对凋亡的诱导的功效

[0035] 测试 DARPin#41 和基准曲妥珠单抗和帕妥珠单抗以及 100nM 曲妥珠单抗和滴定的帕妥珠单抗的组合对 BT474 细胞的增殖抑制作用和对凋亡的诱导。图 6A 展示了对于各不同的单个试验各种浓度的 DARPin, 各基准浓度对增殖的抑制作用, 以及相应的抑制拟合曲线。表 3 列举了不同细胞系的 IC₅₀ 值。该曲线图展示了 OD, 在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD, 针对 C、DARPin/ 基准浓度 (nM) 绘图。X 轴以对数标度显示。图 6B 展示了对于各不同的单个试验, 不同浓度的 DARPin, 各基准浓度对凋亡的诱导, 以及相应的激活拟合曲线。表 3 列举了不同细胞系的 EC₅₀ 值。该曲线图展示了相对光度单位 (RLU) 针对 C、DARPin/ 基准 (nM) 浓度绘图。X 轴以对数标度显示。参见下文对 DARPin ;T、曲妥珠单抗 ;P、帕妥珠单抗 ;#41、DARPin#41 的定义。

[0036] 图 7. 不同形式的双特异性结合蛋白对 BT474 细胞增殖的抑制作用

[0037] 该图展示了由在 N 端的 DARPin#1 和在 C 端的 DARPin#18 组成的不同形式的双特异性 DARPin 对 BT474 增殖的抑制作用。图 7A 展示了对于不同的单个试验, 各种浓度的双特异性 DARPin(该双特异性 DARPin 被改造成具有长血清半衰期) 对增殖的抑制以及相应的抑制拟合曲线。双特异性 DARPin#63 在其 C 端 Cys 残基被聚乙二醇化, 而双特异性 DARPins#64 和 #65 包含结合至血清白蛋白的锚蛋白重复序列结构域。图 7B 展示了对于不同的单个试验, 在结合 HER2 的重复序列结构域之间含有不同接头的不同浓度的双特异性 DARPin 对增殖的抑制以及相应的抑制拟合曲线。表 2 列举了 DARPin 的 IC₅₀ 值。该曲线图展示了 OD, 在 450nm 的光密度减去 620nm 的 OD, 针对 C、不同浓度的 DARPin(nM) 绘图。X 轴以对数标度显示。参见下文对 DARPin ;#66、DARPin#66(其在两个重复序列结构域之间包含 2 个氨基酸长度的短 GS- 接头) ;#67、DARPin#67(其在两个重复序列结构域之间包含 5 个氨基酸长度的 GS- 接头) ;#41、DARPin#41(其在两个重复序列结构域之间包含 10 个氨基酸长度的 GS- 接

头) ;#68、DARPin#68(其在两个重复序列结构域之间包含 24 个氨基酸长度的 PT- 接头) 的定义,

具体实施方式

[0038] 根据本发明的一个实施例,重组结合蛋白包含至少第一和第二重复序列结构域,其中所述两个重复序列结构域中的每个结合 HER2 的胞外区,并且其中所述重复序列结构域是通过共价键连接的。

[0039] 已经令人惊讶地证明 HER2 的胞外部分与包含至少两个共价连接的重复序列结构域(每个共价连接的重复序列结构域对 HER2 的胞外区具有特异性)的重组结合蛋白的结合比上文概括的现有技术的方法[通过不同和单独的结合物(例如,曲妥珠单体和帕妥珠单体的组合;图 6)结合 HER2]具有优势和意想不到的效果。

[0040] 人 HER2 由 1255 个氨基酸组成,其中 21 个氨基酸的信号序列、631 个氨基酸的胞外区(例如,包含结构域 I 至 IV 的胞外域)、23 个氨基酸的跨膜区,以及 580 个氨基酸的胞浆结构域。

[0041] 优选地,HER2 的胞外区与所述重组结合蛋白的结合和所述重复序列结构域结合至 HER2 的胞外区是同时发生的或并行发生的。同样优选地,所述重复序列结构域结合至 HER2 胞外区的 2 个不同的表位。同样优选地,所述重复序列结构域结合至 HER2 胞外区的 2 个不同的非覆盖型表位。

[0042] 功效增加的一个原因可能是根据本发明的重组结合蛋白诱导迄今未描述的 HER2 胞外区的非激活态构象,这似乎是本发明的双特异性结合蛋白与 HER2 胞外区上的 2 个不同表位的分子内相互作用的结果(实施例 8);即,该结合蛋白的 2 个重复序列结构域似乎都同时结合至相同的 HER2 分子上的不同表位,并且从而迫使 HER2 的胞外区处于这种新的非激活态构象中。现有技术没有描述这种非激活态构象。重要的是,这 2 个重复序列结构域需要连接在相同的结合蛋白中,即,这两个重复序列结构域的简单混合不表现出疗效(图 2B)。此外,这种结合蛋白与 HER2 胞外区的二价结合可以通过显示增加的亲合力(即,同步结合至靶的不同表位的组合强度)产生协同结合效果。亲合力与亲和力不同,其对应单个的结合相互作用的强度。总之,如实施例所示,该结合蛋白与 HER2 的特异性相互作用可以解释通过这些分子对增殖非常有效的抑制作用和对凋亡的诱导。

[0043] 根据这些理论,在相同蛋白中的 2 个不同的重复序列结构域协同地支持彼此结合其各自的表位,从而导致对靶的总亲和力增加。

[0044] 第一重复序列结构域结合至 HER2 上的表位使得第二重复序列结构域进入积极和/或空间有利的位置,这促进该第二重复序列结构域与 HER2 上其单独的表位结合。

[0045] 如实施例所示,该第一和第二重复序列结构域的共价连接似乎增强其生物活性。

[0046] 在根据本发明的重组结合蛋白的优选实施例中,第一重复序列结构域结合 HER2 的结构域 II 并且第二重复序列结构域结合 HER2 的结构域 IV。

[0047] 重点要了解的是,术语“结合结构域 II”意味着单独的重复序列结构域主要结合 HER2 的结构域 II。但是,这个定义并不排除所述重复序列结构域的部分可以与其它结构域结合,或相交。这同样适用于术语“结合结构域 IV”。

[0048] 根据本发明的双特异性结合蛋白同时靶向 HER2 的结构域 II 和 IV 比现有技术中

的已知技术具有特别意想不到的效果。在这些结合蛋白抑制增殖和诱导细胞凋亡的情况下的细胞应答相比现有技术的抗体获得的效果要更加明显的多。例如,这些应答的程度已经证明优于临床抗体基准 [比如,分别靶向 HER2 的结构域 IV 和 II 的曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的组合 (图 4、5 和 6)] 诱导的程度。有趣的是,与 HER2 的结构域 I 和结构域 IV 结合的一些双特异性结合蛋白没有显示这些意想不到的效果 (图 3C 和 3D)。

[0049] 本领域技术人员周知确定与重复序列结构域结合的 HER2 胞外区的结构域的方法 (例如, Jost 等人, 同上)。

[0050] 通过本发明的双特异性结合蛋白同时靶向 HER2 的结构域 II 和 IV 可能更有效替代当前抗体靶向方法,在此意义上,申请人的发现对 HER2 造成的人癌症有重要意义。

[0051] 因此,根据本发明的结合蛋白优选双特异性结合蛋白,即,其包括识别在相同蛋白靶 (即,HER2) 上的 2 个不同表位,或结构域 (即,结构域 II 和 IV) 的 2 个抗原重复序列结构域。但是,和那些既是双特异性或多特异性多肽、也是多价多肽 (即具有能够识别一个或更多个其它靶蛋白的抗原重复序列结构域的多肽) 的多肽一样,多特异性多肽,即,含有能够识别相同靶蛋白上的 3 个、4 个或更多个表位的抗原重复序列结构域的多肽,也包含在本发明的范围之内。

[0052] 在此使用的 HER2 涉及人表皮生长因子受体 2,也称为 Neu, ErbB-2, CD340 (分化群 340) 或 p185。HER2 为表皮生长因子受体 (EGFR/ErbB) 家族成员。在人中,HER2 由 ERBB2 编码,ERBB2 是位于人染色体 17 长臂 (17q12) 上的已知的原癌基因。HER2 的 UniProtKB/Swiss-Prot 编号为 P04626。

[0053] 根据本发明的优选实施例,该第一和第二重复序列结构域位于相同的多肽上,而靶向 HER2 的结构域 II 的重复序列结构域位于靶向 HER2 的结构域 IV 的重复序列结构域的 N 端。

[0054] 例如,图 2A 以及相应的描述展示了这些实施例。发明人已经令人惊讶地展示靶向 HER2 的结构域 II 的重复序列结构域位于靶向 HER2 的结构域 IV 的重复序列结构域 C 端的结合蛋白比靶向 HER2 的结构域 II 的重复序列结构域位于靶向 HER2 的结构域 IV 的重复序列结构域 N 端的结合蛋白的功效明显较小。

[0055] 优选地,结合 HER2 的结构域 II 的所述第一重复序列结构域不与帕妥珠单抗竞争结合至 HER2。例如,图 1C 展示了这些重复序列结构域不与帕妥珠单抗竞争结合至 HER2。同样优选地,结合 HER2 的结构域 IV 的所述第二重复序列结构域不与曲妥珠单抗竞争结合至 HER2。例如,DARPin#18 至 20 的重复序列结构域不与曲妥珠单抗竞争结合至 HER2。本领域技术人员周知确定重复序列结构域是否与曲妥珠单抗或帕妥珠单抗竞争结合至 HER2 的方法,例如,如实施例 3 所示。

[0056] 这意味着,在第一优选实施例中,与帕妥珠单抗比较,该第一重复序列结构域结合与 HER2 结构域 II 不同的表位。同样地,在第二优选实施例中,与曲妥珠单抗比较,该第二重复序列结构域结合与 HER2 结构域 IV 不同的表位。在不受限于理论的情况下,发明人将试验部分中所示的至少一些效果归因于这些事实。

[0057] 根据本发明的另一优选实施例,所述第一重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域,或设计的锚蛋白重复序列结构域,并且所述第二重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域,或设计的锚蛋白重复序列结构域。

[0058] 优选地,所述锚蛋白重复序列结构域或设计的锚蛋白重复序列结构域包括 70 ~ 300 个氨基酸,特别是 90 ~ 200 个氨基酸。

[0059] 同样优选地,本发明的重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域,或如在 WO 2002/020565 中所示的设计的锚蛋白重复序列结构域。实施例展示了对 HER2 的不同结构域具有双特异性结合特异性的设计的锚蛋白重复序列结构域的例子。

[0060] 根据本发明的优选实施例,该第一重复序列结构域在 PBS 中以小于 10^{-7} M 的 Kd 结合 HER2 的胞外区并且所述第二重复序列结构域在 PBS 中以小于 10^{-7} M 的 Kd 结合 HER2 的胞外区。

[0061] Kd 为解离常数,其将进一步在下文中定义。Kd 需要小于 10^{-7} M 才能使重复序列结构域对其靶具有足够的亲和力。优选的是,重复序列结构域在 PBS 中以比 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M 小,或者,更优选比 10^{-11} M 小的 Kd 结合其靶结构域。

[0062] 实施例 2 展示了包含在 PBS 以低于 10^{-7} M 的 Kd 结合 HER2 结构域 II 和 / 或结构域 IV 的蛋白的重组结合蛋白。

[0063] 根据优选实施例,所述结合蛋白以小于 100nM 的半抑制浓度 (IC_{50}) 值抑制 BT474 细胞的受激增殖。优选地,所述结合蛋白以小于 90、80、70、60、50、40、30、20 或 10nM 的 IC_{50} 值抑制 BT474 细胞的受激增殖。同样优选地,所述结合蛋白抑制至少 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10% BT474 细胞的受激增殖。

[0064] 可以通过本领域技术人员周知的标准手段将 BT474 细胞用于测量本发明的结合蛋白抑制增殖的功能,例如,如实施例 4 所示。优选地, BT474、SKBR-3、NCI-N87、ZR75-30、HCC1419 或 MDA-MB175 细胞可以用于测量本发明的化合物抑制增殖的功能,例如,如实施例 5 所示。

[0065] 在实施例 4 中公开并论述了以小于 100nM 的 IC_{50} 值抑制 BT474 细胞的受激增殖的重组结合蛋白。

[0066] 根据本发明的另一优选实施例,所述结合蛋白以小于 100nM 的半数有效浓度 (EC_{50}) 在 BT474 细胞中诱导凋亡。优选地,所述结合蛋白以小于 90、80、70、60、50、40、30、20 或 10nM 的 EC_{50} 在 BT474 细胞中诱导凋亡。

[0067] 可以通过本领域技术人员周知的标准手段将 BT474 细胞用于测量本发明的结合蛋白诱导凋亡的功能,例如,如实施例 5 所示。优选地, BT474、SKBR-3、NCI-N87、ZR75-30、HCC1419 或 MDA-MB175 细胞可以用于测量本发明的化合物诱导凋亡的功能,例如,如实施例 5 所示。

[0068] 在实施例 5 中公开并论述了以小于 100nM 的 EC_{50} 值在 BT474 细胞中诱导凋亡的重组结合蛋白。

[0069] 根据优选实施例,所述第一和第二重复序列结构域通过多肽接头连接。

[0070] 例如,这种多肽接头可以通过仅对待融合的各结构域的编码 cDNA 进行基因融合实现。这类实施例有资格成为具有 2 个不同重复序列结构域的融合多肽蛋白。

[0071] 例如,该接头可以由分别含有氨基酸 G 和 S,或 P 和 T 的寡肽组成,如 SEQ ID Nos:7 至 12 中阐述。根据另一优选实施例,可以使用下文所述的“多聚化部分”。可替代地,该 2 个重复序列结构域可以,例如,通过基于非多肽的化学接头,互相连接。

[0072] 优选地,在 PBS、pH7.4 中该重组结合蛋白和 / 或重复序列结构域的热去折叠的中

点变性温度 (T_m) 高于 45°C , 更优选高于 50°C , 更优选高于 55°C , 并且最优选高于 60°C 时。在生理条件下, 本发明的结合蛋白或重复序列结构域具有确定的二级和三级结构。这种多肽的热去折叠导致其丧失二级和三级结构, 这接着, 例如, 可以进行圆二色性测量。该重组结合蛋白和 / 或重复序列结构域的热去折叠的中点变性温度对应于在生理缓冲液中通过将温度从 10°C 缓慢提高至约 100°C 使所述蛋白或结构域热变性时协作转变的中点温度。本领域技术人员周知热去折叠的中点变性温度的测定。该结合蛋白或重复序列结构域在热去折叠的中点变性温度表明所述多肽的热稳定性。

[0073] 还优选的是这样的重组结合蛋白和 / 或锚蛋白重复序列结构域: 当在 37°C , PBS 中培养超过 5 天, 优选超过 10 天, 更优选超过 20 天, 更优选超过 40 天, 最优选超过 100 天, 该重组结合蛋白和 / 或锚蛋白重复序列结构域在浓度高达 20g/L , 优选高达 40g/L , 更优选高达 60g/L , 甚至更优选高达 80g/L , 最优选高达 100g/L 时, 形成小于 5% (w/w) 的不溶性聚集物。可通过直观沉淀的出现、凝胶过滤或动态光散射 (不溶性聚集物形成后其将极大地增加) 检测不溶性聚集物的形成。可通过在 $10^4 \times g$ 离心 10 分钟从蛋白样品移除不溶性聚集物。在 PBS、 37°C 上述培养条件下重组结合蛋白和 / 或锚蛋白重复序列域形成少于 2% , 更优选少于 1% 、 0.5% 、 0.2% 、 0.1% , 或最优选少于 0.05% (w/w) 的不溶性聚集物。可以通过从可溶性蛋白中分离不溶性聚集物, 接着用标准量化方法测定可溶性和不溶性部分中的蛋白量而确定不溶性聚集物的百分比。

[0074] 还优选的是: 在含有 100mM 二硫苏糖醇 (DTT) 的 PBS 中 37°C 培养 1 或 10 小时后, 不丧失其天然三维结构的重组结合蛋白和 / 或锚蛋白重复序列结构域。

[0075] 在一个特别的实施例中, 本发明涉及这样的重组结合蛋白: 其包含 2 个锚蛋白重复序列结构域, 特异性结合 HER2 并具有如上定义的指示的或优选的中点变性温度和不聚集性质。

[0076] 根据本发明的其它优选的实施例, 提供:

[0077] 所述第一重复序列结构域与选自 EQ ID NOs: 62 至 68、72 和 114 至 121 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2; 和 / 或

[0078] 所述第二重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs: 74 至 82 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2。

[0079] 发明人已经证实这些重复序列结构域, 第一重复序列结构域结合 HER2 的结构域 II, 而第二重复序列结构域结合 HER2 的结构域 IV。

[0080] 优选地, 所述第一重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs: 62 至 67 和 115 至 121 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2。更优选地, 所述第一重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs: 62、115、120 和 121, 特别是 SEQ ID NO: 115 和 120 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2。同样优选地, 所述第一重复序列结构域与选自 DARPins#1 至 6 和 54 至 60 的结合蛋白, 更优选地, 与选自 DARPins#1、54、59 和 60 的结合蛋白, 特别地, 与选自 DARPins#54 和 60 的结合蛋白竞争结合至 HER2。

[0081] 另外优选地, 所述第二重复序列结构域与选自 SEQ ID NOs: 79 至 81, 特别是 SEQ ID NO: 80 和 81 的锚蛋白重复序列结构域竞争结合至 HER2。同样优选地, 所述第二重复序列结构域与选自 DARPins#18 至 20 的结合蛋白, 特别地, 与选自 DARPins#19 和 20 的结合蛋白竞争结合至 HER2。

[0082] 根据本发明的其它优选实施例,提供:

[0083] 第一重复序列结构域包含于选自 SEQ ID NOs:62 至 68,72 和 114 至 121 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列,

[0084] 第二重复序列结构域包含于选自 SEQ ID NOs:74 至 82 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列,

[0085] 并且其中进一步地

[0086] 在所述锚蛋白重复序列结构域位置 1 的 G 和 / 或在位置 2 的 S 可选择地缺失 ;和

[0087] 在所述锚蛋白重复序列结构域的倒数第二位置的 L 和 / 或在最后位置的 N 可选择地被 A 替换。

[0088] 优选地,所述第一重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:62 至 67 和 115 至 121 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。更优选地,所述第一重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:62、115、120 和 121,特别是 SEQ ID NO:115 和 120 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。同样优选地,所述第一重复序列结构域包含与选自 DARPins#1 至 6 和 54 至 60 的结合蛋白,更优选地,与选自 DARPins#1、54、59 和 60 的结合蛋白,特别地,与选自 DARPins#54 和 60 的结合蛋白具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。

[0089] 另外优选地,所述第二重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:79 至 81,特别是 SEQ ID NO:80 和 81 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。同样优选地,所述第二重复序列结构域包含与选自 DARPins#18 至 20 的结合蛋白,特别是与选自 DARPins#19 和 20 的结合蛋白具有至少 70%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。

[0090] 优选地,所述第一锚蛋白重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:62 至 68、72 和 114 至 121 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 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,或 100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。

[0091] 优选地,该第二锚蛋白重复序列结构域包含与选自 SEQ ID NOs:74 至 82 的一个锚蛋白重复序列结构域具有至少 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,或 100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。

[0092] 同样优选地,该第一锚蛋白重复序列结构域包含与一个、两个或三个锚蛋白重复序列模块具有至少 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,或 100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列,该一个、两个或三个锚蛋白重复序列模块存在于选自 SEQ ID NOs:62 至 68、72 和 114 至 121 的锚蛋白重复序列结构域的 N 端和 C 端加帽模块之间。

[0093] 同样优选地,该第二锚蛋白重复序列结构域包含与一个、两个或三个锚蛋白重复序列模块具有至少 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,或 100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列,该一个、两个或三个锚蛋白重复序列模块存在于选自 SEQ ID NOs:74 至 82 的锚蛋白重复序列结构域的 N 端和 C 端加帽模块之间。

[0094] 根据本发明的其它优选实施例,提供:

[0095] 所述第一重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:62 至 68、72 和 114 至 121,
[0096] 所述第二重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:74 至 82,
[0097] 并且其中进一步地
[0098] 在所述锚蛋白重复序列结构域位置 1 的 G 和 / 或在位置 2 的 S 可选择地缺失 ; 和
[0099] 在所述锚蛋白重复序列结构域的倒数第二位置的 L 和 / 或在最后位置的 N 可选择地被 A 替换。

[0100] 优选地,所述第一锚蛋白重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:62 至 67、72 和 115 至 121 ;更优选 SEQ ID NO:115、120, 和 121,特别是, SEQ ID NO:115 和 120。

[0101] 优选地,该第二锚蛋白重复序列结构域选自 SEQ ID NOs:79 至 81,特别是 SEQ ID NO:80 和 81。

[0102] 根据本发明的其它优选实施例,提供 :

[0103] 所述第一重复序列结构域包含锚蛋白重复序列模块,该锚蛋白重复序列模块具有选自 SEQ ID NO:15 至 18、21 至 23、37、38、125、126、129、130、133 和 134 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:15 至 18、21 至 23、37、38、125、126、129、130、133 和 134 中多达 9 个氨基酸被任何其它氨基酸残基取代,和 / 或

[0104] 所述第二重复序列结构域包含锚蛋白重复序列模块,该锚蛋白重复序列模块具有选自 SEQ ID NO:46、47、51、52、55 和 56 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:46、47、51、52、55 和 56 中多达 9 个氨基酸被任何其它氨基酸残基取代。

[0105] 优选地,所述第一锚蛋白重复序列结构域的锚蛋白重复序列模块选自 SEQ ID NO:15 至 18、125、126、129、130、133 和 134,更优选 SEQ ID NO:15、125、129 和 133,并且甚至更优选 SEQ ID NO:125 和 133。

[0106] 优选地,所述第二锚蛋白重复序列结构域的锚蛋白重复序列模块选自 SEQ ID NO:46、47、55 和 56,并且更优选 SEQ ID NO:55 和 56。

[0107] 同样优选地,在 SEQ ID NO:15 至 18、21 至 23、37、38、46、47、51、52、55、56、125、126、129、130、133 和 134 的重复序列模块中多达 8 个氨基酸被另一氨基酸替换,被替换的氨基酸优选为多达 7 个氨基酸,更优选为多达 6 个氨基酸,更优选为多达 5 个氨基酸,甚至更优选为多达 4 个氨基酸,更优选为多达 3 个氨基酸,更优选为多达 2 个氨基酸,最优选为 1 个氨基酸。

[0108] 优选地,当在加帽模块、重复序列模块或重复序列结构域,重复序列结构域,或结合蛋白中替换氨基酸时,这些氨基酸被选自 A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y,更优选 A、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V, 和 Y 的氨基酸取代。同样优选地,氨基酸被同源氨基酸替换,即,氨基酸被侧链具有相似的生物物理特性的氨基酸替换。例如,带负电荷的氨基酸 D 可以被带负电荷的氨基酸 E 取代,或疏水性氨基酸,例如 L 可被 A, I 或 V 取代。本领域技术人员周知在多肽中氨基酸被另一氨基酸替换的技术。

[0109] 优选地,根据本发明的重复序列结构域具有选自 KDFQGITPLHIAATSGHLEIVEVLLKAG ADVNA (SEQ ID NO:16) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:16 中多达 9 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代,并且其中

[0110] 在位置 3 的 F 被 A 可选择地替换 ;

[0111] 在位置 4 的 Q 被 E 可选择地替换 ;

- [0112] 在位置 5 的 G 被 S 可选择地替换；
- [0113] 在位置 6 的 I 被 V 可选择地替换；
- [0114] 在位置 11 的 I 被 L 可选择地替换；
- [0115] 在位置 14 的 T 被 Q 可选择地替换；和 / 或
- [0116] 在位置 15 的 N 被选自 S 和 W 的氨基酸可选择地替换。
- [0117] 该组中一个非常优选的重复序列模块具有由 KDFQGVTPHLIAAQSGHLEIVEVLLKAGADVNA (SEQ ID NO:125)、SEQ ID NO:129 或 SEQ ID NO:133 组成的氨基酸序列。
- [0118] 同样优选地,根据本发明的锚蛋白重复序列模块具有选自 K D I T G E T P L H H A A D S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (SEQ ID NO:18) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:18 中多达 9 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代,并且其中
- [0119] 在位置 3 的 I 被 V 可选择地替换；
- [0120] 在位置 6 的 E 被 D 可选择地替换；
- [0121] 在位置 11 的 H 被 L 可选择地替换；
- [0122] 在位置 14 的 D 被 Q 可选择地替换；
- [0123] 在位置 15 的 S 被 H 可选择地替换；和 / 或
- [0124] 在位置 19 的 E 被 V 可选择地替换。
- [0125] 该组中一个非常优选的重复序列模块具有由 K D V T G D T P L H L A A Q H G H L E I V E V L L K A G A D V N A (SEQ ID NO:126)、SEQ ID NO:130 或 SEQ ID NO:134 组成的氨基酸序列。
- [0126] 同样优选地,根据本发明的锚蛋白重复序列结构域具有选自 K D W E G T T P L H L A A H T G H L E I V E V L L K A G A D V N A (SEQ ID NO:21) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:21 中多达 9 个氨基酸残基被任何氨基酸残基取代,并且其中
- [0127] 在位置 3 的 W 被 F 可选择地替换；
- [0128] 在位置 4 的 W 被 Q 可选择地替换；
- [0129] 在位置 6 的 T 被选自 I、Y 和 V 的氨基酸可选择地替换,优选 T；
- [0130] 在位置 11 的 L 被选自 I 和 V 的氨基酸可选择地替换,优选 I 和 V；
- [0131] 在位置 14 的 H 被选自 H、Q、Y 和 W 的氨基酸可选择地替换,优选 H；和 / 或
- [0132] 在位置 15 的 T 可选择地缺失或被选自 A 和 D 的氨基酸替换。
- [0133] 同样优选地,根据本发明的锚蛋白重复序列结构域具有选自 K D T V G T T P L H Y A A E D G H L E I V E V L L K A G A D V N A (SEQ ID NO:22) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:22 中多达 9 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代,并且其中
- [0134] 在位置 3 的 T 被选自 S、K、E 和 I 的氨基酸可选择地替换；氨基酸分配相等；
- [0135] 在位置 4 的 V 被选自 Q、I 和 Y 的氨基酸可选择地替换；优选 Y；
- [0136] 在位置 6 的 T 被选自 Q、F、R 和 W 的氨基酸可选择地替换；
- [0137] 在位置 11 的 Y 被选自 L、E 和 S 的氨基酸可选择地替换；优选 S；
- [0138] 在位置 14 的 E 被选自 S、Q、Y 和 V 的氨基酸可选择地替换；和 / 或
- [0139] 在位置 15 的 D 被选自 S、F 和 Y 的氨基酸可选择地替换；
- [0140] 在位置 16 的 G 被 D 可选择地替换；
- [0141] 同样优选地,根据本发明的锚蛋白重复序列模块选自 K D V E G W T P L H Y A A S S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (SEQ ID NO:38) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:38 中多达 9 个氨基酸被任何

其它氨基酸残基取代,并且其中

[0142] 在位置 6 的 W 被 Q 可选择地替换;

[0143] 在位置 11 的 Y 被 L 可选择地替换;和/或

[0144] 在位置 15 的 S 被 Y 可选择地替换。

[0145] 同样优选地,根据本发明的锚蛋白重复序列模块选自 KDWRGFTPLHYAAYLGHLEIVEVL LKAGADVNA (SEQ ID NO:46) 的氨基酸序列,其中在 SEQ ID NO:46 中多达 9 个氨基酸被任何其它氨基酸残基取代,并且其中

[0146] 在位置 3 的 W 被选自 W、T、V 和 R 的氨基酸可选择地替换;优选 T 和 R;

[0147] 在位置 4 的 R 被选自 R、T 和 I 的氨基酸可选择地替换;优选 I;

[0148] 在位置 6 的 F 被选自 F 或 H 可选择地替换;优选 F;

[0149] 在位置 11 的 Y 被 R 可选择地替换;

[0150] 在位置 14 的 Y 被 F 可选择地替换;

[0151] 在位置 15 的 L 被 V 可选择地替换;和/或

[0152] 在位置 17 的 H 被 Q 可选择地替换。

[0153] 优选地,SEQ ID NOs:16、18、28、31、21、22、38 和/或 46 的 9、8、7、6、5、4、3、2,或 1 个氨基酸残基被任何其它氨基酸残基取代。

[0154] 此外,特别优选地,所述结合蛋白包含多肽,其中所述多肽包含所述第一和第二锚蛋白重复序列结构域,并且其中所述多肽与选自 SEQ ID NO:83 至 98、102、103、122、123 和 136 至 141 的多肽具有至少 70%氨基酸序列一致性。

[0155] 优选地,所述多肽包含与选自 SEQ ID NO:83 至 98、102、103、122、123 和 136 至 141 的多肽具有至少 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,或 100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。

[0156] 同样优选地,所述多肽选自 SEQ ID NO:84、85、86、87、90、91、92、98、102、103、122 and 123,更优选 SEQ ID NO:85、86、87、90、91、92、102、103、122 和 123,甚至更优选 SEQ ID NO:86、87、91 和 92,并且最优选 SEQ ID NO:86 和 87。

[0157] 根据其它优选实施例,所述第一和第二锚蛋白重复序列结构域的锚蛋白重复序列模块的一个或更多个氨基酸残基被在锚蛋白重复序列单元的比对上相应位置处的氨基酸残基替换。

[0158] 本发明的另一实施例提供核酸分子,该核酸分子编码上文所述的至少一个结合蛋白或特别的锚蛋白重复序列结构域。此外,考虑包含所述核酸分子的载体。

[0159] 并非所有根据本发明的结合组合物都包含多肽或蛋白。后面的实施例仅涉及那些包含多肽或蛋白的结合组合物。对于这些组合物,申请人没有在此公开能够对它们进行编码的所有核酸分子,这是因为,由于遗传密码的简并性,许多核酸分子能够对一个和相同的多肽或蛋白进行编码。

[0160] 但是,它可以明确地并且毫不含糊地确定给定的核酸是否编码给定的多肽或蛋白。因此,对技术人员来说,本实施例是清楚的,并且其范围是易于确定的。

[0161] 本发明的另一实施例是提供根据上文所述的结合蛋白抑制以下至少一种的用途:

[0162] HER2 受体二聚化,

[0163] HER2/HER3 异源二聚化，

[0164] HER2 受体自身磷酸化，

[0165] HER 受体介导的信号传导，

[0166] HER3 受体配体诱导的磷酸化，和 / 或

[0167] HER3 受体介导的信号传导。

[0168] HER2 受体二聚化（也称为“同源二聚化”）发生在独立于配体之外使 HER2 过度表达的组织中。所述同源二聚化导致胞内自身磷酸化，这可以最终导致，例如，增加细胞增殖。

[0169] 因为 HER3 缺乏内在的激酶活性，HER2/HER3 异源二聚体形成之后，在 HER2 过度表达的乳腺癌中 HER3 被磷酸化，其可以最终导致，例如，抑制细胞凋亡。

[0170] 所述用途可以发生在体外或体内。如上所述，所有这些方法可以导致致病结果，即，通过激活各自的信号转导通路。通过 HER2 二聚化和 / 或 HER2/HER3 异源二聚体激活的信号转导通路包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)，磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K/Akt)，磷脂酶 C γ ，蛋白激酶 C (PKC)，信号转导和转录激活因子 (STAT)，Ras-Map 激酶通路和 mTOR 通路。

[0171] 例如，磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K/Akt) 通路被认为是通过阻断凋亡使细胞维持存活的关键通路之一。其病理激活，例如，通过 HER2/HER3 异源二聚体，可能引发恶性增殖（例如，参见实施例）。

[0172] HER2 的病理结合，例如，通过 HER2 同源二聚化，可能引发细胞恶性迁移、入侵或增殖（例如，参见实施例、Hynes NE. 和 Lane HA., Nat. Rev. Cancer., 5, 341-54, 2005）。

[0173] 本发明的另一实施例，提供包含根据上述公布的结合蛋白或组合物的药物制剂，以及可选地提供可接受药物的载体和 / 或稀释剂。

[0174] 可接受药物的载体和 / 或稀释剂对本领域技术人员来说是已知的并且在下文有更详细的说明。甚至进一步地，考虑包含一种或更多种上文所述的重组结合蛋白，特别是包含重复序列结构域的结合蛋白的用于诊断的组合物。

[0175] 药物制剂包含上述的重组结合蛋白和可接收药物的载体、赋形剂或稳定剂，例如，如在 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980] 一文中所述。本领域技术人员已知的合适的载体、赋形剂或稳定剂为生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液、汉克 (Hank's) 溶液、固定油、油酸乙酯、在盐水中的 5% 葡萄糖、增强等渗性和化学稳定性的物质、缓冲剂和防腐剂。其它合适的载体包括本身不诱导对接受所述组合物的个体有害的抗体的产生的任何载体，例如，蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸和氨基酸共聚物。

[0176] 用于体内服用的制剂必须是消过毒的或无菌的。这经由无菌滤膜过滤轻易实现。该药物制剂可通过在本领域技术人员知识范围内的任何合适的方法来服用。

[0177] 此外，在本发明的另一实施例中提供根据上文公布的至少一种结合蛋白、组合物或药物制剂作为药剂的用途。同样地，提供包括使患者服用上述的结合蛋白、组合物或药物制剂的方法。在这两种情况下，优选，待治疗的疾病是肿瘤疾病，优选癌症。

[0178] 在每种情况下，优选使患者服用有效量的上述的结合蛋白、组合物或药物制剂以治疗疾病。

[0179] 在此使用的术语“肿瘤性疾病”是指细胞或组织的异常状态或情况，特征在于迅速增殖的细胞生长或肿瘤。在更具体的意义上，该术语涉及癌变过程，例如，瘤和 / 或白血病。

[0180] 根据本发明的结合蛋白显示出凋亡和抗增殖作用（参见实施例部分）。由于肿瘤疾病的特征通常为由凋亡受抑制和 / 或增殖增强, 从这些实施例中合理推断出根据本发明的结合蛋白可以用于肿瘤疾病的治疗。

[0181] 优选地, 所述肿瘤疾病为具有选自以下的至少一个特征的疾病:

[0182] HER2 编码基因的扩增,

[0183] HER2 编码基因的过度表达,

[0184] HER2 编码基因的突变形式的表达, 和 / 或

[0185] 在抗曲妥珠单抗的肿瘤中 HER3 编码基因的过度表达。

[0186] 人 HER2 由 ERBB2 基因编码。上述选项可以归因于 ERBB2 基因突变, 这可以通过现代分子诊断来检测, 如目前市场上的现代分子诊断。

[0187] 在此使用的术语“HER2 表面具有的表达”涉及表达 HER2 受体蛋白的细胞、组织或器官, 例如, 通过免疫组织化学法 (IHC) 检测出。在此使用的术语“HER2 编码基因的扩增或过度表达”涉及与在正常细胞、组织或器官中的表达水平比较, 指示在细胞、组织或器官中 HER2 受体蛋白的异常表达水平, 例如, 通过免疫组织化学法 (IHC) 检测出。

[0188] 本领域已知这样的 IHC 检测试验, 包括临床试验测定 (CTA), 市售 LabCorp4D5 测验和市售 DAKOHercepTest® (DAKO, 卡平特里亚, 加利福尼亚州)。后面的试验使用 0 至 3+ (0 是正常表达, 3+ 表示最强阳性表达) 细胞染色的特定得分范围, 以识别 HER2 蛋白过度表达的癌症。因此, HER2 蛋白的过度表达在 1+、2+ 或 3+, 优选 2+ 或 3+, 更优选 3+ 的范围特征的癌症患者将受益于本发明的治疗方法。

[0189] 可代替地, 也可以通过原位杂交法 (ISH)、RT-PC 和其它方法检测 HER2 表达和 / 或过度表达的得数。

[0190] 根据特别优选的实施例, 所述肿瘤疾病为选自以下疾病中的至少一种:

[0191] • 乳腺癌,

[0192] • 卵巢癌,

[0193] • 胃肿瘤 (gastric cancer),

[0194] • 胃癌 (stomach cancer), 和 / 或

[0195] • 子宫癌,

[0196] • 结肠直肠癌。

[0197] 此外, 优选通过服用选自以下的至少一种活性物质以协作方式补充所述用途:

[0198] • 抗肿瘤试剂

[0199] • 内分泌药物,

[0200] • 肿瘤疫苗,

[0201] • 免疫疗法, 和 / 或

[0202] • 细胞疗法。

[0203] 在此使用的术语“以协作方式补充”应该指的是共同服用, 其在给定方案的情况下进行。这包括同步服用不同化合物, 以及时移服用不同化合物 (例如, 化合物 A 给药一次并且在此之后化合物 B 给药几次, 或反之亦然, 或这两种化合物同步给药并且在稍后阶段两者之一也给药)。

[0204] 在此使用的术语“抗肿瘤试剂”涉及具有抗肿瘤或抗癌作用的药物, 或药物的组

合。这首先适用于化疗剂，其通过消弱有丝分裂，有效地靶向快速分裂的细胞或者通过使细胞进行凋亡而起作用。大多数化疗药物可分为烷化剂、抗代谢物、蒽环类药物、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂，和其它抗肿瘤试剂。

[0205] 优选的抗肿瘤试剂是 5- 氟尿嘧啶、放线菌素、阿霉素、安吡啶、蒽环类药物、硫唑嘌呤、苯达莫司汀、博莱霉素、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、柔红霉素、多西紫杉醇、阿霉素、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、氮芥、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、奥沙利铂、紫杉醇、普卡霉素、鬼臼毒素、替尼泊苷、托泊替康、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春新碱、长春地辛，和 / 或长春瑞滨。

[0206] 免疫治疗涉及从癌细胞分离蛋白质并且随后使癌症患者对这些蛋白质免疫，以期刺激免疫反应，杀死癌细胞。另一种治疗性抗癌疫苗接种方法是在患者体内的原位产生免疫应答。这增强对肿瘤抗原的抗肿瘤免疫应答，随后释放裂解性病毒复制体，结果在原位产生患者特异性抗肿瘤疫苗。另一种方法是使患者对在癌症发生中起生理作用的化合物免疫，从而使人体消除所述化合物。

[0207] 靶向药物是通过干扰致癌和肿瘤生长所需的特异靶向分子，而不是简单干扰快速分裂的细胞（例如，传统的化疗），阻断癌细胞的生长的一类药剂。靶向治疗的主要种类是小分子和单克隆抗体。

[0208] 落入此定义的小分子包括，但不限于，拉帕替尼、来那替尼、阿法替尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、硼替佐米、Bcl-2 抑制剂（例如，奥巴克拉、ABT-263、和棉酚）、PARP 抑制剂（例如，Iniparib、奥拉帕尼）、Janus 激酶抑制剂、PI3K 抑制剂、阿帕替尼、mTOR 抑制剂（依维莫司）、AN-152、AKT 抑制剂、HDAC 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、连接至 [D-Lys(6)]-LHRH 的多柔比星、哌加他尼、舒尼替尼、索拉非尼、Tivozanib 和帕唑帕尼。落入此定义的单克隆抗体包括，但不限于，利妥昔单抗、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗 -TDM1、帕妥珠单抗、西妥昔单抗和贝伐珠单抗。

[0209] 在此使用的内分泌药物是对激素或激素受体有拮抗作用并因此干扰生长需要激素的癌症类型的药物。这样的内分泌药物的一个例子是它莫西芬，其为乳房组织中的雌激素受体的拮抗剂。

[0210] 在此使用的术语“细胞治疗”，应涉及基于细胞的治疗，如修饰，或未经修饰的，细胞毒性淋巴细胞或树突状细胞的过继转移。

[0211] 在此使用的术语“肿瘤疫苗”是指如下的疫苗 a) 防止感染致癌病毒（作用模式类似于其它抗病毒感染疫苗），b) 治疗现有癌症（治疗性癌症疫苗），或 c) 防止癌症发展，或减轻其影响（预防癌症疫苗）。

[0212] 另外或可代替地，优选通过以下的至少一种其它治疗以协作方式补充所述用途：

[0213] • 放射治疗

[0214] • 手术，和 / 或

[0215] • 激光消融。

[0216] 此外，提供了治疗人或动物受试者的方法，该方法包括根据上述公开的用途。优选地，所述治疗方法涉及上文所述的指示。该方法包括使有需要的人或动物服用治疗有效量的本发明的重组结合蛋白。

[0217] 可通过比如噬菌体 (WO 1990/002809, WO 2007/006665)、或细菌细胞 (WO

1993/010214) 表面展示、核糖体展示 (WO 1998/048008), 质粒展示 (WO 1993/008278) 几种方法, 或通过利用共价 RNA 重复序列蛋白杂交构建体 (WO 2000/032823), 或胞内表达和选择 / 筛选比如蛋白互补试验 (WO 1998/341120) 获得和 / 或进一步形成根据本发明的重组结合蛋白或锚蛋白重复序列结构域。本领域技术人员知晓这些方法。

[0218] 可以根据本领域技术人员已知的方案获得用于根据本发明的重组结合蛋白或锚蛋白重复序列结构域的选择 / 筛选的锚蛋白重复序列蛋白的文库 (WO 2002/020565, Binz, H. K., 等人, J. Mol. Biol., 332, 489-503, 2003 和 Binz 等人, 2004, 同上)。实施例 1 举例说明了这些文库在选择对 HER2 胞外区具有特异性的锚蛋白重复序列结构域上的用途。此外, 可以利用标准的重组 DNA 技术 (例如, WO2002/020565, Binz 等人, 2003, 同上和 Binz 等人, 2004, 同上) 由根据本发明的锚蛋白重复序列模块和合适的加帽模块或加帽重复序列模块化地组装 ((Forrer, P. 等人, FEBS letters 539, 2-6, 2003) 本发明的锚蛋白重复序列结构域。

[0219] 本发明并不限于在实施例中描述的特定实施例。也可以使用其它资源, 并用下面概括的方法进行处理。

[0220] 定义

[0221] 术语“蛋白”是指多肽, 其中至少部分所述多肽具有或能够通过在其多肽链内和 / 或之间形成二级、三级或四级结构获得确定的三维排列。如果蛋白包含两条或更多条多肽, 该单独的多肽链可以非共价地或共价地连接, 例如, 通过两条多肽之间的二硫键连接。通过形成二级或三级结构单独具有, 或能够获得确定的三维排列的蛋白部分被称为“蛋白结构域”。本领域技术从事者周知这样的蛋白质结构域。

[0222] 在重组蛋白、重组蛋白结构域、重组结合蛋白等等中使用的术语“重组”是指通过利用相关领域从事者周知的重组 DNA 技术产生所述多肽。例如, 可以将编码多肽的重组 DNA 分子 (例如, 通过基因合成产生) 克隆到细菌表达质粒 (例如, pQE30, Qiagen)、酵母表达质粒或哺乳动物表达质粒中。例如, 当将这样构建的重组细菌表达质粒插入到合适的细菌 (例如, 大肠杆菌) 时, 该细菌可产生由该重组 DNA 编码的多肽。相应产生的多肽被称为重组多肽

[0223] 在本文, 术语“多肽”涉及由例如, 通过肽键连接的多个, 即, 2 个或更多个氨基酸的一条或多条链组成的分子。优选地, 多肽由通过肽键连接的八个以上的氨基酸组成。

[0224] 术语“多肽标签”指的是连接至多肽 / 蛋白质的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列用于所述多肽 / 蛋白质的纯化、检测或靶向, 或其中所述氨基酸序列能够改善所述多肽 / 蛋白质的物理化学行为, 或其中所述氨基酸序列具有效应子功能。单独的多肽标签, 结合蛋白的部分和 / 或结构域可直接或通过多肽接头彼此连接。这些多肽标签在本领域中都是周知的, 并且对本领域技术人员来说完全是可以获得的。多肽标签的例子为小多肽序列, 例如, 组氨酸 (His) (例如, SEQ ID NO :6 的组氨酸标签)、myc、FLAG、Strep 标签或部分, 例如, 酶 (例如, 碱性磷酸酶), 其能对所述多肽 / 蛋白质, 或可用于靶向 (如免疫球蛋白或其片段) 和 / 或作为效应分子的部分或进行检测。

[0225] 术语“多肽接头”是指氨基酸序列, 其能够连接, 例如两个蛋白结构域, 多肽标签和蛋白结构域, 蛋白结构域和非多肽部分, 例如, 聚乙二醇或两个序列标签。相关领域技术人员已知这些结构域、标签、非多肽部分和接头。在申请号为 WO2002/020565 的专利申请的描

述中提供了上述例子的列表。此类接头的具体例子为长度可变的甘氨酸-丝氨酸连接子及脯氨酸-苏氨酸接头,优选地,所述接头的长度在 2 和 24 个氨基酸之间;更优选地,所述接头的长度在 2 和 16 个氨基酸之间。SEQ ID NO:7 至 10 提供甘氨酸-丝氨酸接头的例子,SEQ ID NO:11 和 12 提供脯氨酸-苏氨酸接头的例子。优选地,SEQ ID NO:11 的脯氨酸-苏氨酸接头之前有 GS 和 / 或之后有 GS。

[0226] 术语“聚合物部分”指的是蛋白质的聚合物部分或非蛋白质的聚合物部分。“蛋白质的聚合物部分”优选为不形成稳定的三级结构的多肽。蛋白质的聚合物部分的例子是 XTEN® (Amunix 的注册商标;WO 2007/103515) 多肽,或如 WO 2008/155134 所述包含脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸残基的多肽。通过利用标准 DNA 克隆技术产生基因融合多肽,随后通过标准的表达和纯化,蛋白质的聚合物部分可以共价连接至,例如,本发明的重复序列结构域。“非蛋白质的聚合物部分”是并非由多肽构成的聚合物部分。非蛋白质的聚合物部分的例子是羟乙基淀粉 (HES)、聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇,或聚氧化烯。术语“聚乙二醇化”是指 PEG 部分共价连接至,例如,本发明的多肽。本发明的聚合物部分的分子量可以广泛变化。优选地,所述聚合物部分由多肽接头连接至重复序列结构域。

[0227] 在特定的实施例中,PEG 部分或任何其它非蛋白质的聚合物可以,例如,通过马来酰亚胺接头连接到半胱氨酸巯基,并且半胱氨酸通过肽接头连接至在此所述的重复序列结构域的 N 或 C 端。

[0228] 术语“结合蛋白”是指包含一个或多个结合结构域,一种或多种生物活性化合物和如下面进一步解释的一种或多种聚合物部分的蛋白质。优选地,所述结合蛋白包含高达四个结合结构域。此外,任何此类结合蛋白可以包含并非为结合结构域的另外的蛋白结构域、多聚化部分、多肽标签、多肽接头和 / 或单个 Cys 残基。

[0229] “多聚化部分”的例子是免疫球蛋白重链恒定区,其成对提供功能性免疫球蛋白 Fc 结构域,和亮氨酸拉链或包含游离巯基(在 2 条这样的多肽之间形成分子间二硫键)的多肽。单个 Cys 残基可用于,例如,通过利用本领域技术人员周知的马来酰亚胺化学作用使其其它部分结合至多肽。优选地,所述结合蛋白为重组结合蛋白。还优选地,结合蛋白的结合结构域具有不同的靶特异性。

[0230] 术语“竞争结合”表示本发明的两个不同的结合结构域都能单独地结合相同的靶,而不能同时结合至相同的靶。因此,这样的两个结合结构域竞争结合至所述靶。优选地,所述两个竞争的结合结构域结合至在所述靶上的重叠或相同的结合表位。本领域技术人员周知确定两个结合结构域是否竞争结合至靶的方法,如竞争酶联免疫吸附法 (ELISA) 或竞争 SPR 测定(例如,通过使用来自 BioRad 公司的 Proteon 仪)。

[0231] 术语“多特异性结合蛋白”是指针对位于相同靶蛋白上的两个或多个不同表位的结合蛋白。例如,靶向 HER2 的多特异性结合蛋白包含至少一个靶向 HER2 上的第一表位的第一结合结构域、靶向 HER2 上的不同的第二表位的第二结合结构域,以及任选地包含靶向 HER2 上的另外的表位的另外的结合结构域。

[0232] 术语“双特异性结合蛋白”是指针对位于相同靶蛋白上的两个不同表位的结合蛋白。例如,靶向 HER2 的双特异性结合蛋白包含至少一个靶向 HER2 第一表位的第一结合结构域和靶向 HER2 上的不同的第二表位的第二结合结构域。相应地,“双特异性结合蛋白”包含针对第一表位的第一结合结构域和针对相同靶分子上的不同的第二表位的第二结合结

构域。

[0233] 术语“生物活性化合物”指的是当适用于具有所述疾病的哺乳动物时,减轻疾病的化合物。生物活性化合物可以具有拮抗或激动性质,并且可以是蛋白质的生物活性化合物或非蛋白质的生物活性化合物。这种蛋白质的生物活性化合物通过使用标准 DNA 克隆技术产生基因融合多肽,随后通过标准的表达和纯化可以共价连接至,例如,本发明的结合结构域。这种非蛋白质的生物活性化合物通过化学方法可以共价连接至,例如,本发明的结合结构域,例如,通过由马来酰亚胺接头连接至半胱氨酸硫基并且半胱氨酸由肽接头连接至在此所述的结合结构域的 N 或 C 端。蛋白质的生物活性化合物的例子是具有不同靶特异性(例如,通过与生长因子结合使其无效)的结合结构域、细胞因子(如白介素)、生长因子(例如,人生长激素)、抗体及其片段、激素(例如, GLP-1) 和任何可能的蛋白质药物。非蛋白质的生物活性化合物的例子是毒素(例如, ImmunoGen 的 DM1)、靶向 GPCR 的小分子、抗生素和任何可能的非蛋白质药物。

[0234] 术语“结合结构域”是指蛋白质支架表现出相同的“折叠”(三维排列)并且具有下文定义的预定形状的蛋白质结构域。这样的结合结构域可以通过合理的,或最常见的是,组合蛋白质工程技术获得,这是本领域已知的技术(Binz 等人,2005,同上)。例如,可以通过包括如下步骤的方法获得具有预定性质的结合结构域:(a) 提供蛋白质支架展示系统折叠的蛋白质结构域的各种集合;和(b) 筛选所述各种集合和/或从所述各种集合中选择,以获得至少一种具有所述预定性质的蛋白质结构域。根据使用的筛选和/或选择系统,可以通过几种方法提供蛋白质结构域的各种集合,并且可以包括利用本领域技术人员已知的方法,比如,噬菌体展示或核糖体展示。优选地,所述结合域是重组结合结构域。还优选地,所述结合结构域是重复序列蛋白或设计的重复序列蛋白。

[0235] 因此,在此使用的术语“结合”涉及识别并结合给定的靶,但基本上不识别或结合其它靶的结合结构域。优选地,具有本发明意义的结合结构域资格的候选者要求解离常数在 PBS 中小于 10^{-7} M。

[0236] 术语“Kd”涉及解离常数,其为测量较大的对象可逆地分离(离解)为较小成分的性质(如当复合物分开成其组成分子时)的特定类型的平衡常数。本领域技术人员周知确定蛋白质-蛋白质相互作用的解离常数的方法,比如,基于表面等离子体共振(SPR)的技术(例如,SPR 平衡分析)或等温滴定量热法(ITC)。如果在不同的条件(例如,盐浓度, pH 值)下测量,那么特定的蛋白质-蛋白质相互作用的测得的 Kd 值可以不同。因此,优选用标准化的蛋白溶液和标准化的缓冲液,例如 PBS 进行 Kd 值的测量。

[0237] 术语“PBS”意为含有 137mM NaCl、10mM 磷酸盐和 2.7mM KCl 并且 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲水溶液。

[0238] 术语“蛋白质支架”是指具有可以高度容忍氨基酸插入、取代或缺失的暴露表面区域的蛋白质。可以用来产生本发明的结合结构域的蛋白质支架的例子是抗体或其片段,比如单链 Fv 或 Fab 片段、来自金黄色葡萄球菌的蛋白 A、来自大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)的胆汁三烯结合蛋白或其它脂质运载蛋白、锚蛋白重复序列蛋白或其它重复序列蛋白,和人纤连蛋白。本领域技术人员已知所述蛋白支架(Binz 等人,2005,同上; Binz 等人,2004,同上)。

[0239] 术语“靶”指的是单独的分子,例如核酸分子、多肽或蛋白质、碳水化合物,或任何

其它天然存在的分子,包括这些单独分子的任何一部分,或两个或多个这些分子的复合物。靶可以是整个细胞或组织样品,或其可以为任何非天然分子或部分。优选地,所述靶是天然存在的或非天然多肽或含有化学修饰,例如,通过天然或非天然的磷酸化、乙酰化、或甲基化修饰的多肽。在本发明的具体应用中,所述靶为 HER2 的胞外区域。

[0240] 术语“预定性质”是指性质,比如,结合至靶、靶的阻断、靶介导的反应的激活、酶活性,以及相关另外的性质。取决于预期性质的类型,普通技术人员能够识别进行筛选和 / 或选择具有预期性质的结合结构域的形式和必要的步骤。优选地,所述预定性质为结合至靶。

[0241] 下文对重复序列蛋白的定义是基于申请号为 W0 2002/020565 的专利申请中的定义。申请号为 W0 2002/020565 的专利申请进一步涵盖了重复序列蛋白特征、技术和应用的概述。

[0242] 术语“重复序列蛋白”是指包含一种或多种重复序列结构域的蛋白质。优选地,每个所述重复序列蛋白包含高达四个重复序列结构域。更优选地,每个所述重复序列蛋白包含高达两个重复序列结构域。最优选地,每个重复序列蛋白包括仅一个重复序列结构域。此外,所述重复序列蛋白可以包含另外的非重复序列的蛋白结构域、多肽标签和 / 或多肽接头。

[0243] 术语“重复序列结构域”是指包含作为结构单元的两个或更多个连续的重复序列单元(模块)的蛋白结构域,其中,所述结构单元具有相同的折叠部分并紧密堆叠从而产生具有共同的疏水核心的超螺旋结构。优选地,重复序列结构域还包含 N 端和 / 或 C 端加帽单元(或模块)。甚至更优选地,所述 N 端和 / 或 C 端加帽单元(或模块)为加帽的重复序列。

[0244] 术语“设计的重复序列蛋白”和“设计的重复序列结构域”分别指的是 W02002/020565 的专利申请中说明的发明方法的结果获得的重复序列蛋白或重复序列结构域。设计的重复序列蛋白和设计的重复序列结构域是合成的,而不是来自大自然的。其分别为人造蛋白或结构域,通过表达相应的设计的核酸而获得。优选地,该表达在真核或原核细胞中,如细菌细胞,或利用体外无细胞表达系统进行。因此,设计的锚蛋白重复序列蛋白(即, DARPIn) 对应包含至少一个锚蛋白重复序列结构域的本发明的重组结合蛋白。

[0245] 术语“结构单元”是指多肽的局部有序的部分,其由二级结构沿着多肽链彼此邻近的两个或更多个片段之间的三维相互作用形成。这样的结构单元呈现结构基序。术语“结构基序”指的是存在于至少一个结构单元的二级结构元件的三维排列。结构基序是本领域技术人员周知的。单独的结构单元不能获得确定的三维排列,然而,其连续结构,例如,在重复序列结构域的重复序列模块,导致相邻单元的相互稳定化,从而产生超螺旋结构。

[0246] 术语“重复序列单元”是指包含一个或多个天然存在的重复序列蛋白的重复序列基序的氨基酸序列,其中所述“重复序列单元”有多个拷贝,并且对于确定蛋白质折叠的所有所述基序,所述“重复序列单元”表现出共同的、确定的折叠拓扑结构。这样的重复序列单元对应重复序列蛋白的“重复序列结构单元(重复序列)”(如 Forrer 等人, 2003, 同上, 一文所述)或重复序列蛋白的“连续的同源结构单元(重复序列)”(如 Binz 等人, 2004, 同上, 一文所述)。这样的重复序列单元包含框架残基和相互作用的残基。这种重复序列单元的例子为犰狳重复序列单元、富含亮氨酸的重复序列单元,锚蛋白重复序列单位,三角形四肽(tetratricopeptide)重复序列单元, HEAT 重复序列单元,和富含亮氨酸的变体的重

复序列单元。含有两个或更多个这种重复序列单元的天然存在的蛋白质被称为“天然存在的重复序列蛋白”。当相互比较时,重复序列蛋白的单独的重复序列单元的氨基酸序列可具有显著数目的突变、取代、添加和 / 或缺失,同时仍基本上保持重复序列单元的一般模式,或基序。

[0247] 因此,术语“锚蛋白重复序列单位”指的是重复序列单元,其为如 Forrer 等人,2003,在上述引文中所述的锚蛋白重复序列。锚蛋白重复序列是本领域技术人员周知的。术语“锚蛋白重复序列结构域”指的是包含两个或更多个连续的作为结构单元的锚蛋白重复序列单位(模块)的重复序列结构域,并且,优选地,包含 N 端和 / 或 C 端加帽单元(或模块)的重复序列结构域。

[0248] 术语“框架残基”涉及重复序列单元的氨基酸残基,或者重复序列模块的相应的氨基酸残基,其对折叠的拓扑结构有贡献,即其对所述重复序列单元(或模块)的折叠部分有贡献或其对相邻单元(或模块)的相互作用有贡献。这样的贡献可能为与在重复序列单元(或模块)的其它残基的相互作用,或如在 α 螺旋或 β 折叠,或氨基酸段形成线性多肽或环中发现的对多肽骨架的构象的影响。

[0249] 术语“靶向相互作用残基”指的是重复序列单元的氨基酸残基或重复序列模块的相应的氨基酸残基,其对与靶物质的相互作用有贡献。这种贡献可能是与靶物质的直接的相互作用,或在其它直接相互作用的残基上的影响,例如,通过稳定重复序列单元(或模块)的多肽的构象以使直接相互作用的残基与所述靶能够或增强相互作用。这样的框架和靶相互作用残基可以通过分析用物理化学方法,比如 X 射线晶体学、NMR 和 / 或 CD 光谱获得的结构数据,或者通过与结构生物学和 / 或生物信息学的从业者周知的已知的和相关的结构信息的比较来识别。

[0250] 优选地,用于推断重复序列基序的重复序列单元是同源的重复序列单元,其中该重复序列单元包含相同的结构基序,并且其中重复序列单元 70% 以上的框架残基是彼此同源的。优选地,重复序列单元 80% 以上的框架残基是彼此同源的。最优选地,重复序列单元 90% 以上的框架残基是彼此同源的。本领域技术人员知晓确定多肽之间的同源百分比的计算机程序,比如 FASTA、BLAST 或间 Gap。进一步优选地,用于推断重复序列基序的重复序列单元是从确定的靶上选择的重复序列结构域获得的同源重复序列单元。

[0251] 术语“重复序列基序”是指由一个或多个重复序列单元或重复序列模块推导出的氨基酸序列。优选地,所述重复序列单元或重复序列模块来自对相同靶具有结合特异性的重复序列结构域。这样的重复序列基序包括框架残基位置和靶相互作用残基位置。所述框架残基位置对应重复序列单元(或模块)的框架残基的位置。同样地,所述靶相互作用残基位置对应重复序列单元(或模块)的靶相互作用残基的位置。重复序列基序包含固定位置和随机位置。术语“固定位置”指的是氨基酸在重复序列基序的位置,其中所述位置被设定为特定的氨基酸。多数情况下,这样的固定位置与对特定靶有特异性的框架残基的位置和 / 或靶相互作用残基的位置是对应的。术语“随机位置”指的是氨基酸在重复序列基序的位置,其中,在所述氨基酸位置可以允许两个或多个氨基酸,例如,其中允许二十种天然存在的常见氨基酸中的任何一种,或者其中允许二十种天然存在的氨基酸中大多数,比如,除半胱氨酸以外的氨基酸,或除甘氨酸、半胱氨酸和脯氨酸之外的氨基酸。多数情况下,这样的随机位置对应靶相互作用残基的位置。然而,框架残基的一些位置也可以是随机化的。

[0252] 术语“折叠拓扑结构”是指所述重复序列单元或重复序列模块的三级结构。折叠拓扑结构由形成至少部分 α 螺旋或 β 折叠的一段氨基酸,或形成线性多肽或环,或 α 螺旋、 β 折叠和 / 或线性多肽 / 环的任意组合的氨基酸段确定。例如,锚蛋白重复序列单元 / 模块由 β 转角,接着两个反平行的 α 螺旋和到达下一个重复序列单元 / 模块的转角的环组成。

[0253] 术语“连续的”指的是排列,其中重复序列单元或重复序列模块串联排列。在设计重复序列蛋白中,有至少 2 个,通常约 2 至 6 个,特别是至少约 6,经常 20 个或更多个重复序列单元 (或模块)。在多数情况下,重复序列结构域的重复序列单元 (或模块) 将呈现高度的序列一致性 (在对应位置的氨基酸残基相同),或序列相似性 (氨基酸残基不同,但具有相似的物理化学性质),并且一些氨基酸残基可能是高度保守的关键残基。然而,只要保持重复序列单元 (或模块) 的共同的折叠拓扑结构,通过在不同的重复序列单元 (或模块) 之间插入和 / 或缺失和 / 或取代氨基酸,高度的序列变异性也是可能的。

[0254] 本领域技术人员周知通过物理化学方法如 X 射线晶体学,核磁共振或 CD 光谱直接确定重复序列蛋白的折叠拓扑结构的方法。识别并确定重复序列单元或重复序列基序或用于识别包含这样的重复序列单元或基序的相关蛋白质的家族的方法,例如,同源性检索 (BLAST 等),已生物信息学领域建立完善,并且被本领域技术人员周知。改进最初的重复序列基序的步骤可包括迭代过程。

[0255] 术语“重复序列模块”指的是设计的重复序列结构域的重复序列的氨基酸序列,其最初来源于天然存在的重复序列蛋白的重复序列单元。包含在重复序列结构域的每个重复序列模块来源于天然存在的重复序列蛋白的家族或亚家族 (例如,狢狢重复序列蛋白或锚蛋白重复序列蛋白的家族) 的一个或多个重复序列单元。进一步优选地,包含在重复序列结构域的每个重复序列模块包括重复序列基序,该重复序列基序由从在靶上选择的重复序列结构域获得的同源重复序列单元 (例如,如实施例 1 所述) 推导出并具有相同靶特异性的。

[0256] 因此,术语“锚蛋白重复序列模块”指的重复序列模块,其最初来源于天然存在的锚蛋白重复序列蛋白的重复序列单元。本领域技术人员周知锚蛋白重复序列蛋白。

[0257] “重复序列模块”可以包括氨基酸残基存在于相应的重复序列模块的所有拷贝中的位置 (“固定位置”) 和不同的或“随机”的氨基酸残基的位置 (“随机位置”)。

[0258] 术语“加帽模块”指的是融合至重复序列结构域的 N 端或 C 端重复序列模块的多肽,其中所述加帽模块形成紧密的三级相互作用 (即,三级结构的相互作用),并且因此所述重复序列模块在不与连续的重复序列模块接触的一侧提供使所述重复序列模块的疏水核心与溶剂隔离的帽。所述 N 端和 / 或 C 端加帽模块可以为,或可以来源于,在天然存在的重复序列蛋白中发现的邻近重复序列单元的加帽单元或其它结构单元。术语“加帽单元”指的是天然存在的折叠的多肽,其中所述多肽限定特定的结构单元,该特定的结构单元的 N 或 C 融合至重复序列单元,其中所述多肽形成紧密的三级结构相互作用,并且因此所述重复序列单元提供使在一侧的所述重复序列单元的疏水核心与溶剂隔离的帽。优选地,加帽模块或加帽单元为加帽重复序列。术语“加帽重复序列”中的是与所述相邻重复序列单元 (模块) 具有相似或相同的折叠和 / 或与相邻重复序列单元 (或模块) 具有序列相似性的重复序列单元 (或模块)。WO 2002/020565 和 Interlandi 等人,2008 (同上) 描述了加帽

模块和加帽重复序列。

[0259] N端锚蛋白加帽模块(即,N端加帽重复序列)的例子为SEQ ID NO:1、2、3、13、14、20、26、27、36、40、44、45、50、54、124、128和132,并且C端加帽重复序列模块(即,C端加帽重复序列)的例子为SEQ ID NO:4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131和135。

[0260] 例如,SEQ ID NO:13的N端锚蛋白加帽模块由位置1至32的氨基酸编码并且SEQ ID NO:19的C端加帽模块由位置99至126的氨基酸编码。

[0261] 根据本发明的重组结合蛋白包含至少一个锚蛋白重复序列结构域,其中所述锚蛋白重复序列结构域对哺乳动物的HER2胞外区具有结合特异性。

[0262] 术语“对靶具有结合特异性”、“特异性结合至靶”或“靶特异性”等等意为结合蛋白或结合结构域在PBS以比结合至不相关蛋白,比如大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MBP)低的解离常数结合至靶。优选地,对于靶,PBS中的解离常数比对于MBP相应的解离常数低至少10倍,更优选至少 10^2 倍,甚至更优选至少 10^3 倍,或最优选至少 10^4 倍。

[0263] 术语“共有序列”是指氨基酸序列,其中通过多个重复序列单元的结构和/或序列比对获得所述共有序列。使用两个或多个结构和/或序列比对的重复序列单元,并在比对中允许间隙,有可能确定各位置上最频繁的氨基酸残基。共有序列是包含最频繁表现在各位置的氨基酸的序列。两个或更多个氨基酸在单个位置以高于平均值表现的情况下,共有序列可包括的那些氨基酸的分组。所述两个或更多个重复序列单元可以取自包括在单一的重复序列蛋白的重复序列单位,或取自两个或更多个不同的重复序列蛋白。

[0264] 本领域技术人员周知共有序列和确定共有序列的方法。

[0265] “共有氨基酸残基”为在共有序列中的某位置发现的氨基酸。如果在所述两个或更多个重复序列单元中以相似概率发现2个或更多个,例如,3个、4个或5个氨基酸残基,那么共有氨基酸残基可以为最频繁发现的氨基酸之一,或所述2个或更多个氨基酸残基的结合。

[0266] 另外优选非天然存在的加帽模块、重复序列模块、结合蛋白或结合结构域。

[0267] 术语“非天然存在”是指合成的或不是来自自然界的,更具体地,该术语是指人造的。术语“非天然存在的结合蛋白”或“非天然存在的结合结构域”是指所述结合蛋白或所述结合结构域是合成的(即由氨基酸通过化学合成产生的)或重组的,而不是来自自然界。“非天然存在的结合蛋白”或“非天然存在的结合结构域”分别为人造蛋白质或结构域,通过表达相应设计的核酸而获得。优选地,该表达在真核或细菌细胞中,或者利用体外无细胞表达系统进行。此外,该术语意为所述结合蛋白或所述结合结构域的序列在序列数据库(比如,GenBank,EMBL-Bank或SWISS-PROT)中不是作为非人工序列而存在。这些数据库和其它类似的序列数据库是本领域技术人员周知的。

[0268] 根据本发明的锚蛋白重复序列结构域的一般修饰和衍生物,特别地根据本发明的锚蛋白重复序列模块和加帽模块:

[0269] 进一步优选分别包含N端或C端锚蛋白加帽重复序列的N端或C端锚蛋白加帽模块,其中在所述加帽重复序列的一个或多个氨基酸残基由相应的锚蛋白加帽单元或锚蛋白重复序列单元的比对上的相应位置发现的氨基酸残基取代。

[0270] 氨基酸可以被20种天然存在的最常见氨基酸中的任何一种取代,优选被选自A、

D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W 和 Y,更优选被选自 A、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、和 Y 的氨基酸取代。而且优选地,氨基酸被同源氨基酸取代,即氨基酸被侧链具有相似生物物理学性质的氨基酸取代。例如,带负电的氨基酸 D 可以被带负电的氨基酸 E 取代,或疏水氨基酸比如,L 可以被 A、I 或 V 取代。氨基酸被同源氨基酸取代是本领域技术人员周知的。

[0271] 而且优选 C 端锚蛋白加帽模块,其包含基于 SEQ ID NO:4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131 或 135 的上述 C 端加帽模块中的任何一个的位置 27 和 28 的氨基酸 A。

[0272] 而且优选 C 端锚蛋白加帽模块,其包含基于 SEQ ID NO:4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131 或 135 的上述 C 端加帽模块中的任何一个的位置 1 至 26 或位置 1 至 27 和 28 的氨基酸。

[0273] 在不对性质有明显的影响的情况下可以从 N 端锚蛋白加帽模块移除在 SEQ ID NO :1, 2, 3, 13, 14, 20, 26, 27, 36, 40, 44, 45, 50, 54, 124, 128 或 132 的位置 1 的 G 或位置 2 的 S。这 2 个氨基酸作为接头连接锚蛋白重复序列结构域至另外的氨基酸和蛋白质。本发明也包含这样的锚蛋白重复序列结构域:其包含 N 端锚蛋白加帽模块,其中移除了在位置 1 的 G 和在位置 2 的 S。应该理解,在此定义的锚蛋白重复序列结构域中的氨基酸位置(例如,“位置 33”)被相应地调整,导致数字偏移,例如,如果缺失一个氨基酸,“位置 33”会变成“位置 32”,或者,如果缺失两个氨基酸,“位置 33”会变成“位置 31”。

[0274] 本发明的锚蛋白重复序列结构域的锚蛋白加帽模块可以通过本领域技术人员已知的组合技术,比如氨基酸序列比对、诱变和基因合成被锚蛋白加帽模块替换。例如,通过如下步骤,SEQ ID NO:79 的 C 端加帽重复序列被 SEQ ID NO:5 的 C 端加帽重复序列取代:(i) 通过与 SEQ ID NO:5 进行序列比对确定 SEQ ID NO:79 的 C 端加帽重复序列(即,序列位置 99 至 126),(ii) 用 SEQ ID NO:5 的序列取代确定的 SEQ ID NO:79 的 C 端加帽重复序列的序列,(iii) 产生编码重复序列结构域的基因,所述重复序列结构域编码替换后的 C 端加帽模块,(iv) 在大肠杆菌的细胞质中表达修饰的重复序列结构域并且(v) 通过标准手段纯化修饰的重复序列结构域。作为另外的实施例,SEQ ID NO:79 的 N 端加帽重复序列可以通过如下步骤被 SEQ ID NO:3 的 N 端加帽重复序列取代:通过与 SEQ ID NO:3 进行序列比对确定 SEQ ID NO:79 的 N 端加帽重复序列(即,序列位置 1 至 32)(ii) 用 SEQ ID NO:3 取代确定的 SEQ ID NO:79 的 N 端加帽重复序列的序列,(iii) 产生编码重复序列结构域的基因,所述重复序列结构域编码替换后的 N 端加帽模块,(iv) 在大肠杆菌的细胞质中表达修饰的重复序列结构域并且(v) 通过标准手段纯化修饰的重复序列结构域。

[0275] 此外,可以通过基因技术合成,组装 N 端锚蛋白加帽模块(例如,SEQ ID NO:3 的 N 端加帽重复序列),接着一个或多个重复序列模块(例如,2 个包含来自 SEQ ID NO:79 的位置 33 至 99 的氨基酸残基的锚蛋白重复序列模块)和 C 端加帽模块(例如,SEQ ID NO:5 的 C 端加帽重复序列),从基因方面构建本发明的锚蛋白重复序列结构域。接着可以在大肠杆菌中表达通过基因技术组装成的重复序列结构域基因。

[0276] 此外优选氨基酸序列缺失氨基酸 C、M 或 N 的重组结合蛋白、重复序列结构域、重复序列模块、N 端加帽模块或 C 端加帽模块。

[0277] 此外优选氨基酸序列缺失氨基酸 N(紧接 G)的重组结合蛋白、重复序列结构域、重复序列模块、N 端加帽模块或 C 端加帽模块。

[0278] 此外优选包含任何这样的 N 端或 C 端加帽模块的重组结合蛋白或重复序列结构域。

[0279] 在包含根据本发明的锚蛋白重复序列结构域的重组结合蛋白的另外的优选实施例中,所述重复序列结构域的 N 端加帽模块的一个或多个氨基酸残基被在 N 端加帽单元的比对上的相应位置处发现的氨基酸残基替换。优选地,高达 30% 的氨基酸残基被替换,更优选地,高达 20%,并且甚至更优选地,高达 10% 的氨基酸残基被替换。最优选地,这样的 N 端加帽单元为天然存在的 N 端加帽单元。

[0280] 在包含根据本发明的锚蛋白重复序列结构域的重组结合蛋白的另外的优选实施例中,所述重复序列结构域的 C 端加帽模块的一个或多个氨基酸残基被在 C 端加帽单元的比对上的相应位置处发现的氨基酸残基替换。优选地,高达 30% 的氨基酸残基被替换,更优选地,高达 20%,并且甚至更优选地,高达 10% 的氨基酸残基被替换。最优选地,这样的 C 端加帽单元为天然存在的 C 端加帽单元。

[0281] 在又一特定实施例中,高达 30% 的氨基酸残基,更优选地,高达 20%,并且甚至更优选地,高达 10% 的氨基酸残基被在重复序列单元、N 端加帽单元或 C 端加帽单元的相应位置中没有发现的氨基酸替换。

[0282] 在包含根据本发明的锚蛋白重复序列结构域的重组结合蛋白的另外的优选实施例中,所述锚蛋白重复序列结构域的重复序列模块的一个或多个氨基酸残基被在重复序列单元的比对上的相应位置处发现的氨基酸残基替换。优选地,高达 30% 的氨基酸残基被替换,更优选地,高达 20%,并且甚至更优选地,高达 10% 的氨基酸残基被替换。最优选地,这样的重复序列单元为天然存在的重复序列单元。

[0283] 在又一特定实施例中,高达 30% 的氨基酸残基,更优选地,高达 20%,并且甚至更优选地,高达 10% 的氨基酸残基被在重复序列单元的相应位置中没有发现的氨基酸替换。

[0284] 在另外的实施例中,在此所述的任何结合 HER2 的重组蛋白或结构域可以共价绑定至一个或多个另外的部分,包括,例如,结合至不同靶以产生双特异性结合试剂的部分、生物活性化合物、标记部分(例如,荧光标记,如荧光素,或放射性示踪剂)、便于蛋白纯化的部分(例如,小肽标记,比如 His 或 Strep 标签),为提高治疗效果提供效应子功能的部分(例如,抗体的 Fc 部分提供抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用、有毒的蛋白部分比如铜绿假单胞菌外毒素 A(ETA) 或小分子毒剂比如美登木素生物碱或 DNA 烷化剂)或提供改善的药物动力学的部分。可以根据感知的治疗需要评估改善的药物动力学。通常,理想的是(有可能通过增加服药后蛋白质保持在血清中的时间)增加生物利用度和/或增加剂量之间的时间。在某些情况下,理想的是改善蛋白质的血清浓度随时间的持续性(例如,降低蛋白质血清在服用后不久的浓度和在下一次服用前不久的浓度之间的浓度差异)。倾向于使从血液中清除蛋白质变慢的部分包括羟乙基淀粉(HES)、聚乙二醇(PEG)、糖(例如,唾液酸),耐受性良好的蛋白质部分(例如,Fc 片段或血清白蛋白),和对丰富的血清蛋白具有特异性和亲和力的结合结构域或肽,例如,抗体的 Fc 片段或血清白蛋白。WO 2012/069654 中提供了这些对血清白蛋白具有亲和力的结合结构域或重复序列结构域的例子。本发明的重组结合蛋白可以连接至使哺乳动物(例如,大鼠、小鼠,或人)中多肽的清除率相对未修饰的多肽降低大于 3 倍的部分。

[0285] 在一个特定的实施例中,本发明涉及包含结合至 HER2 的第一重复序列结构域、结

合至 HER2 的第二重复序列结构域,并且进一步包含特异性结合至人血清白蛋白的一个或多个锚蛋白重复序列结构域的重组结合蛋白。在此给出了对 HER2 具有特异性的重复序列结构域的例子并且 WO 2012/069654 中描述了对人血清白蛋白具有特异性的锚蛋白重复序列结构域的例子。这些结构域可以通过本领域技术人员已知的方法、通过遗传手段由多肽接头连接。

[0286] 另一优选的实施例时重组结合蛋白,其中第一重复序列结构域和第二重复序列结构域为锚蛋白重复序列结构域,该锚蛋白重复序列结构域对 HER2 具有结合特异性,包含 1 个、2 个、3 个或更多个参与结合至 HER2 的内部重复序列模块。优选地,这些锚蛋白重复序列结构域包含 N 端加帽模块,一至四个内部重复序列模块,和 C 端加帽模块。优选地,所述加帽模块为加帽重复序列。而且优选地,所述加帽模块将参与结合至 HER2。

[0287] 此外,为了治疗病症考虑上述的任何药物组合物。

[0288] 本发明进一步提供治疗方法。该方法包括使有需要的患者服用治疗有效量的本发明的重组结合蛋白。

[0289] 此外,考虑治疗包括人的哺乳动物的病理状态的方法,包括使有需要的患者服用有效量的上述药物组合物。

[0290] 实施例

[0291] 下文公开的所有的起始原料和试剂是本领域技术人员已知并且是市售的或者可以利用公知的技术来制备的。

[0292] 材料

[0293] 化学制品购自 Fluka(瑞士)。寡核苷酸来自 Microsynth(瑞士)。除非另有说明,DNA 聚合酶,限制性内切酶和缓冲液来自 New England Biolabs(USA) 或 Fermentas(立陶宛)。克隆和蛋白质生产菌株是 E. coli XL1-blue(Stratagene, USA) 或 BL21(Novagen, USA)。重组人 HER2 胞外域(通过标准手段在 CHO 细胞中产生的 ErbB2S22-N530-Flag 和 ErbB2S22-E645-Flag) 购自 CSIRO Enquiries(澳大利亚)。生物素化的 HER2 胞外域使用标准生物素化试剂和方法通过将生物素部分连接至蛋白质的伯胺以化学方法获得(Pierce, USA)。细胞系购自 LGC/ATCC(法国/USA;商品目录号:BT474-HTB-20、SKBR-3-HTB-30、NCI-N87-CRL5822、ZR75-30-CRL1504、HCC1419-CRL2326、MDA-MB175VII-HTB-25)。细胞培养基来自 Invitrogen/Lubio(瑞士)。胎牛血清来自 PAA。检测细胞增殖、细胞增殖 ELISA 的分析试剂, BrdU(色度)(商品目录号:G8091) 来自 Roche, 瑞士并且检测凋亡的分析试剂, Caspase Glo 3/7(商品目录号:1164722900) 来自 Promega 和瑞士并且 Cell Death Detection ELISAPLUS 系统(11774425001) 来自 Roche, 瑞士。细胞转染试剂, Lipofectamin2000(11668027) 是来自 Invitrogen 瑞士。使用来自 Becton-Dickinson(瑞士)的 FACS Canto II 系统进行 FACS 分析。利用 anti-Penta-His Alexa Fluor 647 轭合物(商品目录号:A21445;Lubio, 瑞士)检测 DARPins 与 Her2 的结合。Accutase(商品目录号:L-11-007) 来自 PAA。曲妥珠单抗购自 Kantonal Apotheke 苏黎世,并且帕妥珠单抗由 Evitro(瑞士)合成。GFP-标记的 Her2 的表达载体(商品目录号:RG212583) 来自 Origene USA。

[0294] 分子生物学

[0295] 除非另有说明,方法是按照(Sambrook J., Fritsch E.F. 和 Maniatis

T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York) 所述方案进行的。

[0296] Proliferation analysis

[0297] 增殖分析

[0298] 利用 BrdU 标记 (BrdU, 细胞增殖 ELISA, Roche) 通过测量 DNA 合成确定 DARPin 对细胞增殖的影响。简要地说, 在 96 孔板的每孔中将 10000BT474 细胞接种在 100u1 完全培养基中并培养 24 小时。加入 DARPin 和基准, 再培养 72 小时。加入用于细胞标记的 BrdU, 最后培养 24 小时。根据制造方案检测标记的 (增殖的) 细胞。用 GraphPad Prism 软件分析数据, 以 x 轴上的 log[c] 对 y 轴上的 OD450-602nm 进行绘图。使用非线性回归拟合 (log(拮抗剂) vs. 反应—可变斜率 (4 个参数)) 对数据进行拟合。

[0299] 凋亡分析

[0300] 使用 Caspase 3/7-Glo 系统 (Promega, 瑞士) 测量 Caspase3/7 的激活确定 DARPin 对凋亡的诱导。简要地说, 在 96 孔板的每孔中将 10000BT474 细胞接种在 100u1 完全培养基中并培养 24 小时。加入 DARPin 和基准, 保持另外的 24 小时。根据制造方案加入 Caspase Glo 试剂, 保持 1h。通过测量荧光素酶活性监测 Caspase 3/7 活性。

[0301] 可代替地, 使用 Cell Death Detection ELISAPLUS 系统 (Roche, 瑞士) 确定对凋亡的诱导。根据制造方案进行该试验。细胞数目和培养时间与 Caspase Glo 读数相似。

[0302] 使用 GraphPad prism 软件分析数据, 以 x 轴上的浓度对 y 轴上的 OD405/490nm 或 RLU 进行绘图。使用非线性回归拟合 (log(激动剂) vs. 反应—可变斜率 (4 个参数)) 对数据进行拟合。

[0303] 设计的锚蛋白重复序列蛋白文库

[0304] (WO 2002/020565 ; Binz 等人 . 2003, 同上 ; Binz 等人 . 2004, 同上) 描述了产生设计的锚蛋白重复序列蛋白文库的方法。通过这种方法, 可以构建具有随机锚蛋白重复序列模块和 / 或随机加帽模块的锚蛋白重复序列蛋白文库。例如, 可以基于固定的 N 端加帽模块 (例如, SEQ ID NO:2 的 N 端加帽模块) 或根据 SEQ ID NO:60 的序列基序的随机的 N 端加帽模块, 根据 SEQ ID NO:58 或 59 的序列基序的一个或多个随机的重复序列模块, 和固定的 C 端加帽模块 (例如, SEQ ID NO:5 的 C 端加帽模块) 或根据 SEQ ID NO:61 的序列基序的随机的 C 端加帽模块组装这些文库。优选地, 这些文库组装成在重复序列或加帽模块的随机位置不具有氨基酸 C、G、M、N (在 G 残基前面) 或 P。此外, 根据 SEQ ID NO:58 或 59 的序列基序的随机重复序列模块在位置 10 和 / 或位置 17 可进一步随机化 ; 根据 SEQ ID NO:60 的序列基序的随机的 N 端加帽模块在位置 7 和 / 或位置 9 可进一步随机化 ; 并且根据 SEQ ID NO:61 的序列基序的随机的 C 端加帽模块在位置 10、11 和 / 或 17 可进一步随机化。

[0305] 此外, 在这些文库中的这些随机模块可以包含在随机的氨基酸位置的另外的多肽环插入物。这些多肽环插入物为抗体的互补决定区 (CDR) 环文库或再次产生的肽文库。例如, 可以利用人核糖核酸酶 L 的 N 端锚蛋白重复序列结构域的结构 (Tanaka, N., Nakanishi, M, Kusakabe, Y, Goto, Y., Kitade, Y, Nakamura, K. T., EMBO J. 23 (30), 3929-3938, 2004) 作为引导设计这种环插入物。类似 10 个氨基酸插入到存在于 2 个锚蛋白重复序列的边界附近的 β 转角的锚蛋白重复序列结构域, 锚蛋白重复序列蛋白文库可以含有插入锚蛋白重复序列

结构域的一个或多个 β 转角的、长度可变（例如，1 至 20 个氨基酸）的随机环（具有固定的和随机的位置）。

[0306] 任何这样的锚蛋白重复序列蛋白文库的 N 端加帽模块优选具有 RELLKA 或 RILKAA 基序而非 RILLAA 基序（例如，存在于 SEQ ID NO:65 的位置 21 至 26）并且任何这样的锚蛋白重复序列蛋白文库的 C 端加帽模块优选具有 KAA 或 KLA 基序而非 KLN 基序（例如，SEQ ID NO:65 的最后 3 个氨基酸）。

[0307] 这种锚蛋白重复序列蛋白文库的设计可以通过与靶相互作用的锚蛋白重复序列结构域的已知结构来引导。这些结构（通过其 Protein Data Bank (PDB) 唯一登录号或识别代码 (PDB-IDs) 识别）的例子为 1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V20、3UXG、3TWQ-3Twx、1N11、1S70 和 2ZGD。

[0308] (WO 2002/020565 ;Binz 等人 . 2003, 同上 ;Binz 等人 . 2004, 同上) 描述了设计的锚蛋白重复序列蛋白文库的例子，比如 N2C 和 N3C 设计的锚蛋白重复序列蛋白文库。N2C 和 N3C 中的数字描述在 N 端和 C 端加帽模块之间存在的随机重复序列模块的数目。

[0309] 用于定义重复序列单元和模块内的位置的命名法基于 Binz 等人 . 2004, 同上, 修饰锚蛋白重复序列模块的边界, 并且锚蛋白重复序列单元通过一个氨基酸位置移位。例如, Binz 等人 2004(同上) 的锚蛋白重复序列模块的位置 1 对应本发明的锚蛋白重复序列模块的位置 2, 并且因此 Binz 等人 . 2004, 同上, 的锚蛋白重复序列模块的位置 33 对应本发明的锚蛋白重复序列模块的位置 1。

[0310] 通过测序确定所有的 DNA 序列, 并且通过质谱法确定所有所述蛋白的计算的分子量

[0311] 实施例 1 :筛选包含对 HER2 具有结合特异性的锚蛋白重复序列结构域的结合蛋白

[0312] 如 Binz 等人 2004(同上) 所述, 利用核糖体展示技术 (Hanes, J. 和 Plückthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997) 从 DARPin 文库筛选许多对 HER2 胞外域具有结合特异性的设计的锚蛋白重复序列蛋白 (DARPin)。通过指示筛选成百上千的 HER2 特异性结合蛋白的粗提物 ELISA(参见下文) 评价结合特异性。通过测试双特异性 DARPin 抑制 BT474 细胞增殖的能力测量选定的克隆对增殖的 HER2 特异性抑制和对凋亡的诱导。

[0313] 例如, SEQ ID NO:62 至 82、112 至 121 的锚蛋白重复序列结构域构成包含对 HER2 具有结合特异性的锚蛋白重复序列结构域的选定的结合蛋白的氨基酸序列。SEQ ID NO:15 至 18、21 至 23、28 至 32、37、38、41、42、46、47、51、52、55、56、125、126、129、130、133 和 134 提供来自这些对 HER2 具有结合特异性的锚蛋白重复序列结构域的单体的锚蛋白重复序列模块。SEQ ID NO:13、14、19、20、24 至 27、33 至 36、39、40、43 至 45、48 至 50、53、54、57、124、127、128、131、132 和 135 提供对 HER2 具有结合特异性的这些锚蛋白重复序列结构域的单体的加帽模块。

[0314] 通过核糖体展示技术筛选 HER2 特异性锚蛋白重复序列蛋白

[0315] 利用人 HER2 作为靶蛋白, 上述的设计的锚蛋白重复序列蛋白文库和已定方案 (Zahnd, C., Amstutz, P. 和 Plückthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007) 通过核糖体展示技术 (Hanes, J. 和 Plückthun, 同上) 进行 HER2 特异性锚蛋白重复序列蛋白的筛选。每轮筛选之后, 逆转录 (RT)-PCR 循环数从 45 不断下降至 30, 因结合物的富集调整产量。前四轮筛选采用标准的核糖体展示筛选, 利用下降的靶浓度和增加的洗涤严格度以从第一轮至第四

轮增加筛选压力。为了富集高亲和力的抗 HER2 DARPIn,将来自标准核糖体展示筛选(上文)的第四轮的产物进行解离速率筛选回合并且增加筛选严格度(Zahnd, 2007, 同上)。进行最后的标准筛选回合以扩增并恢复解离速率筛选的结合蛋白。

[0316] 如粗提物 ELISA 所示筛选特异性结合至 HER2 的克隆

[0317] 根据标准方案利用 DARPIn 表达细胞的大肠杆菌粗提物通过酶联免疫吸附测定(ELISA) 识别特异性结合 HER2 胞外域的单克隆筛选出的 DARPIn。将由核糖体展示技术筛选出的 DARPIn 克隆到 pQE30(Qiagen) 表达载体中,转化到 E. coli XL1-Blue(Stratagene),接着在含有 1ml 生长培养基(含有 1%葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 2YT) 的 96 深孔板中(每个克隆单个孔)37 $^{\circ}$ C 过夜生长。将 100 μ l 过夜培养物与含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 1ml 新鲜 2YT 接种到新的 96 深孔板中培养。在 37 $^{\circ}$ C 中培养 2h 之后,用 IPTG(终浓度 1mM) 诱导表达并且持续 3h。收集细胞,重新悬浮在 100 μ l B-PERII(Pierce) 中并且在室温下培养并摇晃 15min。接着,加入 900 μ l PBS-TC(补充 0.25%酪蛋白水解物,0.1% Tween 20[®], pH 7.4 的 PBS) 并且通过离心移除细胞碎片。将 100 μ l 每个裂解克隆应用于含有 HER2 或通过其生物素部分固定的不相关 MBP 的 Neutravidin coated MaxiSorp 板的孔中并在 RT 下培养 1h。用 PBS-T(补充 0.1% Tween 20[®], pH 7.4 的 PBS) 充分洗涤之后,利用辣根标记的抗 RGS(His)₄单克隆抗体(34650, Qiagen) 以标准 ELISA 程序展开该板,接着用 POD 底物(Roche) 检测结合。在 405nm 测量显色。通过这种细胞粗提物 ELISA 筛选几百个克隆揭示超过百种不同的 DARPins 对 HER2 具有特异性。选择这些结合蛋白用于进一步分析。SEQ ID NO:62 至 82 和 112 至 121 提供了特异性结合至 HER2 胞外域的选定的锚蛋白重复序列结构域的氨基酸序列的例子。

[0318] 将这些对 HER2 具有结合特异性的锚蛋白重复序列结构域和对 HER2 没有结合特异性的负对照锚蛋白重复序列结构域(即, SEQ ID NO:111) 克隆到基于 pQE(QIAGEN, Germany) 的表达载体(如下所述,提供 N 端 His 标签以便于简化蛋白质纯化)中。从而构建编码下面的 DARPIn 的表达载体。

[0319] DARPIn#1(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:62) ;

[0320] DARPIn#2(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:63) ;

[0321] DARPIn#3(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:64) ;

[0322] DARPIn#5(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:66) ;

[0323] DARPIn#6(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:67) ;

[0324] DARPIn#7(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:68) ;

[0325] DARPIn#8(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:69) ;

[0326] DARPIn#9(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:70) ;

[0327] DARPIn#10(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:71) ;

[0328] DARPIn#11(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:72) ;

[0329] DARPIn#12(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:73) ;

[0330] DARPIn#13(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:74) ;

[0331] DARPIn#14(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:75) ;

[0332] DARPIn#15(His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:76) ;

- [0333] DARPin#16 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:77) ;
- [0334] DARPin#17 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:78) ;
- [0335] DARPin#18 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:79) ;
- [0336] DARPin#19 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:80) ;
- [0337] DARPin#20 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:81) ;
- [0338] DARPin#21 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:82) ;
- [0339] DARPin#50 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:111) .
- [0340] DARPin#51 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:112) ;
- [0341] DARPin#52 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:113) ;
- [0342] DARPin#53 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:114) ;
- [0343] DARPin#54 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:115) ;
- [0344] DARPin#55 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:116) ;
- [0345] DARPin#56 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:117) ;
- [0346] DARPin#57 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:118) ;
- [0347] DARPin#58 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:119) ;
- [0348] DARPin#59 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:120) ;
- [0349] DARPin#60 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:121) .
- [0350] SEQ ID NO:83 至 110、122、123 和 136 至 141 提供筛选出的双特异性锚蛋白重复序列蛋白的氨基酸序列的例子。将这些双特异性 DARPin 克隆到基于 pQE (QIAGEN, Germany) 的表达载体 (如下所述, 提供 N 端 His 标签以便于简化蛋白质纯化) 中。从而构建编码下面的 DARPin 的表达载体。
- [0351] DARPin#22 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:83) ;
- [0352] DARPin#23 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:84) ;
- [0353] DARPin#24 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:85) ;
- [0354] DARPin#25 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:86) ;
- [0355] DARPin#26 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:87) ;
- [0356] DARPin#27 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:88) ;
- [0357] DARPin#28 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:89) ;
- [0358] DARPin#29 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:90) ;
- [0359] DARPin#30 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:91) ;
- [0360] DARPin#31 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:92) ;
- [0361] DARPin#32 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:93) ;
- [0362] DARPin#33 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:94) ;
- [0363] DARPin#34 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:95) ;
- [0364] DARPin#35 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:96) ;
- [0365] DARPin#36 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:97) ;
- [0366] DARPin#37 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:98) ;
- [0367] DARPin#38 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:99) ;
- [0368] DARPin#39 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:100) ;

- [0369] DARPin#40 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:101) ;
- [0370] DARPin#41 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:102) ;
- [0371] DARPin#42 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:103) ;
- [0372] DARPin#43 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:104) ;
- [0373] DARPin#44 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:105) ;
- [0374] DARPin#45 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:106) ;
- [0375] DARPin#46 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:107) ;
- [0376] DARPin#47 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:108) ;
- [0377] DARPin#48 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:109) ;
- [0378] DARPin#49 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:110)
- [0379] DARPin#61 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:122) ;
- [0380] DARPin#62 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:123) ;
- [0381] DARPin#63 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:136) ;
- [0382] DARPin#64 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:137) ;
- [0383] DARPin#65 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:138) ;
- [0384] DARPin#66 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:139) ;
- [0385] DARPin#67 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:140) ;
- [0386] DARPin#68 (His- 标签 (SEQ ID NO:6) 融合至其 N 端的 SEQ ID NO:141).

[0387] 单价 DARPin 的高水平和可溶表达

[0388] 为了进一步分析,在 *E. coli* BL21 或 XL1-Blue 细胞中表达 DARPins#1 至 50 并利用标准方案通过其 His 标签纯化。将 25ml 静止过夜培养物 (LB, 1% 葡萄糖, 100mg/l 氨苄青霉素的 ;37°C) 用于接种到 11 培养物 (相同的培养基) 中。在 600nm, 吸光度为 0.7, 用 0.5mM IPTG 诱导培养物并在 37°C 培养 4-5h。将培养物离心并且将得到的团块重新悬浮在 40ml TBS500 (50mM Tris - HCl, 500mM NaCl, pH 8) 中并进行超声处理。将裂解产物离心并且将甘油 (终浓度 10% (v/v)) 和咪唑 (终浓度 20mM) 加入所得的上清液中。根据制造商的指示 (QIAGEN, 德国) 在镍 - 氨次氨基三乙酸柱 (2.5ml 柱容积) 上纯化蛋白。可代替地, 根据本领域技术人员已知的标准树脂和方案, 通过阴离子交换色谱, 接着通过体积排阻色谱纯化缺乏 6xHis 标签的 DARPin 或选定的重复序列结构域。从 SDS-15% PAGE 估计, 1 升大肠杆菌培养物可以纯化出高达 200mg 对 HER2 具有结合特异性的高度可溶的 DARPin, 并且纯度 >95%。这样纯化的 DARPin 用于进一步表征。

[0389] 实施例 2 : 通过表面等离子体共振分析表征对 HER2 具有结合特异性的 DARPin

[0390] 通过表面等离子体共振 (SPR) 分析和 ProteOn 阵列系统 (BioRad) 检验纯化的、结合 HER2 的感兴趣的 DARPin 的蛋白结合动力学, 其中 ProteOn 阵列系统这样设置 : 通过中和亲和素 (neutravidin) 固定生物素化的人 HER2 并且加入游离的单价 DARPin 测量相互作用。根据标准程序确定 Kd 值。

[0391] 通过结合至涂布的链霉亲和素将生物素化的人 HER2 分子的胞外域固定在流动池中, 并且分析与各种选定的 DARPin 的相互作用。

[0392] 表面等离子体共振 (SPR) 分析

[0393] 利用 ProteOn 仪 (BioRad) 测量 SPR 并且根据本领域技术人员已知的标准程序进

行测量。运行缓冲液为 PBS, pH 7.4, 其含有 0.005% Tween 20[®]。中和亲和素通过共价键固定在 GLC 芯片 (BioRad) 上, 达到约 8000 个共振单位 (RU) 的水平。接着, 将 HER2 固定在涂布中和亲和素的芯片上。然后, 通过如下方式测量 DARPin-HER2 的相互作用: 注入 100 μ l 含连续稀释的 DARPin (浓度为 50、25、12.5、6.25 和 3.125nM) 的运行缓冲液 (含有 0.005% Tween[®] 的 PBS) (基于速率测量), 接着, 使运行缓冲液以 100 μ l/min 的恒定流速流动 10 分钟至最多 3 小时 (解离速率测量)。从注入 HER2 之后获得的 RU 踪迹 (双参考) 中去除未涂布的参考细胞和参考注入物 (即, 仅注入运行缓冲液) 的信号 (即, 共振单元 (RU) 值)。从结合速率测量和解离速率测量获得的 SRP 踪迹可以确定相应的 DARPin-HER2 相互作用的结合速率和解离速率。

[0394] 表 1 总结了结果。利用本领域技术人员已知的标准程序由预计的结合速率和解离速率计算解离常数 (Kd)。

[0395] 表 1: 通过 SPR 确定的选定用于人 HER2 的 DARPin 的解离常数

[0396]

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

[0397] n. d. : 未确定。

[0398] 实施例 3 : 绘制结合至特定的胞外 HER2 表位的重复序列结构域的图谱

[0399] 通过本领域技术人员已知的标准方法, 分析重复序列结构域与胞外 HER2 结构域的相互作用, 比如, 通过 X 射线结晶技术或 NMR 光谱法分析复合物四级结构, 或利用潜在的相互作用的残基的丙氨酸突变或利用质谱法和共价标记进行表位绘图。此外, 进行本领域从事者已知的各种竞争试验, 比如竞争酶联免疫吸附试验 (ELISA) 以识别选定的重复序列

蛋白结合的胞外结构域或者其是否具有与其它结合蛋白（例如，抗体，比如曲妥珠单抗或帕妥珠单抗）重叠的在 HER2 的胞外结构域上的表位。

[0400] HER2 的胞外结构域通过购买得到或如 (Jost 等人, 同上) 所述制备得到。

[0401] 通过表面等离子体共振 (SPR) 分析和 ProteOn 阵列系统 (BioRad) 进行结合 HER2 的、感兴趣的纯化的 DARPIn 的竞争, ProteOn 阵列系统使用如下设置: 生物素化人 ErbB2S22-N530 和 ErbB2S22-E645 通过中和亲和素固定, 并且通过加入饱和状态 (1 μ M) 的第一单价 DARPIn, 接着加入第一和第二 DARPIn (各 100 μ M) 的 1:1 混合物, 测量竞争。如果尽管存在第一 DARPIn, 第二 DARPIn 仍结合, 则该第二 DARPIn 被认为结合不同的表位。

[0402] 例如, 竞争 ELISA (图 1A 和 1B) 数据表明 DARPIn#54 结合 HER2 的结构域 II 并且 DARPIn#51 结合 HER2 的结构域 I。先前已表明 DARPIn#18 结合至 HER2 的结构域 IV (Jost 等人, 同上)。所述 DARPins (20nM) 与 HER2 域 I, 结构域 I-III 或域 III-IV (在每种情况下结构域浓度为 500nM) 在 PBS 中室温预培养 45 分钟。将混合物加入涂布在 F96 MaxiSorb Nunc (商品目录号 442404) 板的 20nM 全长 HER2 中。使用小鼠抗 RGS-His 单克隆抗体 (Qiagen, 商品目录号 34650) 作为第一抗体并且用辣根过氧化物酶标记的抗小鼠抗体 (Pierce, 商品目录号 31438) 作为第二抗体特异性检测结合的 DARPins。在图 1B 描述的 ELISA 中, 第一抗体 (小鼠抗 RGS-His 单克隆抗体) 被小鼠抗 DARPIn 单克隆抗体代替。

[0403] 在 450nm 下进行读数。除了涂板 (利用 PBS, pH 7.4 在 4 $^{\circ}$ C 过夜进行) 之外, 所有的培养步骤在含有 0.1% Tween 20[®] 和 0.25% 酪蛋白, pH7.4 的 PBS 中、450rpm Heidolph Titramax 1000 摇床上室温下进行 2h。

[0404] 这些研究结果得到了确认: 通过流式细胞术 (FACS) 确定, 这些 DARPIn 已竞争结合至具有 HER2 重组结构域 I、结构域 I-II-III 和结构域 III-IV 的 HER2 过表达细胞 (BT474)。DARPins (100nM) 与单独的 Her2 构建体 (1 μ M) 在 25 $^{\circ}$ C 预培养 30 分钟。将混合物施加在细胞 (100 μ l 中 100,000 个细胞) 中, 在冰上保持 20 分钟。利用 Alexa 647 标记的抗 5-His 抗体 (Qiagen 商品目录号: 35370) 监测 DARPIn 与细胞的结合。该试验确定 DARPIn#51 结合至 HER2 的结构域 I, 并且 DARPIn#1 结合至 HER2 的 II, DARPIn#18 结合至 HER2 的 IV。

[0405] 还利用流式细胞仪测试 DARPIn#1 与帕妥珠单抗和 DARPIn#18 与曲妥珠单抗的竞争。为此, 在与各 DARPIn (1 μ M) 一起培养之前, 将 BT474 细胞分别与帕妥珠单抗、曲妥珠单抗 (两者都为 1 μ M) 一起培养。利用 Alexa 647 标记的抗 5-His 抗体 (Qiagen 商品目录号: 35370) 监测 DARPIn 与细胞的结合, 并且利用 Alexa 546 标记的抗人 -IgG 抗体 (Invitrogen 商品目录号: A-21089) 监测帕妥珠单抗或曲妥珠单抗与细胞的结合。该实验展示了 DARPIn 都不与帕妥珠单抗或曲妥珠单抗竞争结合至 BT474 细胞表达的 HER2。

[0406] 也通过 ELISA (图 1C) 观察该研究结果, 其中在与各 DARPIn (20nM) 一起培养之前, 将帕妥珠单抗 (以 20nM 涂布在 F96 MaxiSorb Nunc (商品目录号 442404) 上) 与 20nM Her2 (结构域 I-III) 一起预培养。利用小鼠抗 RGS-His 单克隆抗体 (Qiagen, 商品目录号 34650) 和辣根过氧化物酶标记的抗小鼠抗体 (Pierce, 商品目录号 31438) (在室温下预混合 45min) 检测 DARPIn 在 HER2-帕妥珠单抗复合物上的特异性结合。除了涂板 (在 4 $^{\circ}$ C 过夜进行) 之外, 所有的培养步骤在 450rpm Heidolph Titramax 1000 摇床上室温下进行 2h。PBS, 0.1% Tween 20[®] pH7.4, 0.25% 酪蛋白用作阻断剂。在帕妥珠单抗存在的情况下, 该试验中测试的所有 N 端 DARPIn (DARPIn#7、DARPIn#52、DARPIn#53, 和 DARPIn#54) 结合 HER2,

表明 N 端 DARPin 都结合与该抗体不同的表位。

[0407] 总的来说,这些实验表明 SEQ ID NO:62 至 68、72,和 114 至 121 编码的单价重复序列结构域结合至 HER2 的结构域 II, SEQ ID NO:69-71、73、112 和 113 编码的单价重复序列结构域结合至 HER2 的结构域 I,并且 SEQ ID NO:74 至 82 编码的单价重复序列结构域结合至 HER2 的结构域 IV。结合至 HER2 的结构域 II 的单价重复序列结构域 (SEQ ID NO:62 至 68、72,和 114 至 121) 都不与帕妥珠单抗竞争结合至 HER2。在结合至 HER2 的结构域 IV 的单价重复序列结构域中,SEQ ID NO:77、78 和 82 编码的重复序列结构域与曲妥珠单抗竞争结合至 HER2,而 SEC ID NO:74 至 76 和 79 至 81 编码的重复序列结构域不与曲妥珠单抗竞争。

[0408] 实施例 4 :结合 HER2 的双特异性 DARPin 阻断过度表达 HER2 的肿瘤细胞的生长

[0409] 测试单价 DARPin、DARPin 的混合物和结合 HER2 的双特异性 DARPin 对 BT474 细胞增殖的抑制。图 2 展示了单价 DARPin 和单价 DARPin 的混合物不能阻断 BT474 细胞增殖。相反,双特异性 DARPin 分组诱导对增殖的抑制 (图 2,表 2)。有趣的是,DARPin HER2 的重复序列结构域 IV 必须位于分子的 C 端 (图 2)。双特异性形式的单价 DARPin 的多个组合导致对增殖有抑制作用的 DARPin。但是并非所有的组合都能将阻断 90-100% 的 BT474 增殖 (图 3),这使某些 DARPin 组合得以归类。这些研究结果表明双特异性形式是有效实现靶向不同分组的某些 HER2 表位的关键。通过曲妥珠单抗诱导 HER2 受体内在化和降解 (据报道) 不足以诱导对肿瘤细胞增殖的有效抑制 (图 3 和 5)。与曲妥珠单抗类似, DARPin#41 和 DARPin#43 都能诱导 HER2 的降解,但仅有 DARPin,比如 DARPin#41 抑制肿瘤细胞增殖。

[0410] 如方法部分所述进行实验。表 2 总结了实验结果。利用本领域技术人员已知的标准程序由如上所述获得的滴定曲线计算 IC_{50} 值。图 2 和 3 中给出了 DARPin#41 的滴定曲线例子。

[0411] 表 2: 各种 DARPin 对 BTB474 细胞增殖的抑制效力

[0412]

DARPin # 或抗体	IC50[nM]	% 活性 vs. DARPin # 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
曲妥珠单抗	3.05	52
帕妥珠单抗	n.i	n.i

[0413] n. i. : 未观察到抑制

[0414] 实施例 5 : 靶向 HER2 的双特异性 DARPin 抑制各种 HER2 过度表达的细胞系的增殖并诱导凋亡

[0415] 测试双特异性 DARPIn#41 的效力。在过度表达 HER2 的细胞系而非表达野生型 HER2 水平的细胞中,该 DARPIn 对增殖的抑制范围为 Her2IHC 3+ 至 1+(图 4;表 3)。此外,在所列举的细胞系中,该 DARPIn 在 24h 的培养中强劲地诱导凋亡(图 5;表 3)。

[0416] 如方法部分所述进行实验。表 3 总结了实施例结果。利用本领域技术人员已知的标准程序由如上所述获得的滴定曲线计算 IC_{50} 和 EC_{50} 值。图 4 和 5 中给出了 DARPIn#41 在三个不同细胞系上的滴定曲线例子。取决于测试的 DARPIn 和细胞系, IC_{50} 和 EC_{50} 值的范围在 0.2 - 10nM 之间。例如,实验表明 DARPIn#41、#45 和 #46 在 BT474、MDA-MB175 和 NCI-N87 细胞中诱导凋亡(表 3)。利用本发明的其它双特异性结合蛋白也获得相似的结果。

[0417] 表 3::DARPIn#41 在各种不同的细胞系上的效力

[0418]

细胞系	Her2 状态	抑制增殖 IC_{50} [nM]	诱导凋亡 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.

[0419] n. a. : 未分析

[0420] n. i. : 无抑制

[0421] 实施例 6 :与当前标准护理治疗对比,靶向 HER2 的双特异性 DARPIn 抑制 BT474 细胞的增殖并诱导凋亡

[0422] 比较双特异性 DARPIn#41 的效力与批准用于治疗 HER2 阳性乳腺癌的药物、曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的效力。与曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的组合相比,该 DARPIn 有效抑制增殖并且诱导凋亡。

[0423] 如方法部分所述进行实验。图 6 展示了实施例结果。利用本领域技术人员已知的标准程序由如上所述获得的滴定曲线计算 IC_{50} 和 EC_{50} 值(表 3)。利用本发明的其它双特异性结合蛋白也获得相似的结果。

[0424] 实施例 7 :各种 DARPIn 形式的产生

[0425] 作为例子,比较不同形式的双特异性 DARPIn#41 和 DARPIn#41 抑制 BT474 细胞增殖的效力(图 7,表 2)。N 端或 C 端的聚乙二醇化或融合至结合人血清白蛋白的 DARPIn(DARPIn#41、#63、#64、#65) 的行为不影响效力(图 7A)。此外,DARPIn 部分之间的

接头的变化不影响效力(图7B)。IC₅₀值范围在1.5-5.5nM之间。利用相应形式的双特异性DARPin#41、#66、#67、#68获得相应的结果。总的来说,这清楚地表明可以(通过本领域技术人员已知的方法,比如聚乙二醇化或融合至结合血清白蛋白的结构域)修饰该双特异性DARPin以增加其体内半衰期而不损失效力。此外,这些实验表明,在双特异性构建体中结合至HER2的两个重复序列结构域之间的接头可以在至少2至24个氨基酸之间变化而不明显影响该双特异性构建体的功效。

[0426] 实施例8:绘制DARPin/Her2相互作用图谱

[0427] 通过溶液(即,PBS,pH 7.4)中这两种分子形成的复合物的化学交联,接着用蛋白酶消化该复合物,并且通过质谱法分析得到的多肽,进一步分析本发明的双特异性DARPin与HER2胞外域的相互作用。在这样的实验中,DARPin区域与HER2区域可以通过共价键交联,只要其接近后者。通过质谱法分析对来自与HER2的相应多肽通过共价键交联的DARPin的多肽的检测表明在HER2/DARPin复合物中这些多肽很接近。本领域技术人员周知这些邻近分析方法(例如,Birch,C.,等人,Anal. Chem.,82,172-179,2010)并且是各种公司提供的服务(例如,CovalX AG,Zürich,瑞士)。

[0428] 例如,在这些实验中发现,双特异性DARPin#41(其结合HER2的结构域II和结构域IV)可以与HER2形成1:1复合物。令人惊讶地,观察到C端重复序列结构域(结合至HER2的结构域IV)和HER2的结构域I之间的共价交联,表明即使其结合至结构域IV,但该重复序列结构域与在该复合物中的HER2结构域I接近。如果HER2的构象如现有技术(例如,Bubli1和Yarden,同上)所述,则预期不能看见这些交联。重要的是,分析HER2胞外域与单独结合至结构域IV的C端重复序列结构域的复合,不能观察到这种与HER2的结构域I的交联,表面在HER2和结合至结构域IV的单体重复序列结构域形成复合物的情况下,该重复序列结构域不接近结构域I。因此,相比单独的重复序列结构域结合HER2的结构域IV形成的复合物,与本发明的双特异性结合蛋白形成的复合物中,HER2的三维结构域排列必然不同

[0429] 有趣的是,考虑到在2个重复序列结构域之间的短接头的范围为2至24个氨基酸,HER2的胞外域的已知结构使本发明的双特异性结合蛋白的两个重复序列结构域不能同时结合至相同的HER2分子。这表明HER2可能处于未知的构象中,从而能同时结合两个重复序列结构域。

[0430] 总的来说,这些实验表明本发明的双特异性结合蛋白可以与HER2的胞外域在分子内相互作用,并且因此本发明的双特异性结合蛋白使HER2胞外域处于现有技术未知的新构象,即,使结构域I和结构域IV处于这样的空间排列:能够观察到重复序列结构域(结合至HER2的结构域IV)和结构域I之间的交联。因此,这种HER2新构象看起来是由本发明的双特异性结合蛋白以分子内的方式通过同时结合HER2的结构域II和结构域IV来稳定。

[0001]

序 列 表

<110> 分子组合公司

<120> 包含至少两个针对 HER2 的重复序列结构域的结合蛋白

<130> MD41080

<160> 141

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Capping module

<400> 1

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

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

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

[0002]

<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

[0003]

<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 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>

[0004]

<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 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 Gly Ser Gly 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

[0005]

<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 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

[0006]

<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)

[0007]

<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

[0008]

<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

[0009]

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

[0010]

<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

[0011]

<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

[0012]

<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

[0014]

<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

[0015]

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

[0016]

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

[0017]

<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

[0018]

<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 Ala Asn Ser Gly
 1 5 10 15

[0019]

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)

[0020]

<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 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 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

[0021]

<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

[0022]

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

[0023]

<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>

[0024]

<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

[0025]

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

<210> 62
 <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>

[0026]

<223> AR domain (one-domain)

<400> 63

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 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

[0027]

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 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

[0028]

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

[0029]

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

[0031]

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 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

[0032]

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

[0033]

<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

[0034]

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 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

[0035]

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
 85 90

<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

[0036]

<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

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

[0037]

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

[0038]

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 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

[0039]

<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

[0040]

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 Ala Met Gly
 35 40 45

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

[0041]

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

[0042]

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 Gly Ser Gly 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

[0043]

<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 Gly Gly Ser Gly 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

[0044]

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

[0045]

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 Gly Ser Gly 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

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

[0046]

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 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

[0047]

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 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

[0048]

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

[0049]

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 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	

[0050]

115	120	125
Gly Ser Gly 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		

[0052]

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
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 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

[0053]

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 Gly Gly Ser Gly 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

[0054]

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

[0055]

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 Ser
115 120 125

Pro Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr 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

[0056]

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 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 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

[0057]

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

[0058]

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 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> 95
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial

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

[0059]

<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 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 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

[0060]

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 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

[0061]

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 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> 97			
<211> 228			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> AR domain (two-domain)			
<400> 97			

[0062]

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 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

[0063]

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 Gly Ser Arg Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu		
	130	135 140

[0064]

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

[0065]

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 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

[0066]

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 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

[0067]

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

[0068]

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 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> 102
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

[0069]

<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 Gly Gly Ser Gly 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

[0070]

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

[0071]

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 Gly Ser Gly 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 Thr 165	170	175
Asp Ile His Gly His Thr Pro Leu His Leu Ala 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		

[0072]

<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 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 Gly Gly Ser Gly 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

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

[0073]

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> 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

[0074]

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 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 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

[0075]

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 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

[0076]

Gly Gly Ser Gly 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

[0077]

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 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

[0078]

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
 305 310 315 320

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 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

[0079]

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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Arg Ser Asp Leu Gly Ile Lys Leu Leu Val Ala Ala Ala Gln Gly Gln
145 150 155 160

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
225 230 235 240

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

[0080]

<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 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 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 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

[0081]

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
 225 230 235 240

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 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

[0082]

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 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

[0083]

<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

[0084]

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 Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Val Ala Gly
35 40 45

[0085]

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

[0086]

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

[0087]

<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

[0088]

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

[0089]

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

[0090]

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

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 Leu Asn
 115 120 125

<210> 121
 <211> 126
 <212> PRT

[0091]

<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

[0092]

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 Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr 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

[0093]

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 Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr 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

[0095]

<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

[0097]

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)

[0098]

<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

[0099]

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 Gly
 260 265 270

Ser Gly Gly Gly Ser Cys
 275

<210> 137
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0101]

<220>

<223> AR domain (three-domain)

<400> 137

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ser Asp Leu Gly 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

[0102]

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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 275 280 285

Arg Ser Asp Leu Gly Lys 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

[0103]

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 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 Gly Ser Gly 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

[0104]

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 Lys Leu Gly
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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

[0105]

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

[0107]

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 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

[0108]

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

[0109]

Val Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser Pro Thr Pro Thr Thr Pro
 130 135 140

Thr Pro Thr Pro Thr 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

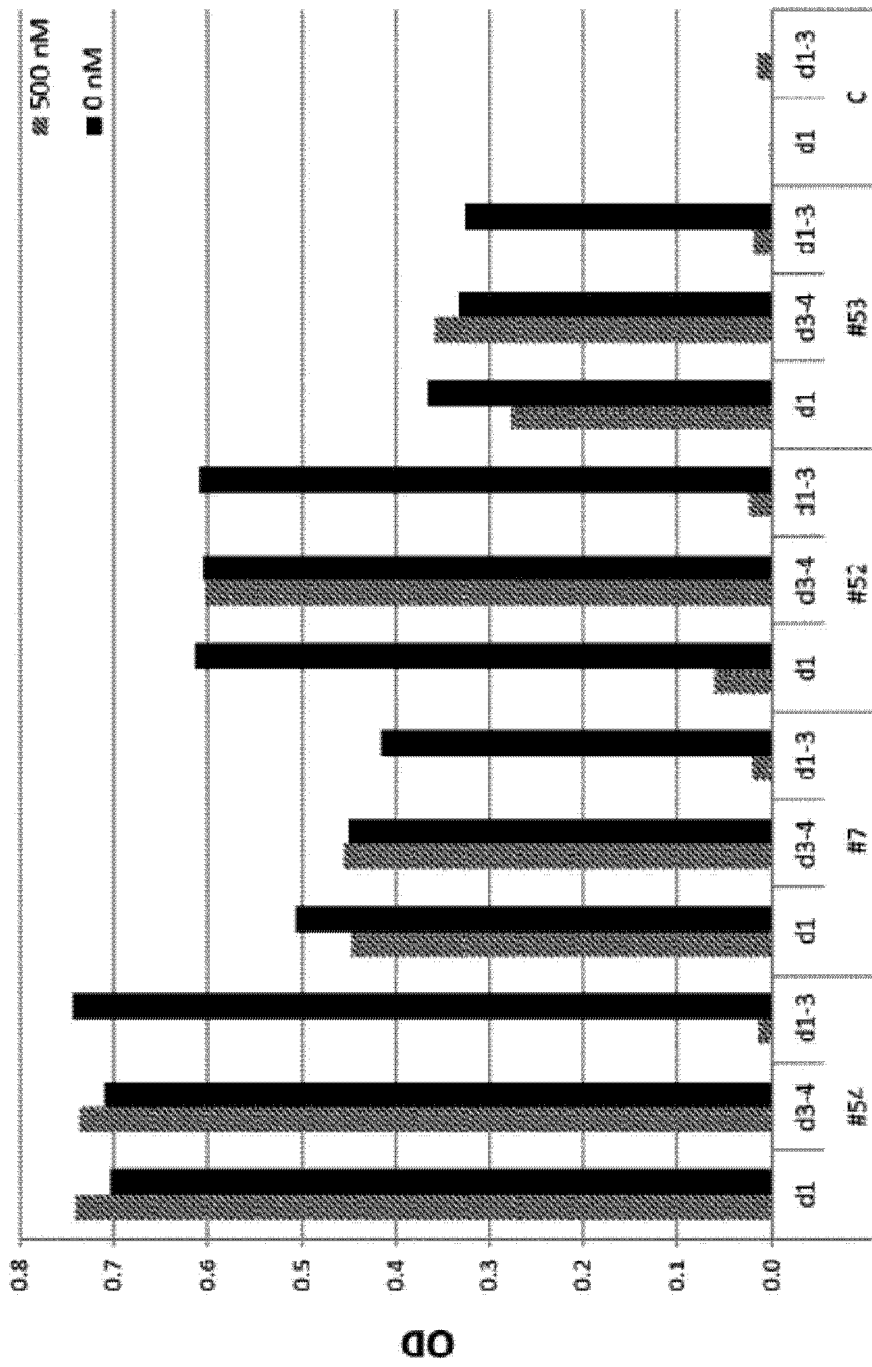


图 1A

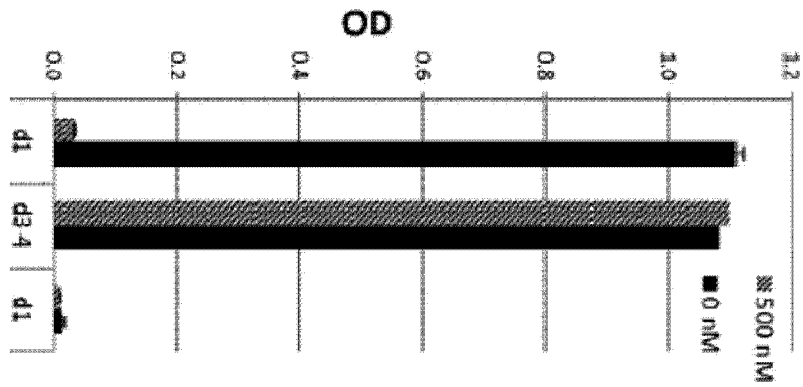


图 1B

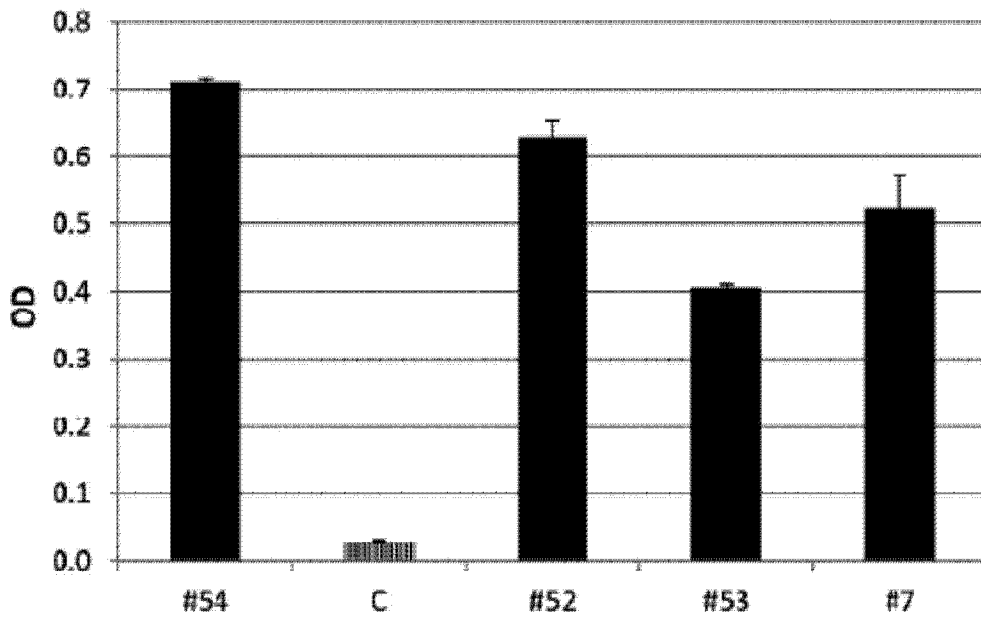


图 1C

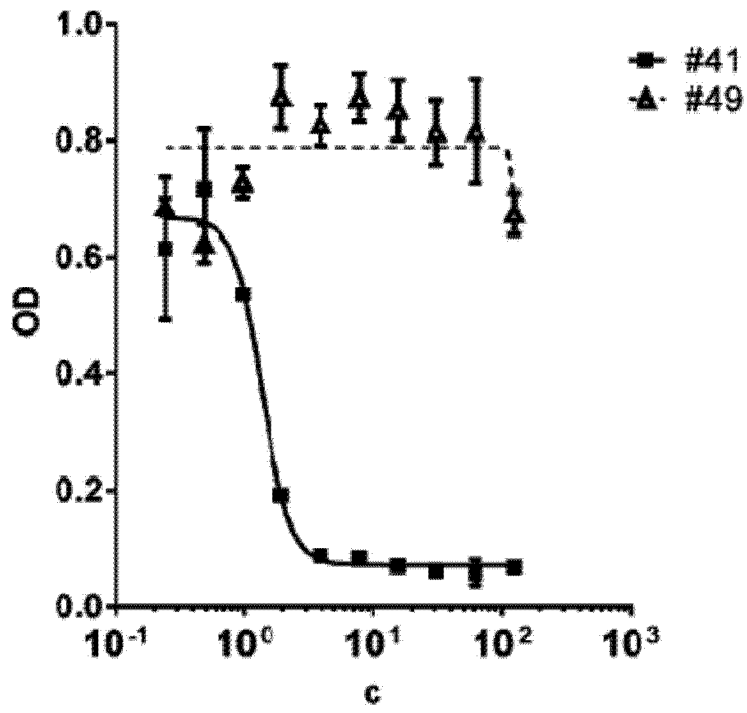


图 2A

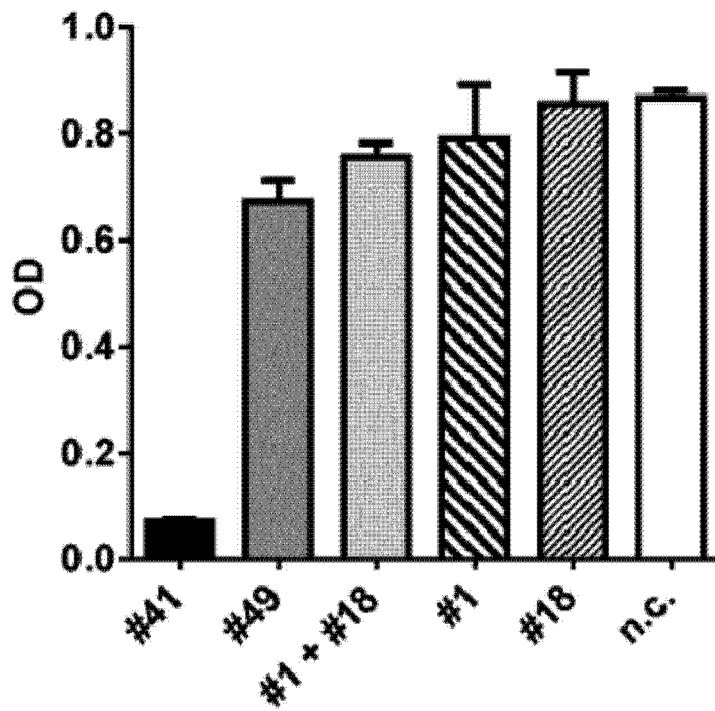


图 2B

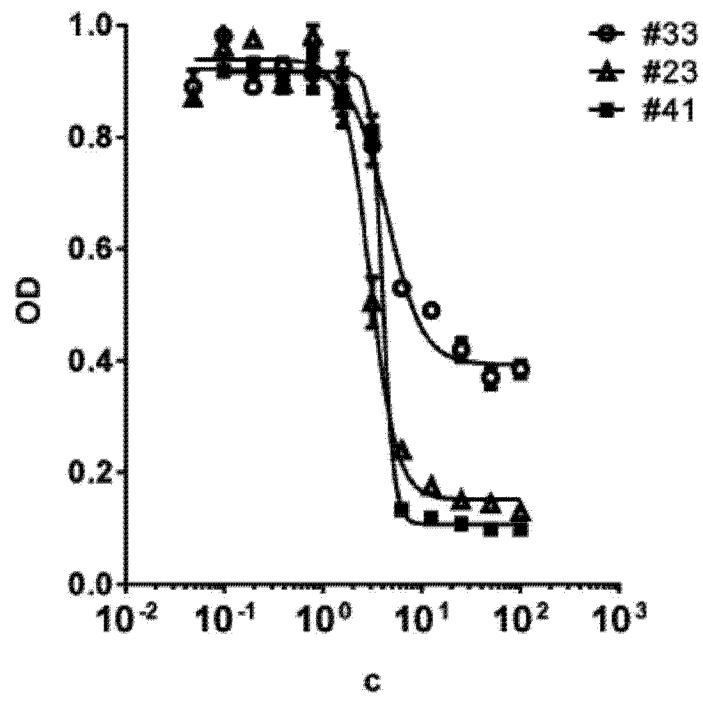


图 3A

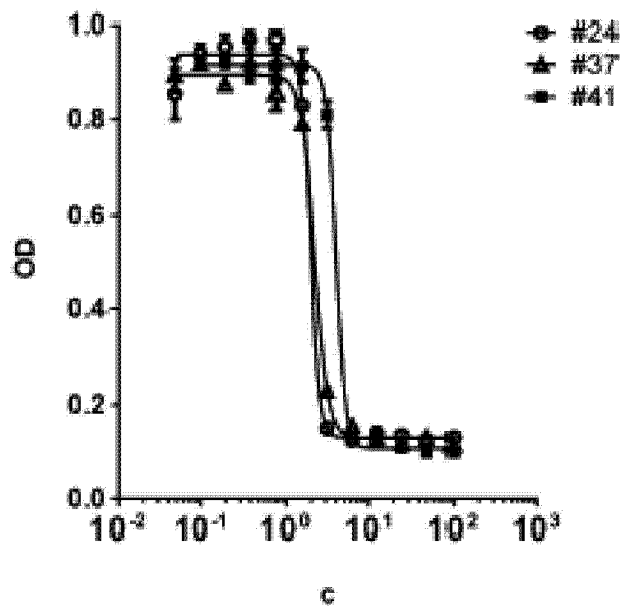


图 3B

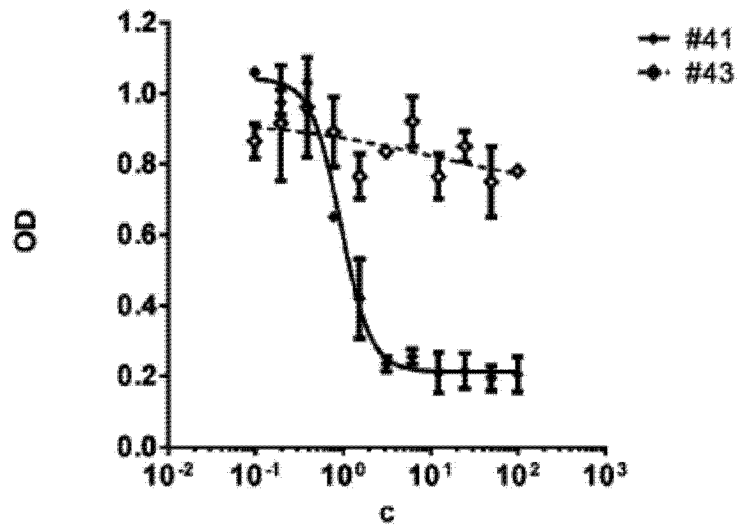


图 3C

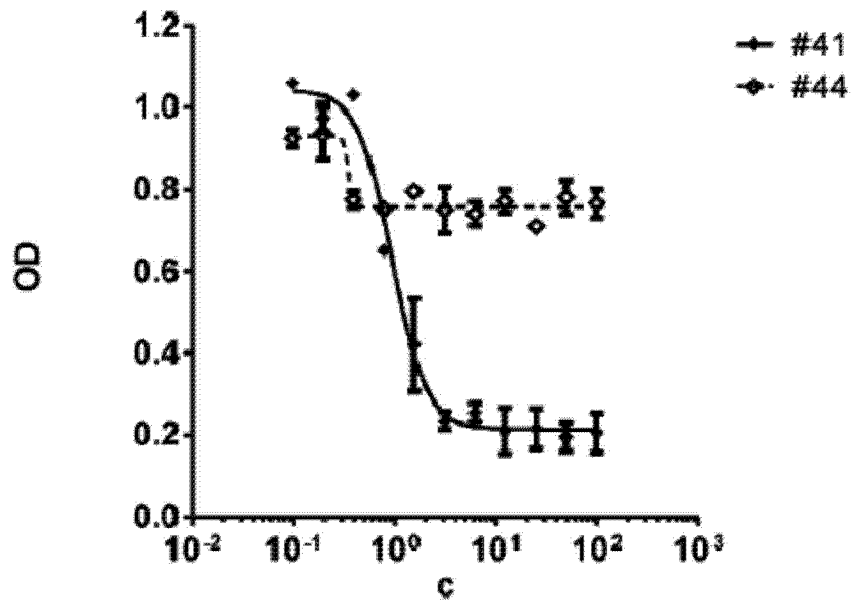


图 3D

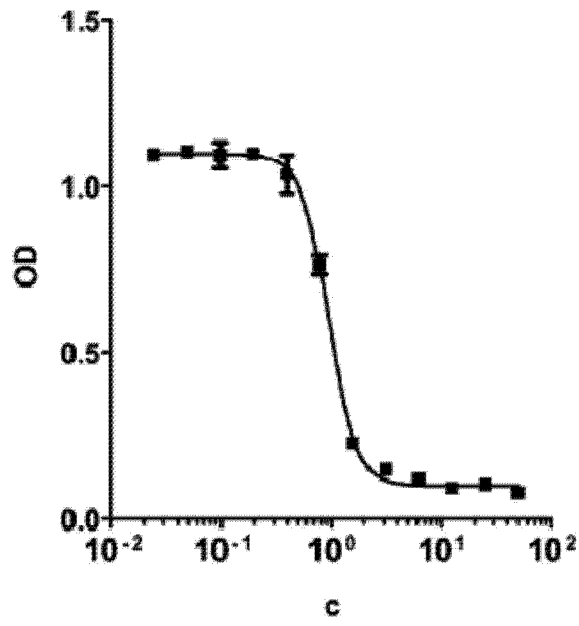


图 4A

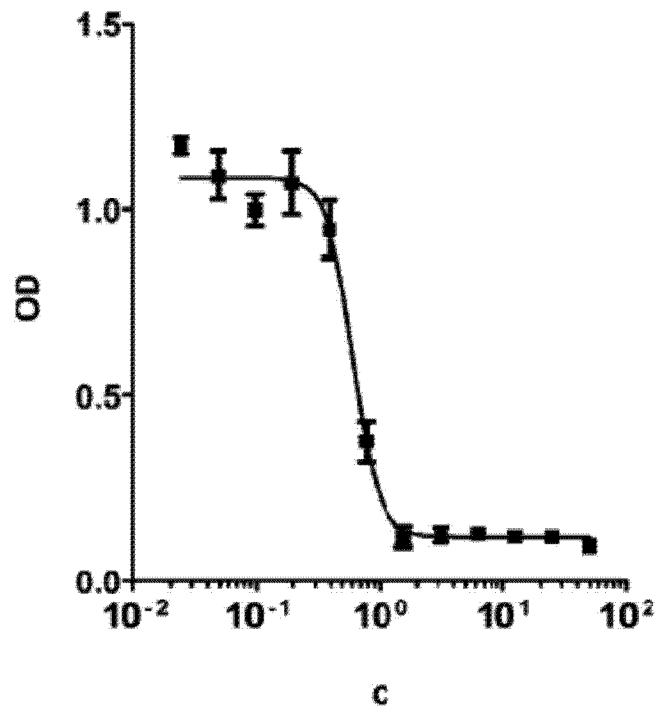


图 4B

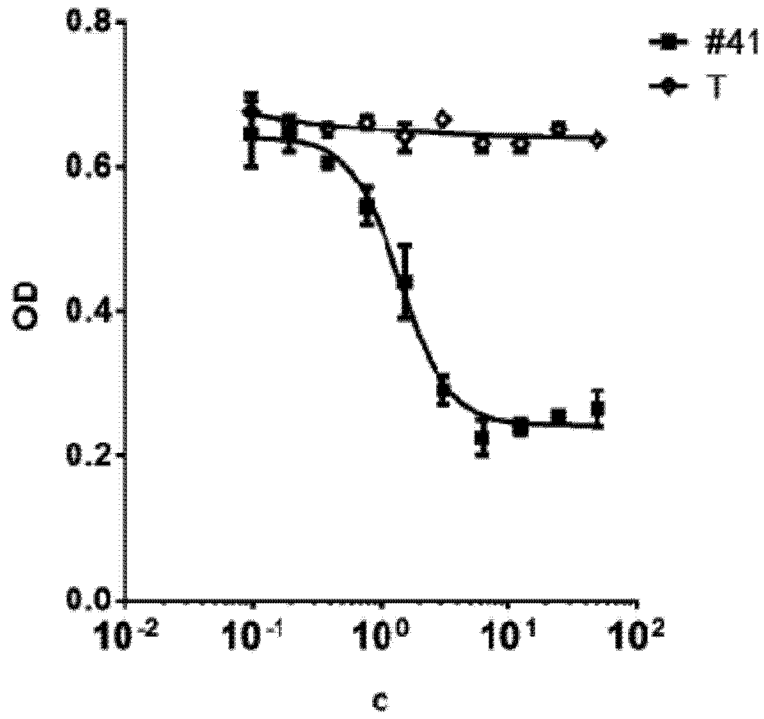


图 4C

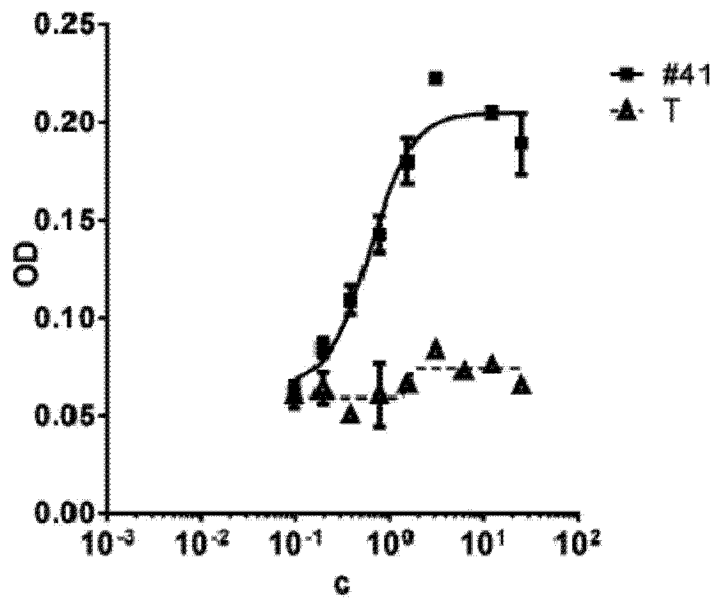


图 5A

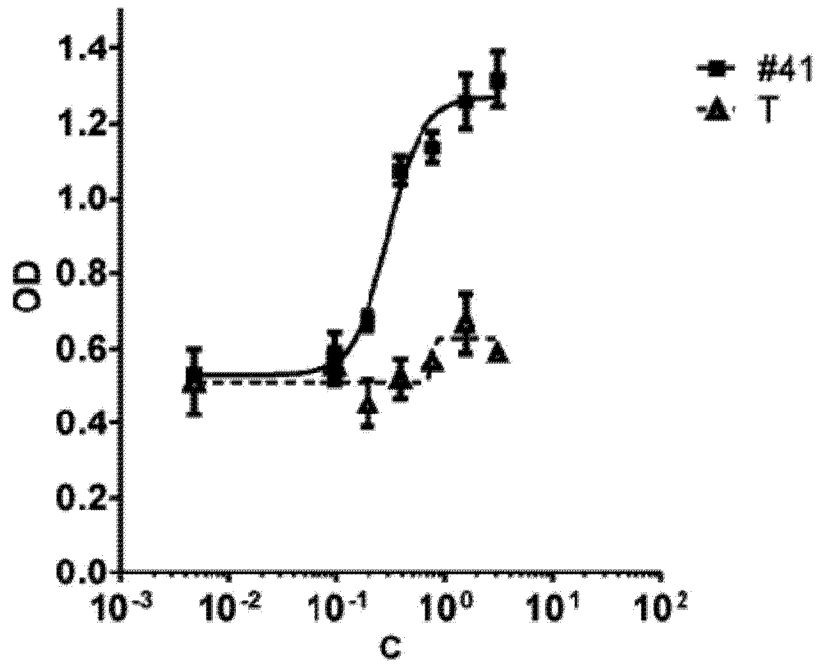


图 5B

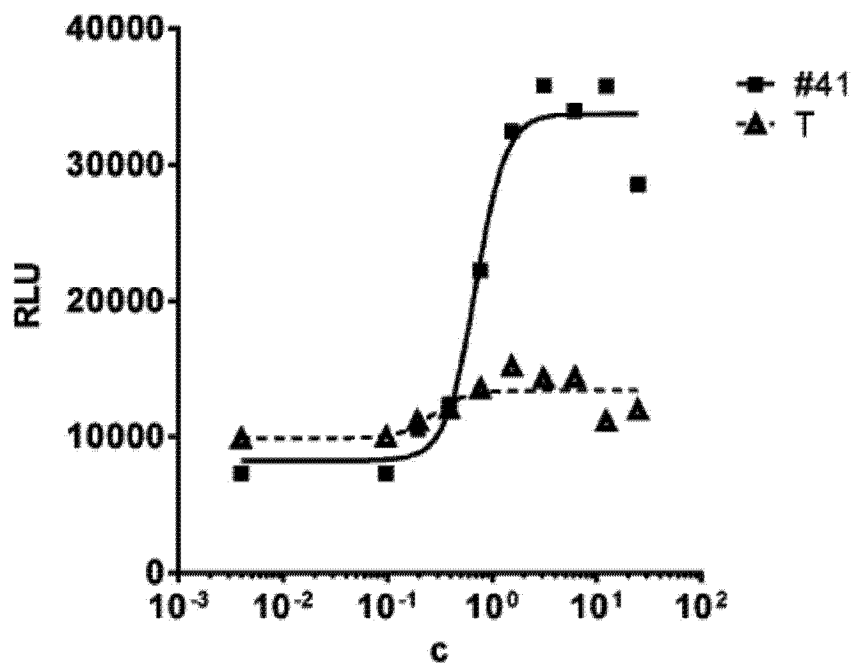


图 5C

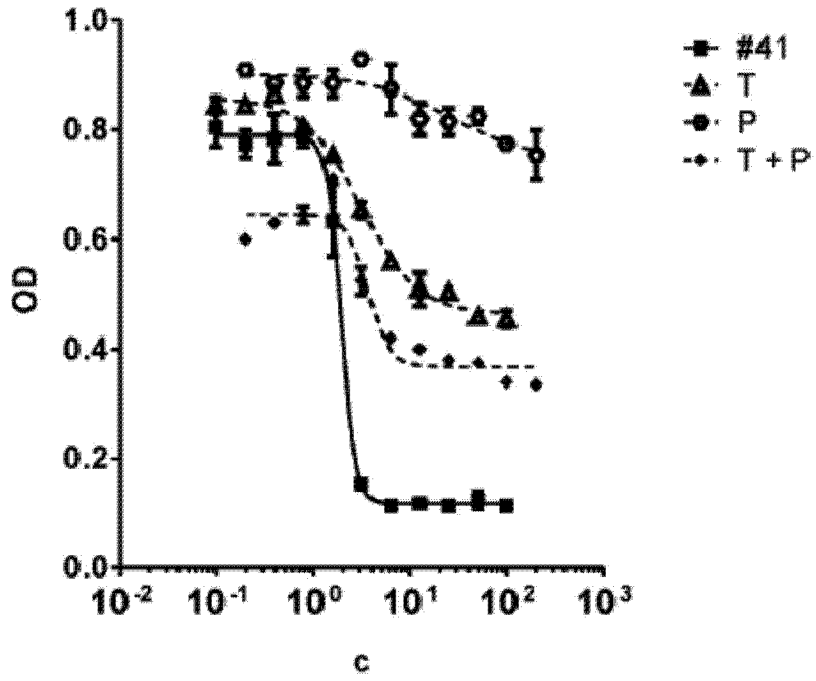


图 6A

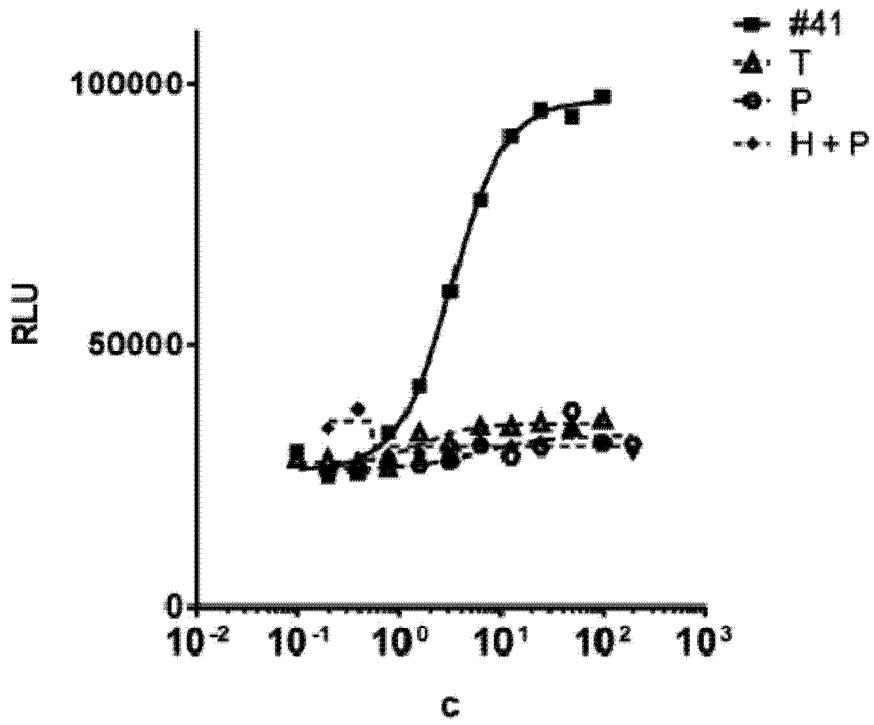


图 6B

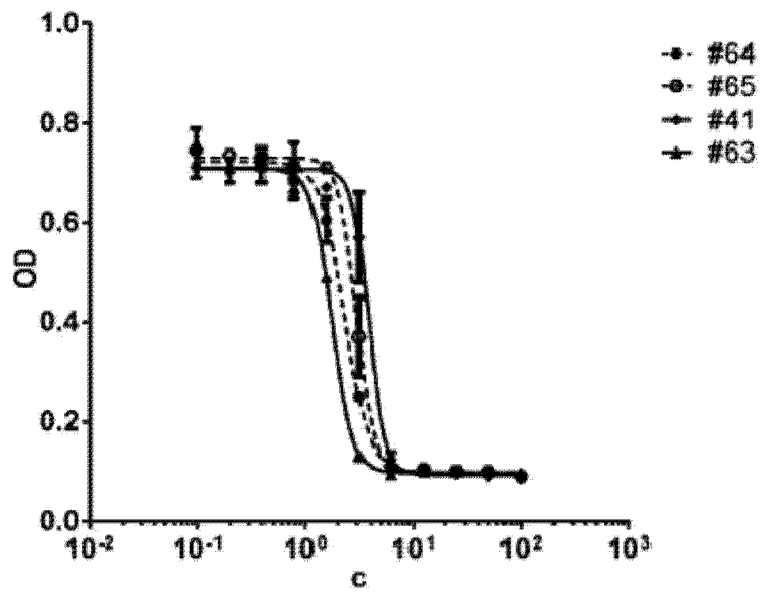


图 7A

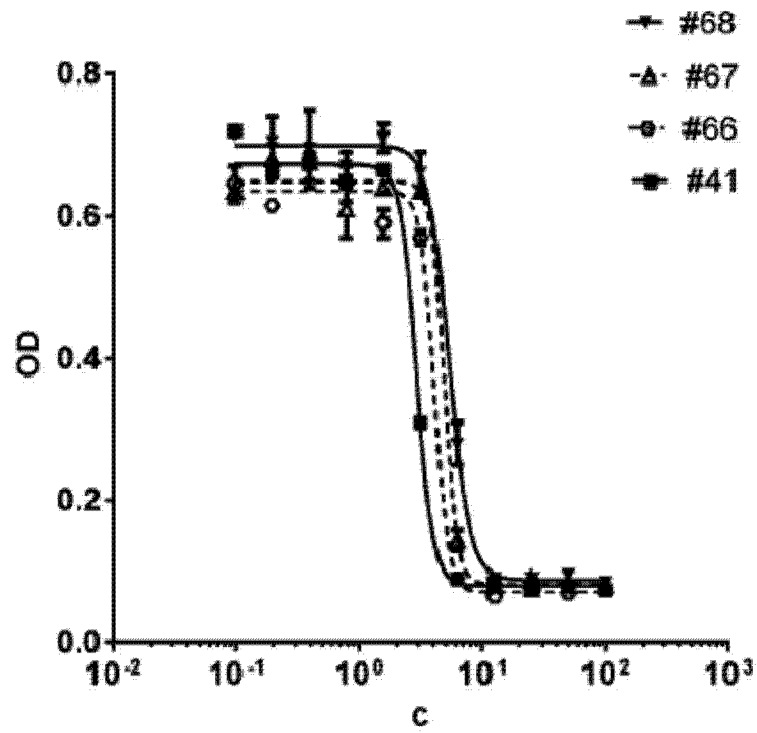


图 7B