(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월30일
(11) 등록번호 10-1516023
(24) 등록일자 2015년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7004449
(22) 출원일자(국제) 2007년08월01일
심사청구일자 2012년07월23일
(85) 번역문제출일자 2009년03월02일
(65) 공개번호 10-2009-0090295
(43) 공개일자 2009년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/057971
(87) 국제공개번호 WO 2008/015239
국제공개일자 2008년02월07일
(30) 우선권주장
60/821,073 2006년08월01일 미국(US)
60/912,013 2007년04월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2005019256 A1

(73) 특허권자
피어이스 에이지
독일 프라이징 85354, 리제마이트너 스트라세 30
(72) 발명자
옌센, 크리스티안
독일 뮌헨 81371 다이져쉬트라쎄 50
후엘스마이어, 마틴
독일 볼페르스도르프 85395 로젠쉬트라쎄 18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

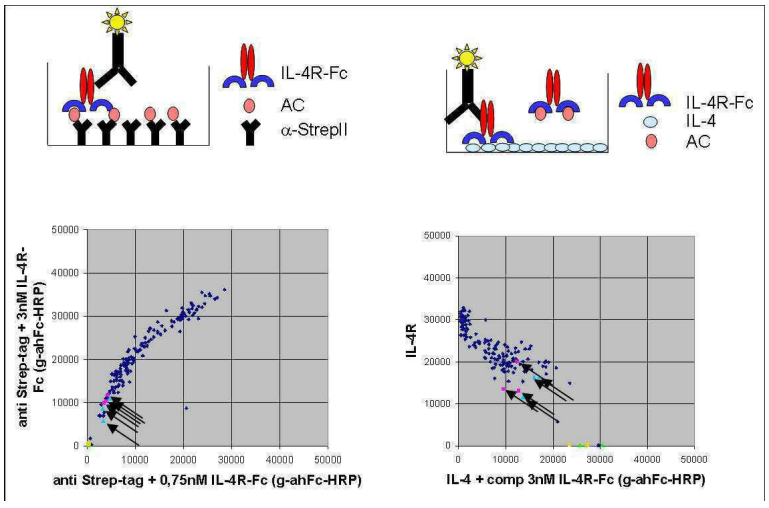
전체 청구항 수 : 총 83 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 및 이를 얻는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 사람 눈물의 리포칼린으로부터 유래된 신규한 돌연변이단백질(mutein)에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 돌연변이단백질을 암호화하는 핵산 및 그것을 발생시키는 방법을 제공한다. 추가로 본 발명은 상기 돌연변이단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 마지막으로, 본 발명은 상기 돌연변이단백질의 다양한 이용뿐만 아니라 상기 리포칼린 돌연변이단백질을 포함하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

쉴레후버, 쉬테판

독일 파운즈하우젠 85307 랑겐바흐 홈러 쉬트라쎄 4에이

홀바움, 안드레아스

독일 파운즈하우젠 85307 라이게르츠하우젠너 쉬트라쎄 4에이

스케라, 아른

독일 프라이징 85354 막스-레너-스트라쎄 19

보드레아우, 에릭

미합중국 노스캐롤라인 27709, 리서치 트리앤젤 파크, 콜웰이즈 로드 3054, 신젠타 바이오테크놀러지 인크.

존스, 리차드 씨.

스위스 바젤 4058 쉬바르즈발달지 215 신젠타

킴버, 이안

영국 에스케이 10 4티제이 마클레스필드 체쉬어 앨더레이 파크 신젠타 센트럴 톡시콜로지 라보라토리

데아르만, 레베카

영국 에스케이 10 4티제이 체쉬어 마클레스필드 앨더레이 파크 신젠타 센트럴 톡시콜로지 라보라토리

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 특정한 사람 눈물 리포칼린의 비자연적 리간드와 검출가능한 결합친화도로 결합하는 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 생산하는 방법으로서, 여기서 상기 비자연적 리간드는 생리학적 조건 하에서 천연형 사람 눈물 리포칼린과는 결합하지 않고, 상기 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 결합하는 물질인 것인 방법:

(a) 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 61 및 153에서 시스테인 잔기들을 암호화하는 코돈들 중 적어도 하나의 코돈이 다른 아미노산 잔기를 암호화하도록 돌연변이시키고, 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 및 108의 적어도 12, 14 또는 16개의 코돈에서 사람 눈물 리포칼린을 암호화하는 핵산분자에 돌연변이를 도입함으로써, 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질들을 암호화하는 다수의 핵산을 얻는 단계,

(b) 상기 (a)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질 핵산분자(들)을 발현시스템에서 발현시킴으로써, 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 얻는 단계, 및;

(c) 선택(selection), 분리(isolation) 또는 둘 다를 통하여 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드에 대해 검출가능한 결합친화성을 가지는, 상기 (b)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 집적(enriching)하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 56, 57, 58, 80, 83, 104, 105, 106 및 108의 18개 코돈들 모두가 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 61 및 153을 암호화하는 코돈들 중 적어도 하나의 코돈이 서열위치 61에서 알라닌, 페닐알라닌, 리신, 아르기닌, 트레오닌, 아스파라긴, 티로신, 메티오닌, 세린, 프롤린 또는 트립토판을 암호화하거나 서열위치 153에서 세린 또는 알라닌을 암호화하도록 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 111 및 114를 암호화하는 코돈들이 서열위치 111에서 아르기닌을 암호화하고 서열위치 114에서 트립토판을 암호화하도록 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 101에서 시스테인을 암호화하는 코돈이 다른 아미노산 잔기를 암호화하도록 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 101에서 시스테인을 암호화하는 코돈이 세린을 암호화하도록 돌연변이되는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (c)단계가 추가적으로 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

(a) 면역학적 합텐(hapten), 펩티드, 단백질 또는 다른 거대분자의 특성을 나타내는 자유 또는 결합 형태의 화합물로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나의 화합물을 상기 특정한 리간드로 제공하는 단계,

(b) 상기 리간드 및 상기 리간드와 결합친화도를 갖는 돌연변이 단백질간 복합체를 형성할 수 있도록 다수의 돌연변이 단백질들을 상기 리간드와 접촉시키는 단계,

(c) 결합친화도가 없거나 실질적인 결합친화도가 없는 돌연변이 단백질을 제거하는 단계.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 리간드가 단백질인 것인 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (c)단계의 선택이 경쟁적인 조건 하에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 특정 리간드의 결합을 위한 적어도 하나의 돌연변이 단백질을 선택하기 위하여, 돌연변이 생성(mutagenesis)을 통해 얻어진, 상기 다수의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산이 3' 말단에서 M13 패밀리의 사상형 박테리오파지(filamentous bacteriophage)의 외피단백질(coat protein) pⅢ 또는 상기 외피단백질 pⅢ의 단편을 암호화하는 유전자와 작동가능하도록 융합된 것인 방법.

청구항 11

야생형 눈물 리포칼린의 서열위치 61 및 153에 나타나는 시스테인 잔기의 적어도 하나가 다른 아미노산으로 대체되고, 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 및 108에서 적어도 12, 14 또는 16개의 돌연변이된 아미노산 잔기들이 나타나는, 특정한 사람 눈물 리포칼린의 비자연적 리간드와 검출가능한 결합친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질로서, 여기서 상기 비자연적 리간드는 생리학적 조건 하에서 천연형 눈물 리포칼린과는 결합하지 않고, 상기 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 결합하는 물질인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 12

삭제

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 서열위치 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 56, 57, 58, 80, 83, 104, 105, 106 및 108의 18개 위치 모두에서 돌연변이된 아미노산 잔기들을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 14

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Tyr, Met, Ser, Pro 또는 Trp; 및 Cys 153 → Ser 또는 Ala의 아미노산 치환들 중 적어도 하나의 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 15

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Arg 111 → Pro 및 Lys114 → Trp으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가적인 아미노산 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 16

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 성숙한 사람 눈물 리포칼린 서열의 서열위치 101에서 시스테인 잔기의 아미노산 치환을 추가적으로 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Cys 101 → Ser의 돌연변이를 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 18

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 그의 N-말단 또는 C-말단에서 효소, 단백질 또는 단백질

도메인(domain), 펩티드, 신호서열 및 친화표지(affinity tag)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나와 작동 가능하도록 결합된 것인 돌연변이 단백질.

청구항 19

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민, 알부민 결합 펩티드, 알부민 결합 단백질 및 트랜스페린(transferrin)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 돌연변이 단백질의 혈청 내 반감기(serum half-life)를 연장시키는 부분과 결합된 것인 돌연변이 단백질.

청구항 20

삭제

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 알부민 결합 단백질이 박테리아 알부민 결합 단백질, 또는 알부민에 대한 항체 또는 도메인 항체인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 박테리아 알부민 결합 단백질이 연쇄상구균 단백질 G (streptococcal protein G)의 알부민 결합 도메인인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 알부민 결합 펩티드가 Cys-Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Cys (Xaa_1은 Asp, Asn, Ser, Thr, 또는 Trp이고; Xaa_2는 Asn, Gln, His, Ile, Leu, 또는 Lys이고; Xaa_3은 Ala, Asp, Phe, Trp, 또는 Tyr이고; Xaa_4는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, 또는 Thr임)의 구조식을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 24

제11항 또는 제13항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 유기 분자들, 효소 표지(label), 방사성 표지, 형광 표지, 발색성 표지, 발광성 표지, 합텐(haptens), 디고시게닌(digoxigenin), 비오틴(biotin), 금속 복합체들, 금속들 및 콜로이드성 금으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 표지에 연결되는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

제11항에 있어서, 상기 비자연적 리간드가 단백질인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 단백질이 혈관내피성장인자(VEGF), 혈관내피성장인자 수용체 2(VEGF-R2), 및 인터루킨 4 수용체 알파사슬(IL-4 receptor alpha)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 단백질이 IL-4 수용체 알파인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 단백질이 사람 IL-4 수용체 알파인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 단백질이 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역(region) 또는 도메인인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 IL-4의 길항자(antagonist)로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 사람 IL-4의 길항자로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 37

제32항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 IL-13의 길항자로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 사람 IL-13의 길항자로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 39

제32항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 시노몰구스(cynomolgus) IL-4 수용체 알파와 교차반응하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 40

제32항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대해 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106, 및 108의 서열위치에서 시스테인 잔기들에 의한 야생의 아미노산 잔기의 적어도 두 개의 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 41

제32항 또는 제34항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 200 nM 이하의 K_D를 갖는 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인과 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 100 nM 이하의 K_D를 갖는 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인과 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 20 nM 이하의 K_D를 갖는 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인과 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 1 nM 이하의 K_D를 갖는 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인

과 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 45

제32항 또는 제34항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대해, Arg 26 → Ser, Pro; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr, His; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly, Ser, Ala, Asp, Lys, Asn, Thr, Arg; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ile, Ala, Arg, Val, Thr, Asn, Lys, Tyr, Leu, Met; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; 및 Lys 108 → Gln으로 이루어진 그룹에서 선택되는, 적어도 12, 14 또는 16개의 아미노산 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Met 39 → Val; Thr 42 → Met, Ala; Thr 43 → Ile, Pro, Ala; Glu 45 → Lys, Gly; Asn 48 → Asp, His, Ser, Thr; Val 53 → Leu, Phe, Ile, Ala, Gly, Ser; Thr 54 → Ala, Leu; Met 55 → Leu, Ala, Ile, Val, Phe, Gly, Thr, Tyr; Glu 63 → Lys, Gln, Ala, Gly, Arg; Val 64 → Gly, Tyr, Met, Ser, Ala, Lys, Arg, Leu, Asn, His, Thr, Ile; Ala 66 → Ile, Leu, Val, Thr, Met; Glu 69 → Lys, Gly; Lys 70 → Arg, Gln, Glu; Thr 78 → Ala; Ile 89 → Val; Asp 95 → Asn, Ala, Gly; 및 Tyr 100 → His으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Leu 33 → Tyr; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; 및 Lys 108 → Gln의 아미노산 치환들을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 다음의 아미노산 치환 집합들 중 어느 하나를 포함하는 것인 돌연변이 단백질:

(1) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ile; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

(2) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Lys; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Asn; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

(3) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

(4) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 →Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Ser; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

(5) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → His; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Ser; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ala; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro;Lys 108 → Gln;

(6) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Asp; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln; 또는

(7) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu

105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln.

청구항 49

제32항 또는 제34항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 서열번호 2 내지 서열번호 8 중의 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 52

제31항에 있어서, 상기 리간드가 VEGF-R2인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 리간드가 VEGF-R2의 세포외 지역 또는 도메인인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF 길항자(antagonist)로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 55

제52항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF-R2와 200 nM 이하의 K_D로 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF-R2와 100 nM 이하의 K_D로 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF-R2와 20 nM 이하의 K_D로 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF-R2와 1 nM 이하의 K_D로 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 59

제52항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대해, Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 → Lys, Glu, Ala, Met; Ile 57 → Phe;Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser, Pro; Lys 83 → Glu, Gly; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; 및 Lys 108 → Thr으로 이루어진 그룹에서 선택되는, 적어도 12, 14 또는 16개의 아미노산 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Leu 41→ Phe; Glu 63 → Lys, Val 64 → Met; Asp 72 → Gly; Lys 76 →Arg, Glu; Ile 88 → Val, Thr; Ile 89 → Thr; Arg 90 → Lys; Asp 95 →Gly; Phe 99 → Leu; 및 Gly 107 → Arg, Lys, Glu으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 →Ser; Met 31

→ Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Ile 57 → Phe; Ser 58 →Arg; Lys 83 → Glu; Glu 104 → Leu; Leu 105 →Ala; His 106 → Val; 및 Lys 108 → Thr 의 아미노산 치환들을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 62

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 다음의 아미노산 치환 집합들 중 어느 하나를 포함하는 것인 돌연변이 단백질:

(1) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 → Lys; Ile 57 → Phe; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Glu; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; Lys 108 → Thr;

(2) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 →Glu; Ile 57 → Phe; Ser 58 →Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Glu; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; Lys 108 → Thr;

(3) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 → Ala; Ile 57 → Phe; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Glu; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; Lys 108 → Thr; 또는

(4) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 → Glu; Ile 57 → Phe; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Pro; Lys 83 → Glu; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; Lys 108 → Thr.

청구항 63

제52항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 서열번호 34 내지 서열번호 39 중의 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 64

제31항에 있어서, 상기 리간드가 VEGF인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 VEGF가 VEGF-R1, VEGF-R2, 및 뉴로필린(Neuropilin)-Ⅰ로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 VEGF 수용체에 결합하는 것을 방해하는 VEGF 길항자로 작용하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 VEGF 수용체가 VEGF-R2인 것인 돌연변이 단백질.

청구항 67

제64항 또는 제65항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 200 nM 이하의 K_D로 VEGF와 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 100 nM 이하의 K_D로 VEGF와 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 20 nM 이하의 K_D로 VEGF와 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 1 nM 이하의 K_D로 VEGF와 결합하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 71

제64항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대해, Arg 26 → Ser, Pro, Val, Leu, Ile; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His, Arg, Tyr, Gln; Ile 57 → Val, Thr, Leu; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn, Ser; 및 Lys 108 → Ala, Val으로 이루어진 그룹에서 선택되는, 적어도 12, 14 또는 16개의 아미노산 치환을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Val 36 → Ala; Thr 37 → Ala, Ile; Met 39 → Thr; Thr 40 → Ala, Ser; Asn 48 → Asp, Ala 51 → Val; Lys 52 → Arg; Thr 54 → Val; Met 55 →Val; Ser 61 → Pro; Lys 65 → Arg; Ala 66 → Val; Val 67 → Ile; Glu 69 → Gly, Ser, Thr; Lys 76 → Arg, Ile, Ala, Met, Pro; Tyr 87 → Arg, His, Lys, Gln; Ile 89 → Thr, Val, Gly, His, Met, Lys; Arg 90 → Gly; Ile 98 → Val; 및 Gly 107 → Glu으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 73

제71항 또는 제72항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; 및 Lys 108 → Val의 아미노산 치환들을 포함하는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 74

제71항 또는 제72항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 다음의 아미노산 치환 집합들 중 어느 하나를 포함하는 것인 돌연변이 단백질:

(1) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Gly; Phe 28 →Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 →Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn; Lys 108 → Val;

(2) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 →His; Ser 58 → Glu; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

(3) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn; Lys 108 → Val;

(4) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu;Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Arg; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

(5) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 →Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile;Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

(6) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 →Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

(7) Arg 26 → Val; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 →Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 →His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

(8) Arg 26 → Leu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 →Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly;Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104

→ Cys; His 106 →Ser; Lys 108 → Val; 또는

(9) Arg 26 → Ile; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val.

청구항 75

제64항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질이 서열번호 26 내지 서열번호 33 또는 서열번호 44 내지 서열번호 47의 아미노산 서열을 갖는 것인 돌연변이 단백질.

청구항 76

제11항 또는 제31항에 따른 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 핵산 분자가 벡터에 삽입된 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 78

제77항에 있어서, 파지미드(phagemid) 벡터에 삽입된 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 79

제76항의 핵산 분자를 포함하는 숙주세포.

청구항 80

삭제

청구항 81

제32항에 정의된 바와 같은 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질 및 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함하는, 알러지성 질환 또는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 82

삭제

청구항 83

제11항 또는 제31항에 정의된 바와 같은 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 생산하는 방법으로서, 상기 돌연변이 단백질이 이를 암호화하는 핵산으로부터 시작하여 박테리아 또는 진핵생물인 숙주 생물체 내에서 유전공학적 방법으로 생산되는 것인 방법.

청구항 84

삭제

청구항 85

제31항에 정의된 바와 같은 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 포함하고 질병 또는 장애를 치료하기 위한 것으로, 상기 질병 또는 장애가 알러지성 질환, 암, 신생혈관성 습성 노인황반변성(neovascular wet age-related macular degeneration(AMD)), 당뇨망막병증(diabetic retinopathy), 황반부종(macular edema), 미성숙 망막증(retinopathy of prematurity) 또는 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

제85항에 있어서, 상기 알러지성 질환은 알러지성 천식, 비염, 결막염 또는 피부염인 것인 약학 조성물.

청구항 89

제52항 또는 제64항에 정의된 바와 같은 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 포함하고 질병 또는 장애를 치료하기 위한 것으로, 상기 질병 또는 장애가 증가된 혈관신생에 의해 야기되거나 촉진되는 질병 또는 장애로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 90

삭제

청구항 91

제89항에 있어서, 상기 질병 또는 장애가 암, 연령관련황반변성(AMD), 당뇨병성 망막증, 황반부종(macular edema), 미성숙 망막병증(retinopathy of prematurity) 및 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 암이 위장관, 직장, 대장, 전립선, 난소, 췌장, 유방, 방광, 신장, 자궁내막, 및 폐의 암종, 백혈병, 및 흑색종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 93

하기 단계를 포함하는, 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드를 검출하는 방법으로서, 여기서 상기 비자연적 리간드는 생리학적 조건 하에서 천연형 눈물 리포칼린과는 결합하지 않고, 상기 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 결합하는 물질인 것인 방법:

(a) 적절한 조건 하에서 상기 특정 리간드를 포함하는 것으로 추측되는 시료를 제11항에 따른 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 접촉시킴으로써, 상기 돌연변이 단백질과 상기 특정한 리간드간 복합체를 형성할 수 있도록 하는 단계, 및

(b) 적절한 신호에 의해 상기 돌연변이 단백질 복합체를 검출하는 단계.

청구항 94

하기 단계를 포함하는, 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드를 분리하는 방법으로서, 여기서 상기 비자연적 리간드는 생리학적 조건 하에서 천연형 눈물 리포칼린과는 결합하지 않고, 상기 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 결합하는 물질인 것인 방법:

(a) 적절한 조건 하에서 상기 리간드를 포함하는 것으로 추측되는 시료를 제11항에 따른 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 접촉시킴으로써, 상기 돌연변이 단백질과 상기 특정한 리간드간 복합체를 형성할 수 있도록 하는 단계, 및

(b) 상기 시료로부터 상기 돌연변이 단백질/리간드 복합체를 분리하는 단계.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 상기 돌연변이 단백질/리간드 복합체가 고체 지지부에 결합되어 있는 것인 방법.

청구항 96

삭제

청구항 97

하기 단계를 포함하는, 인 비트로(*in vitro*)에서 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드의 복합체를 형성하는 방법으로서, 여기서 상기 비자연적 리간드는 생리학적 조건 하에서 천연형 눈물 리포칼린과는 결합하지 않고, 상기 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질과 결합하는 물질인 것인 방법:

제11항에 따른 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드와 접촉시키는 단계.

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 리포칼린 단백질 패밀리 멤버들 (Pervaiz, S., and Brew, K. (1987) *FASEB* J. **1**, 209-214) 은 다양한 분자-인식 특성들: 레티노이드(retinoid), 지방산(fatty acid), 콜레스테롤, 프로스타글란딘(prostaglandin), 비리버딘(biliverdin), 페로몬, 타스탄트(tastant), 및 오도란트와 같은 다양하고 주로 소수성인 분자들에 결합하는 능력, 특정 세포-표면 수용체들에 결합하는 능력 및 거대분자 복합체를 형성하는 능력에 의해 특징지워지는 일반적으로 작은 분비단백질들이다. 이들은 과거에는 주로 운반단백질로 분류되었으나, 현재는 리포칼린 단백질이 다양한 생리학적 기능들을 충족한다는 것이 명확하게 되었다. 상기 기능들에는 레티놀 운반, 후각작용(olfaction), 페로몬 신호전달, 및 프로스타글란딘의 합성에서의 역할을 포함한다. 또한 리포칼린은 면역반응 및 세포 항상성의 조절에도 관련되어 있다(Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* **318**, 1-14 and Flower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9-24).

[0002] 리포칼린은 서열 동일성이 보통 20% 미만으로, 전체서열이 매우 낮은 수준으로 보존되어 있다. 반면에, 그들의 전체적인 접힘(folding) 패턴은 매우 보존적이다. 리포칼린 구조의 중심부는, 연속적인 수소결합을 가진 베타-배럴(barrel)을 형성하기 위하여 닫혀진 하나의 8-가닥 반-평행(anti-parallel) 베타-시트(sheet)로 이루어져 있다. 배럴의 한쪽 끝은 베타-가닥을 연결하는 세 개의 펩티드 루프뿐 아니라 그것의 바닥을 관통하는 N-말단 펩티드 단편에 의해 공간적으로 막혀 있다. 베타-배럴의 다른쪽 끝은 용매에 대해 열려 있고, 표적-결합 부위를 에워싸며, 이것은 네 개의 펩티드 루프들에 의해 형성된다. 다른 크기, 형태, 및 화학적 특성의 표적들을 각각 수용할 수 있는 다양한 결합 모드를 만드는 것은 이러한 루프의 다양성 때문이며, 그렇지 않다면 경직된 리포칼린 골격(scaffold)이었을 것이다(Flower, D.R. (1996), *supra*; Flower, D.R. et al. (2000), *supra*, or Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 337-350).

[0003] 현재는 눈물 리포칼린(TLPC 또는 Tlc)이라 불리는 사람 눈물 전-알부민(pre-albumin)은 원래 사람 눈물의 주된(전체 단백질 함량의 약 3분의 1) 단백질로 알려졌으나, 최근에는 전립선, 코 점막 및 기관 점막(tracheal mucosa)을 포함하는 여러 다른 분비조직들에서도 발견되고 있다. 쥐(rat), 돼지, 개 및 말에서 상동 단백질들이 발견되고 있다. 상대적으로 불용성인 지질에 대한 섞임 및 이 단백질 패밀리의 다른 멤버들과는 다른 결합 특성들 때문에 눈물 리포칼린은 특이한 리포칼린 멤버이다(Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 241-248). 지방산, 지방알콜, 인지질, 당지질 및 콜레스테롤과 같은 화학적 부류가 다른 상당수의 지방 친화성 화합물들은 이 단백질의 내생적(endogenous) 리간드들이다. 흥미롭게도, 다른 리포칼린들과 달리 리간드(표적) 결합 강도가 알킬 아미드 및 지방산 모두에 대해 탄화수소 꼬리의 길이와 상관관계에 있다. 따라서, 눈물 리포칼린은 가장 불용성인 지방과 가장 강하게 결합한다(Glasgow, B.J. et al. (1995) *Curr. Eye Res.* **14**, 363-372; Gasymov, O.K. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1433**, 307-320).

배 경 기 술

[0004] 사람 눈물 리포칼린의 정확한 생물학적 기능은 아직 완전히 명확하게 밝혀지지는 않았으며, 여전히 논쟁거리이다. 눈물 용액에서, 그것은 눈 점막 표면으로부터 액체상으로 지질을 제거함으로써 눈물막을 보전하는데 가장 중요할 것으로 보인다(Gasymov, O.K. et al. (1999), *supra*). 하지만, 그것은 시험관에서(*in vitro*) 일반적인 리포칼린에서는 매우 이례적인 추가적인 활성들, 즉 비-특이적 내생성 활성뿐 아니라 시스테인 단백질분해효소

의 억제를 나타낸다(van't Hof, W. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1837-1841; Yusifov, T.N. et al. (2000) *Biochem. J.* **347**, 815-819). 최근에 눈물 리포칼린이 시험관에서 여러 지질 과산화작용 산물들과 결합할 수 있다는 사실이 밝혀졌고, 이는 눈물 리포칼린이 잠재적으로 유해한 지방친수성 분자들의 생리적 산화-스트레스-유발 청소부(scavenger)로서 기능할 수 있다는 가설을 낳는다(Lechner, M. et al. (2001) *Biochem. J.* **356**, 129-135).

[0005] 비공유결합으로 그들의 대응하는 표적들과 선택적으로 결합하는 단백질들은 일반생물학 및 생명과학에서뿐만 아니라 생명공학, 의약, 생물분석학 분야에서 시약으로서 결정적인 역할을 한다. 항체들, 즉 면역글로불린(immunoglobulin)들은 이러한 부류의 단백질의 대표적인 예이다. 인식, 결합 및/또는 리간드/표적의 분리와 함께 그러한 단백질들에 대한 다양한 요구들에도 불구하고, 현재로서는 면역글로불린이 거의 배타적으로 사용된다. 제한된 리간드-결합 특성을 갖는 다른 단백질들, 예를 들면 렉틴(lectins)의 적용은 특별한 경우에 제한되어 왔다.

[0006] 더 최근에, 리포칼린 패밀리 멤버들은 제한된 리간드-결합 특성을 갖는 단백질들에 관한 연구의 주제가 되고 있다. PCT 공개공보 WO 99/16873 는 4개의 펩티드 루프 지역에서 돌연변이된 아미노산 위치들을 갖는 리포칼린 패밀리의 폴리펩티드들을 개시하며, 이는 결합 포켓을 에워싸는 원통모양의 베타-배럴(β-barrel) 구조의 끝에 위치하며, *Pieris brassicae*의 바이린-결합 단백질(the bilin-binding protein, BBP)의 28 부터 45, 58부터 69, 86부터 99, 및 114부터 129 아미노산 위치를 포함하는 선형의 폴리펩티드 서열에서 그 단편들과 대응된다.

[0007] PCT 공개공보 WO 00/75308 은 바이린-결합 단백질의 돌연변이 단백질들을 개시하며, 이들은 디고시게닌(digoxigenin)과 특이적으로 결합한다. 반면에, 국제특허출원 WO 03/029463 및 WO 03/029471 은 각각 사람 호중성(neutrophil) 젤라티나제(gelatinase)-관련 리포칼린 (hNGAL) 및 아포리포단백질(apolipoprotein) D의 돌연변이 단백질들과 관련이 있다. 리포칼린 변형체의 접힘안정성 뿐만 아니라 리간드 친화성, 특이성을 더 개선하고 조절하기 위하여, 추가적인 아미노산 잔기들의 치환과 같은 다른 멤버의 리포칼린 패밀리를 이용한 다양한 접근들이 제안되었다(Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* **74**, 257-275; Schlehuber, S., and Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* **96**, 213-228). PCT 공개공보 WO 2006/56464 은 낮은 나노몰(nanomolar) 범위에서 CTLA-4와 결합친화성을 갖는 사람 호중성 젤라티나제-관련 리포칼린의 돌연변이 단백질들을 개시한다.

[0008] PCT 공개공보 WO 2005/19256 는 다르거나 동일한 표적 리간드에 대해 적어도 하나의 결합부위를 갖는 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 개시하며, 그러한 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질의 생산방법을 제공한다. 상기 PCT 출원에 따르면, 어떤 아미노산은 눈물 리포칼린의 1차 서열 안에 있으며, 특히 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 7-14, 24-36, 41-49, 53-66, 69-77, 79-84, 87-98, 및 103-110을 포함하는 루프 지역은 결합친화도를 갖는 돌연변이 단백질을 만들기 위해 돌연변이 생성(mutagenesis)에 사용된다. 생성되는 돌연변이 단백질들은 선별된 리간드(K_D) 에 대해 나노몰 범위(대부분 >100 nM)의 결합친화도를 갖는다.

[0009] 이러한 진전에도 불구하고, 진단 및 치료용의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 적합성을 더 개선시키기 위하여 여전히 선택된 표적 분자들에 대해 증가된, 예를 들면 피코몰 범위의, 결합특성을 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들을 생산하기 위한 방법을 갖을 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

[0010] 따라서, 본 발명은 특정 표적에 대해 높은 결합친화성을 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 제 1 태양으로, 본 발명은 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 생산방법을 제공한다. 상기 돌연변이 단백질

은 검출가능한 결합친화성을 갖는 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비-자연적 리간드와 결합한다. 상기 방법은

[0012] (a) 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 61 및 153에서 시스테인 잔기들을 암호화하는 코돈들 중 적어도 하나의 코돈이 다른 아미노산 잔기로 암호화하도록 돌연변이시키고, 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열 위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 및 108 의 적어도 어느 하나의 코돈에서 사람 눈물 리포칼린을 암호화하는 핵산분자에 돌연변이를 도입함으로써, 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질들을 암호화하는 다수의 핵산을 얻는 단계,

[0013] *(b) 상기 (a)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질 핵산분자(들)을 발현시스템에서 발현시킴으로써, 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 얻는 단계, 및

[0014] (c) 상기 (b)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 증식(enriching)하고, 선택(selection) 및/또는 분리(isolation)를 통하여 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비-자연적 리간드에 대해 검출가능한 결합친화성을 갖는 단계를 포함한다.

[0015] 본 발명자들은 놀랍게도 시스테인 잔기 61 및 153 에 의해 형성된 야생형 눈물 리포칼린의 구조적 이황화결합(disulfide bond)의 제거(Breustedt, et al. (2005), The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J. Biol. Chem.* 280, 484-493 참조.)는 구조적으로 안정할 뿐 아니라 특정의 비-자연적 리간드와 낮은 피코몰 범위의 친화도로 결합할 수 있는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 제공한다는 것을 발견하였다. 또한 구조적 이황화 결합의 제거는 본 발명의 돌연변이 단백질에 비자연적인 인공 이황화 결합들을 자연발생적으로 또는 의도적으로 도입시킴으로써, 예를 들어 돌연변이 단백질들의 안정성을 증가시키는 추가적인 이점을 제공할 것으로 생각된다.

[0016]

[0017] 본 명세서에 사용된 "돌연변이 생성(mutagenesis)" 이라는 용어는 사람 눈물 리포칼린(Swiss-Prot data bank entry P31025)의 특정 서열위치에서 자연적으로 발생하는 아미노산이 각각의 자연적 폴리펩티드 서열에서는 그 특정 위치에 나타나지 않는 적어도 하나의 아미노산에 의해 치환될 수 있도록 실험조건이 결정되는 것을 말한다. 또한 "돌연변이 생성(mutagenesis)" 이라는 용어는 하나 또는 그 이상의 아미노산들의 결실 또는 삽입에 의한 서열단편 길이의 (추가적인) 변형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 어떤 서열위치에서 하나의 아미노산이 3개의 임의적인 돌연변이에 의해 치환되어, 야생형 단백질보다 2개의 아미노산 잔기가 추가된 경우도 본 발명의 범주 내에 속하게 된다. 상기 삽입 또는 결실은 본 발명에서 돌연변이 생성이 일어날 수 있는 어떠한 펩티드 단편들에서도 독립적으로 일어날 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 여러 돌연변이들의 삽입은 결정된 리포칼린 골격(scaffold)의 루프 AB로 도입될 수 있다(국제특허출원 WO 2005/019256 참조). "임의적 돌연변이 생성(random mutagenesis)" 이라는 용어는 어떤 특정 서열위치에 미리 결정된 어떠한 단일 아미노산(돌연변이)이 존재하지는 않지만, 적어도 두 개의 아미노산이 돌연변이 생성 동안에 어떤 미리 결정된 서열 위치에서 어느 정도의 확률로 삽입될 수 있다는 것을 의미한다.

[0018] 사람 눈물 리포칼린의 암호화서열(Redl, B. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20282-20287) 은 본 발명에서 선택된 펩티드 단편의 돌연변이 생성을 위한 시작점으로 이용된다. 당업자라면 상기 열거된 아미노산 위치들의 돌연변이 생성을 위하여 다양한 공지의 표준적인 점 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis) 방법을 임의로 사용할 수 있다(Sambrook, J. et al. (1989), *supra*). 흔히 사용되는 방법의 하나는 합성 올리고뉴클레오티드 혼합물을 사용한 PCR을 이용하여 돌연변이들을 도입시키는 것이며, 이것은 원하는 서열위치들에 축퇴성(degenerate) 염기 구성을 제공한다. 예를 들면, 코돈 NNK 또는 NNS (wherein N = adenine, guanine or cytosine or thymine; K = guanine or thymine; S = adenine or cytosine)의 사용은 돌연변이 생성 동안, 모든 20 아미노산들과 암베르(amber) 정지코돈을 삽입시킨다. 반면에, 예를 들어 코돈 VVS 는 Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val 들이 폴리펩티드 서열의 선택된 위치에 삽입되는 것을 막기 때문에 삽입될 수 있는 아미노산들의 수를 12로 제한시키며, 코돈 NMS (wherein M = adenine or cytosine) 의 사용은 Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val 이 선택된 서열위치에 삽입되는 것을 막기 때문에 선택된 서열위치에서 가능한 아미노산의 수를 11로 제한시킨다. 이러한 점에서 (일반적인 20 개의 자연적으로 발생하는 아미노산들이 아닌) 셀레노시스테인(selenocystein) 또는 피로라이신(pyrrolysine)과 같은 다른 아미노산들에 대한 코돈들 역시 돌연변

이 단백질의 핵산으로 삽입될 수 있다. Wang, L., et al. (2001) *Science* **292**, 498-500, or Wang, L., and Schultz, P.G. (2002) *Chem. Comm.* **1**, 1-11 에 기술된 바와 같이, 예를 들어 o-메틸(methyl)-L-티로신(tyrosine) 또는 p-아미노페닐알라닌(aminophenylalanine) 과 같은 일반적이지 않은 아미노산들을 삽입시키기 위해 보통 정지 코돈으로 인식되는 UAG와 같은 "인공" 코돈들을 사용하는 것도 가능하다.

[0019] 예를 들어 이노신(inosine), 8-옥소(oxo)-2'디옥시구아노신 또는 6(2-디옥시(deoxy)-베타-D-리보퓨라노실(ribofuranosyl))-3,4-디하이드로(dihydro)-8H-피리민도(pyrimindo)-1,2-옥사진(oxazine)-7-온(one) (Zaccolo et al. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 589-603) 과 같은, 염기쌍 특이성이 감소된 뉴클레오티드 빌딩블럭(building block)들의 사용은 선택된 서열 단편에 돌연변이를 도입시키기 위한 또다른 방법이다.

[0020] 또다른 가능성은 소위 "트리플릿-돌연변이 생성(triplet-mutagenesis)"이다. 이 방법은 암호화 서열로의 삽입을 위해 각각이 하나의 아미노산을 암호화하는 다른 뉴클레오티드 트리플릿 혼합물들을 이용한다(Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE. 1994 Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **22**, 5600-5607).

[0021] 각각의 폴리펩티드의 선택된 영역에 돌연변이를 도입하는 하나의 가능한 전략은 각각이 돌연변이될 대응하는 서열 단편들의 하나로부터 부분적으로 유래되는 네 개의 올리고뉴클레오티드를 사용하는 것에 근거한다. 이 올리고뉴클레오티드들을 합성할 때, 당업자라면 모든 자연의 아미노산들을 암호화하는 코돈들이 임의적으로 생기도록 돌연변이될 아미노산 위치에 대응되는 뉴클레오티드 트리플릿의 합성을 위해 핵산 빌딩블럭 혼합물들을 이용할 수 있고, 이것은 결국 리포칼린 펩티드 라이브러리를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 첫번째 올리고뉴클레오티드는 그것의 서열에 있어서 - 돌연변이된 위치들 이외에 - 리포칼린 폴리펩티드의 N-말단 끝 위치에서 돌연변이될 펩티드 단편에 대한 암호화 사슬에 대응된다. 따라서, 두 번째 올리고뉴클레오티드는 폴리펩티드 서열에 따라 두 번째 서열 단편을 위해 비-암호화 사슬과 대응된다. 세 번째 올리고뉴클레오티드는 대응되는 세 번째 서열 단편을 위해 차례로 암호화 사슬에 대응된다. 마지막으로, 네 번째 올리고뉴클레오티드는 네 번째 서열 단편을 위해 비암호화 사슬에 대응된다. 각각의 첫번째 및 두번째 올리고뉴클레오티드로, 개별적으로, 필요하다면, 각각의 세번째 및 네번째 올리고뉴클레오티드로 PCR을 수행할 수 있다.

[0022] 이들 반응 모두의 증폭산물들은 알려져 있는 다양한 방법들에 의해 선택된 위치에 돌연변이가 삽입된 첫번째부터 네번째까지의 서열단편들을 포함하는 하나의 핵산으로 결합될 수 있다. 이 산물들 모두는 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 매개 핵산 분자들뿐 아니라 인접하는 올리고뉴클레오티드들을 이용한 새로운 PCR 반응에 이용될 수 있으며, 이것은 그 서열을 두 번째 및 세번째 서열 단편들 사이에 줄 수 있다. 돌연변이 생성에 사용되는 올리고뉴클레오티드 서열 안의 개수 및 배치의 선택에 있어서, 당업자는 여러 가지 대안들을 임의로 선택할 수 있다.

[0023] 상기 정의된 핵산분자들은 리포칼린 폴리펩티드 및/또는 벡터를 암호화하는 핵산의 잃어버린 5'- 및 3'- 서열로 접합시켜 연결될 수 있으며, 알려진 숙주 생물체에 클론될 수 있다. 접합 및 클로닝은 잘 알려진 여러 방법들을 사용하여 수행할 수 있다 (Sambrook, J. et al. (1989), *supra*). 예를 들어, 클로닝 벡터 서열에도 나타나는 제한효소 인식서열은 합성 올리고뉴클레오티드 서열 내로 설계될 수 있다. 따라서, 각각의 PCR 산물의 증폭 및 효소에 의한 절단이 끝난 뒤 생기는 단편은 대응되는 인식 서열을 사용하여 쉽게 클론될 수 있다.

[0024] 돌연변이 생성을 위해 선택된 단백질을 암호화하는 유전자 내에 더 긴 서열 부분들은 알려져 있는 방법, 예를 들어 에러 발생율이 높은 조건에서의 PCR반응을 이용하거나, 화학적 돌연변이 생성에 의하거나, 또는 돌연변이를 유발하는 박테리아 종들을 이용하여 임의적 돌연변이 생성에도 사용할 수 있다. 그러한 방법들은 리포칼린 돌연변이 단백질의 표적 친화성 또는 특이성의 최적화를 위해서도 사용될 수 있다. 실험적 돌연변이 생성의 단편들 외부에서 일어날 수 있는 돌연변이들은 종종 묵인되거나 심지어 예를 들어, 그것들이 리포칼린 돌연변이 단백질의 증가된 접힘 효율 또는 접힘 안정성에 기여한다면 유용한 것으로 입증될 수 있다.

[0025] 본 명세서에 사용된 "사람 눈물 리포칼린(human tear lipocalin)" 이란 용어는 SWISS-PROT 데이터뱅크 수납번호 P31025의 성숙한 사람 눈물 리포칼린을 지칭한다.

[0026] "비자연적 리간드(non-natural ligand)" 라는 용어는 어떤 화합물을 지칭하며, 생리학적 조건들에서 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린에 한정되는 것은 아니다. 표적(리간드)은 면역학적 부착소(immunological hapten), 스테로이드 호르몬과 같은 호르몬 또는 바이오폴리머 또는 그 단편, 예를 들어, 단백질 또는 단백질 도메인, 펩티드, 올리고디옥시뉴클레오티드, 핵산, 올리고- 또는 다당류 또는 그것의 컨쥬게이트(conjugate), 지질 또는 다른 거대분자들의 특성을 나타내는 자유 또는 연결(conjugated) 형태의 화합물이 될 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예로서, 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 생산방법은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106, 및 108의 어느 코돈에서 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 또는 17의 돌연변이를 포함한다. 또다른 실시예로서 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 56, 57, 58, 80, 83, 104, 105, 106, 및 108의 모든 18 코돈들이 돌연변이된다.

[0028] 본 발명의 또다른 태양으로, 본 발명은 특정한 사람 눈물 리포칼린의 비자연적 리간드와 검출가능한 결합친화도로 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 생산방법으로서,

[0029] (a) 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 34, 80, 및 104 중 적어도 어느 하나의 코돈에서 사람 눈물 리포칼린을 암호화하는 핵산분자에 돌연변이를 도입함으로써, 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질들을 암호화하는 다수의 핵산을 얻는 단계,

[0030] (b) 상기 (a)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질 핵산분자(들)을 발현시스템에서 발현시킴으로써, 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 얻는 단계, 및;

[0031] (c) 상기 (b)단계에서 얻은 하나 또는 그 이상의 돌연변이 단백질(들)을 증식(enriching)하고, 선택(selection) 및/또는 분리(isolation)를 통하여 사람 눈물 리포칼린의 특정한 비자연적 리간드에 대해 검출가능한 결합친화성을 갖는 단계를 포함하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 생산방법을 포함한다.

[0032] 상기 언급한 방법의 일실시예로서, 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26-33, 56-58, 83, 105-106, 및 108의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 또는 15 코돈들에서 돌연변이가 발생한다.

[0033] 본 발명의 실시예로서, 본 발명에 따른 상기 방법들은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 61 및 153에서 시스테인 잔기들을 암호화하는 코돈들 모두의 돌연변이를 포함한다. 일실시예로서, 서열위치 61은 알라닌, 페닐알라닌, 리신, 아르기닌, 스레오닌(threonin), 아스파라긴, 티로신, 메티오닌, 세린, 프롤린 또는 트립토판 잔기를 암호화하도록 돌연변이된다. 서열위치 153이 돌연변이된 실시예들에서, 세린 또는 알라닌과 같은 아미노산이 서열위치 153에 도입될 수 있다.

[0034] 본 명세서에 기술된 본 발명의 또다른 실시예에서, 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 111 및/또는 114 를 암호화하는 코돈들은 예를 들어, 서열위치 111에서 아르기닌을 및 서열위치 114에서 트립토판을 암호화하도록 돌연변이 된다.

[0035] 본 발명의 방법들의 또다른 실시예는 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 101에서 시스테인을 암호화하는 코돈의 돌연변이 생성으로 이 코돈이 다른 아미노산을 암호화하도록 하는 것과 관련된다. 일실시예로서 서열위치 101을 암호화하는 돌연변이된 코돈은 세린을 암호화한다. 따라서, 일부 실시

예들에서, 서열위치 61, 101 및 153에서 시스테인 코돈들 중 두 개 또는 세 개의 코돈 모두는 또다른 아미노산 코돈에 의해 치환된다.

[0036] 본 발명의 방법에 따른 돌연변이 단백질은 사람 눈물 리포칼린을 암호화하는 핵산으로부터 시작하여 얻어진다. 그러한 핵산을 돌연변이시켜 재조합 DNA 기술을 이용하여 적절한 박테리아 또는 진핵생물 숙주로 도입시킬 수 있다. 눈물 리포칼린의 핵산 라이브러리는 항체-유사 성질을 갖는 리포칼린 돌연변이 단백질, 즉 주어진 표적에 대해 친화성을 갖는 돌연변이 단백질을 생산하기 위한 당업계에 알려진 적절한 기술들을 이용하여 얻을 수 있다. 그러한 조합적인 방법들의 예는 국제특허출원 WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256, 또는 WO 2006/56464 등에 자세히 기술되어 있다. 이들 특허출원 각각의 내용은 본 명세서에 참고문헌으로 삽입되어 있다. 적절한 숙주에서 돌연변이 생성의 대상이 되는 핵산 서열의 발현 후에, 다수의 각각의 리포칼린 돌연변이 단백질들의 유전정보를 나르는, 특정 표적에 결합하는 클론들은 얻어진 라이브러리로부터 선택할 수 있다. 이러한 클론들을 선택하는데 파지 디스플레이 (Kay, B.K. et al. (1996) *supra*; Lowman, H.B. (1997) *supra* or Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *supra*), 콜로니 스크리닝 (Pini, A. et al. (2002) *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **5**, 503-510), 리보솜 디스플레이 (Amstutz, P. et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 400-405) 또는 mRNA 디스플레이 (Wilson, D.S. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3750-3755) 또는 WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256, 또는 WO 2006/56464에 기술된 방법들과 같은 잘 알려진 기술들을 사용할 수 있다..

[0037] 상기 개시와 일치하여, 단계 (c) 는 상기 방법들의 또다른 실시예에서 추가로 다음 단계를 포함한다:

[0038] (i) 예를 들어, 면역학적 부착소(immunological hapten), 펩티드, 단백질 또는 다당류와 같은 다른 거대분자, 핵산분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA) 또는 전체 바이러스 입자 또는 바이로이드(viroid)의 특징을 보이는 자유 또는 결합 형태의 화합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 화합물을 특정 리간드로 제공하는 단계,

[0039] (ii) 상기 리간드 및 상기 리간드에 대해 결합친화도를 갖는 돌연변이 단백질들 간에 복합체 형성을 가능하게 하기 위해 다수의 돌연변이 단백질들을 상기 리간드와 접촉시키는 단계, 및

[0040] (iii) 결합친화도가 없거나 실질적인 결합친화도가 없는 돌연변이 단백질을 제거하는 단계.

[0041] 본 발명의 일부 실시예들에서, 리간드는 단백질 또는 그 단편일 수 있다. 이들 실시예들 중 하나에서는 사람 T-세포 공동수용체 CD4 에 결합하는 돌연변이 단백질들은 제외된다.

[0042] 본 발명의 방법에 따른 일실시예에서, 단계 (c)에서의 선택은 경쟁적 조건하에서 수행된다. 본 명세서에 사용된 경쟁적 조건(Competitive condition)들은 돌연변이 단백질들의 선택이 돌연변이 단백질들과 사람 눈물 리포칼린(표적)의 특정한 비자연적 리간드가, 돌연변이 단백질들의 표적에의 결합과 경쟁하는 추가적인 리간드의 존재하에서 접촉하는 적어도 하나의 단계를 포함하는 것을 의미한다. 이러한 추가적인 리간드는 표적의 생리학적 리간드, 과량의 표적 그 자체, 또는 본 발명의 돌연변이 단백질에 의해 인식되는 에피토프(epitope)에 대해 적어도 중복되는 에피토프에 결합하여 돌연변이 단백질들의 표적 결합을 방해하는 다른 비생리학적 리간드일 수 있다. 선택적으로, 추가적인 리간드는 알로스테릭(allosteric) 효과에 의해 돌연변이 단백질의 그 표적에 대한 결합부위와 구별되는 에피토프와 복합체를 형성함으로써 돌연변이 단백질의 결합과 경쟁한다.

[0043] temperent M13 파지를 이용한 파지 디스플레이 기술(Kay, B.K. et al. (1996), *supra*; Lowman, H. B. (1997) *supra* or Rodi, D. J., and Makowski, L. (1999), *supra*)의 실시예가 본 발명에 사용될 수 있는 선택 방법의 예로 제시된다. 본 발명의 돌연변이 단백질 선택에 사용될 수 있는 파지 디스플레이 기술의 또다른 실시예는 하이퍼파지 파지 기술이다(Broders et al. (2003) "Hyperphage. Improving antibody presenttation in phage display." *Methods Mol. Biol.* 205:295-302). f1과 같은 다른 temperent 파지 또는 T7과 같은 용해성 파지 역시 사용될 수 있다. 예시적인 선택 방법으로, 돌연변이된 리포칼린 핵산서열이 N-말단에 신호서열, 바람직하게

는 OmpA-신호서열을 가지고, C-말단에는 파지 M13의 캡시드 단백질 pIII 또는 파지 캡시드(capsid) 내로 삽입될 수 있게 하는 그것의 단편을 가진 융합단백질로 발현되도록 하는 M13 파지미드(phagemid)들이 생산된다. 바람직하게는 야생형 서열의 아미노산 217 부터 406 을 포함하는 파지 캡시드 단백질의 C-말단 단편 ΔpIII 가 융합단백질을 생산하는데 사용된다. 더 바람직한 실시예는, 서열위치 201에서 시스테인 잔기가 사라지거나 다른 아미노산으로 대체되는 pIII의 C-말단 단편이다.

[0044] 따라서, 본 발명에 따른 방법의 추가적 실시예는 특정 리간드의 결합을 위해 적어도 하나의 돌연변이 단백질을 선택하기 위하여, 다수의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하고 3' 말단에서 M13-패밀리의 사상형 박테리오파지의 외피단백질 pIII 또는 이 외피단백질의 단편을 암호화하는 유전자로 돌연변이시켜서 얻은 핵산을 작동가능하도록 융합하는 것과 관련된다.

[0045] 상기 융합단백질은 친화표지와 같은 추가적인 구성부위들을 포함할 수 있으며, 이는 융합단백질 또는 그것의 부분들의 부동화(immobilization), 검출 및/또는 정제를 가능하게 한다. 추가로, 정지코돈은 리포칼린 또는 그것의 돌연변이 단백질을 암호화하는 서열부위와 파지 캡시드 유전자 또는 그것의 단편들을 암호화하는 부위 사이에 위치할 수 있으며, 여기서 정지코돈, 바람직하게는 앰버(amber) 코돈은 적절한 억제 종에서 번역과정동안 적어도 부분적으로는 어떤 아미노산으로 번역된다.

[0046] 예를 들어, 현재는 본 명세서에 사용된 것처럼 pTlc27 로도 불리는 파스미드 벡터 pTLPC27은 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 파지미드 라이브러리를 만드는데 사용될 수 있다. 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 독창적인 핵산분자들은 두 개의 *Bst*XI 제한효소 부위를 이용한 벡터에 삽입된다. 접합시킨 후 *E. coli* XL1-Blue 와 같은 적절한 숙주는 많은 수의 독립적인 클론들을 생산하기 위하여 핵산 혼합물로 형질전환된다. 각각의 벡터는 원한다면 하이퍼파지미드 라이브러리를 위해 생성될 수 있다.

[0047] 만들어지는 라이브러리는 기능적인 파지미드들을 생산하기 위하여 연속적으로 액체 배지에서 적절한 M13-헬퍼 파지 또는 하이퍼파지로 중복감염된다. 보통 융합단백질의 N-말단 신호서열은 잘려나가는 반면에, 재조합 파지미드는 외피단백질 pIII 또는 그것의 단편과의 융합으로 표면에 리포칼린 돌연변이 단백질을 나타낸다. 반면에, 그것은 헬퍼 파지로부터 공급되는 하나 또는 그 이상 반복의 야생형 캡시드 단백질 pIII 도 가지며, 따라서 수용체, 일반적으로 F- 또는 F'-플라스미드를 가지는 박테리아 균주를 감염시킬 수 있다. 하이퍼파지 디스플레이의 경우, 하이퍼파지미드들은 야생형 캡시드 단백질이 아닌 감염성 외피단백질 pIII 와의 융합으로 그것의 표면에 리포칼린 돌연변이 단백질을 보인다. 헬퍼 파지 또는 하이퍼파지로 감염시키는 동안 또는 감염시킨후에, 리포칼린 돌연변이 단백질 및 캡시드 단백질 pIII간 융합단백질의 유전자 발현은, 예를 들어 안하이드로테트라사이클린(anhydrotetracycline)의 첨가에 의해 유도될 수 있다. 유도조건은 얻어진 파지미드의 상당 부분이 그것의 표면에 적어도 하나의 리포칼린 돌연변이 단백질을 나타내도록 선택된다. 하이퍼파지 디스플레이의 경우에 유도조건들은 리포칼린 돌연변이 단백질 및 캡시드 단백질 pIII로 이루어진 세 개에서 다섯 개의 융합단백질들을 옮기는 하이퍼파지미드들을 만든다. 파지미드들을 분리하기 위하여 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol)로 침전시키는 것과 같은 다양한 방법들이 알려져 있다. 분리(Isolation)는 일반적으로 6-8 시간의 배양기간 후에 일어난다.

[0048] 그 후 분리된 파스미드들은 원하는 표적과 함께 배양시켜 선택될 수 있다. 상기 표적은 그것의 외피에 융합단백질로서 원하는 결합친화도를 갖는 돌연변이 단백질들을 옮기는 파지미드들의 적어도 일시적인 부동화(immobilization)를 허용하는 형태로 나타난다. 당업자에게 알려져 있는 다양한 실시예들 중에서 상기 표적은, 예를 들어, 혈청 알부민과 같은 운반 단백질과 결합될 수도 있고, 이 운반 단백질을 통하여 단백질 결합표면, 예를 들어 폴리스티렌에 결합될 수 있다. 바람직하게는 상기와 같은 표적의 부동화에 ELISA 기술에 적합한 미세적정 플레이트(Microtiter plate) 또는 소위 "면역막대(immuno-sticks)"를 이용할 수 있다. 선택적으로, 비오틴(biotin)과 같은 다른 결합 그룹들을 가진 표적들의 컨쥬게이트 (conjugate) 들도 이용될 수 있다. 그 후 상기 표적은 이 그룹에 선택적으로 결합하는 표면, 예를 들어 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin) 또는 아비딘(avidin)으로 덮힌 미세적정 플레이트 또는 상자성입자(paramagnetic particle) 상

에 부동화될 수 있다. 만약 상기 표적이 면역글로불린(immunoglobulin)의 Fc 부위에 융합된다면, 부동화 역시 표면, 예를 들어 미세적정 플레이트 또는 상자성 입자들과 함께 성공할 수 있으며, 이는 단백질 A 또는 단백질 G로 덮힌다.

[0049] 상기 표면들에 나타나는 비특이적 파지미드 결합부위는 블로킹(blocking) 용액들로 포화될 수 있으며, 이것은 ELISA 법으로 알려져 있다. 그 후 파지미드들은 일반적으로 생리학적 버퍼의 존재하에 상기 표면에 부동화된 표적과 접촉하게 된다. 결합되지 않은 파지미드들은 여러번의 세척으로 제거된다. 그 후 표면에 남아있는 파지미드 입자들은 용출된다. 용출을 위해 여러 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 파지미드들은 단백질분해효소의 첨가에 의해 용출되거나 산, 염기, 세제 또는 카오트로픽 소금(chaotropic salts)의 존재 하에서 또는 중성의 변성 조건하에서 용출될 수 있다. 선호되는 방법은 용출액이 연속적으로 중성화되는 pH 2.2의 버퍼를 사용하는 용출이다. 선택적으로, 파지미드에 결합하기 위한 부동화된 표적과 경쟁하기 위해 자유 표적 용액이 첨가되거나 면역글로불린 또는 특이적으로 흥미있는 표적에 결합하는 자연적 리간딩 단백질들과의 경쟁으로 표적-특이적 파지미드들이 용출될 수 있다.

[0050]

[0051] 그 후에, *E. coli* 세포들은 용출된 파지미드들로 감염된다. 선택적으로, 핵산들은 용출된 파지미드들로부터 추출될 수 있고, 서열분석, 증폭 또는 다른 방식의 세포 형질전환에 사용된다. 이러한 방식으로 얻은 *E. coli* 클론들로부터 시작하여, 신선한 파지미드들 또는 하이퍼파지미드들은 M13 헬퍼 파지들 또는 상술한 방법에 따른 하이퍼파지로 중복감염시켜 다시 생산되고, 이러한 방식으로 증폭된 파지미드들은 다시 한번 부동화된 표적 상의 선택에 사용된다. 본 발명의 돌연변이 단백질을 가진 파지미드들을 충분한 양으로 얻기 위해 종종 복합적인 선택 사이클이 필요하다. 바람직하게 선택 사이클의 수는 연속적인 기능분석에서 적어도 0.1 % 의 연구된 클론들이 특정 표적에 대해 탐지가능한 친화도를 갖는 돌연변이 단백질을 생산하도록 선택된다. 크기, 즉 사용된 라이브러리의 복잡성에 따라서, 일반적으로 2 에서 8 사이클이 필요하다.

[0052] 선택된 돌연변이 단백질들의 기능분석을 위하여, *E. coli* 균주를 선택 사이클로부터 얻은 파지미드들로 감염시키고, 그에 대응하는 이중사슬 파스미드 DNA를 분리하였다. 이 파스미드 DNA로부터 시작하거나 파지미드들로부터 추출한 단일-사슬 DNA로부터 시작하여, 본 발명의 선택된 돌연변이 단백질의 핵산 서열은 당업계에 알려진 방법으로 결정될 수 있고, 아미노산서열 역시 그로부터 추론할 수 있다. 전체 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 돌연변이된 부분 또는 서열은 또다른 발현벡터에 서브클론될 수 있고, 적절한 숙주생물체에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 현재는 pTlc26 으로도 불리는 벡터 pTLPC26 는 *E.coli* TG1 과 같은 *E. coli* 균주에서 발현시키는데 사용될 수 있다. 따라서 생산된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 다양한 생화학적 방법으로 정제될 수 있다. 생산된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들은, 예를 들어 pTlc26으로, 그들의 C-말단에서 친화 펩티드 *Strep*-tag II (Schmidt et al., supra)를 운반하고, 따라서 바람직하게는 스트렙타비딘(streptavidin) 친화 크로마토그라피로 정제될 수 있다.

[0053] 상기 선택은 다른 방법들로 수행할 수도 있다. 대응되는 많은 실시예들이 당업계에 알려져 있거나 문헌에 기술되어 있다. 추가로, 상기 방법들의 조합도 가능하다. 예를 들어, "파지 디스플레이(phage display)"에 의해 선택되거나 적어도 증가된(enriched) 클론들은 추가적으로 "콜로니 스크리닝(colony screening)"의 대상이 될 수 있다. 이 방법은 개개의 클론들이 특정 표적에 대해 탐지가능한 결합친화도를 갖는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 생산에 대하여 직접적으로 분리될 수 있는 장점을 갖는다.

[0054] "파지 디스플레이(phage display)" 기술 또는 "콜로니 스크리닝(colony screening)" 방법에서 숙주생물체로서 *E. coli* 뿐 아니라, 다른 박테리아 균주들, 효모 또는 곤충 세포들 또는 포유동물 세포들 역시 사용될 수 있다. 상술한 임의적 라이브러리로부터의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 선택에 더하여, 제한적 돌연변이 생성을 포함한 진화 방법들 역시 반복된 스크리닝 사이클 후에 표적 친화성 또는 특이성의 측면에서 이미 표적에 대해 약간의 결합친화도를 갖는 돌연변이 단백질을 최적화하기 위하여 사용될 수 있다.

[0055] 일단 특정 표적에 대해 친화성을 갖는 돌연변이 단백질을 선택했다면, 연속적으로 더 높은 친화도를 갖거나 높은 열안정성, 증가된 혈장 안정성, 열역학적 안정성, 증가된 용해성, 증가된 단량체성(monomeric behavior), 열변성, 화학적 변성, 단백분해(proteolysis) 또는 세제 등에 대한 증가된 저항성과 같은 증가된 특성들을 갖는 변이체들을 선별하기 위하여, 추가적으로 돌연변이 단백질들을 또다른 돌연변이 생성 대상으로 하는 것도 가능하다. 더 높은 친화성을 목표로 하는 경우에는 시험관내 "친화도 성숙(affinity maturation)"으로 여겨지는 이러한 추가적인 돌연변이 생성은 합리적 디자인 또는 임의적 돌연변이에 기초한 부위 특이적 돌연변이에 의해 성취될 수 있다. 더 높은 친화도 또는 증가된 특성들을 얻기 위한 또다른 가능한 접근은, 리포칼린 돌연변이 단백질의 선택된 범위의 서열위치들에 대해 점 돌연변이를 일으키는, 에러율이 높은(error-prone) PCR의 이용이다. 에러율이 높은(error-prone) PCR은 Zaccolo et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 589-603 에 기술된 것과 같은 알려진 프로토콜에 따라 수행할 수 있다. 그러한 목적에 적합한 임의적 돌연변이 생성의 다른 방법들은 Murakami, H et al. (2002) Nat.Biotechnol. 20, 76-81에 기술된 임의적 삽입/결손 (RID) 돌연변이 생성 또는 Bittker, J. A et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20,1024-1029에 기술된 비상동성 임의적 재조합(nonhomologous random recombination, NRR)을 포함한다. 원한다면, 디고시게닌(digoxigenin)에 대해 높은 친화도를 갖는 바이린(bilin)-결합 단백질의 돌연변이 단백질을 얻을 수 있는, 친화도 성숙(affinity maturation) 역시 WO 00/75308 또는 Schlehuber, S. et al., (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120 에 기술된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0056] 또다른 측면에서, 본 발명은 상술한 방법에 의해 얻어지거나 얻을 수 있는 사람 눈물 리포칼린의 특정 비자연적 리간드에 대한 검출가능한 결합친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질을 제공한다.

[0057] 일실시예로서, 상술한 방법에 의해 얻어진 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 서열위치 61 및 153 각각에서 일어나는 시스테인 잔기들의 적어도 어느 하나 또는 모두의 다른 아미노산으로의 치환 및 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106, 및 108의 어느 하나에서 적어도 하나의 아미노산 잔기의 돌연변이를 포함한다. 눈물 리포칼린의 베타-배럴 구조의 열린 끝에 있는 결합 부위에서 서열위치 24-36 은 AB 루프(loop)에 포함되고, 서열위치 53-66 은 CD 루프에 포함되며, 서열위치 69-77 은 EF 루프에 포함되며, 서열위치 103-110 은 GH 루프에 포함된다. 본 명세서에서 이러한 4개의 루프의 정의는 Flower (Flower, D.R. (1996), *supra* 및 Flower, D.R. et al. (2000), *supra*)에 따른다. 보통, 그러한 돌연변이 단백질은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106, 및 108에서 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 또는 18 돌연변이 아미노산 잔기들을 포함한다. 구체적인 실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 다음의 아미노산 치환을 포함한다: Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Tyr, Met, Ser, Pro 또는 Trp; 및 Cys 153 → Ser 또는 Ala. 상기 치환은 자연적으로 발생하는, Cys 61 및 Cys 153을 연결하는 이황화 다리(disulphide bridge)의 형성을 막는데 유용하여 돌연변이 단백질을 다루는데 유용한 것으로 입증되었다.

[0058]

[0059] 또다른 실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 Arg 111 → Pro 및 Lys 114 → Trp 으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가적인 아미노산 치환을 포함한다. 추가로 본 발명의 돌연변이 단백질은 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 서열위치 101에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있는 시스테인을 포함할 수 있다. 이러한 치환은, 예를 들면, Cys 101 → Ser 또는 Cys 101 → Thr 으로의 돌연변이일 수 있다.

[0060] 돌연변이 단백질이 결합하는 비자연적 리간드는 일부실시예들에서 사람 T-세포 공동수용체(coreceptor) CD4가 비자연적 표적으로 배제될 수 있는 조건을 갖는 단백질 또는 그것의 단편일 수 있다.

[0061] 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질은 돌연변이된 아미노산 서열위치들을 제외하고는 야생형(자연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 반면에, 본 명세서에 기술된 리포칼린 돌연변이 단백질들은 그 돌연변이 단백질들의 결합 활성 및 접힘을 방해하지 않는 한, 돌연변이 생성의 대상이 된 서열위치들 이외에 아미노산 돌연변이들을 가질 수 있다. 그러한 돌연변이들은 이미 수립된 표준 방법(Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)을 이용하여 DNA 수준에서 쉽게 만들 수 있다. 아미노산 서열의 가능한 변경은 아미노산 치환뿐 아니라 삽입 또는 결손도 있

다. 상기 치환은 보존적일 수 있다. 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 치환된다. 보존적 치환들의 예는 다음 그룹들의 멤버 사이에서의 치환들이다: 1) 알라닌, 세린 및 스레오닌(threonine); 2) 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid); 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 리신; 5) 아이소루신, 루신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 반면에, 아미노산 서열에 비보존적 변경을 도입하는 것도 가능하다. 추가로, 단일 아미노산 잔기를 치환하는 대신에, 이러한 결실 또는 삽입이 안정하게 접힌/기능적 돌연변이 단백질을 만드는 한(예를 들어, 끝이 잘린(truncated) N- 및 C-말단을 가진 돌연변이 단백질들이 생성되는 실험 섹션 참조), 눈물 리포칼린의 1차 구조의 하나 또는 그 이상의 연속적인 아미노산들을 삽입하거나 결실시키는 것도 가능하다.

[0062] 아미노산 서열의 그러한 변형들은, 특정 제한효소에 대한 절단부위를 삽입시킴으로써 돌연변이된 리포칼린 유전자 또는 그것의 부분들의 서브클로닝을 단순화시키기 위하여, 단일 아미노산 위치의 유도된 돌연변이 생성을 포함한다. 추가로, 이러한 돌연변이들은 특정 표적에 대한 리포칼린 돌연변이 단백질의 친화도를 더 증가시키기 위하여 삽입될 수도 있다. 게다가, 돌연변이들은 필요하다면 접힘 안정성, 혈장내 안정성, 단백질 저항성 또는 수용성을 증가시키거나 응집을 감소시키는 것과 같이 돌연변이 단백질의 특정 성질을 변화시키기 위하여 삽입될 수 있다. 예를 들면, 자연적으로 발생하는 시스테인 잔기는 이황화다리(disulphide bridge) 형성을 막기 위하여 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다. 하지만, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 히드록시에틸 녹말(HES), 비오틴(biotin), 펩티드 또는 단백질들과 같은 다른 화합물들과의 연결 또는 비자연적으로 발생한 이황화결합의 형성과 같은 새로운 활성그룹들의 도입을 위하여 다른 아미노산 서열위치를 의도적으로 시스테인으로 돌연변이시키는 것도 가능하다. 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 아미노산 서열에 시스테인 잔기를 도입시키는 것과 같은 돌연변이의 대표적인 가능성들은 Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys, 및 Glu 131 → Cys 으로의 치환들을 포함한다. 아미노산 위치 40, 73, 90, 95 및/또는 131 의 어느 한 편에서 발생된 티올(thiol) 일부는, 예를 들어 각각의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 혈장내 반감기를 증가시키기 위하여, 돌연변이 단백질을 PEG화 또는 HES화시키는데 이용될 수 있다. 이러한 서열위치들에서 시스테인이 삽입된 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (실시예 46 참조) 은 본 발명의 그러한 돌연변이 단백질의 실례이다.

[0063] 본 발명은 성숙한 사람 눈물 리포칼린 서열의 처음 네 개의 N-말단 아미노산 잔기들 (His-His-Leu-Leu; 서열위치 1-4) 및/또는 성숙한 사람 눈물 리포칼린 서열의 마지막 두 개의 C-말단 아미노산 잔기들 (Ser-Asp; 서열위치 157-158) 이 결손된 (실시예 및 서열목록 참고), 상기와 같이 정의된 돌연변이 단백질들도 포함한다

[0064] 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질들은 탐지가능한 친화도, 즉 적어도 200 nM의 해리상수(dissociation constant)로 원하는 표적과 결합할 수 있다. 바람직한 것은 특정 표적에 대해 적어도 100, 20, 1 nM 또는 그보다 낮은 해리상수로 결합하는 리포칼린 돌연변이 단백질이다. 바라는 표적에 대한 돌연변이 단백질의 결합친화도는 형광 적정, 경쟁 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) (BIAcore) 과 같은 다양한 방법으로 측정할 수 있다.

[0065] 복합체 형성이 결합파트너의 농도, 경재자들의 존재, 버퍼 시스템의 이온강도 등과 같은 여러 요인들에 의존적이라는 것은 당업자에게 자명하다. 선택 및 증식(enrichment)은 일반적으로, 원하는 표적과 복합체를 형성하며, 적어도 200 nM의 해리상수를 갖는 리포칼린 돌연변이의 분리를 허용하는 조건 하에서 수행된다. 하지만, 세척 및 용출 단계들은 다양한 조건하에서 수행될 수 있다. 동역학적 특성에 관한 분리도 가능하다. 예를 들어, 상기 선택은 표적으로부터의 해리속도가 느린, 환언하면 낮은 k_{off} 값을 갖는 돌연변이 단백질과 표적이 복합체를 형성하는 것이 선호된는 조건 하에서 수행될 수 있다. 선택적으로, 상기 선택은 돌연변이 단백질과 표적간에 빠른 복합체 형성이 선호되는, 환언하면 높은 k_{on} 값을 갖는 조건하에서 수행될 수 있다. 더 예시적인 선택으로서, 상기 스크리닝은 (야생형 눈물 리포칼린 또는 이미 선택된 표적에 대해 친화도를 갖는 돌연변이 단백질에 비하여) 증가된 열안정성을 갖는 돌연변이 단백질을 선택하기 위한 조건하에서 수행될 수 있다.

[0066] 본 발명의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 일반적으로 단량체 단백질로 존재한다. 하지만, 본 발명의 리포칼

린 돌연변이 단백질이 자연발생적으로 이량체화되거나 올리고머화될 수 있다. 안정한 단량체들을 형성하는 리포칼린 돌연변이 단백질의 사용이 일부 응용들을 위해 선호될 수도 있으나, 예를 들어 더 빠른 확산 및 더 나은 조직침투 때문에, 다른 예들에서 자연발생적으로 안정한 동종이량체(homodimer) 또는 다량체(multimer)를 형성하는 리포칼린 돌연변이 단백질의 사용이 유리할 수도 있다. 그러한 다량체들은 일정한 표적에 대하여 더 증가된 친화도 및/또는 갈망을 제공할 수 있기 때문이다. 추가로, 리포칼린 돌연변이 단백질의 올리고머 형태들은 더 느린 해리속도 또는 지연된 혈장내 반감기를 가질 수 있다. 만약 안정한 단량체를 형성하는 돌연변이 단백질의 이량체화 또는 다량체화를 원한다면, 예를 들어 준-포스(jun-fos) 도메인 또는 루신-지퍼(leucin-zippers)와 같은 각각의 올리고머화(oligomerization) 도메인을 본 발명의 돌연변이 단백질에 융합시킴으로써 또는 "듀오칼린스(Duocalins)"(아래 참조) 를 이용하여 얻을 수 있다.

[0067] 본 발명의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 특정 표적과의 복합체 형성을 위해 사용될 수 있다. 상기 표적은 비자연적 표적/리간드일 수 있다. 상기 표적(리간드)은 면역학적 부착소(immunological hapten), 스테로이드 호르몬과 같은 호르몬 또는 바이오폴리머(biopolymer)나 그 단편, 예를 들어 단백질 또는 단백질 도메인, 펩티드, 올리고디옥시뉴클레오티드, 핵산, 올리고- 또는다당류 또는 그 컨쥬게이트의 특성을 나타내는 자유 또는 연결 형태의 화합물이 될 수 있다. 본 발명의 일실시예로서, 상기 표적은 사람 T-세포 공동수용체(coreceptor) CD4를 제외한 단백질이다. 상기 단백질은 구형의 용해성 단백질 또는 수용체 단백질, 예를 들어, 세포 신호전달과 관련된 막관통 단백질, MHC 분자와 같은 면역시스템의 구성요소 또는 특정질병의 표지인 세포 표면 수용체가 될 수 있다. 상기 돌연변이 단백질은 단백질의 단편하고만 결합할 수도 있다. 예를 들어, 만약 그것이 세포막에 부착된 수용체의 일부분일 때 돌연변이 단백질은 세포 표면 수용체의 도메인과 결합할 수 있고, 만약 이 도메인이 용해성 단백질로도 생산될 수 있다면 용액상의 같은 도메인에 결합할 수도 있다. 하지만, 본 발명이 그러한 거대분자 표적에만 결합하는 돌연변이 단백질로 제한되는 것은 결코 아니다. 비오틴(biotin), 플루오레세인(fluorescein) 또는 디곡시게닌(digoxigenin)과 같은 (더) 낮은 분자량의 리간드에 특이적 결합친화도를 나타내는 돌연변이 생성으로 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질들을 얻는 것도 가능하다.

[0068] 본 발명의 일실시예로서, 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질에 의해 결합되는 상기 리간드는 혈관내피성장인자(VEGF), 혈관내피성장인자 수용체 2(VEGF-R2), 및 인터루킨 4 수용체 알파사슬(IL-4 receptor alpha) 또는 그것의 단편들로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단백질 또는 그것의 단편이다. 또한 VEGF-R2 또는 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인도 리간드에 포함될 수 있다. 이 리간드들은 일반적으로 포유동물에서 기원된다. 일실시예로서 이 리간드들은 사람으로부터 기원되지만, 예를 들어 마우스, 쥐(rat), 돼지, 말, 개, 고양이 또는 소 또는 시노몰구스(cynomolgus) 로부터 나온 것일 수도 있다. 사람 VEGF는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, 및 VEGF-D 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있고, SWISS PROT 데이터뱅크 수탁번호 P15692, P49765, P49767, 및 043915 (서열번호: 22-25) 에 기술된 아미노산 서열 또는 그것의 단편을 가질 수 있다. 대표적인 단편의 하나는 VEGF-A의 아미노산 8부터 109로 구성된다. 사람 혈관내피성장인자 수용체 2(VEGF-R2)는 SWISS PROT 데이터뱅크 수탁번호 P35968 (서열번호: 21) 의 아미노산 서열 또는 그 단편을 가질 수 있다. 그러한 단편들의 대표적인 예들은, 각각 아미노산 46 부터 110, 141 부터 207, 224 부터320, 328 부터 414, 421 부터 548, 551 부터 660, 및 667 부터 753을 포함하는 VEGF-R2의 세포외 Ig-유사 C2-형 도메인 1부터 7 을 포함한다. 사람 인터루킨-4 수용체 알파 사슬(Human interleukin-4 receptor alpha chain)은 SWISS PROT 데이터뱅크 수탁번호 P24394 (서열번호: 20)의 아미노산 서열 또는 그 단편을 가질 수 있다. 사람 인터루킨-4 수용체 알파 사슬 단편의 대표적인 예는 IL-4 수용체 알파의 아미노산 26 부터 232를 포함한다.

[0069] 일반적으로, 본 명세서에서 본 발명의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 단백질 리간드들에 관하여 사용된 "단편(fragment)"이라는 용어는 N-말단 및/또는 C-말단으로 짧아진 단백질 또는 펩티드 리간드와 관련이 있으며, 이는 본 발명에 따른 돌연변이 단백질에 의해 인식 및/또는 결합될 전장(full length) 리간드의 능력을 갖는다.

[0070] 따라서, 본 발명의 또다른 측면은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 24-36, 53-66, 79-84, 및 103-110 의 어떤 둘 또는 그 이상에서 적어도 하나의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, IL-4 수용체 알파, VEGF-R2 또는 VEGF에 결합하는 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질로 향한다.

[0071] IL-4 수용체 알파와 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 IL-4 길항자(antagonists) 및/또는 IL-13 길항자로 작용할 수 있다. 일실시예에서, 상기 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 사람 IL-4 및/또는 IL-13의 길항자로 작용한다. 또다른 실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 IL-4 및/또는 IL-13과 같은 시노몰구스(cynomolgus) 리간드와 교차반응(cross-reactive)하며, 시노몰구스 IL-4 수용체 알파의 길항자로서 작용한다.

[0072] IL-4 수용체 알파에 결합하는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 관하여 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106, 및 108의 시스테인 잔기들에 의해 적어도 두 개의 야생의 아미노산 잔기들의 아미노산 치환들을 포함한다. 일반적으로, 그러한 돌연변이 단백질은 IL-4 수용체 알파의 세포외 지역 또는 도메인과 200 nM 이하, 100 nM 이하, 20 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 K_D 또는 피코몰 범위의 K_D 로 결합한다. 따라서, 본 발명은 900 pM 이하, 600 pM 이하, 500 pM 이하, 250 pM, 100 pM 이하, 60 pM 이하 또는 40 pM 이하의 K_D 로 IL-4 수용체와 결합하는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질도 포함한다. 돌연변이 단백질 - 리간드 복합체의 K_D 값을 결정하는 적절한 방법들이 당업자에게 알려져 있으며, 형광적정(fluorescence titration), 경쟁(competition) ELISA, 등온적정열량측정법(isothermal titration calorimetry, ITC)과 같은 열량측정법(calorimetric methods), 및 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 포함한다. 그러한 방법들의 예는 예를 들어 실시예 6, 8, 14, 16, 22, 24, 및 27에 잘 기술되어 있다.

[0073] 이러한 맥락에서, 각각의 돌연변이 단백질 및 그것의 리간드 간의 복합체 형성은 각각의 결합파트너들의 농도, 경쟁자들의 존재, pH 및 사용된 버퍼시스템의 이온강도, 및 해리상수 K_D의 결정을 위해 사용된 실험방법(예를 들어 형광적정(fluorescence titration), 경쟁(competition) ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)) 또는 실험데이터의 평가를 위해 사용된 수학적 알고리즘과 같은 많은 다른 요소들에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

[0074] 따라서, 당업자라면 본 명세서에 나온 K_D 값들(dissociation constant of the complex formed between the respective mutein and its ligand)이 어떤 실험 범위내에서는 주어진 리간드에 대한 특정 리포칼린 돌연변이 단백질의 친화도를 결정하는데 사용되는 방법 및 실험 설정에 따라서 변경될 수 있다는 것을 이해할 수 있다. 이것은, 예를 들어 K_D 값이 표면 플라즈몬 공명 (Biacore) 에 의해 결정되었는지 또는 경쟁 ELISA에 의해 결정되었는지에 따라서, 측정된 K_D 값들에서 또는 허용가능한 범위에서 약간의 편차가 있을 수 있다는 것을 의미한다..

[0075] 본 발명의 특정 실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 관하여 Arg 26 → Ser, Pro; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr, His; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly, Ser, Ala, Asp, Lys, Asn, Thr, Arg; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ile, Ala, Arg, Val, Thr, Asn, Lys, Tyr, Leu, Met; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; 및 Lys 108 → Gln 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 6, 8, 10, 12, 14 또는 16 의 아미노산 치환들을 갖는다.

[0076] 추가적으로, 상기 돌연변이 단백질은 Met 39 → Val; Thr 42 → Met, Ala; Thr 43 → Ile, Pro, Ala; Glu 45 → Lys, Gly; Asn 48 → Asp, His, Ser, Thr; Val 53 → Leu, Phe, Ile, Ala, Gly, Ser; Thr 54 → Ala, Leu; Met 55 → Leu, Ala, Ile, Val, Phe, Gly, Thr, Tyr; Glu 63 → Lys, Gln, Ala, Gly, Arg; Val 64 → Gly, Tyr, Met, Ser, Ala, Lys, Arg, Leu, Asn, His, Thr, Ile; Ala 66 → Ile, Leu, Val, Thr, Met; Glu 69 → Lys, Gly; Lys 70 → Arg, Gln, Glu; Thr 78 → Ala; Ile 89 → Val; Asp 95 → Asn, Ala, Gly; 및 Tyr 100 → His으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 더 포함할 수 있다.

[0077] 일실시예로서, IL-4 수용체 알파에 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 다음 아미노산 치환들을 포함한다: Arg 26 → Ser, Glu 27 → Arg, Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala, Leu 33 → Tyr, Leu 56 → Gln, Ile 57 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Arg, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Cys, His 106 → Pro, 및 Lys 108 → Gln.

[0078] 또다른 실시예에서, IL-4 수용체 알파에 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 다음의 아미노산 치환 집합들 중의 하나를 포함한다:

[0079] (1) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ile; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

[0080] (2) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Lys; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Asn; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

[0081] (3) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

[0082] (4) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Ser; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

[0083] (5) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → His; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Ser; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Ala; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln;

[0084] (6) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Asp; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln; 및

[0085] (7) Arg 26 → Ser;Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Tyr; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Gln; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln.

[0086] 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 결합 IL-4 수용체 알파는 서열번호 2-8 또는 그 단편 또는 변형체의 아미노산 서열들을 포함하거나, 그 서열들을 필수 구성요소로 하거나 그 서열들로 구성될 수 있다. 일실시예에서, 본 발명에 따른 돌연변이 단백질은 서열번호 5 또는 6 또는 그 단편 또는 변형체의 아미노산 서열들을 포함하거나, 그 서열들을 필수 구성요소로 하거나 그 서열들로 구성될 수 있다.

[0087] 본 발명의 돌연변이 단백질과 함께 본 발명에 사용된 "단편(fragment)" 이라는 용어는 N-말단 및/또는 C-말단이 짧아진, 즉 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산들 중 적어도 하나가 소실된 전장의 성숙한 사람 눈물 리포칼린으로부터 유래된 단백질 또는 펩티드와 관련이 있다. 상기 단편들은 바람직하게는 적어도 10, 더 바람직하게는 20, 가장 바람직하게는 30 이상의 성숙한 사람 눈물 리포칼린 1차 서열의 연속적인 아미노산들을 포함하고, 보통 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 면역측정(immunoassay)으로 탐지가능하다.

[0088]

[0089] 본 발명에 사용된 "변형체(variant)"라는 용어는, 예를 들어 치환, 결손, 삽입 또는 화학적 변형에 의한 아미노산 서열의 변화를 포함하는 단백질 또는 펩티드의 유도체들과 관련된다. 바람직하게, 그러한 변형들은 단백질 또는 펩티드의 기능을 감소시키지 않는다. 상기 변형체들은 그들 각각의 D-입체이성질체(stereoisomers)에 의해

또는 예를 들어, 오르니틴(ornithine), 히드록시프롤린(hydroxyproline), 시트룰린(citrulline), 호모세린(homoserine), 히드록시리신(hydroxylysine), 노르발린(norvaline)과 같은 자연적으로 발생하는 20개의 아미노산과 다른 아미노산들에 의해 하나 또는 그 이상의 아미노산들이 치환된 단백질들을 포함한다. 하지만, 상기 치환들은 보존적일 수도 있다. 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 다음 그룹의 멤버들 사이의 치환이 보존적 치환들의 예들이다: 1) 알라닌(alanine), 세린(serine), 및 스레오닌(threonine); 2) 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid); 3) 아스파라긴(asparagines) 및 글루타민(glutamine); 4) 아르기닌(arginine) 및 리신(lysine); 5) 이소루신(isoleucine), 루신(leucine), 메티오닌(methionine), 및 발린(valine); 및 6) 페닐알라닌(phenylalanine0, 티로신(tyrosine), 및 트립토판(tryptophan).

[0090] 또다른 측면에서, 본 발명은 혈관내피성장인자 수용체 2(VEGF-R2) 또는 그 외부영역 또는 도메인에 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질과 연관된다. 보통, 상기 돌연변이 단백질은 VEGF 길항자로 작용하며, VEGF-R2 의 외부영역 또는 도메인과 200 nM 이하, 100 nM 이하, 20 nM 이하, 15 nM 이하, 10 nM 이하 또는 심지어 1 nM 이하의 K_D 로 결합한다.

[0091] 상기 돌연변이 단백질은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 관하여 Arg 26 → Ser; Glu 27 → Ile; Glu 30 → Ser; Met 31 → Gly; Asn 32 → Arg; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Tyr; Leu 56 → Lys, Glu, Ala, Met; Ile 57 → Phe; Ser 58 → Arg; Asp 80 → Ser, Pro; Lys 83 → Glu, Gly; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Ala; His 106 → Val; 및 Lys 108 → Thr 으로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 6, 8, 10, 12, 14 또는 16의 아미노산 치환들을 포함할 수 있으며, 추가로 Leu 41 → Phe; Glu 63 → Lys; Val 64 → Met; Asp 72 → Gly; Lys 76 → Arg, Glu; Ile 88 → Val, Thr; Ile 89 → Thr; Arg 90 → Lys; Asp 95 → Gly; Phe 99 → Leu; 및 Gly 107 → Arg, Lys, Glu 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0092] 하나의 구체적인 실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 다음 아미노산 치환들을 포함한다: Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, 및 Lys 108 → Thr.

[0093] VEGF-R2 의 외부영역 또는 도메인과 검출가능한 친화도로 결합하는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 다음 아미노산 치환들의 조합 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다:

[0094] (1) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Lys, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr;

[0095] (2) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Glu, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr;

[0096] (3) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Ala, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr; 및

[0097] (4) Arg 26 → Ser, Glu 27 → Ile, Glu 30 → Ser, Met 31 → Gly, Asn 32 → Arg, Leu 33 → Ile, Glu 34 → Tyr, Leu 56 → Glu, Ile 57 → Phe, Ser 58 → Arg, Asp 80 → Pro, Lys 83 → Glu, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Ala, His 106 → Val, Lys 108 → Thr.

[0098] 본 발명의 일실시예에서, VEGF-R2 와 결합하는 돌연변이 단백질은 서열번호 34-39 의 아미노산 서열들 중 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수 구성요소로 하거나 구성요소로 한다.

[0099] 또다른 측면에서, 본 발명은 혈관내피성장인자(VEGF)와 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질과 연관된다. 보통, 상기 돌연변이 단백질은 VEGF 가 VEGF 수용체에 결합하는 것을 막는 VEGF 길항자로 작용하며, VEGF와 200 nM 이하, 100 nM 이하, 20 nM, 5 nM 이하 또는 심지어 1 nM 이하의 K_D 로 결합한다.

[0100] 본 발명의 방법에 따라 얻을 수 있는 상기 돌연변이 단백질은 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에서 Arg 26 → Ser, Pro, Val, Leu, Ile; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His, Arg, Tyr, Gln; Ile 57 → Val, Thr, Leu; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile, Val; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn, Ser, Asp; 및 Lys 108 → Ala, Val 으로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 6, 8, 10, 12, 14, 16의 아미노산 치환들을 포함할 수 있으며, 추가로 Val 36 → Met; Thr 37 → Ala; Met 39 → Thr; Thr 40 → Ala, Ser; Asn 48 → Asp; Ala 51 → Val; Lys 52 → Arg; Thr 54 → Val; Met 55 → Val; Ser 61 → Pro; Lys 65 → Arg; Ala 66 → Val; Val 67 → Ile; Glu 69 → Gly, Ser, Thr; Lys 76 → Arg, Ile, Ala, Met, Pro; Tyr 87 → Arg, His, Lys, Gln; Ile 89 → Thr, Val, Gly, His, Met, Lys; Arg 90 → Gly; Ile 98 → Val; 및 Gly 107 → Glu으로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0101] 일실시예로서, VEGF 와 결합하는 사람 눈물 리포칼린의 상기 치환은 다음의 아미노산 치환들을 포함할 수 있다: Glu 27 → Gly, Phe 28 → Ala, Pro 29 → Leu, Glu 30 → Arg, Met 31 → Cys, Asn 32 → Leu, Leu 33 → Ala, Glu 34 → Gly, Asp 80 → Ile, Lys 83 → Ile, Glu 104 → Cys, 및 Lys 108 → Val.

[0102] 또다른 구체적인 실시예로서, VEGF 와 결합하는 사람 눈물 리포칼린의 돌연변이 단백질은 다음 아미노산 치환들의 조합 중 어느 하나를 포함할 수 있다:

[0103] (1) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn; Lys 108 → Val;

[0104] (2) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Glu; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

[0105] (3) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Asn; Lys 108 → Val;

[0106] (4) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Arg; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

[0107] (5) Arg 26 → Pro; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile;Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

[0108] (6) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

[0109] (7) Arg 26 → Val; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80

→ Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val;

[0110] (8) Arg 26 → Leu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val; 및

[0111] (9) Arg 26 → Ile; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Ala; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Arg; Met 31 → Cys; Asn 32 → Leu; Leu 33 → Ala; Glu 34 → Gly; Leu 56 → His; Ser 58 → Lys; Asp 80 → Ile; Lys 83 → Ile; Glu 104 → Cys; His 106 → Ser; Lys 108 → Val.

[0112] 본 발명의 일실시예로서, VEGF와 결합하는 본 발명의 돌연변이 단백질은 서열번호 26-33 또는 서열번호 44-47의 아미노산 서열들 중 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수 구성요소로 하거나 구성요소로 한다.

[0113] 또한 그것들의 잠재적인 면역원성(immunogenicity)에 관하여 변화가 생기는 상기 돌연변이 단백질들 역시 본 발명의 범주 내에 속한다.

[0114] 세포독성 T-세포들은 항원전달세포(antigen-presenting cell)의 표면에서 클래스 I 주조직복합체(MHC) 분자와 함께 펩티드 항원들을 인식한다. 펩티드가 MHC 분자들과 결합하는 능력은 대립유전자(allele) 특이적이며, 그들의 면역원성과 상관관계가 있다. 특정 단백질의 면역원성을 감소시키기 위하여, 단백질의 어느 펩티드들이 주어진 MHC 분자와 결합할지를 예측하는 능력은 매우 중요하다. 잠재적인 T-세포 에피토프(epitope)들을 동정하기 위하여 컴퓨터 스레딩 접근(computational threading approach)법을 사용하는 방법이 MHC 클래스 I 분자들에 대한 주어진 펩티드의 결합을 예측하기 위하여 이미 기술되어져 왔다(Altuvia et al. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**: 244-250).

[0115] 상기 접근법은 본 발명의 돌연변이 단백질에서 잠재적인 T-세포 에피토프들을 동정하는데 이용될 수도 있고, 예측된 면역원성에 근거한 특정한 돌연변이 단백질의 선택에도 이용될 수 있다. 추가로, T-세포 에피토프들을 감소시키거나 제거시켜서 면역원성을 최소화하기 위하여, T-세포 에피토프들을 갖는 것으로 예측된 펩티드 영역들에 추가적인 돌연변이 생성을 시키는 것도 가능하다. 유전공학적으로 조작된 항체로부터 나온 양친매성(amphipathic) 에피토프들의 제거는 Mateo et al. (2000) *Hybridoma* **19(6)**:463-471 에 개시되어 있으며, 본 발명의 돌연변이 단백질에 적용될 수 있다.

[0116] 따라서, 상기 돌연변이 단백질은 최소화된 면역원성을 가질 수 있으며, 이것은 아래 기술되는 바와 같이, 치료 및 진단 목적에 유용하다.

[0117] 일부 응용을 위하여, 표지된 형태의 본 발명의 돌연변이 단백질을 사용하는 것도 유용하다. 따라서, 본 발명은 효소 표지(label), 방사성 표지, 유색 표지, 형광 표지, 발색성 표지, 발광성 표지, 부착소(haptens), 디고시게닌(digoxigenin), 비오틴(biotin), 금속 복합체들, 금속들 및 콜로이드성 금으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 표지와 연결된 리포칼린 돌연변이 단백질들과도 연관된다. 상기 돌연변이 단백질은 유기 분자에 연결될 수도 있다. 본 명세서에 사용되는 "유기 분자(organic molecule)"라는 용어는 바람직하게는 적어도 두 개의 탄소 원자들을 포함하는, 그러나 바람직하게는 7 또는 12이상의 회전성 탄소 결합들을 갖지 않으며, 100 에서 2000 달톤(Dalton), 바람직하게는 100 에서 1000 달톤, 사이의 분자량을 갖고, 선택적으로 하나 또는 두 개의 금속 원자들을 포함하는 유기 분자를 의미한다.

[0118] 일반적으로, 화학적, 물리적, 광학적 또는 효소 반응에서 검출가능한 화합물 또는 신호를 직접 또는 간접적으로 발생시키는, 적절한 화학적 물질 또는 효소로 리포칼린 돌연변이 단백질을 표지하는 것이 가능하다. 물리적 반응인 동시에 광학적 반응/마커의 예로서, 빛의 투사에 의한 형광의 방출이나 방사성 표지의 사용에 의한 X선의

방출이 있다. 발색성 반응 산물의 형성을 촉매화하는효소표지들(및 동시에 광학 표지들)의 예들로 알칼린 포스파타제(Alkaline phosphatase), 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase) 또는 베타-갈락토시다제(galactosidase)가 있다. 일반적으로, 흔히 항체들로 사용되는 모든 표지들은 (면역글로불린(immunoglobulins)의 Fc 부분에서 당 부분(sugar moiety)과 배타적으로 사용되는 것들을 제외하고) 본 발명의 돌연변이 단백질에 대한 연결(conjugation)을 위해서도 사용될 수 있다. 본 발명의 돌연변이 단백질은, 예를 들어 상기 물질의 특정 세포, 조직 또는 기관으로의 표적전달을 위하여 또는 예를 들어 주변의 일반 세포들에 영향을 미치지 않고 종양 세포들에 선택적인 타겟팅(targeting)을 하는 등 세포에 선택적인 타겟팅(targeting)을 하기 위하여, 적절한 치료적 활성 물질(therapeutically active agent)과 결합될 수도 있다. 방사핵(radionuclides), 독소(toxins), 유기소분자, 및 (세포 표면 수용체의 작용자(agonists)/길항자(antagonists)로 작용하는 펩티드 또는 특정 세포 표적에서 단백질 결합부위를 위해 경쟁하는 펩티드와 같은) 치료 펩티드(therapeutic peptides) 가 상기 치료적 활성 물질의 예들에 포함된다. 하지만, 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질은 안티센스(antisense) 핵산분자들, 작은 간섭(interfering) RNAs, 마이크로 RNAs 또는 리보자임(ribozymes)과 같은 치료적 활성 핵산들과 결합될 수도 있다. 상기 결합들은 당업계에 알려진 방법들에 의해 이루어질 수 있다.

[0119] 일실시예에서, 본 발명의 돌연변이 단백질은 체내의 원하는 부위나 영역으로 돌연변이 단백질을 전달하기 위하여 특정 체내영역을 표적으로 하는 표적부(targeting moiety)와 결합할 수도 있다. 상기 변형이 바람직할 수 있는 한가지 예는 혈액-뇌 장벽의 횡단(crossing)이다. 혈액-뇌 장벽을 횡단하기 위하여, 본 발명의 돌연변이 단백질은 이 장벽을 가로지르는 능동수송을 이용하는 부분과 연결될 수 있다(Gaillard PJ, e al,. Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. *International Congress Series*. 2005 1277:185-198 또는 Gaillard PJ,e al. Targeted delivery across the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005 2(2): 299-309 참조). 상기 부분들은 예를 들어 상품명으로 2B-Trans™(to-BBB technologies BV, Leiden, NL) 을 이용할 수 있다.

[0120] 상술한 바와 같이, 본 발명의 돌연변이 단백질은 일부 실시예에서 상기 돌연변이 단백질의 혈장내 반감기(serum half-life)를 확장시키는 부분과 연결될 수 있다. PCT 공개공보 WO 2006/56464에는 CTLA-4에 결합친화도를 갖는 사람 호중성(neutrophile)겔라티나제(gelatinase) 관련 리포칼린의 돌연변이 단백질에 대한 상기 연결 전략들이 기술되어 있다. 혈장내 반감기를 증가시키는 부분은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 히드록시에틸 녹말, 팔미트산(Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* **52**, 1-9)과 같은 지방산 분자들, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 또는 그 단편, 알부민 결합 펩티드, 또는 알부민 결합 단백질, 트랜스페린(transferrin) 등이 될 수 있다. 상기 알부민 결합 단백질은 박테리아 알부민 결합 단백질, 항체, 도메인 항체들을 포함하는 항체단편(예를 들어, US patent 6,696,245 참조), 또는 알부민에 대해 결합친화도를 갖는 리포칼린 돌연변이 단백질이 될 수 있다. 따라서, 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질의 상기 반감기를 증가시키는 적절한 결합 파트너들은 알부민(Osborn, B.L. et al. (2002) Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548), 또는 알부민 결합 단백질, 예를 들어, 연쇄상구균 단백질 G 의 하나와 같은 (Konig, T. and Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83) 박테리아 알부민 결합 도메인을 포함한다. 연결(conjugation) 파트너로 사용될 수 있는 알부민 결합 펩티드의 다른 예들은 Cys-Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Cys 일치(consensus) 서열을 가진 것들이다. US patent application 2003/0069395 또는 Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002). "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins." "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins." *J Biol Chem* 277, 35035-35043)에 기술된 바와 같이, 상기 Xaa_1 은 Asp, Asn, Ser, Thr, 또는 Trp; Xaa_2 는 Asn, Gln, His, Ile, Leu, 또는 Lys; Xaa_3 는 Ala, Asp, Phe, Trp, 또는 Tyr; 및 Xaa_4 는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, 또는 Thr 이다.

[0121] 다른 실시예들에서, 알부민 자체 또는 알부민의 생물학적 활성 단편은 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질의 연결 파트너로 사용될 수 있다. "알부민(albumin)"이라는 용어는 사람 혈장 알부민 또는 소 혈장 알부민 또는

쥐(rat) 알부민과 같은 모든 포유동물 알부민을 포함한다. 상기 알부민 또는 그 단편은 미국특허출원 US 5,728,553 또는 유럽특허출원 EP 0 330 451 및 EP 0 361 991에 기술된 바와 같인 재조합적으로 생산될 수 있다. 재조합 사람 알부민(Recombumin Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) 는 상기 돌연변이 단백질의 반감기를 증가시키기 위하여 리포칼린 돌연변이 단백질에 연결되거나 융합될 수 있다.

[0122] 만약 상기 알부민-결합 단백질이 항체 단편이라면, 그것은 도메인 항체일 수 있다. 도메인 항체들(dAbs)은 적정 안정성 및 효율 산물 프로파일을 만들기 위하여 생물물리적 특성 및 생체내 반감기에 대해 정확한 조절이 가능하도록 조작된다. 도메인 항체들은 예를 들어 Domantis Ltd. (Cambridge, UK and MA, USA)로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0123] 본 발명의 돌연변이 단백질의 혈장내 반감기를 증가시키는 부분으로서의 트랜스페린(transferrin)의 이용을 위해, 돌연변이 단백질을 유전적으로 글리코실화되지 않은(non-glycosylated) 트랜스페린의 N 또는 C 말단, 또는 양쪽 모두에 융합시킬 수 있다. 글리코실화되지 않은(non-glycosylated) 트랜스페린은 14-17일의 반감기를 가지며, 트랜스페린 융합 단백질은 유사하게 증가된 반감기를 가질 것이다. 트랜스페린 운반자 역시 높은 생물학적 이용가능성, 생물분포(biodistribution) 및 순환 안정성(circulating stability)을 제공한다. 이 기술은 BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA) 로부터 상업적으로 이용가능하다. 단백질 안정제/반감기 연장 파트너로서 상용화된 재조합 사람 트랜스페린(DeltaFerrin™)역시 Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK)로부터 이용가능하다.

[0124] 만약 면역글로불린의 Fc 부분이 본 발명의 돌연변이 단백질의 혈장내 반감기를 연장하기 위해 사용된다면, Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA)로부터 상업적으로 이용가능한 *SynFusion* 기술이 이용될 수 있다. 이 Fc-융합 기술의 이용은 더 오래 작용하는 생물약제의 제작을 가능하게 하며, 예를 들어 약물동력학, 용해성, 및 생산효율을 증가시키기 위해 항체의 Fc 영역에 연결된 돌연변이 단백질 두 세트로 이루어질 수 있다.

[0125] 그러나 본 발명의 돌연변이 단백질의 반감기를 증가시키기 위한 또다른 대안은 본 발명의 돌연변이 단백질의 N- 또는 C-말단에 길고, 일정한 체계가 없는, 유연한 글라이신이 많은 (예를 들어 약 20 에서 80 의 연속적인 글라이신 잔기들을 갖는 폴리-글라이신) 서열들을 융합시키는 것이다. 이러한 접근법은 WO2007/038619에서, 예를 들어 "rPEG"(재조합 PEG)라는 용어로도 사용된다.

[0126] 만약 폴리알킬렌 글라이콜을 연결 파트너로 사용하는 경우, 폴리알킬렌 글라이콜은 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 선형 또는 가지가 있는 형태일 수 있다. 그것은 활성화된 폴리알킬렌 유도체일 수도 있다. 적절한 화합물의 예들로서 WO 99/64016에 기술된 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 분자들, US Patent 6,177,074 또는 US Patent 6,403,564 에 기술된 인터페론(interferon), PEG-변형 아스파라기나제(asparaginase), PEG-아데노신(adenosine) 디아미나제(deaminase) (PEG-ADA) 또는 PEG-슈퍼옥사이드(superoxide) 디스뮤타제(dismutase) (예를 들어, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins *J. Control. Release* **11**, 139-148 참고)가 있다. 상기 폴리머(polymer), 바람직하게는 폴리에틸렌 글라이콜의 분자량은 약 300 에서 약 70.000 달톤(Dalton) 범위일 수 있으며, 예를 들어, 약 10.000, 약 20.000, 약 30.000 또는 약 40.000 달톤의 분자량을 가진 폴리에틸렌 글라이콜을 포함한다. 추가로, 예를 들어 US patents 6,500,930 또는 6,620,413에 기술된, 녹말 또는 히드록시에틸 녹말 (HES)과 같은 탄수화물 올리고- 및 폴리머들은 혈장내 반감기 연장을 위해 본 발명의 돌연변이 단백질에 연결될 수 있다.

[0127] 상기 부분들 중 하나가 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 단백질에 연결된다면, 아미노산 곁사슬에의 연결이 유리할 수 있다. 적절한 아미노산 곁사슬들은 사람 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에서 자연적으로 발생하거나 돌연변이 생성으로 도입될 수 있다. 적절한 결합부위가 돌연변이 생성을 통해 도입될 경우의 한 가지 가능성은 시스테인 잔기에 의한 적절한 위치에서의 아미노산 치환이다. 일실시예에서, 상기 돌연변이 단백질은 Thr 40→ Cys,

Glu 73→ Cys, Arg 90→ Cys, Asp 95→ Cys 또는 Glu 131→ Cys 치환의 적어도 하나를 포함한다. 이 위치들중 어느 곳에 새롭게 만들어진 시스테인 잔기는 돌연변이 단백질을 PEG 또는 그것의 활성화된 유도체와 같이 돌연변이 단백질의 혈장내 반감기를 증가시키는 부분에 연결시키는데 이용될 수 있다.

[0128] 또다른 실시예에서, 상기 부분들 중 하나를 본 발명의 돌연변이 단백질에 연결시키기 위한 적절한 아미노산 곁사슬들을 제공하기 위하여 인공 아미노산들이 돌연변이 생성에 의해 도입될 수 있다. 일반적으로, 상기 인공 아미노산들은 더 활성적으로 설계되어, 원하는 부분에 연결하는 것을 용이하게 한다. 인공 tRNA 를 통하여 도입될 수 있는 상기 인공 아미노산의 예들 중 하나는 파라-아세틸-페닐알라닌 (para-acetyl-phenylalanine)이다.

[0129] 본 명세서에 개시된 상기 돌연변이 단백질의 여러 응용을 위하여, 그것들을 융합단백질의 형태로 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일부 실시예들에서, 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 그것의 N-말단 또는 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 신호서열 및/또는 친화표지와 같은 펩티드에 융합된다.

[0130] 약학적 응용을 위하여, 본 발명의 돌연변이 단백질은 돌연변이 단백질의 생체내 혈장반감기를 연장하는 융합 파트너에 융합될 수 있다(상기 PCT 공개공보 WO 2006/56464 참조). 상술한 컨쥬게이트들과 유사하게, 상기 융합파트너는 예를 들어 면역글로불린의Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민, 알부민 결합 펩티드 또는 알부민 결합 단백질 등이 될 수 있다. 다시, 알부민 결합 단백질은 박테리아 알부민 결합 단백질 또는 알부민에 대해 결합친화도를 갖는 리포칼린 돌연변이 단백질이 될 수 있다. 따라서, 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질의 반감기를 증가시키는 적절한 융합 파트너들은 알부민(Osborn, B.L. et al. (2002) *supra J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548), 또는 알부민 결합 단백질, 예를 들어, 연쇄상구균 단백질 G와 같은 (Konig, T. and Skerra, A. (1998) *supra J. Immunol. Methods* **218**, 73-83) 박테리아 알부민 결합 단백질을 포함한다. Dennis et al, supra (2002) 또는 US patent application 2003/0069395에 기술된, Cys-Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Cys 일치 서열을 갖는(상기 Xaa_1 는 Asp, Asn, Ser, Thr, 또는 Trp; Xaa_2 은 Asn, Gln, His, Ile, Leu, 또는 Lys; Xaa_3 는 Ala, Asp, Phe, Trp, 또는 Tyr; 및 Xaa_4 는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, 또는 Thr), 상기 알부민 결합 펩티드들은 융합파트너로도 사용될 수 있다. 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질의 융합파트너로서 알부민 자체 또는 생물학적으로 활성이 있는 알부민의 단편을 사용하는 것도 가능하다. "알부민(albumin)"이라는 용어는 사람 혈장 알부민 또는 소 혈장 알부민 또는 쥐(rat) 알부민과 같은 모든 포유동물 알부민을 포함한다. 상기 알부민 또는 그 단편의 재조합적 생산은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 US patent 5,728,553, European patent applications EP 0 330 451 또는 EP 0 361 991에 기술되어 있다.

[0131] 상기 융합파트너는 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질에 효소 활성 또는 다른 분자들에 대한 결합친화도와 같은 새로운 특성을 부여할 수 있다. 적절한 융합단백질들의 예로서 알칼린 포스파타제(Alkaline phosphatase), 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 글루타치온(gluthation)-S-트란스퍼라제, 단백질 G의 알부민 결합 도메인, 단백질 A, 항체 단편들, 올리고머화 도메인들, 동일하거나 상이한 결합특이성을 가진 리포칼린 돌연변이 단백질 ("듀오칼린(Duocalins)"의 형성을 초래하는, cf. Schlehuber, S., and Skerra, A. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold.*Biol. Chem.* **382**, 1335-1342) 또는 독소 등이 있다.

[0132] 특히, 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질을 분리된 효소 활성 부위와 융합시켜서 생겨나는 융합단백질의 "구성성분(components)"들 모두가 함께 주어진 치료 표적에 작용하는 것도 가능할 것이다. 상기 리포칼린 돌연변이 단백질의 결합 도메인은 질병-원인 표적에 붙으며, 이는 상기 효소 도메인이 상기 표적의 생물학적 기능을 파괴시키도록 한다.

[0133] Strep-tag 또는 Strep-tag II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) *J. Mol.* Biol. **255**, 753-766), *myc*-tag, FLAG-

tag, His_6-tag 또는 HA-tag 와 같은 친화표지들 또는 재조합 단백질들의 검출 및/또는 정제를 쉽게 만들기도 하는 글루타치온 -S-트란스퍼라제와 같은 단백질 들이 바람직한 융합 파트너의 추가적인 예들이다. 마지막으로, 발색성 또는 녹색형광단백질(GFP) 또는 황색형광단백질(YFP)과 같은 형광 성질을 갖는 단백질들도 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질의 적절한 융합파트너들이다.

[0134] 본 명세서에 사용된 "융합단백질(fusion protein)"이라는 용어는 신호서열을 포함하는 본 발명에 따른 리포칼린 돌연변이 단백질들을 포함한다. 폴리펩티드의 N-말단에 있는 신호서열은 이 폴리펩티드를 특정 세포 구획(compartment), 예를 들어 *E. coli* 의 주변세포질 또는 진핵세포들의 소포체로 이끈다. 다수의 신호서열들이 당업계에 알려져 있다. 폴리펩티드를 *E. coli* 의 주변세포질로 분비시키는 바람직한 신호서열은 OmpA-신호 서열이다.

[0135] 본 발명은 본 명세서에 기술된 돌연변이 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들을 포함하는 핵산 분자들(DNA 및 RNA)과도 관련이 있다. 유전암호의 축퇴성(degeneracy)은 같은 아미노산을 지정하는 다른 코돈들에 의한 특정 코돈들의 치환을 허용하므로, 본 발명은 본 발명의 돌연변이 단백질을 암호화하는 특정 핵산분자에 제한되는 것은 아니며, 기능적 돌연변이 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들을 포함하는 모든 핵산 분자들을 포함한다.

[0136] 따라서, 본 발명은 야생의 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열위치 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 및 108 중의 적어도 하나의 코돈에서 돌연변이를 포함하는 본 발명에 따른 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산서열도 포함하며, 성숙한 사람 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩티드 서열의 서열위치 61 및 153에서 적어도 하나의 시스테인 잔기를 암호화하는 상기 코돈들은 다른 아미노산 잔기를 암호화하도록 돌연변이된다.

[0137] 또한 본 명세서에 개시된 발명은 실험적 돌연변이 생성의 지정된 서열 위치들 외의 추가적인 돌연변이들을 포함하는, 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산 분자들도 포함한다. 상기 돌연변이들은 종종 내성이 있거나, 예를 들어 만약 그것들이 향상된 접힘(folding) 효율, 혈장 안정성, 열 안정성 또는 돌연변이 단백질의 리간드 결합친화도에 기여한다면, 유리한 것으로 증명될 수 있다.

[0138] 본 명세서에 개시된 핵산분자는 이 핵산분자의 발현을 위해 조절서열에 "작동가능하도록 연결(operably linked)"될 수 있다.

[0139] DNA와 같은 핵산분자는, 만약 그것이 전사 및/또는 번역 조절과 관련된 정보를 포함하는 서열부위를 포함하는 경우, "핵산분자를 발현할 수 있는(capable of expressing a nucleic acid molecule)" 또는 "뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는(to allow expression of a nucleotide sequence)" 이라고 불리며, 그러한 서열들은 폴리펩티드를 암호화하는 핵산서열에 "작동가능하도록 연결(operably linked)" 되어 있다. 작동가능한 연결은 조절서열부위와 발현될 서열이 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 결합된 연결이다. 유전자 발현에 필요한 조절영역의 정확한 특성은 종에 따라 다양하나, 일반적으로 원핵생물에서 이 영역들은 RNA로 전사될 때 번역의 시작을 신호하는 DNA 부위들뿐만 아니라 프로모터 그 자체, 즉 전사의 시작을 이끄는 DNA 부위들도 모두 포함하는 프로모터를 포함한다. 상기 프로모터 영역들은 일반적으로 원핵생물에서의 -35/-10 박스 및 샤인-달가르노 부위 또는 진핵생물에서의 TATA 박스, CAAT 서열들, 및 5'-캡핑(capping) 부위와 같은 전사 및 번역의 개시와 관련된 5' 비암호화 서열들을 포함한다. 이 영역들은 야생의 폴리펩티드를 숙주세포의 특정 구획에 타겟팅하기 위한 번역된 서열 및 리더(leader) 서열들뿐 아니라 증강자(enhancer) 또는 억제자(repressor)도 포함할 수 있다.

[0140] 추가로, 3' 비암호화 서열들은 전사종결, 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 등과 관련된 조절부위들을 포함할 수 있다. 하지만, 만약 이 종결서열들이 특정 숙주세포에서 충분히 기능적이지 않다면, 그 세포에서 기능적인

신호들로 치환될 수 있다.

[0141]

[0142] 따라서, 본 발명의 핵산분자는 조절서열, 바람직하게는 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 또다른 바람직한 실시예에서, 본 발명의 핵산분자는 프로모터 서열 및 전사 종결 서열을 포함한다. 예를 들어, 적절한 원핵생물 프로모터는 *tet* 프로모터, *lac*UV5 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 진핵세포에서의 발현에 유용한 프로모터들의 예는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.

[0143]

[0144] 본 발명의 핵산분자는 벡터나 플라스미드, 파지미드(phagemid), 파지(phage), 바큘로바이러스(baculovirus), 코스미드(cosmid) 또는 인공 염색체(artificial chromosome)와 같은 다른 종류의 클로닝 운반체의 일부가 될 수도 있다.

[0145] 일실시예에서, 상기 핵산분자는 파스미드(phasmid)에 포함된다. 파스미드 벡터는 M13 또는 f1과 같은 템퍼런트 파지(temperent phage)의 인터제닉(intergnic) 영역, 또는 관심 있는 cDNA에 융합된 그것의 기능적 부분을 암호화하는 벡터를 의미한다. 상기 파지미드 벡터 및 적절한 헬퍼 파지 (예를 들어, M13K07, VCS-M13 또는 R408) 로 박테리아 숙주세포들을 중복감염(superinfection)시킨 후, 완전한 파지 입자들이 생산되며, 그에 따라 암호화된 이종기원의(heterologous) cDNA를 파지 표면에 나타난 그것의 대응하는 폴리펩티드에 물리적으로 결합할 수 있다(Kay, B.K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual*, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 40124, 또는 Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 873).

[0146] 상기 클로닝 운반체들은, 상술한 조절서열들 및 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산서열을 제외하고, 형질전환되거나 트랜스펙션시킨 세포들에 선별가능한 형질을 부여하는 선별 마커들 뿐만 아니라 발현을 위해 사용되는 숙주세포들과 양립할 수 있는 종들로부터 기원한 복제 및 조절서열들을 포함한다. 다수의 적절한 클로닝 벡터들이 당업계에 알려져 있고, 상업적으로 이용가능하다.

[0147] 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질을 암호화하는 DNA 분자, 및 특히 상기 리포칼린 돌연변이 단백질의 암호화 서열을 포함하는 클로닝 벡터는 상기 유전자를 발현할 수 있는 숙주세포에 형질전환될 수 있다. 형질전환은 표준 기술들을 이용해서 수행될 수 있다(Sambrook, J. et al. (1989), *supra*). 따라서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 핵산분자를 포함하는 숙주세포와도 연관된다.

[0148] 형질전환된 숙주세포들은 본 발명의 융합단백질을 암호화하는 핵산서열의 발현에 적합한 조건들 하에서 배양된다. 적절한 숙주세포들은 *Escherichia coli* (*E. coli*) 또는 *Bacillus subtilis*와 같은 원핵세포 또는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, SF9 또는 High5 곤충 세포들, 불멸의(immortalized) 포유동물 세포주들(예를 들어, HeLa 세포들 또는 CHO 세포들) 또는 1차 포유동물 세포들(primary mammalian cells)과 같은 진핵세포가 될 수 있다.

[0149] 본 발명은 본 발명의 돌연변이 단백질의 생산방법과도 관련되며, 상기 돌연변이 단백질, 그 단편 또는 상기 단백질과 다른 폴리펩티드의 융합단백질은 유전공학적 방법을 이용하여 상기 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산으로부터 출발하여 생산된다. 상기 방법은 생체내에서 수행될 수 있으며, 상기 돌연변이 단백질은 예를 들어 박테리아 또는 진핵 숙주생물체에서 생산되어, 이 숙주생물체 또는 그것의 배양액으로부터 분리될 수 있다. 또한, 예를 들어 시험관내 번역시스템(*in vitro* translation system)을 이용하여 시험관 내에서 생산하는 것도 가능하다.

[0150] 상기 돌연변이 단백질을 생체내에서 생산할 때, 본 발명의 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산은 재조합 DNA 기

술을 이용하여 적절한 박테리아 또는 진핵 숙주생물체로 도입된다. 이러한 목적을 위해, 상기 숙주세포는 먼저 수립된 표준 방법들을 이용하여 본 발명의 돌연변이 단백질을 암호화하는 핵산분자를 포함하는 클로닝 벡터로 형질전환된다(Sambrook, J. et al. (1989), *supra*). 그 후 상기 숙주세포는 이종기원 DNA 의 발현 및 대응하는 폴리펩티드의 합성을 가능하게 하는 조건들에서 배양된다. 연속적으로, 상기 폴리펩티드는 세포나 배양배지의 어느 하나로부터 회수된다.

[0151] 본 발명의 일부 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질에서는, 자연적으로 발생한 Cys 61 및 Cys 153 사이의 이황화 결합(disulfide bond)이 제거된다. 따라서, 상기 돌연변이 단백질들 (또는 분자내 이황화 결합을 포함하지 않는 다른 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질) 은 환원의 산화환원반응의 주변환경을 갖는 세포 구획(compartment), 예를 들어 그람-음성 박테리아의 세포질, 에서 생산될 수 있다. 본 발명의 리포칼린 돌연변이 단백질이 분자내 이황화결합들을 포함하는 경우, 적절한 신호 서열을 이용하여 초기의 폴리펩티드를 산화의 산화환원반응의 주변환경을 갖는 세포구획으로 이끄는 것이 바람직할 것이다. 상기의 산화 환경은 *E. coli* 와 같은 그람-음성 박테리아의 주변세포질(periplasm), 그람-양성 박테리아의 세포외부 환경, 또는 진핵세포들의 소포체의 루멘(lumen)에서 제공될 수 있고, 보통 구조적 이황화결합들의 형성을 선호한다. 하지만, 본 발명의 돌연변이 단백질을 숙주세포, 바람직하게는 *E. coli* 의 세포질 내에서 생산하는 것도 가능하다. 이러한 경우, 상기 폴리펩티드는 용해상태나 접힌 상태의 어느 하나에서 직접적으로 얻거나, 시험관내 재생으로 봉입체(inclusion body) 형태에서 회수될 수 있다. 또다른 방법은 산화성의 세포내 환경을 갖는 특정 숙주 균주의 이용이며, 이는 세포질 내에서의 이황화결합의 형성을 가능하게 한다(Venturi M, Seifert C, Hunte C. (2002) High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **315**, 1-8.).

[0152] 하지만, 본 발명의 돌연변이 단백질이 반드시 유전공학적 방법을 이용해서만 발생 또는 생산되는 것은 아니다. 오히려, 리포칼린 돌연변이 단백질은 메리필드 고체상 폴리펩티드 합성(Merrifield solid phase polypeptide synthesis) 과 같은 화학적 합성이나 시험관내 전사 및 번역에 의해서도 얻을 수 있다. 예를 들어, 분자 모델링을 이용하여 유망한 돌연변이들을 동정하고, 원하는 (디자인된) 폴리펩티드를 시험관내에서 합성하고, 주어진 표적에 대한 결합 활성을 조사하는 것이 가능하다. 단백질의 고체상 및/또는 액체상 합성방법들은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Lloyd-Williams, P. et al. (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Fields, G.B., and Colowick, S.P. (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego, or Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 29-43).

[0153] 또다른 실시예에서, 본 발명의 돌연변이 단백질은 당업자에게 알려진 잘 수립된 방법들을 이용하여 시험관내 전사/번역에 의해 생산될 수 있다.

[0154] 또한 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 또는 융합 단백질 또는 그 컨쥬게이트 및 약학적으로 허용가능한 부형제(excipient)를 포함하는 약학 조성물과도 관련된다.

[0155] 본 발명에 따른 리포칼린 돌연변이 단백질은 단백질 약물들에 대해 치료적으로 유효한 장관외 또는 장관내 경로로 투여될 수 있다. 장관외(Parenteral) 투여 방법들은, 예를 들어 피내의(intracutaneous), 피하의(subcutaneous), 근육 내의(intramuscular), 기관 내의(intratracheal), 비강 내의(intranasal), 눈을 통한(intravitreal) 또는 예를 들어 에어로졸 혼합물들, 스프레이 또는 파우더의 형태와 같은 에어로졸 인스톨레이션(installation) 및 흡입뿐 아니라, 예를 들어 주사용액, 주입 용액 또는 팅크(tinctures)의 형태의 정맥내의(intravenous) 주사(injection) 및 주입(infusion) 기술들을 포함한다. 폐의 약물전달, 즉 (비강 내 투여로도 이용될 수 있는) 에어로졸의 흡입 또는 기관 내의 흡입 중 어느 하나를 통한 전달에 관한 개관은 예를 들어, J.S. Patton et al. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. Proc. Amer. Thoracic Soc. 2004 Vol. 1 pages 338-344에 기술되어 있다. 장관내(Non-parenteral) 전달 모드들은, 알약(pills), 정제(tablets), 캡슐(capsules), 용액(solutions) 또는 서스펜션(suspensions)의 형태와 같은 경구적 전달, 또는 좌약의 형태와 같은 직장 전달이 있다. 본 발명의 돌연변이 단백질은 필요에 따라 일반적인 비독성의 약학적으

로 허용가능한 부형제(excipients) 또는 담체(carriers), 첨가제(additives) 및 운반체(vehicles)를 포함하는 제제(formulation) 내에서 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0156] 본 발명의 일실시예에서, 상기 약제는 포유동물, 특히 사람에게 장관외로 투입된다. 대응되는 투입 방법들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 피내의(intracutaneous), 피하의(subcutaneous), 근육 내의(intramuscular), 기관 내의(intratracheal), 비강 내의(intranasal), 눈을 통한(intravitreal) 또는 예를 들어 에어로졸 혼합물들, 스프레이 또는 파우더의 형태와 같은 에어로졸 인스톨레이션(installation) 및 흡입뿐 아니라, 예를 들어 주사용액, 주입 용액 또는 팅크(tinctures)의 형태의 정맥내의(intravenous) 주사(injection) 및 주입(infusion) 기술들을 포함한다. 상대적으로 짧은 혈장내 반감기를 가진 화합물의 경우 정맥내 및 피하 주입 및/또는 주사의 조합이 가장 편리할 것이다. 상기 약학조성물은 수용액, 오일-인 워터 에멀젼(oil-in water emulsion) 또는 워터-인-오일 에멀젼(water-in-oil emulsion)일 수 있다.

[0157] 경피성(transdermal) 전달 기술들, 예를 들어 전리요법(iontophoresis), 초음파 치료(sonophoresis) 또는 미세바늘-강화 전달(microneedle-enhanced delivery)(Meidan VM and Michniak BB 2004 Am. J. Ther. 11(4): 312-316) 역시 본 명세서에 기술된 돌연변이 단백질의 경피성 전달에 사용될 수 있다. 장관내(Non-parenteral) 전달 모드들은, 예를 들어 알약(pills), 정제(tablets), 캡슐(capsules), 용액(solutions) 또는 서스펜션(suspensions)의 형태와 같은 경구적 전달, 또는 좌약의 형태와 같은 직장 전달이 있다. 본 발명의 돌연변이 단백질은 일반적인 비독성의 약학적으로 허용가능한 부형제(excipients) 또는 담체(carriers), 첨가제(additives) 및 운반체(vehicles)를 포함하는 제제(formulation) 내에서 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0158] 사용되는 돌연변이 단백질의 용량은 원하는 예방 효과 또는 치료적 반응을 성취하기 위하여 넓은 제한범위 내에서 다양할 수 있다. 예를 들어, 그것은 생체내에서의 돌연변이 단백질 및 리간드 복합체의 반감기뿐 아니라 선택된 리간드에 대한 화합물의 친화도에 달려 있다. 추가로, 상기 적정 용량은 환자의 상태뿐 아니라 상기 돌연변이 단백질, 그것의 융합단백질 또는 그것의 컨쥬게이트의 생체분포(biodistribution), 투약형태, 치료될 병/질환의 정도에 의존적일 수 있다. 예를 들어, 국부적 투여를 위한 연고 형태로 사용될 경우, 고농도의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질이 사용될 수 있다. 하지만, 원한다면, 상기 돌연변이 단백질은 지속적 방출 제제(sustained release formulation)의 형태 , 예를 들어 리포솜 분산(liposomal dispersions) 또는 PolyActive™ 또는 OctoDEX™ (cf. Bos et al., Business Briefing: Pharmatech 2003: 1-6)과 같은 히드로겔-기반 폴리머 마이크로구(hydrogel-based polymer microspheres)로 제공될 수 있다. 다른 이용가능한 지속적 방출 제제는 예를 들어 PLGA 기반 폴리머 (PR pharmaceuticals), PLA-PEG 기반 히드로겔 (Medincell) 및 PEA 기반 폴리머 (Medivas) 등이 있다.

[0159] 따라서, 본 발명의 돌연변이 단백질은 수립된 방법 뿐 아니라 약학적으로 허용가능한 성분들을 이용한 조성물들에 제제화될 수 있다(Gennaro, A.L. and Gennaro, A.R. (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 약학조성물을 만들기 위하여, 약학적으로 안정한 무기 또는 유기 부형제들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 알약, 파우더, 젤라틴 캡슐 또는 좌약을 준비하기 위하여, 락토스, 활석(talc), 스테아르산 및 그것의 염, 지방, 왁스, 고체 또는 액체 폴리올(polyols), 천연 및 경화 오일 등을 사용할 수 있다. 용액, 서스펜션, 에멀젼, 에어로졸 혼합물들 또는 사용전 용액 또는 에어로졸 혼합물로 복원하기 위한 파우더를 생산하는데 적합한 부형제들로는 식물성 유지(vegetable oils) 뿐만 아니라 물, 알코올, 글리세롤, 폴리올, 및 그것의 적절한 혼합물들이 있다.

[0160] 상기 약학적 조성물은 예를 들어, 충전제(filler), 결합체(binder), 습윤제(wetting agent), 활제(glidant), 안정제(stabilizer), 보존제(preservative), 유화제(emulsifier), 및 추가로 용매 또는 가용화제(solubilizer) 또는 저류작용(depot effect)을 위한 물질 등을 포함할 수도 있다. 후자를 통해 융합단백질은 느리거나 지속적인 방출이나 리포솜 및 마이크로캡슐과 같은 표적 전달 시스템에 삽입될 수 있다.

[0161] 상기 제제는 박테리아-리테이닝 필터(bacteria-retaining filter)를 통한 여과를 포함하는 다양한 수단에 의해, 또는 사용전에 멸균수나 다른 멸균된 매질에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균된 고체 화합물 형태의 멸균제를 삽입함으로써 멸균시킬 수 있다.

[0162] 본 발명의 또다른 측면은 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법에는 상술한 돌연변이 단백질을 포함하는 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0163] 상기 치료를 필요로 하는 대상은 대표적으로 사람, 개, 마우스, 쥐(rat), 돼지, 시몰로구스(cymologous)와 같은 유인원 등의 포유류가 될 수 있다.

[0164] 본 발명의 방법에 따라 치료될 질병 및 장애들의 정확한 특성은 상기 이용되는 돌연변이 단백질이 결합하고자 하는 리간드에 달려 있다. 따라서, 본 발명의 돌연변이 단백질은, 질병이나 장애의 발달과 관련된 것으로 알려진 표적 분자가 본 발명의 핵산 라이브러리의 발현산물 또는 그 외에 얻어지는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들에 나타날 수 있는 한, 질병을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0165] IL-4 수용체 알파와 높은 친화도로 결합하는 상기 돌연변이 단백질 또는 그것을 포함하는 약학 조성물은 Th2 면역반응의 증가와 관련된 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 이용될 수 있다. 상기 질병 또는 장애는, 예를 들어 알러지 반응 또는 알러지성 염증(allergic inflammation)일 수 있다. 알러지성 염증은 알러지성 천식, 결막염 또는 피부염과 관련된 것일 수 있다(cf., Hage et al., Crystal Structure of the Interleukin-4 Receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface, Cell, Vol. 97, 271-281, April 16, 1999 or Mueller et al, Structure, binding and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system, Biochemica et Biophysica Acta (2002), 237-250).

[0166] 다양한 종양 세포들은 일반 세포들보다 더 많은 수의 고친화성 IL-4 수용체들을 발현한다. 상기 세포들에는 예를 들어, 흑색종(melanoma), 유방암, 난소암, 중피종(mesothelioma), 교아종(glioblastoma), 성상세포종(astrocytoma), 신장암, 두경부암(head and neck carcinoma), 카포지 육종(Kaposi's sarcoma) 관련 AIDS(= AIDS KS), 호르몬 의존 및 비의존적 전립선암 세포들, 및 전립선 암세포의 1차 배양물과 같은 사람의 암이 포함된다(cf., Garland L, Gitlitz B, et al., Journal of Immunotherapy. 28: 376-381, No. 4, Jul-Aug 2005; Rand RW, Kreitman RJ, et al. Clinical Cancer Research. 6: 2157-2165, Jun 2000; Husain SR, Kreitman RJ, et al. Nature Medicine. 5: 817-822, Jul 1999; Puri RK, Hoon DS, et al. Cancer Research. 56: 5631-5637, 15 Dec 1996, 10. Debinski W, Puri R, et al, or Husain SR, Behari N, et al. Cancer Research. 58: 3649-3653, 15 Aug 1998, Kawakami K, Leland P, et al. Cancer Research. 60: 2981-2987, 1 Jun 2000; or Strome SE, Kawakami K, et al. Clinical Cancer Research. 8: 281-286, Jan 2002).

[0167] Specific examples of cells with documents overexpression of IL-4 수용체들을 과발현하는 것으로 알려진 구체적인 예들로는, 이에 제한되는 것은 아니나, Burkitt 림프종 세포주, Jijoye (B-cell lymphom), 전립선암(LNCaP, DU145), 두경부암(SCC, KCCT873), 췌장암 (PANC-1 cell line), SCC-25: 13.000 (+/-500)h 두경부암 세포주(ATCC) 등이 있다. IL4R 알파 사슬은 IL4-내재화(internalization)에 중요한 역할을 한다. 따라서, 독소에 융합되거나 연결될 때, IL-4 수용체 알파 사슬에 연결되는 상기 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 암의 치료에도 사용될 수 있다. 적절한 독소의 예들로는, 슈도모나스 엑소톡신(Pseudomonas exotoxin), 페르투시스-독소(pertussis-toxin), 디프테리아 독소(diphtheria toxin), 리신(ricin), 사포린(saporin), 칼리케아미신(calicheamicin) 또는 그 유도체들, 택소이드(taxoid), 마이탄시노이드(maytansinoid), 튜뷸리신(tubulysin) 및 돌라스타틴(dolastatin) 유사체(analogue) 등이 있다. 돌라스타틴 유사체의 예들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 오리스타틴(auristatin) E, 모노메틸오리스타틴(monomethylauristatin) E, 오리스타틴(auristatin) PYE 및 오리스타틴(auristatin) PHE 등이 있다.

[0168] 암의 치료를 위해서, IL-4 수용체 알파 사슬에 결합하는 돌연변이 단백질을 세포증식 억제제(cystostatic agent)에 연결하는 것도 가능하다. 상기 세포증식 억제제의 예들은 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin), 옥사리플라틴(Oxaliplatin), 5-플루오로우라실(Fluorouracil), 택소티어(Taxotere)(Docetaxel), 파클리탁셀(Paclitaxel), 안스라사이클린(Anthracycline) (Doxorubicin), 메토트렉세이트(Methotrexate), 빈블라스틴(Vinblastin), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine), 다카르바진(Dacarbazine), 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide), 에토포시드(Etoposide), 아드리아마이신(Adriamycine), 캄프토테신(Camptotecine), 콤브레타타스틴(Combretatastin) A-4 관련 화합물들, 설폰아마이드(sulfonamides), 옥사디아졸린(oxadiazolines), 벤조[b]티오펜(benzo[b]thiophenes), 합성 스파이로케탈 피란(synthetic spiroketal pyrans), 모노테트라하이드로퓨란(monotetrahydrofuran) 화합물들, 큐라신(curacin) 및 그 유도체들, 메톡시에스트라디올(methoxyestradiol) 유도체들 및 루코보린(Leucovorin) 등이 있다.

[0169] 이와 관련하여, 독소 또는 세포증식 억제제와 융합 또는 연결된 본 발명의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들은 물론 IL-4 수용체 알파 사슬에 친화도를 갖는 돌연변이 단백질만에 국한되는 것은 아니다. 오히려, 암 세포의 표면에서 발현되는 수용체에 결합하는 어떠한 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질도 암 치료를 위한 융합단백질 또는 컨쥬게이트의 형태로 사용될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다.

[0170] VEGF-R2 또는 VEGF와 높은 친화도로 결합하는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 또는 그것들을 포함하는 약학 조성물은 암, 신생혈관성 습성 노인황반변성(neovascular wet age-related macular degeneration(AMD)), 당뇨망막병증(diabetic retinopathy) 또는 황반부종(macular edema), 미성숙 망막증(retinopathy of prematurity) 또는 망막정맥폐쇄(retinal vein occlusion)와 같은 증가된 혈관신생(vascularization)과 관련된 질병 또는 장애의 치료 방법에 사용될 수 있다. 상기 암은 소화관(gastrointestinal tract), 직장, 대장, 전립샘, 난소, 췌장, 유방, 방광, 신장, 자궁 내막, 및 폐의 암, 백혈병, 및 흑색종으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0171] 상술한 바로부터, 본 발명의 돌연변이 단백질 또는 그것의 융합단백질이나 컨쥬게이트가 여러 응용분야에서 사용될 수 있다는 점은 명백하다. 일반적으로, 상기 돌연변이 단백질은 Fc 부분의 글라이코실화(glycosylation)에 특이적으로 의존하는 것들을 제외하고 항체가 사용되는 모든 분야에서 사용될 수 있다.

[0172]

[0173] 따라서, 본 발명의 또다른 측면에서, 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 주어진 사람 눈물 리포칼린의 비자연적 리간드의 검출에 사용된다. 상기 사용은 상기 주어진 리간드를 포함하는 것으로 예측되는 시료와 상기 돌연변이 단백질을 적절한 조건하에서 접촉시키는 단계, 그에 따라 상기 돌연변이 단백질과 주어진 리간드간 복합체를 형성하게 하는 단계, 및 적절한 신호에 의해 상기 복합체가 형성된 돌연변이 단백질을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0174] 상기 검출 신호는 상술한 표지에 의하거나, 결합, 즉 복합체 형성, 그 자체에 의한 물리적 특성의 변화에 의해 야기될 수 있다. 한가지 예가, 그로부터 하나가 골드 포일(gold foil)과 같은 표면에 부동화되는 결합파트너들의 결합 동안에 그 수치가 변하는, 플라즈몬 표면 공명(plasmon surface resonance)이다.

[0175] 본 명세서에 개시된 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 주어진 사람 눈물 리포칼린의 비자연적 리간드의 분리에도 사용될 수 있다. 상기 사용은 상기 리간드를 포함하는 것으로 예측되는 시료와 상기 돌연변이 단백질을 적절한 조건하에서 접촉시키는 단계, 그에 따라 상기 돌연변이 단백질과 주어진 리간드간 복합체를 형성하게 하는 단계, 및 상기 시료로부터 상기 돌연변이 단백질/리간드 복합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다

[0176] 상기 주어진 리간드의 분리 뿐 아니라 상기 주어진 비자연적 리간드의 검출을 위한 돌연변이 단백질의 사용 모

두에 있어서, 상기 돌연변이 단백질 및/또는 상기 표적은 적절한 고체상(solid phase)에 고정될 수 있다.

[0177] 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질은 화합물을 미리선택된 위치에 표적화하는데 사용될 수도 있다. 그러한 목적을 위해 상기 돌연변이 단백질은 복합체 형성을 위해 관심 있는 화합물과 접촉된다. 그 후, 상기 돌연변이 단백질과 관심 있는 화합물을 포함하는 복합체는 미리선택된 위치에 전달된다. 이러한 사용은, 이에 제한되는 것은 아니나, 특히 약물을 약물의 치료대상인 감염된 생체 부위, 조직 또는 기관과 같은 생물체의 미리선택된 위치로 (선택적으로) 전달하는데 적합하다. 돌연변이 단백질과 관심 있는 화합물간 복합체 형성 외에도, 상기 돌연변이 단백질은 돌연변이 단백질과 화합물의 컨쥬게이트를 만들기 위해 상기 주어진 화합물과 반응할 수도 있다. 상기 복합체와 유사하게, 그러한 컨쥬게이트는 상기 화합물을 이미선택된 표적위치에 전달하는데 적합할 수 있다. 그러한 돌연변이 단백질 및 화합물의 컨쥬게이트는 돌연변이 단백질과 화합물을 서로 공유적으로 연결하는 링커(linker)를 포함할 수도 있다. 선택적으로, 그러한 링커는 혈류내에서는 안정하나, 세포 환경에서는 쪼개질 수 있다.

[0178] 따라서 본 명세서에 기술된 돌연변이 단백질 및 그의 유도체들은 항체 또는 그의 단편들과 유사한 많은 영역에서 사용될 수 있다. 지지체에 결합하여, 주어진 돌연변이 표적 또는 이 표적의 컨쥬게이트나 융합단백질을 고정시키거나 분리하게 하기 위한 사용 이외에도, 상기 돌연변이 단백질은 효소, 항체, 방사성 물질 또는 생화학적 활성 또는 제한된 결합 특성들을 갖는 다른 그룹으로 표지(labeling)하는데 사용될 수 있다. 그렇게 함으로써, 그들 각각의 표적들 또는 그 컨쥬게이트나 융합단백질들은 검출되거나 그들과 접촉할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 돌연변이 단백질은 수립된 분석방법(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블랏)이나 현미경 또는 면역센서를 이용하여 화학 구조들을 검출하는데 이용될 수 있다. 여기에서, 검출신호는 적절한 돌연변이 단백질 컨쥬게이트나 융합단백질을 이용하여 직접적으로 발생시키거나 항체를 통한 결합된 돌연변이 단백질의 면역화학적 검출에 의해 간접적으로 발생시킬 수 있다.

[0179] 의학분야에서도 본 발명의 돌연변이 단백질의 가능한 응용분야가 다수 존재한다. 진단 및 약물전달에서의 이용뿐 아니라, 예를 들어 조직- 또는 종양- 특이적 세포 표면 분자에 결합하는 본 발명의 돌연변이 단백질 폴리펩티드가 발생될 수 있다. 상기 돌연변이 단백질은, 예를 들어 "종양 이미징(tumor imaging)"에 대한 연결형태(conjugated form)나 융합단백질로 사용되거나 또는 암 치료에 직접적으로 이용될 수 있다.

[0180] 따라서, 본 발명은 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 상기 단백질과 주어진 비자연적 리간드와의 복합체 형성에 이용하는 것과도 관련이 있다.

[0181] 본 발명의 돌연변이 단백질과 관련된 또다른 바람직한 사용은 표적 확인(target validation), 즉, 병 또는 장애의 발달 또는 진전과 관련된 것으로 추정되는 폴리펩티드가 약간이나마 실제로 그 질병 또는 장애의 원인이 되는지를 분석하는 것 이다. 어떤 단백질을 약물 표적으로 확인하기 위한 이러한 사용은, 본 발명의 돌연변이 단백질이 야생의 컨포메이션(conformation)을 갖는 단백질의 표면 지역을 특이적으로 인식하는, 즉 야생의 에피토프에 결합하는 능력을 이용한다. 이러한 측면에서, 이러한 능력은 제한된 수의 재조합 항체들에 대해서만 보고되었다는 점을 유의하여야 한다. 하지만, 본 발명의 돌연변이 단백질의 약물 표적 확인을 위한 사용은 표적으로서의 단백질의 검출에 제한되는 것은 아니며, 단백질 도메인, 펩티드, 핵산분자들, 유기분자들 또는 금속복합체들의 검출도 포함한다.

실 시 예

[0255] **실시예 1: $2x10^9$ 의 독립적인 Tlc 돌연변이 단백질들을 갖는 라이브러리의 제작**

[0256] 높은 복잡성(complexity)을 갖는 눈물 리포칼린(Tlc)의 임의적 라이브러리는 성숙한 야생형 사람 눈물 리포칼린의 18개의 선택된 아미노산 잔기들 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 56, 57, 58, 80, 83, 104, 105, 106,

및 108의 공동의 돌연변이 생성에 의해 제작되었다. 이 때문에, 대응하는 코돈들이 표적화된 방식으로 임의로 추출된 유전자 카세트가 이전에 기술된 전략에 따라 두 단계에서 축퇴된 프라이머 올리고디옥시뉴클레오티드들을 이용한 PCR로 결합된다(Skerra, A. (2001) "Anticalins": a new class of engineered-ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J. Biotechnol.* 74, 257-275). 이 라이브러리 디자인에서 눈물 리포칼린의 야생형 서열의 마지막 두 개의 C-말단 아미노산 잔기들 (SD) 뿐 아니라 처음 4개의 N-말단 아미노산 잔기들 (HHLA) 도 삭제되었다(이 때문에, 첨부된 서열목록에 나타나는 모든 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들은 N-말단에서 야생형 서열의 Ala5를, C-말단에서 Gly156을 갖는다(후자는 선택적으로 예를 들어 친화표지에 융합된다).).

[0257] 임의적 라이브러리 생성의 첫번째 단계에서, Tlc 의 첫번째 및 두번째 노출된 루프에 대해 임의추출된 코돈들을 가진 PCR 단편을 프라이머 TL46 (서열번호:10) 및 TL47 (서열번호:11) 을 사용하여 준비하였다. 반면에 Tlc의 세번째 및 네번째 노출된 루프에 대해 임의추출된 코돈들을 가진 또다른 PCR 단편은, 프라이머 TL48 (서열번호:12) 및 TL49 (서열번호:13)를 사용하여 평행하게 준비하였다. 두 번째 단계에서 이 두개의 PCR 단편들은 올리고디옥시뉴클레오티드로 연결시켰고, 연결된 임의추출된 유전자 카세트를 생산하기 위하여 프라이머 AN-14 (서열번호:14), TL50 bio (서열번호:15) 및 TL51 bio (서열번호:16) 를 이용한 PCR 반응에서 주형으로 사용하였다.

[0258] 첫번째 단계를 위한 상기 두 PCR 반응들 (1a 및 1b)은 각각의 반응에 대한 주형으로 10 ng pTLPC10 플라스미드 DNA (**도 1**) 를 이용하여 100 ㎕ 의 부피로 각각 수행하였고, 각각 50 pmol 의 프라이머쌍 (각각 TL46 및 TL47, 또는 TL48 및 TL49) 을 이용하였고, 일반적인 포스포라미디트(phosphoramidite) 방법에 따라 합성하였다. 추가로, 반응 혼합물에는 10㎕ 10 x Taq 반응버퍼 (100 mM Tris/HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 1% v/v Triton X-100) 및 2 ㎕ dNTP-Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)가 포함되었다. 물로 부피를 맞춘 후, 5 u Taq DNA 중합효소(5 u/ml, Promega)를 첨가하고, 94℃에서 1분, 58℃에서 1분 및 72℃에서 1.5분 조건의 20사이클로, 가열뚜경이 있고 완성을 위해 60℃에서 5분간 배양되는 프로그램화될 수 있는 열순환장치(programmable thermocycler) (Eppendorf)에서 수행하였다. 각각 135 bp 및 133 bp 의 예상 크기를 갖는 증폭산물들은 GTQ 아가로스 (Roth)를 이용한 아가로스젤 전기영동 및 Wizard DNA 추출 키트 (Promega) 를 사용하여 분리하였다.

[0259] 두번째 PCR 단계를 위하여 1000 ml 의 혼합물을 준비하였다. 각각의 인접 프라이머들 TL50 bio (서열번호:15) 및 TL51 bio (서열번호:16) 500 pmol 및 10 pmol 의 매개 프라이머 AN-14 (서열번호:14)의 존재 하에 PCR 반응 1a 및 1b 로부터 나온 약 500 fmol 의 양 단편들을 주형으로 사용하였다. 양 인접 프라이머들 모두 그것의 5'-말단에 비오틴(biotin)을 갖고 있어, *Bst*XI 절단 후에 스트렙타비딘(streptavidin)-코팅된 파라마그네틱 비드(paramagnetic bead)들을 이용하여 불완전하게 잘린 산물로부터 상기PCR 산물을 분리시킬 수 있다. 추가로, 상기 반응 혼합물에는 100 ㎕ 10 x Taq 버퍼, 20 ml dNTP-Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 u Taq DNA 중합효소 (5 u/ml, Promega) 및 최종농도 1000 ㎕를 맞추게 하는 물이 포함된다. 상기 혼합물을 100 ㎕ 씩 분주하고, PCR 을 94℃에서 1분, 57℃에서 1분 및 72℃에서 1.5분의 20사이클로, 60℃에서 5분간 마지막 배양되는 조건으로 수행하였다. 상기 PCR 산물은 E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (PeqLab)를 이용하여 정제하였다.

[0260] 연속적인 클로닝을 위하여, 핵산형태에서 Tlc 돌연변이 단백질 라이브러리의 중심 부분을 대표하는 이 단편을 먼저 생산자의 지시에 따라 제한효소 *Bst*XI (Promega) 으로 자르고, 상술한 아가로스 젤 전기영동 방법에 따라 정제한 결과, 301 bp 크기의 이중사슬 DNA-단편을 얻었다.

[0261] 불충분하게 잘리거나 잘리지 않은 DNA 단편들은 스트렙타비딘-코팅된 파라마그네틱 비드(Merck) 를 이용한 그것들의 5'-비오틴(biotin) 표지들을 이용해서 제거하였다. 이를 위해, 150㎕ 의 스트렙타비딘-코팅된 파라마그네틱 입자의 상용화된 서스펜션(10 mg/ml의 농도)을 100 ㎕ TE 버퍼 (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)로 세번 세척하였다. 그 후 상기 입자들을 자석의 도움으로 빼내고, 실온에서 70 pmol의 잘린 DNA 단편과 100 ㎕ TE 버퍼에서 15 분간 섞었다. 그 후 상자성(paramagnetic) 입자들을 자석의 도움으로 Eppendorf 용기 벽에서 수집

하였고, 정제된, 완전히 잘린 DNA 단편들을 포함하는 상등액은 이어지는 접합(ligation) 반응에 사용하기 위해 회수하였다.

[0262] 상기 벡터 pTLPC27 (도 20)을 생산자의 지시에 따라 제한효소 *Bst*XI (Promega) 으로 자르고, 얻어진 큰 벡터 단편은 상술한 아가로스 젤 전기영동으로 정제하였고, 벡터 골격을 대표하는 3772 bp 크기의 이중사슬 DNA-단편을 얻었다.

[0263]

[0264] *접합 반응을 위하여, 40 pmol 의 PCR 단편 및 40 pmol 의 벡터 단편 (pTLPC27) 을 1074 Weiss 단위의 T4 DNA 리가아제 (Promega)의 존재 하에 총 부피 10.76 ml (50 mM Tris/HCl pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 ㎍/ml BSA) 로 48시간 동안 16℃로 배양시켰다. 그 후 접합 혼합물 내의 DNA를 267 ㎕ 의 효모 tRNA (H_2O 내 10 mg/ml 용액 (Roche)), 10.76 ml 의 5 M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 및 42.7 ml 에탄올을 첨가하여 1.5 시간 동안 침전시켰다. 침전시킨 후에, DNA 펠렛(pellet)을 70% EtOH 로 세척하고 말렸다. 마지막으로 DNA를 최종농도 200 ㎍/ml 가 되도록 총 부피 538 ㎕ 의 물에 녹였다.

[0265] *E. coli* 균주XL1-Blue의 전기적 수용능력이 있는(electrocompetent) 박테리아 세포들 (Bullock et al., *supra*)은 Tung 및 Chow (*Trends Genet*. **11** (1995), 128-129) 및 Hengen (*Trends Biochem. Sci*. **21** (1996), 75-76)에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 1 l 의 LB배지 (10 g/L Bacto Tryptone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, pH 7.5) 의 600 nm 광학밀도를 XL1-Blue 의 오버나잇 배양물의 첨가로 OD_{600} = 0.08로 맞추고 140 rpm 및 26℃로 2 l Erlenmeyer 플라스크에서 배양했다. OD_{600} = 0.6 에 도달한 후, 상기 배양물을 30분간 얼음에서 식히고 연속적으로 15분간 4000 g 및 4℃에서 원심분리 시켰다. 상기 세포들을 500 ml 얼음-냉각 10% w/v 글리세롤로 두 번 세척하고 2 ml 얼음-냉각 GYT-배지(10% w/v glycerol, 0.125% w/v yeast extract, 0.25% w/v tryptone)에서 최종적으로 재현탁했다. 그 후 상기 세포들을 분주하고 (200 ㎕), 액체질소에서 쇼크-냉각(shock-frozen)시키고 -80℃에 저장했다.

[0266] 4℃ 에서 같은 벤더(전극 거리 2 mm)로부터 큐벳과 연계하여 Micro Pulser system (BioRad)으로 전기천공(Electroporation)을 수행했다. (1 ㎍ DNA를 포함하는) 접합된 DNA 용액 10 ml 분주물을 100 ml 의 세포 서스펜션과 혼합하고, 처음 1분간 얼음에서 배양하고, 그 후 미리 냉각시킨 큐벳으로 옮겼다. 5 ms 및 12.5 kV/cm 필드력으로 전기천공을 수행하고 상기 서스펜션을 즉시 2 ml 얼음-냉각 SOC배지(20 g/L Bacto Tryptone, 5 g/L Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.5, 오토클레이브(autoclaved), 전기천공전 20 ml/L 20% 글루코스와 함께 10 ml/L 1 M $MgCl_2$ 및 1 M $MgSO_4$ 첨가)에 옮기고, 60분간 37℃ 에서 140 rpm으로 배양했다. 그 후, 상기 배양액을 100 ㎍/ml 클로람페니콜(chloramphenicol) (2 YT/Cam)을 포함하는 2 L 2 x YT 배지 (16 g/L Bacto Tryptone, 10 g/L Bacto Yeast Extract, 5 g/L NaCl, pH 7.5) 에서 희석하여, OD_{550} 을 0.26으로 만들었다. 상기 배양액을 OD_{550} 가 다시 0.6 으로 될때까지 37℃ 에서 배양했다.

[0267] 54 전기천공에서 총 접합 DNA 107.6 ㎍을 사용함으로써, 총 약 2.0 x 10^9 의 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체들은 추가로 융합단백질로서 Tlc 돌연변이 단백질의 라이브러리를 암호화하는 파지미드의 준비에 사용되었다.

[0268] 파지미드의 준비를 위하여, 상기로부터의 4 l 개의 배양을 4 l 개의 배양을 1.3 x 10^{12} 의 헬퍼파지(Stratagene)로 감염시켰다. 37℃ 에서 45분간 흔들어준 뒤 온도를 26℃로 낮췄다. 온도를 맞추기 위해 10분 후에, Tlc 돌연변이 단백질과 파지 외피 단백질간 융합단백질을 위한 유전자 발현을 유도하기 위하여 25 ㎍/l의 안하이드로테트라사이클린 (anhydrotetracycline)을 첨가했다. 파지미드 생산은 11시간 동안 26℃에서 이루어졌다. 원심분

리로 박테리아를 제거한 후 파지미드들을 20% (w/v) 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol) 8000 (Fluka), 15% (w/v) NaCl 로 배양상층액으로부터 두 번 침전시키고 마지막으로 PBS (4 mM KH_2PO_4, 16 mM Na_2HPO_4, 115 mM NaCl)에 녹였다.

[0269] **실시예 2: IL-4 수용체 알파에 대해 친화도를 갖는 Tlc 돌연변이 단백질들의** 파지미드 프리젠테이션(presentation) 및 선별

[0270] 파지미드 디스플레이 및 선별은, 상기 표적 단백질 (IL-4 수용체 알파, Peprotech) 을 200 nM 의 농도로 사용하고, 스트렙타비딘 비드(streptavidin beads) (Dynal) 를 이용한 파지-표적 복합체의 연속적인 포획과 함께 비오틴이 부착된 단백질로 상기 라이브러리에 제공된다는 점을 제외하고, WO 2006/56464 실시예 2에 기술된 바에 따라 실시예 1로부터 얻은 파지미드를 사용하여 수행하였다. 선택적으로, 상기 표적 단백질은 200nM의 농도에서 Fc-융합 단백질(IL-4 수용체 알파-Fc, R&D Systems)로 사용되었고, 단백질 G 비드 (Dynal) 를 이용한 파지-표적 복합체의 연속적인 포획에 이용되고, 생산자의 지시에 따라 Fc-융합 단백질을 항-사람 Fc 포획 항체 (Jackson Immuno Research) 코팅 면역막대(Nunc)에 고정시켜 이용된다. 세 번 혹은 네 번의 선별을 수행하였다.

[0271] **실시예 3: 대량의(high-throughput) ELISA 스크리닝을 이용한 IL-4 수용체** 알파 특이적 돌연변이 단백질의 동정

[0272] 실시예 2에 따라 선별된 돌연변이 단백질의 스크리닝은, 발현벡터가 pTLPC10 (도 1)이라는 점을 제외하고는, WO 2006/56464의 실시예 3에 기술된 바에 따라 수행하였다. 사용된 표적 단백질은 IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems) 및 IL-4 수용체 알파 (Peprotech) 였으며 모두 2 ㎍/ml 의 농도였다.

[0273] 실시예 2에 따라 선별된 스크리닝 5632 클론들은, 2294의 1차 히트(hits) 동정을 이끌며, 라이브러리로부터 성공적인 분리가 일어났음을 보였다. 이러한 접근법을 이용하여, 클론 S148.3 J14 (서열번호:2) 을 동정하였다. S148.3 J14 의 서열은 도 2에도 나와있다.

[0274] **실시예 4: 에러율이 높은(error-prone) PCR 을 이용한 돌연변이 단백질** S148.3 J14 의 친화도 성숙

[0275] 돌연변이 단백질 S148.3 J14 (서열번호:2)에 기초한 변이체 라이브러리 제작은 올리고뉴클레오티드 TL50 bio (서열번호:15) 및 TL51 bio (서열번호:16) 를 이용하여 WO 2006/56464 의 실시예 5에 기술된대로 수행하였고, 구조유전자당 평균적으로 3개의 치환을 갖는 라이브러리를 만들었다.

[0276] 파지미드 선별은 실시예 2에 기술된대로 수행하였으나, 제한된 표적농도 (IL-4 수용체 알파 2 nM, 0.5 nM 및 0.1 nM, Peprotech Ltd), IL-4 수용체 알파에 대한 길항적 모노크로날 항체와 함께, 증가된 세척 시간 (MAB230, R&D Systems; 1 시간의 세척 시간 및 2 시간의 세척 시간) 또는 짧은 배양시간 (30 초, 1 분 및 5 분)을 이용하였다. 세 번 혹은 네 번의 선별을 수행하였다.

[0277]

[0278] *실시예 5: 점-지정 임의적 접근(site-directed random approach)을 이용한 돌연변이 단백질 S148.3 J14 의 친화도 성숙

[0279] 돌연변이 단백질 S148.3 J14 (서열번호:2)에 기초한 변이체들의 라이브러리는 34, 53, 55, 58, 61, 64 및 66 의 위치에서 20개의 아미노산 모두를 허용하는 무작위화에 의해 제작되었다. 상기 라이브러리는 디옥시뉴클레오티드 TL46, TL47, 및 AN-14 를 대신해서 각각 TL70 (서열번호:17), TL71 (서열번호:18) 및 TL72 (서열번호:19) 이 사용된 점을 제외하고 실시예 1에 기술된 바에 따라 제작되었다.

[0280] 파지미드 선별은, IL-4 수용체 알파에 대한 경쟁적 모노크로날 항체와 함께 증가된 세척 시간과 결합한 (MAB230, R&D Systems; 1 시간의 세척) 제한된 표적농도(0.5 nM 및 0.1 nM 의 IL-4 수용체 알파, Peprotech) 또는 짧은 배양시간 (10 분) 각각을 이용하여, 실시예 2에 기술된대로 수행하였다. 세 번 혹은 네 번의 선별을

수행하였다.

[0281] **실시예 6: 대량의 ELISA 스크리닝을 이용한 IL-4 수용체 알파-결합 돌연변이** 단백질들의 친화도 스크리닝

[0282] 스크리닝은 다음의 사항들을 제외하고는 실시예 3에 기술된대로 수행하였다. 3 nM IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems)를 사용하였고, 다음 사항들을 추가하였다. i) 생산된 돌연변이 단백질들을 포획하기 위하여 모노크로날 항-Strep 표지 항체 (Qiagen) 가 ELISA 플레이트에 코팅되어 있고, IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems, 3 nM 및 0.75 nM) 의 포획된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들에의 결합은 IL-4 수용체 알파-Fc의 Fc 도메인에 대한 HRP (horseradish peroxidase)-연결 폴리크로날 항체를 이용하여 측정하였다. 대체적인 스크리닝 셋업에서, 선택적으로 ii) IL-4 를 ELISA 플레이트에 코팅하고, IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems, 3 nM)를 발현된 돌연변이 단백질들로 발현시키고, IL-4 수용체 알파-Fc 의 비어 있는 IL-4 결합 부위와의 결합을 IL-4 수용체 알파-Fc 의 Fc 도메인에 대한 HRP-연결 폴리크로날 항체를 이용하여 검출하였다.

[0283] 상기 스크리닝 결과는 도 3에 나타나 있다. 실시예 4 및 5에 기술된 많은 수의 돌연변이 단백질들은 친화도 성숙에 대한 기초로 역할하는 돌연변이 단백질 S148.3 J14 (서열번호:2)과 비교하여 IL-4 수용체 알파에 대해 향상된 친화도를 갖는 것으로 동정되었다. 이러한 방법을 이용하여 돌연변이 단백질 S191.5 K12, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, S197.8 D22 및 S148.3 J14AM2C2 (서열번호:3-8)들을 동정하였다. S191.5 K12, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, S197.8 D22 및 S148.3 J14AM2C2 의 서열들 역시 도 4에 나와 있다.

[0284] **실시예 7: IL-4 수용체 알파-결합 돌연변이 단백질들의 생산**

[0285] IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질들의 생산을 위하여, 발현벡터 pTLPC10 (도1) 에 암호화된 각각의 돌연변이 단백질을 보유하는 *E. coli* K12 균주 JM83을 Schlehuber, S. et al. (*J. Mol. Biol.* (2000), **297**, 1105-1120)에 기술된 프로토콜에 따라 LB-암피실린 배지에서 2 L 쉐이크 플라스크 배양으로 키웠다. 더 많은 양의 단백질이 필요할 때, 각각의 발현벡터를 보유하는 *E. coli* 균주 W3110을, Schiweck, W., and Skerra, A. *Proteins* (1995) **23**, 561-565)에 기술된 프로토콜에 근거하여 1 l 또는 10 l 용기에서 벤치 탑 발효조(bench top fermenter) 배양을 통해 페리플라즈마 생산(periplasmatic production)에 이용하였다.

[0286] 상기 돌연변이 단백질들은 Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. (2000)에 기술된 방법에 따라 적절한 층부피(bed volume)의 컬럼을 사용하여 스트렙타비딘 친화 크로마토그라피를 통하여 한 단계로 페리플라즘 영역으로부터 정제했다(Use of the *Strep*-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326A, 271-304). 높은 순도를 달성하고 응축된 재조합 단백질을 제거하기 위하여, 돌연변이 단백질의 젤 여과를 Superdex 75 HR 10/30 컬럼에서 PBS 버퍼의 존재하에 마지막으로 수행했다 (24-ml 층부피, Amersham Pharmacia Biotech). 모노머 단백질 구획들이 차고, 순도를 SDS-PAGE로 측정하고, 다른 생화학적 특성 규명에 사용되었다.

[0287] **실시예 8: Biacore를 이용한 친화도 측정**

[0288] 친화도 측정을 (WO 2006/56464에서 표적으로 사용한 2000 RU 의 사람 CTLA-4 또는 쥐 CTLA-4-Fc 대신) 약 400 RU 의 IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems)를 고정시켰다는 점 및 (WO 2006/56464에서 5-0.3 uM 농도에서 사용된 40㎕의 정제된 리포칼린 돌연변이 단백질 대신) 100 ㎕의 돌연변이 단백질을 25 nM의 농도로 주입하였다는 점을 제외하고, WO 2006/056464 의 실시예 9에 기술된 바에 따라 수행하였다.

[0289] S148.3 J14, S191.5 K12, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, S197.8 D22 및 S148.3 J14AM2C2 를 사용한 친화도 측정의 결과들을 도 5-11 에 나타내었고, 표 1에 요약하였다._

[0290]

클론	친화도 Biacore (pM)	k_{on} (1/Ms x 10^{5})	k_{off} (1/s x 10^{-5})
S148.3 J14	37500	1.4	517

S191.5 K12	13.5 (2.9)	58 (27)	7.7 (3.3)
S148.3 AM2C2	17.9 (2.7)	23 (1.7)	4.2 (0.7)
S191.4 B24	19.3 (3.3)	26 (6.7)	4.9 (1.0)
S191.4 K19	20.1 (14)	17 (2.7)	3.6 (2.8)
S191.5 H16	24.3 (12)	17 (1.8)	4.1 (1.6)
S197.8 D22	55.8 (4.2)	11 (1.3)	6.3 (1.0)

[0291] **표 1.** Biacore 로 측정한 본 발명의 선별된 돌연변이 단백질들의 IL-4 수용체 알파에 대한 친화도. 5번의 실험의 평균 (표준편차) 을 나타내었다.

[0292] **실시예 9: 억제 ELISA를 이용한 IL-4 길항자의 동정**

[0293] 선별된 돌연변이 단백질에 의한 IL-4 및 IL-4 수용체 알파 간의 상호작용의 억제를 억제 ELISA로 측정하였다. 따라서, IL-4 수용체 알파의 일정 농도 (0.5 nM 비오틴화 IL-4 수용체 알파, Peprotech, 또는 15 nM IL-4 수용체 알파-Fc, R&D Systems) 를 리포칼린 돌연변이 단백질의 연속적 희석과 함께 배양하였다. 비어 있는 IL-4 결합 자리를 갖는 IL-4 수용체 알파의 양은 IL-4 또는 길항적 항 IL-4 수용체 알파 모노크로날 항체로 코팅된 플레이트를 갖는 ELISA에서 정량화했다. 결합된 비오틴화 IL-4 수용체 알파를 HRP-연결 Extravidin (Sigma) 을 사용하여 탐지하고, 일정한 양의 비오틴화된 IL-4 수용체 알파의 표준곡선과 비교하였다. 돌연변이 단백질 S148.3 J14, S191.5 K12, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, S197.8 D22 및 S148.3 J14AM2C2을 사용한 측정결과를 도 12-18에 나타내고 표 2에 요약하였다.

[0294]

클론	친화 경쟁 ELISA (pM)
S148.3 J14	17300
S191.5 K12	25.3 (9.9)
S148.3 AM2C2	40.7 (14.8)
S191.4 B24	49.2 (14)
S191.4 K19	120 (32)
S191.5 H16	61.7 (11.4)
S197.8 D22	140 (37)

[0295] **표 2**. 경쟁 ELISA로 측정한 본 발명의 선별된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 IL-4 수용체 알파에 대한 길항적 능력 및 친화도. 3개의 실험들의 평균 (표준편차) 를 나타내었다.

[0296] **실시예 10: TF-1 증식 측정을 이용한 IL-4 및 IL-13 신호전달의 길항자 동정**

[0297] IL-4 및 IL-13-자극 TF-1 세포 증식 측정을 Lefort et al. 에 기술된 바에 따라 수행하였다(Lefort S., Vita N., Reeb R., Caput D., Ferrara P. (1995) *FEBS Lett.* **366(2-3)**, 122-126). 그 결과를 도 19 에 나타내었고, 고친화도 변이체들 S191.5 K12, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, S197.8 D22 및 S148.3 J14AM2C2 들은 IL-13 뿐 아니라 IL-4 유도 신호전달 및 증식의 잠재적인 길항자임을 나타낸다.

[0298] **실시예 11: 사람 눈물 리포칼린의 항-IL-4 수용체 알파 돌연변이 단백질들은** STAT6 매개 경로를 억제한다

[0299] TF-1 세포들을 10% 열-불활성화 소 태아혈청, 2 mM L-글루타민, 100 Units/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신을 포함하고, 2 ng/ml 재조합 사람 그라눌로사이트(granulocyte)-마크로파지 콜로니-자극 인자를 보충한 RPMI 1640 에 배양했다. 상기 세포들을 100 mm 직경 조직 배양 접시에서 총부피 20 ml 배지에 5 x 10^4 cells/ml 로 살포하고, 분열시키고 이 농도에서 매 2에서 3일간 재살포했고, 5% CO_2 의 습윤 공기에서 37 ℃로 배양했다.

[0300] TF-1 세포들을 1200 rpm, 5분의 원심분리로 수득하고, 10% 열-불활성화 소 태아혈청, 2 mM L-글루타민, 100 Units/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신(RPMI-1%FCS)을 포함하는 RPMI 1640에서 1200 rpm, 5분의 원심분리로 2번 세척했다. 세포들을 RPMI-1% FCS에서 1 x 10^6 cells/ml로 재현탁했고, 24 웰 플레이트에서 1ml 씩 평판배양했고, 오버나잇 배양했다. 다음날, TF-1 세포들을 20 mg/ml의 IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질들 또는 음성 조절 돌연변이 단백질들과 함께 1시간 동안 배양했다. 세포들의 추가적 분주물은 배지만으로 5% CO_2 의 습윤 대기 상태에서 1 시간 동안 37 ℃에서 배양했다. 연속적으로, 사람 재조합 IL-4 또는 IL-13 을 각각 최종농도 0.8 ng/ml 또는 12 ng/ml 로 첨가하고, 상기 배양액을 5% CO_2 의 습윤 대기 상태에서 10분 동안 37 ℃에서 배양했다.

[0301] 세포들을 42 ml 의 37% 포름알데히드 (1.5% 의 최종농도)의 첨가로 10분간 실온에서 고정시키고, 5 ml 원형 바닥의 폴리스티렌 튜브 (BD Falcon)에 옮겼다. 세포들을 1% FCS (PBS-FCS)를 포함한 2ml PBS로 세척하고, 1200 rpm 으로 5 분간 원심분리한 후 상등액을 버렸다. 세포들은 강하게 볼텍싱(vortexing) 하는 동안 500 ml 아이스 콜드(ice-cold) 메탄올의 첨가로 투과성이 생겼다. 4 ℃에서 10분간 배양한 후, 상기 세포들을 2 ml 의 PBS-FCS 로 1200 rpm, 5 분의 원심분리로 두 번 세척하였다. 상기 세포들을 100 ml 의 PBS-FCS 에 재현탁하고, 20 ml 의 항-인산화된 STAT-6 피코리스린(phycoerythrin) (PE)-표지 항체 (clone Y641; BD Biosciences)로 30분간 암조건의 실온에서 염색했다. 마지막으로, 상기 세포들을 1200 rpm , 5 분의 원심분리로 2 ml 의 PBS-FCS 로 2번 세척하고, 500 ml 의 PBS-FCS에 재현탁했다. 상기 세포들을 FACScalibur 사이토미터 (BD Biosciences)를 이용하여 플로 사이토메트리로 분석했다. 적어도 10000 개의 게이트된(gated)세포들로부터 데이터를 수집했다.

[0302] TF-1 세포들에서 IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호: 5) 및 S191.4 K19 (서열번호: 6) 의 IL-4 및 IL-13 매개 STAT-6 인산화에 대한 저해능력은 플로우 사이토메트리로 측정했다. 게이트는 FL2 값에 근거하여 (channel 2 fluorescence; PE intensity), 세포 크기(forward scatter; FSC) 및 세포입상(side scatter; SSC)에 근거하여 (자극받지 않은 및 염색되지 않은) 99% 의 대조구 비염색군을 배제시키기 위하여 대조구 TF-1 세포들을 이용하여 완전한 세포들에 설정되었다. 자극받지 않은 세포들의 추가적 분주물을 항-인산화된 STAT-6 PE-표지 항체로 염색했다.

[0303] STAT-6 인산화 측정의 결과는 IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질 S191.4 B24 및 S191.4 K19 가 TF-1 세포들에서 상당히 IL-4 및 IL-13 유발 STAT-6 인산화를 저해한다는 것을 명확히 보여준다 (데이터는 표 3에 요약되어 있다).

[0304]

처리	% 양성	MFI
Unstained	1	3.8
Stained unstimulated	6	5.8
IL-4	75	15.8
IL-13	77	16.4
pTLPC10 + IL-4 (neg control)	72	13.1
pTLPC10 + IL-13 (neg control)	84	18.6
S191.4 K19 + IL-4	6	4.9
S191.4 K19 + IL-13	8	5.0
S191.4 B24 + IL-4	6	4.8
S191.4 B24 + IL-13	11	5.5

[0305] **표 3**. TF-세포에서 S191.4 B24 및 S191.4 K19 (서열번호: 5 및 6)의 IL-4 및 IL-13에 의한 STAT-6- 인산화-유도 저해능력을 플로 사이토메트리로 측정했다. STAT-6 인산화에 대해 양성 염색하는 게이트된 세포들의 비율 및

모든 게이트된 세포들의 메디안 형광 강도 (MFI) 를 나타내었다.

[0306] **실시예 12: 항-사람 IL-4 수용체 알파 돌연변이 단백질들은 시노몰구스 말초**혈액 림프구와 상호작용한다

[0307] Astra Zeneca (Macclesfield, UK) 에서, 9 ml 리튬-헤파린 튜브에 건강한 남성 지원자의 전혈을 CPU (clinical pharmacology unit)에 의해 수집하였다. 시노몰구스의 헤파린화된 전혈 시료를 Harlan Sera-Lab (Bicester, UK) 또는 B and K Universal Ltd (Hull, UK)로부터 얻었다.

[0308] 사람 및 시노몰구스 전혈을 적혈구 용해 버퍼 (0.15 M NH_4Cl, 1.0 mM $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA, pH 7.2-7.4)를 이용하여 1:5의 비율로 희석하고, 실온에서 10분간 배양했다. 세포들을 1200 rpm 으로 5분간 원심분리하고, 상등액을 버렸다. 세포들을 용해 버퍼에 현탁하고, 상기 과정을 상등액이 더 이상 헤모글로빈을 함유하지 않을 때까지 반복한다. 세포들을 처음 부피와 같은 부피의 냉동 배지(1:10, 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide) : 소 태아 혈청)에서 재현탁하고, 극저온 유리병에 옮긴다. 각각의 유리병은 1ml 의 혈액으로부터 세포들을 포함한다. 세포들은 -80 °C에서 오버나잇으로 냉동되고, 보관을 위해 액체질소로 옮겨진다.

[0309] 얼린 말초혈액세포들을 빠르게 37 °C 에 박고, FACS 버퍼 (PBS/1% FCS)로 씻었다. 세포 펠렛을 FACS 버퍼 (1 ml buffer/vial)에서 재현탁했다. 100 ml 분주물들을 96 웰 둥근바닥 플레이트에 놓고, 100 ml FACS 버퍼를 웰마다 첨가한다. 상기 플레이트들을 1200 rpm에서 5분간 4℃에서 원심분리하고 상등액을 버렸다. 연속적으로, 세포들을 느린 속도의 볼텍싱으로 재현탁하고 100 ml 의 희석된 1차 항체 (항-CD124 또는 IgG1 이소타입 대조구, eBioscience, 10 mg/ml) 또는 항-IL-4 수용체 알파 돌연변이 단백질 (10 mg/ml) 들을 첨가하고, 세포들을 얼음에서 30 분간 배양했다. 세포들을 100ml FACS 버퍼의 첨가 및 1200 rpm, 5 분, 4℃의 원심분리로 한 번 세척하고 상등액을 버렸다. 상기 세포들을 느린 속도의 볼텍싱으로 재현탁했다. 세포들을 세척하기 위해 200 ml 의 FACS 버퍼를 사용하여 이를 두 번 더 수행했다. 마지막 원심 분리 후에, 상기 세포 펠렛을 5 mg/ml에서 100 ml 의 적절한 2차 항체 (biotinylated anti-human lipocalin-1 항체 (R&D Systems) 또는 biotinylated rat anti-mouse IgG (Insight Biotechnology Ltd)) 에 재현탁했고 세포들을 얼음에서 30분간 배양했다. 100 ml 의 FACS 버퍼에서 1200 rpm, 5분, 4℃ 조건의 원심분리로 세포들을 한 번 세척했다. 상등액을 버리고, 세포들을 느린 속도의 볼텍싱으로 재현탁했다. 200 ml 의 FACS 버퍼에서 1200 rpm, 5분, 4 ℃ 조건의 원심분리로 두 번의 추가적 세척들을 수행했다. 마지막 원심분리 후에, 세포 펠렛을 100 ml 의 검출시약 (phycoerthyrin [PE]-labelled streptavidin (eBioscience); 1.25 mg/ml)에 재현탁하고, 암조건에서 30분간 얼음에서 배양했다. 전과 같은 3 번의 추가적인 세척 후에, 상기 세포들을 200 ml FACS 버퍼에 넣고, 40 x 6 mm 시험관에 옮기고 FACScalibur 사이토미터를 이용한 플로 사이토메트리로 분석했다. 대조구 세포들은 염색하지 않았다. 염색되지 않은 대조구 세포들을 이용하여, 완전한 림프구 세포 게이트를 세포크기 (forward scatter; FSC) 및 세포입상 (side scatter; SSC) 에 설정했다(Chrest, F.J. et al. (1993). Identification and quantification of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G0 T cells. *Cytometry* **14**: 883-90). 이 영역은 같은 날 분석된 시료들간에 변경되지 않았다. 마커는 IL-4 수용체 알파$^+$ 및 IL-4 수용체 알파$^-$ 군을 구별하기 위하여 그려졌으며, 염색되지 않은 군집의 대조구에서 FL2 (channel 2 fluorescence; PE intensity) 값에 근거한다; 마커 1 (M1) IL-4Ra$^+$ 세포들은 염색되지 않은 군의 99% 의 배제에 근거한다. 각각의 시료에 대해, 적어도 1 x 10^4 세포들의 데이터를 얻었다.

[0310] 돌연변이 단백질 S191.5 K12, S.148.3 J14-AM2C2, S.191.4 B24, S.191.4 K19, 및 S.197.8 D22 (서열번호: 3-6 및 8) 는 시노몰구스 림프구에 대해 높은 수준의 결합을 보였고, IL-4 수용체 알파$^+$ 세포들은 61% 및 80% 의 다양성을 갖고, MFI 값들은 6.0 에서 9.2 의 다양성을 갖는다(표 2). 변이체 S.191.5 H16 (서열번호: 7) 역시 시노몰구스 림프구에 특이적으로 결합하나 나머지 돌연변이 단백질들에 비하면 감소된 친화도이다(41% IL-4 수용체 알파$^+$ cells; MFI values 4.1).

[0311] 유사하게, 이 IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질들이 한 사람의 기증자의 말초혈액 림프구에 대해 결합하는 능력도 플로 사이토메트리로 분석하였다. 모든 항 -IL-4 수용체 알파 돌연변이 단백질들은 사람 세포들에 대해 pTLPC10 음성대조구에 대해 나타난 것보다 상당히 높은 수준의 결합을 보였다. IL-4 수용체 알파$^{+}$ 세포들은 60% 에서 76% 의 다양성을 갖고, MFI 값들은 7.4 에서 9.7의 다양성을 갖는다. pTLPC10 음성 대조구로 염색된 세포들은 낮은 수준의 비특이적 결합을 보였으며, 9% 세포들이 3.2의 MFI 값을 갖는 IL-4 수용체 알파$^{+}$ 로 기록됐다. 돌연변이 단백질 S191.5 K12, S.191.4 B24, 및 S.191.4 K19 (서열번호: 3, 5 및 6) 은 2차 사람 기증자 말초혈액 림프구에 대해 유사한 결합친화도를 나타냈다.

[0312]

	사람 말초혈액 세포들		시노몰구스 말초혈액 세포들	
처리	% 양성	MFI	% 양성	MFI
Unstained	1	2.4	1	1.7
pTLPC10 (neg control)	9	3.2	5	1.9
S.191.4 K19	72	8.9	65	6.6
S.191.5 K12	74	9.7	78	9.0
S.191.4 B24	74	9.3	80	9.2
S.148.3 J14-AM2C2	76	9.6	68	6.8
S.191.5 H16	72	9.0	42	4.1
S.197.8 D22	72	9.3	70	7.1

[0313] **표 4**. 플로 사이토메트리로 분석한 IL-4 수용체 알파-특이적 돌연변이 단백질들이 사람 및 시노몰구스 말초혈액 림프구에 결합하는 능력. IL-4 수용체 알파에 대해 양성 염색된 게이트 세포들의 백분율 및 모든 게이트 세포들의 MFI를 나타냈다.

[0314] **실시예 13: 사람 VEGF에 대해 친화도를 갖는 T1c 돌연변이 단백질의 파지미**드 프리젠테이션 및 선별

[0315] 실시예 1에서 얻은 파지미드를 이용한 파지미드 디스플레이 및 선별을, 다음을 제외하고, 실시예 2에 따라 수행하였다: 표적 단백질, 즉 사람 VEGF-A의 재조합 단편 ($VEGF_{8-109}$, 성숙한 폴리펩티드 사슬의 아미노산 8-109)을 200 nM 의 농도로 사용하고, 생산자의 지시에 따라 스트렙타비딘 비드 (Dynal)를 이용하여 연속적으로 파지-표적 복합체를 포획하는 비오틴화 단백질로 파지미드 라이브러리에 도입했다. 4번의 선별을 수행했다.

[0316] 사람 VEGF A 의 성숙한 폴리펩티드 사슬 (SWISS PROT Data Bank Accession No. P15692)의 아미노산 8부터 109까지를 암호화하는 핵산들을 발현벡터 pET11c (Novagen)에 도입함으로써 상기 표적 단백질을 얻었다. 따라서, *Bam*HI 및 *Nde*I 제한효소 자리들을 사람 VEGF 단편의 cDNA의 3 및 5 말단에 각각 도입하고 VEGF 유전자 단편의 서브클로닝에 사용했다.

[0317] 생성되는 발현 플라스미로 *E. coli* BL21(DE3) 를 형질전환시키고, 암피실린-포함 LB 배지에서 IPTG로 3시간 동안 37℃에서 발현 배양의 유도 후에 $VEGF_{8-109}$ 의 세포질 생산을 이루었다. 5000 g 로 20분간 원심분리한 후에 세포 펠렛을 200 ml PBS에서 각 2 l 의 배양 브로스에 대해 재현탁하고 -20℃에서 오버나잇으로 배양하기 전에 다시 5000 g 로 10분간 원심분리했다. 500 ml 배양 브로스에서 얻은 각각의 세포 펠렛을 20 ml의 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA 에서 재현탁하고 얼음에서 10초간 4번 소니피케이션하였다. 10 분간 10000 g 로 4℃에서 원심분리한 후에, 봉입체들을 15 ml 의 미리 차게한 IB 버퍼 (2 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl)로 가용화하고, 소니피케이션 및 원심분리하였다. 그 후, 상기 세포 펠렛들을 20 ml IB 버퍼로 가용화하고 다시 위와 같이 25 ml 가용화 버퍼(7.5 M urea, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM DTT)에 가용화하기 전에 원심분리하였다. 상기 세포 서스펜션은 2시간 동안 주변공기와 같은 온도로 섞이고 40000 g 에서 15분간 4℃ 로 원심분리하고, 재조합 VEGF 를 포함하는 상등액을 여과했다(0.45 ㎛). 주변공기와 같은 온도에서 오버나잇으로 5 l 버퍼 1 (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 400 mM NaCl, 1 mM Cystein)에 대해 투석 (3.5 kDa molecular weight

cut-off)함으로써 재접힘이 일어났다. 그 후 5 l 버퍼 2 (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1 mM Cystein) 및 5 l 버퍼 3 (20 mM Tris-HCl (pH 8.4))에 대한 2번의 연속적인 투석이 따랐다. 원심분리(40000 g, 20 분, 4℃) 및 농축 후에 표준 방법에 따라 연속적인 이온 교환 크로마토그라피 (Q-Sepharose) 및 크기 배제 크로마토그라피 (Superdex 75)에 의해 재조합 VEGF 단편을 정제하였다..

[0318] **실시예 14: 대량의 ELISA 스크린을 이용한 VEGF-결합 돌연변이 단백질들의** 동정

[0319] 실시예 13에서 얻은 Tlc 돌연변이 단백질들의 스크리닝을 다음의 변형과 함께 실시예 3에 따라 수행하였다: 실시예 11에서 얻은 재조합 표적 단백질 $VEGF_{8-109}$ 를 5 ㎍/ml 사용하였고 직접적으로 마이크로타이어 플레이트 (microtitre plate)에 코팅했다. 2124 클론들과의 스크리닝을 통해 972 1차 히트를 동정했고, 이는 돌연변이 단백질들의 라이브러리로부터의 성공적인 분리를 의미한다. 이 방법을 이용하여 Tlc 돌연변이 단백질 S168.4-L01 (서열번호:26) 을 동정했다._

[0320] **실시예 15: 에러율이 높은 PCR 을 이용한 Tlc 돌연변이 단백질 S168.4-L01** 의 친화도 성숙

[0321] 올리고뉴클레오티드 TL50 bio (서열번호:15) 및 TL51 bio (서열번호:16) 를 이용하여 실시예 4에 따라, 돌연변이 단백질 S168.4-L01에 기반한 변형체들의 라이브러리 제작을 수행했다. 이를 통해 구조유전자에 평균적으로 5개의 치환들을 갖는 라이브러리를 얻었다.

[0322] 파지미드 선별은 제한 표적 농도 (10 nM, 100 nM)를 갖거나 갖지 않고, 제한된 표적 농도(10 nM, 1 nM and 0.2 nM $VEGF_{8-109}$) 또는 짧은 배양시간 (1 및 5 분) 을 이용하여 실시예 13에 따라 수행했다. 네 번의 선별을 수행했다.

[0323]

[0324] **실시예 16: 대량의 ELISA 스크리닝을 이용한 VEGF-결합 돌연변이 단백질들**의 친화도 스크리닝

[0325] 실시예 15에서 얻은 돌연변이 단백질들의 스크리닝을 다음의 변형을 제외하고 실시예 14에 따라 수행했다: 돌연변이 단백질들의 포획을 위해 모노크로날 항-T7 표지 항체 (Novagen) 를 ELISA 플레이트에 코팅했고, 비오틴화 $VEGF_{8-109}$ (500 nM 및 50 nM)의 포획된 Tlc 돌연변이 단백질들에의 결합들은 HRP-연결 Extravidin을 사용하여 검출됐다.

[0326] 돌연변이 단백질 S168.4-L01에 비하여 향상된 친화도를 갖는 다수의 클론들을 동정했고, 이는 친화도 성숙의 기초로 사용된다. 이 방법을 사용하여 클론 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6-H10, S209.2-M17, S209.2-O10 (서열번호:27-33) 을 동정했다.

[0327] **실시예 17: VEGF 결합 돌연변이 단백질들의 생산**

[0328] 생산은 실시예 7에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0329] **실시예 18: Biacore를 이용한 VEGF-특이적 돌연변이 단백질들의 친화도 결정**

[0330] 다음의 변형을 제외하고 실시예 8에 기술된대로 친화도 측정들을 수행하였다: 약 250 RU 의 재조합 VEGF 를 직접적으로 표준 아민화학을 이용해 센서칩에 연결했다. 실시예 15에서 얻은40㎕의 Tlc 돌연변이 단백질들을 400 nM의 농도로 주입했다.

[0331] 돌연변이 단백질 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6H10, S209.2-M17 및 S209.2-O10 (서열번호:27-33)의 친화도 결정의 결과들을 표 5에 요약했다.

[0332]

클론	k_{on}	k_{off}	친화도
	[10^4 1/Ms]	[10^{-5} 1/s]	[nM]
S209.2-C23	3.6	1.3	0.37
S209.2-D16	3.8	3	0.79
S209.2-N9	5.9	7.1	1.2
S209.6-H7	6.4	4.4	0.68
S209.6-H10	4.6	4.4	0.97
S209.2-M17	2.8	2.0	0.72
S209.2-O10	3.2	0.67	0.21

[0333] **표 5.** 25℃에서 Biacore 측정으로 결정된 VEGF에 대한 본 발명의 선별된 돌연변이 단백질들의 친화도

[0334] **실시예 19: 저해 ELISA(Inhibition ELISA)를 이용한 VEGF 길항자 확인**

[0335] VEGF와 VEGF 수용체 2(VEGF-R2)간 상호작용 저해를 저해 ELISA(Inhibition ELISA)를 이용하여 측정했다. 끝까지 단계별로 희석된 각각의 Tlc 돌연변이 단백질에 일정한 농도의 비오틴화된 VEGF8-109(1nM)를 넣고 VEGF/VEGF-R2의 상호작용을 방해하는 항-VEGF 항체(MAB293,R&D Systems)로 덮여있는 ELISA를 이용하여 비어있는 VEGF-R2의 결합자리에 VEGF의 양을 정량했다. 결합자리에 붙은 VEGF는 HRP-결합 엑스트라비딘(Extravidin(Sigma))와 정제된 VEGF를 이용한 표준곡선과의 비교를 통해서 검출했다. 돌연변이 단백질 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6-H10, S209.2-M17 및 S209.2-O10 (서열번호:27-33)을 측정한 결과가 표 6에 정리되어 있다.

[0336]

클론(clone)	친화경쟁 ELISA(Affinity Competition ELISA)
	Ki [nM]
S209.2-C23	2.3
S209.2-D16	3.9
S209.2-N9	2.8
S209.6-H7	2.4
S209.6-H10	1.3
S209.2-M17	2.0
S209.2-O10	0.83

[0337] 표6. VEGF에 대한 선택된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 길항자적 능력과 친화도를 경쟁 ELISA를 이용하여 확인

[0338] **실시예 20: HUVEC 증식 에세이(assay)를 사용한 VEGF 항진자 확인**

[0339] HUVEC 세포증식을 자극하는 VEGF와 FGF-2를 저해하는 정도는 전에 서술된(Korherr C., Gille H, Schafer R., Koenig-Hoffmann K., Dixelius J., Egland K.A., Pastan I. & Brinkmann U. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 103(11) 4240-4245) 방법에서 다음과 같은 방법의 변형을 통해 평가했다. HUVEC세포(promocell) 은 생산자의 추천에 따라 배양되었고 2단계와 6단계 사이의 세포가 사용되었다. 첫째날 1400 세포를 완벽한 배지로 전배양을 한다. 다음날 셀을 씻고 다른 첨가물은 넣지 않고 0.5% FCS, 하이드로코티존(hydrocortisone), 젠타마이신(gentamycin), 암포테리신(amphotericin)이 포함된 최소배지 100ul을 첨가한다. VEGF 특이 돌연변이 단백질 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6-H10, S209.2-M17, S209.2-O10 (서열번호s:27-33), 정상 눈물 리포칼린 (pTLPC10의 유전자 생산물; 대조군) 혹은 VEGF-특이 치료상의 항체 아바스틴®(Roche; 대조군)를 지정된 농도로 단계별 희석된 3배의 웰(well)에 첨가한다. 30분 후 인간 VEGF165(R&D Systems) 혹은

인간 FGF-2(Reliatech) 둘 중 하나를 첨가했다. 세포의 생존능력은 6일 후 생산자의 지시에 따라 CellTiter 96 Aqueous One (Promega)를 이용하여 평가했다.

[0340] 돌연변이 단백질 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6-H10, S209.2-M17 and S209.2-O10 (서열번호:27-33)을 측정한 결과는 그림 21에 있다. 제작된 모든 돌연변이 단백질은 아바스틴 유도 HUVEC 세포 증식을 뚜렷하게 억제한다. 정상 눈물 리포칼린이 VEGF 유도 세포증식을 억제하지 않는 반면에 제작된 모든 돌연변이 단백질은 아바스틴 유도 억제와 비견할 만 하거나 혹은 더 효과가 좋다. FGF-2유도 세포 증식은 어떠한 VEGF 특이 돌연변이 단백질, TLPC10 혹은 아바스틴 일지라도 영향을 주지 못한다(데이터는 보여주지 않았다)

[0341] **실시예 21: VEGF-R2에 대비한 Tlc 돌연변이 단백질의 선택과 파지미**드(phagemid) 소개

[0342] 실시예 1에서 획득된 파지미드의 소개와 선택은 뒤따르는 변형과정과 더불어 실시예 2번에 서술된 바와 같이 수행되었다. 표적 단백질 VEGF-R2-Fc(R&D Systems)를 200nM농도로 놓고 생산자의 지시에 따라 단백질 G 비드(bead)(Dynal)을 사용하여 파지 표적 복합체를 연이어 획득하여 Fc 융합 단백질로서 라이브러리(library)에 제시했다. 위 과정을 4번 반복했다.

[0343] **실시예 22: high-throughput(높은 재료처리) ELISA 스크리닝를 이용하여** VEGF-R2 결합 돌연변이 단백질 확인

[0344] 2.5ug/ml 농도의 VEGF-R2-Fc(R&D Systems) 표적 단백질로서 실시예 3에서 서술된 스크리닝방법을 이용했다. 실시예 21에서 서술된 방법으로 얻어진 1416개의 클론을 스크리닝하여 클론으로부터 돌연변이 단백질이 성공적으로 분리된 593개의 1차적 표시를 확인했다.

[0345] 이런 방법을 통해 돌연변이 단백질인 S175.4 H11(SEQ ID: NO:34)를 확인했다.

[0346] **실시예 23: 오류를 만들기 쉬운 PCR(error-prone PCR)방법을 이용하여 VEGF-**R2 특이 돌연변이 단백질인 S175.4 H11의 친화도 성숙

[0347] 구조유전자당 평균적으로 2개의 치환을 가지는 하나의 라이브러리(library)을 만들어 내는 올리고디옥시뉴클레오티드(oligodeoxynucleotides) TL50 바이오(서열번호:15)와 TL51 바이오 (서열번호:16)을 이용하여 실시예 4에서 서술된 바와 같이 돌연변이 단백질 S175.4 H11에 기반한 변이들을 만들었다.

[0348] 제한된 표적농도(5 nM, 1 nM, 0.2 nM VEGF-R2-Fc)를 이용하여 실시예 21의 방법처럼 VEGF-R2-Fc와 경쟁할 수 있는 재조합된 VEGF8-109(100nM)를 넣은 상태에서 1시간 동안 씻어내거나 짧은 반응시간(2분, 5분)동안 제한된 표적농도(10nm, 100nM) 존재 여부의 조건으로 파지미드(phagemid)를 선택했다. 이러한 선택실험을 4번 반복하였다.

[0349] **실시예 24: high-throughput ELISA 스크리닝을 이용하여 VEGF-R2 결합 돌연**변이 단백질의 친화도 스크리닝

[0350] 생산된 Tlc 돌연변이 단백질을 포획하기 위해 단일클론 항-T7 택(T7-tag) 항체(novagen)를 ELISA 플레이트에 도말하는 방법으로 실시예 3에서 서술된 바와 같이 스크리닝을 수행하였다. 포획된 돌연변이 단백질와 VEGF-R3-Fc(R&D Systems, 3nM과 1nM)의 결합은 VEGF-R2-Fc의 Fc 도메인(domain)부분과 결합하는 HRP-결합 항체를 이용하여 검출했다.

[0351] 많은 클론들이 돌연변이 단백질 S175.4 H11과 비교하여 향상된 친화도를 가지는 것으로 밝혀졌다. 이는 친화도 성숙에 대한 근거가 된다. 이러한 접근을 통해 S197.7-N1, S197.2-I18, S197.2-L22, S197.7-B6, S197.2-N24 (서열번호:35-39)가 확인되었다.

[0352] **실시예 25: VEGF-R2 결합 돌연변이 단백질의 생산**

[0353] 실시예 7에 따라 생산하였다.

[0354] **실시예 26: Biocore를 이용하여 VEGF-R2 특이 돌연변이 단백질의 친화도 측**정

[0355] 대략 500RU의 VEGF-R2-Fc(R&D Systems)를 획득하고 1.5um의 농도로 돌연변이 단백질 80ul를 주입하는 방법으로 실시예 8에서 서술된 바와 같이 친화도를 측정하였다. S175.4-H11, S197.7-N1, S197.2-I18, S197.2-L22, S197.7-B6, S197.2-N24 (서열번호:35-39)을 측정한 결과들은 표7에 정리했다.

[0356]

클론	k_{on}	k_{off}	친화도
	[10^4 1/Ms]	[10^{-5} 1/s]	[nM]
S175.4-H11	0.9	36	35
S197.7-N1	2.1	11	5.5
S197.2-I18	2.7	8.3	3.1
S197.2-L22	1.2	2.4	3.3
S197.7-B6	2.3	13	6
S197.2-N24	2.4	6.4	2.7

[0357] 표7. Biacore 측정법으로 VEGf-R2에 대한 선택된 돌연변이 단백질의 친화도 측정

[0358] **실시예 27: 저해 ELISA를 이용하여 VEGF의 길항자의 확인**

[0359] 저해 ELISA를 이용하여 VEGF-R2 특이 돌연변이 단백질에 의한 VEGF와 VEGF-R@간의 상호작용 억제정도를 측정하였다. 단계적으로 희석된 각각의 돌연변이 단백질과 함께 일정농도의 VEGF-R2(4nM VEGF-R2-Fc, R&D Sysyems)를 인큐베이션했다. VEGF 결합자리가 비어있는 VEGF-R2양은 $VEGF_{8-109}$ 가 도말된 ELISA를 이용하여 정량했다. 결합된 VEGF-R2는 HRP 결합 항 인간 Fc 항체(Dianova)이용하여 검출했고 정제된 VEGF-R3-Fc의 표준곡선과의 비교했다. S175.4-H11, S197.7-N1, S197.2-I18, S197.2-L22, S197.7-B6 and S197.2-N24 (서열번호:35-39)의 측정결과는 표8에 정리했다.

[0360]

클론	친화 경쟁 ELISA
	Ki [nM]
S175.4-H11	12.9
S197.7-N1	12
S197.2-I18	5.5
S197.2-L22	3.5
S197.7-B6	3.8
S197.2-N24	2.3

[0361] 표8. 경쟁 ELISA를 이용하여 VEGF-R2에 대한 (돌연변이방법을 이용해 만들어진) 선택된 눈물 리포칼린의 항진자적 능력과 친화도

[0362] **실시예 28: 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)로 IL-4 수용체의 알파** 특이 돌연변이 단백질의 특정 자리 변이

[0363] 활성부위에 활성화된 PEG를 연결시키기 위해 점 돌연변이를 이용하여 IL-4 수용체의 알파 특이 돌연변이 단백질 S148.3 J14(서열번호:2)의 131번째 글루타민(Glu)을 짝이 맞지 않는 시스테인으로 바꾼다. 자유로운 시스테인 잔기를 가진 이 재조합 돌연변이 단백질은 실시예 7번에서 서술된 것처럼 이어서 대장균에서 생산된다.

[0364] PEG와 돌연변이 단백질 S148.3 J14의 연결을 위해 5.1mg의 폴리에틸렌 글리콜 말레이마이드(polyethylene

maleimide) (평균 분자량 20 kDa, 선형탄소체인; NOF)과 실온에서 3시간동안 교반한다. 최종농도가 85uM이 되게끔 베타 메캅토에탄올(beta-mercaptoethanol)을 첨가하여 반응을 종료한다. 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 투석과정을 진행한 뒤 반응액을 HiTrap Q-XL 세팔로스 컬럼(Sepharose column (Amersham))에 통과시킨다. 용출액은 버리고 이후 NaCl 농도기울기를 0mM에서 100mM까지 선형적으로 변화시킴으로써 PEG가 연결된 돌연변이 단백질과 그렇지 않은 단백질을 분리하고 추출한다.

[0365] **실시예 29: Biacore를 이용하여 PEG가 연결된 돌연변이 단백질 S148.3 J14의** 친화도 측정

[0366] 대략 500RU의 IL-4 수용체 알파 Fc(R&D Systems)를 고정하고 정제된 PEG가 연결된 돌연변이 단백질을 각각 200nM, 67nM, 22nM의 농도로 주입했다. 그림 22와 표9가 측정된 결과다. PEG 연결 돌연변이 단백질 S148.3 J14(ca. 30 nM)의 친화도는 PEG가 연결되지 않는 돌연변이 단백질(ca. 37 nM, 실시예8과 비교)과 비교하여 거의 변하지 않았다.

[0367]

클론	k_{on}	k_{off}	친화도
	[10^5 1/Ms]	[10^{-3} 1/s]	[nM]
S148.3 J14-PEG	1.64	4.93	30

[0368] 표9. Biacore 방법을 이용하여 IL-4 수용체 알파에 대한 PEG화된 돌연변이 단백질 S148.3 J14의 친화도

[0369] **실시예 30: 특정부분 무작위 접근(site-directed random approach)을 이용한** S209.6-H10 돌연변이 단백질의 친화도 성숙

[0370] 20가지의 아미노산이 전부 들어갈 수 있도록 S209.6-H10 돌연변이 단백질(서열번호:30)의 26, 69, 76, 87, 89, 106번 잔기 위치의 무작위화 과정을 통해 S209.6-H10 돌연변이 단백질의 변이들을 만들었다. TL107 디옥시뉴클레오타이드(26번위치), TL46, TL47, TL48, TL49 대신에 TL109 디옥시뉴클레오타이드(87, 89번위치), TL110 디옥시뉴클레오타이드(106번위치), TL111 디옥시뉴클레오타이드(69, 76번위치)가 각각 사용되어 실시예 1번의 과정을 통해 라이브러리가 만들어졌다.

[0371] 제한된 표적농도(10 pM and 2 pM and 0.5 pM of $VEGF_{8-109}$)를 이용하거나 혹은 VEGF에 대응하는 경쟁적인 단일클론항체(Avastin)과의 혼합을 통해서 파지미드를 선택하였다. 이 선택과정은 4번 반복되었다.

[0372] TL107 (서열번호: 40)

[0373] GAAGGCCATGACGGTGGACNNSGGCGCGCTGAGGTGCCTC

[0374] TL109 (서열번호: 41)

[0375] GGCCATCGGGGGCATCCACGTGGCANNSATCNNSAGGTCGCACGTGAAGGAC

[0376] TL110 (서열번호: 42)

[0377] CACCCCTGGGACCGGGACCCCSNNCAAGCAGCCCTCAGAG

[0378] TL 111 (서열번호: 43)

[0379] CCCCCGATGGCCGTGTASNNCCCCGGCTCATCAGTTTTSNNCAGGACGGCCCTCACCTC

[0380] **실시예 31: high throughput ELISA 스크리닝을 이용하여 VEGF 결합 돌연변이** 단백질의 친화도 스크리닝

[0381] 스크리닝은 실시예 14의 방법으로 진행했다. 1ug/ml VEGF가 사용되었으며 추가로

[0382] 1) 생산된 돌연변이 단백질을 획득하기 위해 단일클론 항-T7 항체(novagen)을 ELISA 플레이트(plate)에 도

말했다. 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 획득하기 위한 비오틴화된 VEGF(3nM과 1nM)의 결합은 HRP(양고추냉이 퍼록시디아제(peroxidase))가 연결된 엑스프라빈을 사용하여 검출했다. 그 이외에 다른 스크리닝 준비는 아래와 같다.

[0383] 2) 인간 $VEGF_{8-109}$ 대신에 쥐 $VEGF_{164}$ (R&D Systems)를 마이크로티터(microtiter) 플레이트에 직접적으로 도말했다.

[0384] 3) VEGF 결합 돌연변이 단백질을 포함한 추출액은 1시간동안 60도로 가열했다.

[0385] 4) 5ug/ml mAB293(R&D Systems)를 ELISA 플레이트에 도마하고 비오틴화된 $VEGF_{8-109}$ 를 발현된 돌연변이 단백질과 함께 반응시킨다. mAB293에 $VEGF_{8-109}$가 결합하는 것은 HRP(양고추냉이 퍼록시디아제(peroxidase))가 연결된 엑스트라비딘을 이용하여 검출한다.

[0386] 친화도 성숙을 위한 기초로써 사용되었던 돌연변이 단백질 S209.6-H10과 비교해보면 많은 클론들이 향상된 친화도를 가지는 것으로 나타났다. 이러한 접근법을 이용하여 S236.1-A22, S236.1-J20, S236.1-M11 and S236.1-L03 (서열번호:44-47) 클론들이 확인되었다.

[0387] 이러한 맥락에서 돌연변이 단백질을 만드는 과정에서 눈물 리포칼린의 첫번째 4 아미노산을 삭제했기 때문에 아미노산 서열은 침전된 정상 눈물 리포칼린 단백질의 서열 5(알라닌)에서부터 시작된다. 그래서 알라닌5은 N-말단 아미노산으로 묘사된다. 그 이외 정상 눈물 리포칼린의 C-말단 아미노산 Asp158은 알라닌 잔기(서열번호: 44-47의 잔기 154, 서열번호: 26-40 처럼 제작된 다른 돌연변이 단백질을 보면)로 대체된다. 게다가 실시예 1에서 실험을 하지 않는 상태의 라이브러리를 제작하기 위해 눈물 리포칼린 단백질의 C-말단에 융합된 STREP-TAG II 를 가지는 S236.1-A22, S236.1-J20, S236.1-M11 and S236.1-L03 돌연변이 단백질의 아미노산 서열은 서열번호:52 (S236.1-A22-strep), 서열번호: 53 (S236.1-J20-strep) , 서열번호: 54 (S236.1-M11-strep) 및 서열번호: 55 (S236.1-L03-step)에 나타나 있다. 또한 이것은 통해 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 서열변이 정도가 각각의 돌연변이 단백질에게 VEGF, VEGF-R2 또는 interleukin 4 수용체 알파 사슬(IL-4 수용체 알파)과 같은 주어진 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 주는데 필요한 지시된 돌연변이 위치/돌연변이 와는 동떨어졌다는 것을 알 수 있다.

[0388] **실시예 32: VEGF 결합 돌연변이 단백질의 생산**

[0389] 실시예 7번에 서술된 바에 따라 생산한다.

[0390] **실시예 33: Biacore를 사용하여 VEGF 특이적 돌연변이 단백질의 친화도 결정**

[0391] 친화도 측정은 실시예8과 같이 진행되었다.(고정된 $VEGF_{8-109}$ 에 인간 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)이 결합하는 것을 측정하는 Biacore 측정은 그림 23에 나와있다). 간단히 말하자면 $VEGF_{8-109}$를 표준 아민 화학법을 이용하여 CM5 칩 위에 고정시켰다. 리포칼린 돌연변이 단백질을 500nM에서 16nM까지 6단계 농동구배로 30ul/ml의 유속을 이용하여 실험했다.

[0392] 각각 돌연변이 단백질의 Kon, Koff and KD값을 구하기 위해서 BIA T100 소프트웨어를 사용하여 감지기록 얻었다.

[0393]

돌연변이 단백질	k_{on}	k_{off}	친화도
	$[10^4$ 1/Ms]	$[10^{-5}$ 1/s]	[nM]
S236.1-A22	8,8	2,2	0,25
S236.1-J20	7,9	2,2	0,28
S236.1-L03	6,8	4,4	0,64
S236.1-M11	7,3	2,3	0,31

[0394] 표10. 25도에서 Biacore 측정법을 이용하여 VEGF에 대한 (돌연변이 기법을 이용해 만든) 선택된 돌연변이 단백질의 친화도

[0395] **실시예 34: 저해 ELISA를 이용한 VEGF 길항자의 확인**

[0396] 1시간의 반응시간을 10분으로 줄이면서 실시예 19에 서술된 바와 같이 저해 ELISA를 이용하여 VEGF와 VEGF 수용체 2(VEGF-R2)간의 상호작용의 억제 정도를 평가했다. 저해상수는 다음 표로 정리된다.

[0397]

돌연변이 단백질	친화 경쟁 ELISA
	Ki [nM]
S236.1-A22	5,8
S236.1-J20	6,3
S236.1-L03	9,4
S236.1-M11	6,4

[0398] 표11. 경쟁 ELISA를 이용하여 VEGF에 대한 선택된 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 항길자적 능력과 친화도

[0399] **실시예 35: Biacore를 사용하여 VEGF 특이 돌연변이 단백질 S236.1-A22의 교**차반응성 확인

[0400] 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)을 센서칩에 고정하고 실시예 18에서 서술된 바롸 같이 친화도를 측정했다. 250nM 농도의 샘플 70ul을 주입하였다.

[0401] 그림 24에서 보이는 감지기록 결과의 정량적인 비교를 통해 기본적으로 끝이 잘린 $hVEGF_{8-109}$ 와 $hVEGF_{121}$는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)와 유사한 친화도를 보였다. 꼬아져 있는 형태의 $hVEGF_{165}$도 리포칼린 돌연변이 단백질과 강한 결합을 보인다. 반면에 각각의 쥐 오르토로그(ortholog) mVEGF164의 친화도는 약간 감소하였다. 이성질체 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 와 관련 단백질 PlGF은 이 실험에서 결합하지 않았다(결과는 보여주지 않았다)

[0402] **실시예 36: CD 분광기기를 이용하여 VEGF 결합 돌연변이 단백질에 대한 열변**성 확인

[0403] 파장 228nM으로 국제특허용도 WO2006/056464의 실시예 14에서 서술된 바와 같이 원편광 이색성 분광분석 방법을 사용하여 측정했다. 예를 들자면 눈물 리포칼린 돌여변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44) 녹는점은 75도였다.

[0404] **실시예 37: S236.1-A22의 안정도 실험**

[0405] PBS와 인간혈청에 37도 온도에서 VEGF 결합 돌연변이 단백질 S236.1-A22의 안정도에 대한 실험은 이용된 농도를 1mg/ml로 했다는 것을 제외하고 국제특허용도 WO2006/056464의 실시예 15에 서술되어진 대로 진행되었다. HPLC-SEC(결과는 보여주지 않았다)로 판단해 볼 때 PBS에서 7일간 인큐베이션(incubation)하는 동안 돌연변이 단백질의 변성을 발견할 수 없었다. 인간 혈청속에서 리포칼린 돌연변이 단백질의 인큐베이션은 참조결과와 비교하여 7일 후 대략 70%정도로 친화도가 떨어지는 결과를 보였다(그림25a)

[0406] **실시예 38: 항 VEGF 돌연변이 단백질에 알부민 결합 부위 융합**

[0407] 혈청 반감기를 늘이기 위해서 항 VEGF돌연변이 단백질의 C-말단부위에 알부민 결합부위(ABD)를 융합시켰다. 발현에 사용된 유전자제작물은 pTLPC51_S236.1-A22 (서열번호:50). (그림 26)으로 명명한다.

[0408] ABD 융합된 VEGF 특이돌연변이단백질 혹은 Tlc-ABD (대조군)의 예비 생산을 실시예 7번에 서술된 바와 같이 수행되었다.

[0409] 실시예 18과 같이 표면 플라스몬(plasmon) 공명(Biacore)를 사용해 친화도 측정했다. 재조합VEGF쪽에 있는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (A22-ABD) (서열번호: 51) (200 pM)의 친화도는 기본적으로 변하지 않았고 260pm으로 측정되었다(그림 27)

[0410] 또한 약 850RU 인간 혈청 알부민을 표준 아민 화학법을 이용하여 센서칩에 결합시켰고 실시예 8과 돌일한 방법으로 ABD 부위의 통합정도를 시험했다. 60ul의 ABD 결합 돌연변이 단백질 (A22-ABD (서열번호: 51) 혹은 정상 Tlc-ABD (서열번호:49))를 500nM농도로 주입했다. 친화도는 20nM였다.

[0411] 인간 혈청에서 ABD 융합된 S236.1-A22(서열번호:51)의 안정도는 실시예37에 서술된 방법으로 측정되었다. 7일의 인큐베이션 기간동안 활성의 소실은 관찰되지 않았다.(그림 25b)

[0412] 인간혈청 알부민속에서 리포칼린 돌연변이 단백질 A22-ABD (ABD-융합된 S236.1-A22)의 기능성은 VEGF로 유도된 HUVEC 증식을 억제하는 능력을 통해 평가했다. 위 에세이(assay)는 지시된 곳에 인간혈청 알부민(HAS, 5uM)첨가하는 것을 제외하고 실시예39 서술방법으로 실행되었다. 5uM HSA에서 A22-ABS의 99.8%이상은 A22-ABD의 나노몰 친화도 때문에 주어진 특정시간에 HAS에 대해 관련된다. IC50값은 다음과 같이 확인되었다.

[0413] S236.1-A22-ABD IC50: 760 pM

[0414] S236.1-A22-ABD (+HSA) IC50: 470 pM

[0415] **실시예 39: VEGF로 유도된 HUVEC 증식의 억제**

[0416] HUVEC(promocell)는 젤라틴 도말된 디쉬(dishes)에서 증식되었고 P2와 P8단계 사이에서 사용되었다. 첫째날 1400 세포를 96 웰 플레이트(well plate)에서 완벽한 배지로 전배양을 한다. 둘째날 셀을 씻고 0.5% FCS, 하이드로코티존(hydrocortisone), 젠타마이신(gentamycin)이 포함된 최소배지 100ul을 첨가한다. 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22(서열번호:44)과 혼합된 20ng/ml VEGF165 혹은 10ng/ml FGF-2을 30분동안 인큐베이션하고 웰에 첨가하여 증식을 자극한다. 생존능력은 6일째 관찰되었다. 결과는 억제 %로 표현되고 IC50값은 다음과 같다.(그림29)

[0417] S236.1-A22 IC50: 0.51 nM

[0418] Avastin IC50: 0.56 nM

[0419] FGF-2를 이용한 자극은 VEGF 길항자에 의해 영향을 받지 않았다.(결과는 보여주지 않았다)

[0420] **실시예 40: HUVEC에서 VEGF 매개 MAP 키나아제(kinase) 활성의 억제**

[0421] HUVEC는 표준배지(promocell, Heidelberg)에 각 웰당 1400 셀을 넣고 96 웰 플레이트에서 배양한다. 다음날 FCS가 0.5%까지 감소되었고 16시간 동안 계속 배양했다. 그때 셀을 5시간 동안 최소배지에 0,5%BSA 로 굶긴다. 용량반응곡선을 얻기 위해 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 A22 혹은 아바스틴(bevacizumab, Genentech/Roche)의 농도증가조건에서 10분 동안 $VEGF_{165}$로 HUVEC를 자극한다. Map 키나아제 ERK1과 ERk2의 인산화는 생산자 취급설명서 Active Motif, Rixensart, Belgium)에 따라 ELISA를 이용하여 정량했다. Ic50값은 돌연변이 단백질 A22 (서열번호:44)는 4.5nM, 아바스틴은 13nM(그림 30 참조)로 확인되었다.

[0422] **실시예 41: 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 국부적 운영에 관한 혈관 투과**도 에세이

[0423] 350±50g 무게의 던칸-하틀리(Duncan-Hartley) 기니 돼지의 어깨와 등부분을 면도했다. 실험동물은 귀정맥을 통해 1% 에반 블루 다이(Evan;s blue dye) 1ml을 정맥내 주사했다. 30분후, 20ng $VEGF_{165}$ (Calbiochem)을 몰농도 10배로 실험물질 혹은 대조군과 혼합하고 3 x 4 격자리에서 피부내로 주입했다. 30분후, 실험동물은 이산화칸소 질식방법으로 안락사시켰다. VEGF주입 한시간 후 격자무늬를 포함한 피부를 제거했고 결합조직도 정리했다. 염

색약 분풀영역은 이미지 분석기를 이용해 정량했다. (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) (그림 31참조)

[0424] **실시예 42: CAM(병아리 장뇨막) 에세이**

[0425] FGF-2 (500 ng), VEGF (150 ng) 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질(1.35 ㎍) 혹은 아바스틴(10 ㎍)이 포함된 콜라겐 온플란트(onplant)를 10일된 닭배아 장뇨막위에 (4개/실험동물, 10마리/그룹) 놓았다. 24시간뒤 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 혹은 아바스틴의 동일한 양을 콜라겐에 다시 넣었다. 72시간후 콜라겐 온플란트를 걷어내고 이미지를 얻었다.

[0426] 적어도 하나의 관을 포함하는 양성격자의 비율은 블라인드 관찰자(blinded)에 의해 확인되었다. 양성격자의 분획으로써(그림 32) 정상 눈물 리포칼린 단백질뿐만 아니라 VEGF 길항자 S209.2-010 (서열번호:33)와 아바스틴의 중앙의 혈관생성 색인값을 확인했다.

[0427] **실시예 43: 쥐에서 A22와 A22-ABD에 대한 약리역학 매개변수의 확인**

[0428] 정맥내 주입후 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1 A22 (서열번호:44) (4mg/kg)에 대한 약리역학 매개변수(반감기 플라즈마농도, 생체이용도)와 단일 환약처지의 정맥내 투입과 i.p.처리에 뒤이은 ABD 연결된 돌연변이 단백질 S236.1 A22 (서열번호:51) (5.4mg/kg)의 결합 단백질 부분은 NMRI 쥐에서 확인되었다.

[0429] 플라즈마는 미리 정한 시간에 획득한 말초혈액 샘플로부터 준비됐다. 리포칼린 돌연변이 단백질의 농도는 ELISA에 의해 확인되었다. 결과는 WinNonlin 소프트웨어(Pharsight Corp., Mountain View, USA)를 이용해 분석되었다. $T_{1/2}$A22 i.v.: 0.42h; $T_{1/2}$ A22-ABD i.v.: 18.32h; $T_{1/2}$ A22-ABD i.p.: 20.82h. A22-ABD 결합 단백질의 i.p.처리에 뒤이은 생체이용도는 82.5%였다(그림33).

[0430] **실시예 44: 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 시스템 운영에 관한 혈관 투과**도 에세이

[0431] 실험 12시간 전 실험물질 혹은 대조군 물질이 그룹당 3마리인 실험동물에 정맥내 주사했다. 그룹 1: PBS 용액, 그룹 2: 아바스틴 10mg/kg; 그룹 3: 돌연변이 단백질 S236.1 A22-ABD, 6.1mg/kg; 그룹 4: TLPC51, 6.1 mg/kg. 에반 블루 다이를 주입하며 시간을 0으로 시작한다. 30분후 4개의 VEGF 농도(5, 10, 20 or 40ng)를 3 x 4 격자에 3배로 피부내에 주입했다. VEGF 주입 30분 후 실험동물은 희생되었고 염색약 분출은 위에서처럼 정량했다. (그림 34참조)

[0432] **실시예 45: 종양 이종이식 모델**

[0433] 방사선이 조사된(2.5 Gy, Co^{60}) 스위스 누드(nude) 쥐의 오른쪽 옆구리에(그룹당 n=12) 마드리젤(matriegel)속 $1x10^7$ A673 (평활근 조직에서 생긴) 악성 종양세포(ATCC)을 접종했다. 실험은 복강내에서 실시되었고 동일한 날 초기화되었고 21동안 계속되었다. 그룹1 : PBS 용액, 매일, 그룹 2: 아바스틴((bevacizumab, Genentech/Roche), 5mg/kg 3일마다 한번씩; 그룹 3: 돌연변이 단백질 A22-ABD (서열번호:51), 매일, 3.1 mg/kg; 그룹 4: TLPC51, 매일, 3.1 mg/kg. 리포칼린 A22-ABD의 투입량은 돌연변이 단백질의 VEGF 결합부위와 A22-ABD 데이터와 쥐속에서 추정되는 항체의 혈청 반감기에 기반한 아바스틴의 일정한 몰농도를 유지하기 위해 선택되었다. 종양크기는 1주일에 2번씩 캘리퍼(calliper)로 측정했고 종양부피는 공식(세로*가로2)/2)에 다라 측정되었다. 쥐는 종양부피가 2,000mm^3(그림 35참조)를 초과하였을 때 희생되었다.

[0434] **실시예 46: 리포칼린 돌연변이 단백질의 시스테인 변이체를 찾기 위한 스크**리닝

[0435] 반응그룹에 예를 들어 활성화된 PEG를 연결하기 위해 짝이 없는 시스테인 잔기를 점(site-directed) 돌연변이 방법을 이용하여 집어 넣었다. 자유 시스테인 잔기를 가지고 있는 재조합 돌연변이 단백질은 실시예 7과 같은 방법으로 대장균에서 연이어 생산되었다. 발현량을 확인하고 실시예 14와 같이 ELISA를 이용하여 친화도를 측정하였다.

[0436] VEGF 특이 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)의 시스테인 스크리닝의 모범적인 결과는 아래 표와 같다. Thr 40, Glu 73, Asp 95, Arg 90 및 Glu 131는 아래와 같은 올리고뉴클레오티드를 이용하여 시스테인으로 대체되었다.

[0437] A22_D95C 앞(forward): GAGGTCGCACGTGAAGTGCCACTACATCTTTTACTCTGAGG (서열번호: 56),

[0438] A22_D95C 뒤(reverse): CCTCAGAGTAAAAGATGTAGTGGCACTTCACGTGCGACCTC (서열번호: 57),

[0439] A22_T40C 앞: GGGTCGGTGATACCCACGTGCCTCACGACCCTGGAAGGG (서열번호: 58),

[0440] A22_T40C 앞: CCCTTCCAGGGTCGTGAGGCACGTGGGTATCACCGACCC, (서열번호: 59),

[0441] A22_E73C 앞: CCGTCCTGAGCAAAACTGATTGCCCGGGGATCTACACGG (서열번호: 60),

[0442] A22_E73C 앞: CCGTGTAGATCCCCGGGCAATCAGTTTTGCTCAGGACGG (서열번호: 61),

[0443] A22_E131C 앞: GCCTTGGAGGACTTTTGTAAAGCCGCAGGAG (서열번호: 62),

[0444] A22_E131C 앞: CTCCTGCGGCTTTACAAAAGTCCTCCAAGGC (서열번호: 63),

[0445] A22_R90C 앞: CGTGGCAAAGATCGGGTGCTCGCACGTGAAGGACC (서열번호: 64), 및

[0446] A22_R90C 뒤: GGTCCTTCACGTGCGAGCACCCGATCTTTGCCACG (서열번호: 65).

[0447]

클론	생산량	친화도
	[μg/L]	[nM]
S236.1-A22	1000	10
S236.1-A22 T40C	420	14
S236.1-A22 E73C	300	13
S236.1-A22 D95C	750	10
S236.1-A22 R90C	470	10
S236.1-A22 E131C	150	> 100

[0448] 표12. ELISA로 확인한 VEGF에 대한 돌연변이 단백질 S236.1-A22 과 Thr 40→ Cys (서열번호: 66), Glu 73→ Cys (서열번호: 67), Asp 95→ Cys (서열번호: 68), Arg 90→ Cys (서열번호: 69), Glu 131→ Cys (서열번호: 70) 변이체들의 친화도

[0449] **실시예 47: 이어탁신(eotaxin)-3 분비 에세이**

[0450] 이어탁신(eotaxin)-3 분비 에세이는 72시간 내내 A549 세포들에서 수행되었다. A549 세포와 같은 폐상피세포는 IL-4/IL-13의 자극에 의해 이어탁신-3를 분비한다. 그래서 A549세포를 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24 (서열번호:4)의 증가하는 농도로 처리하고 각각 0.7 nM IL-4 혹은 0.83 nM IL-13로 자극한다. 이어탁신-3 분비는 상업화된 샌드위치(sandwich) ELISA(R&D Systems)를 이용하여 72시간 후에 평가했다. 그 결과 (그림 36) IL-4수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24은 A549세포에서 IL-4과 IL-13 매개 이어탁신-3 분비를 보였다. Ic50값은 각각 32와 5.1nM이다.(표 13)

[0451]

	IC_{50} (nM)
IL-4	32
IL-13	5.1

[0452] 표13. A549세포에서 IL-4과 IL-13 매개 이어탁신-3 분비에 관한 S191.4. B24의 IC50값

[0453] **실시예 48: 말초혈액 단핵세포에서 IL-4/IL-13 매개 CD23 유도**

[0454] 전체 인간 PBMC는 (혈액을 centrifuged하면 생기는) 담황색 층으로부터 분리했다. PBMC는 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24의 증가되는 농도를 처리했다. IL-4 혹은 IL-13는 각각 최종농도가 1.0nM과 2.5nM이 되도록 첨가되었다. PBMC는 10% FCS가 포함되어 있는 RPMI 배지에서 48시간 동안 배양되었다. 세포를 항-CD14-FITC와 항-CD23-PE로 염색되어 유동 혈구계산을 이용하여 분석했다. 각각의 지점에서 모든 CD14 양성 단핵세포 중에 이중양성세포의 비율을 측정하였고 돌연변이 단백질 농도의 함수로 그래프를 그렸다.

[0455] 얻어진 결과로부터 단핵세포에서 IL-4와 il-13매개 CD23의 발현을 저해하는 것에 관한 발현돌연변이 단백질 S191.4. B24의 IC50값이 계산되었다(표14)

[0456]

	IC_{50} (nM)
IL-4	905
IL-13	72

[0457] 표14. PBMC에서 IL-4와 IL-13매개 CD23의 발현에 관한 S191.4. B24의 IC50값

[0458] **실시예 49: IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24의 친화도에** 대한 쉴드(Schild) 분석법

[0459] 쉴드 분석법은 돌연변이 단백질의 가설상태의 경쟁적 결합 모드를 확인하고 세포에서 K_d값을 확인하기 위해 수행된다. TF-1세포에 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24 (0, 4.1, 12.3, 37, 111.1, 333.3 or 1000 nM)를 고정된 농도로 처리하고 IL-4로 적정했다. 4일후에 세포 생존능력을 평가했다(그림 38A) EC_{50} 값은 비선형 회귀방법에 의해 확인되었다. 획득한 결과(그림 38B)에 대한 전통적인 쉴드분석을 통해 K_d값 192pM(선형 회귀)와 더 정확하게 비선형회귀방법으로 116pM 값을 구할 수 있었다. 쉴드 기울기 1.084는 경쟁적 저해를 의미한다. 다시 말하면 돌연변이 단백질과 IL-4는 IL-4수용체 알파 결합과 경쟁한다.

[0460] **실시예 50: 제 1기 B세포에 돌연변이 단백질 S191.4. B24의 피코**몰(picomolar)농도 결합

[0461] 인간 혈액으로부터 PBMC를 분리하여 IL-4 수용체 알파 결합 인간 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S191.4. B24 혹은 정상 인간 눈물 리포칼린(TLPC26)로 각기 다른 농도를 만들어 배양한다. 세포는 스트렙타비딘(streptavidin)-PE에 뒤이은 항-CD20-FITC 단일클론 항체와 비오틴화된 항 리포칼린 항혈청으로 염색한다. 정상 리포칼린과 IL-4 수용체 알파 결합 인간 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S191.4. B2의 결과는 각각 그림 39A, B에 나와있다. PE-양성 B세포의 확인된 퍼센트를 리포칼린 돌연변이 단백질의 농도에 대해 맞추었고(그림 39C) 획득한 곡선으로부터 EC_{50} 값을 계산했다. 제 1기 B세포에 결합하는 IL-4 수용체 알파 결합 인간 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S191.4. B2(서열번호:4)의 EC_{50} 값은 105pM이다.

[0462] **실시예 51: 피하와 기관지내 처리 후 돌연변이 단백질의 생체이용도**

[0463] 쥐에 4mg/kg로 환약주입을 한 후 4시간동안 돌연변이 단백질 S191.4. B24의 플라즈마 농도를 조사하는 방법으로 정맥내, 피하 혹은 기관지내 처리 후 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4. B24의 생체이용도를 측정했다. 기관지내 처리는 상업적으로 이용되는 기관지내 투입량 기구((MicroSprayer® Penn-Century Inc, Philiadelphia, PA, USA)를 이용하여 진행했다. 그것은 실린지(syringe)에 붙어 있는 길고 가는 튜브의 끝에서 분무된다. 분무되는 크기는 20uM였다. 피하 주입은 연속적 약리역학분석의 결과 100% 생체이용도를 나타냈다. 항체와는 반대로 인간 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 폐로의 이동은 거의 없는 것으로 나타났다. 결과는 표

15에 있다.

[0464]

	정맥내 처리.	피하 처리	기관지내 처리
반감기 [h]	0.78	1.6	2.36
생체이용도(AUC_{last})	n/a	97.2%	10%
생체이용도(AUC_{inf})	n/a	119%	13.8%

[0465] 표15. 정맥내, 피하, 기관지내 처리 후 S191.4 B24의 반감기와 생체이용도

[0466] **실시예 52: HUVEC 증식에세이를 이용하여 PEG화된 VEGF 항길자의 시험관내(생체밖에서의) 효과**

[0467] VEGF로 자극한 HUVEC 세포 증식의 억제는 실시예 20을 기반으로 다음과 같은 변형방법을 이용하여 평가했다. VEGF 특이 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)을 실시예 28에서 서술된 것 같이 95C위치에서 PEG 20, PEG 30 혹은 PEG 40를 연결했다. PEG화된 돌연변이 단백질 변이체와 정상 눈물 리포칼린(pTLPC26의 유전자 산물; 대조군)을 단계적으로 희석하여 VEGF165 에 첨가하여 실온에서 30분간 인큐베이션했다. 혼합물을 3배의 웰안에 있는 HUVEC 세포에 첨가하여 최종적으로 20ng/ml VEGF농도와 0.00nM와 2000nM 사이의 농도를 만들었다. 세포의 생존능력은 생산자의 설명서에 따라 CellTiter-Glo (Promega)를 이용하여 6일 후 평가했다.

[0468] 위에서 언급한 돌연변이 단백질의 측정결과는 그림 41에 제시되어 있다. S236.1-A22 (서열번호:44) 와 그것의 PEG화된 변이체는 결합된 PEG일부분의 분자량이 줄어들면서 HUVEC세포의 VEGF 유도 증식을 뚜렷하게 억제했다. 반면 정상 눈물 리포칼린은 VEGF 유도 세포 증식을 억제하지 못했다(표16)

[0469]

	IC_{50} (nM)
S236.1-A22	0.4
S236.1-A22-PEG20	0.53
S236.1-A22-PEG30	2.13
S236.1-A22-PEG40	3.27

[0470] 표16. HUVEC 세포증식 억제에 관한 S236.1-A22 (서열번호서열번호것의 PEG 20, PEG 30 혹은 PEG 40를 이용하여 PEG화된 변이체의 IC_{50} 값

[0471] 여기에서 예로써 서술된 제작 돌연변이 단백질들은 여기에서 특이적으로 발표되지 않았지만 어떤 성분이 없거나 제한된 조건에서 적절하게 이용될 수 있다. 그래서 예를 들면 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "포함하는(containing)" 등과 같은 용어는 제한없이 넓게 쓰였다. 또한 여기에서 사용된 용어와 표현은 제한에 관한 것이 아니라 서술에 관한 용어로써 사용되었다. 서술되고 보여진 그림의 등가물 혹은 그것의 부분을 제외하는 영어와 표현의 사용은 의도하지 않았다.

[0472] 하지만 다양한 변형방법들은 돌연변이 단백질의 제작이 요구되는 영역에서 가능했다. 그래서 현재 제작된 돌연변이 단백질은 우선적인 구체화와 선택적 특징에 의해 특이적으로 제작되었지만 이곳 저곳에서 만들어진 돌연변이 단백질의 변형과 변이는 시술적으로 숙련된 사람들에 의해 진행되었고 그런 변형과 변이는 돌연변이 단백질의 영역을 고려하면서 진행되었다. 돌연변이 단백질은 여기에서 넓고 일반적으로 서술되었다. 또한 포괄적 명세에서 더 한정된 종과 서브제네릭(subgeneric) 단위설정 각각은 돌연변이 단백질의 부분을 형성한다. 이는 조항 혹은 삭제된 실험재료가 여기에서 특이적으로 열거되거나 열거되지 않는 것에 관계없이 돌연변이 속(genus)으로부터 어떤 대상물을 제거하는 부정적 제한으로 돌연변이 단백질을 포괄적으로 서술하는 것을 의미한다. 그 외에 돌연변이 단백질의 특징과 모양이 마쿠시(Markush) 단위의 조항으로 서술될 것이기 때문에 돌연변이 단백질 또한 마쿠시 단위들 중 하위단위 혹은 개별단위의 조항으로 서술될 것이다. 여기에서 발명된(이 실험에서 제작된)

돌연변이 단백질의 구체화 작업은 추후 명백히 진행될 것이다.

산업상 이용 가능성

[0473] 본 발명은 사람 눈물의 리포칼린으로부터 유래된 신규한 돌연변이단백질(mutein)에 관한 것으로서, 본 발명은 상기 돌연변이단백질의 다양한 이용뿐만 아니라 상기 리포칼린 돌연변이단백질을 포함하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0182] 본 발명은 이하 기술되는 실시예와 첨부된 도면에 의해 더욱 상세히 설명된다. 다만, 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 도면에 제한되는 것은 아니다. 달리 표시한 바가 없다면, Sambrook et al. (*supra*) 에 기술된 것과 같은 재조합 유전자 기술의 정립된 방법들을 사용하였다.

[0183] **도 1**은 발현벡터 pTLPC10 (서열번호 1) 의 지도를 나타낸다.

[0184] **도 2**는 IL-4 수용체 알파에 결합친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S148.3 J14 의 폴리펩티드 서열을 나타낸다.

[0185] **도 3**은 ELISA 를 통하여 친화도를 스크리닝하는 방법 및 IL-4 수용체 알파에 대한 친화도로 돌연변이 단백질들로부터 얻은 결과들을 보여준다.

[0186] **도 4**는 수용체 알파에 대해 가장 높은 친화도를 갖는 돌연변이 단백질들(서열번호 3-8)의 폴리펩티드 서열들을 보여준다.

[0187] **도 5**는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S148.3 J14; 서열번호2) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0188] **도 6**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.5 K12; 서열번호 3) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0189] **도 7**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S148.3 J14AM2C2; 서열번호 4) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0190] **도 8**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.4 B24; 서열번호 5) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0191] **도 9**는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.4 K19; 서열번호 6) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0192] **도 10**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.5 H16; 서열번호 7) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0193] **도 11**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S197.8 D22; 서열번호 8) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0194] **도 12**는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S148.3 J14; 서열번호 2) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0195] **도 13**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.5 K12; 서열번호 3) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0196] **도 14**는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S148.3 J14AM2C2; 서열번호 4) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0197] **도 15**는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.4 B24; 서열번호 5) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0198] **도 16**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.4 K19; 서열번호 6) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0199] **도 17**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.5 H16; 서열번호 7) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0200] **도 18** 은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S197.8 D22; 서열번호 8) 의 IL-4 수용체 알파에 대한 결합의 경쟁(competition) ELISA 측정을 보여준다.

[0201] **도 19**는 IL-4 또는 IL-13 및 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S191.5 K12, S148.3 J14AM2C2, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, 및 S197.8 D22 [서열번호: 3-8])의 존재 하에서 TF-1 세포 증식 측정결과를 보여준다.

[0202] **도 20**은 pTLPC27 (서열번호 9) 발현벡터의 지도를 나타낸다.

[0203] ***도 21**은 사람 VEGF165 및 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질들(S209.2 C23, S209.2 D16, S209.2 N9, S209.6 H7, S209.6 H10, S209.2 M17, S209.2 010 [서열번호:27-33]), 야생형 눈물 리포칼린 (pTLPC10 유전자 산물; 대조구) 또는 Avastin(Roche; control) 의 존재하의 사람 제대정맥 (HUVEC)으로부터 배양된 내피세포들의 증식측정 결과를 보여준다.

[0204] **도 22**는 PEG화된(PEGylated) 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질(S148.3 J14; 서열번호:2)의 IL-4 수용체 알파에의 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0205] **도 23**은 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S236.1-A22, 서열번호:44)의 고정된 $VEGF_{8-109}$에의 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0206] **도 24**는 $hVEGF_{8-109}$, $hVEGF_{121}$, 스플라이스 형태의 $hVEGF_{165}$, 및 각각의 마우스 오솔로그(ortholog) $mVEGF_{164}$ 의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)에의 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0207] **도 25** 는 상기 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질S236.1-A22 (서열번호:44) 의 사람 혈장 및 유리체액(vitreous liquid) 내에서의 안정성 시험 결과 (도 25A) 및 상기 돌연변이 단백질 S236.1-A22과 알부민-결합 도메인 (ABD) (서열번호:51) 의 융합단백질의 안정성 시험 결과를 보여준다(도 25B).

[0208] **도 26** 는 OmpA 신호서열 (OmpA), 알부민-결합 도메인(abd)에 융합된, Strep-tag II가 뒤따르는 돌연변이된 사람 눈물 리포칼린(Tlc)을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 발현벡터 pTLPC51을 보여준다.

[0209] **도 27** 는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질S236.1-A22 (서열번호:44) 및 돌연변이 단백질 S236.1-A22 의 ABD와의 융합단백질(서열번호:51)의 재조합 VEGF 에 대한 결합의 BIAcore 측정을 보여준다.

[0210] **도 28** 는 사람 혈장 알부민(HSA)의 존재 또는 부존재 하에 ABD를 가진 S236.1-A22 (서열번호:51)에 의한 VEGF 유발 HUVEC 증식의 억제를 보여준다..

[0211] **도 29** 는 Avastin 및 야생형 리포칼린에 의한 억제에 대한 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)에 의한 HUVEC으로부터 배양한 내피세포의 VEGF 유발 증식의 억제를 보여준다.

[0212] **도 30** 는 Avastin에 의한 억제에 대한 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)에 의한 HUVEC에서의 VEGF 매개 MAP 키나아제 활성 억제를 보여준다.

[0213] **도 31** 는 Avastin 및 야생형 리포칼린에 대한 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S209.2_010 (서열번호:33)의 국부적 투여에 의한 혈관투과성 측정 결과를 보여준다.

[0214] **도 32** 는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S209.2_010 (서열번호:33) 및 Avastin 및 야생형 눈물 리포칼린에 대한 메디안 앤지오닉 인덱스(median angionic index)를 비교한 CAM 측정 결과를 보여준다.

[0215] **도 33** 은 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44) 및 돌연변이 단백질 S236.1-A22 과 ABD 의 융합단백질 (서열번호:51)에 대한 NMRI 마우스의 혈장내 리포칼린 돌연변이 단백질의 농도를 보여준다.

[0216] **도 34** 는 야생형 눈물 리포칼린, PBS 버퍼 및 Avastin 과 비교한 사람 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22와 ABD와의 융합단백질 (서열번호:51) 의 전신투여(systemic administration) 후의 혈관투과성 측정 결과이다.

[0217] **도 35** 는 야생형 눈물 리포칼린, PBS 버퍼 및 Avastin과 비교한 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 의 ABD와의 융합단백질 (서열번호:51)의 복강내투여(intraperitoneal administration)에 대한 암 이종이식 모델

(tumor xenograft model) (Swiss nude mice)의 결과이다.

[0218] **도 36** 은 증가하는 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4) 의 부존재 및 존재하에 IL-4 또는 IL-13으로 자극받은 A549 세포들의 Eotaxin-3 분비 측정 결과이다.

[0219] **도 37** 은 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질S191.4 B24 (서열번호:4)의 증가하는 농도의 부존재 및 존재하에 자극받은 PBMCs 상에서 IL-4/IL-13 유도 CD23 발현을 보여준다.

[0220] **도 38**은 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 Schild 분석 결과를 보여준다.

[0221] **도 39** 는 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 사람 1차 B 세포들에 대한 친화도 측정 결과를 보여준다.

[0222] **도 40** 은 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 정맥내, 피하 또는 기관내(intratracheal) 투여 후의 생물학적 이용가능성(bioavailability) 시험 결과를 보여준다.

[0223] **도 41** 은 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44) 의 VEGF-자극 HUVEC 증식 측정에서 PEG20, PEG30 또는 PEG40에 의한 PEG화(PEGylation)가 있거나 없는 시험관내 포텐시(potency) 측정을 나타낸다.

[0224] **도 1** 은 OmpA 신호서열(OmpA), T7 친화표지 및 Strep-tag II가 뒤따르는 돌연변이된 사람 눈물 리포칼린(Tlc)을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 발현벡터 pTLPC10을 보여준다. 돌연변이된 유전자 카세트의 클로닝에 사용되는 *Bst*XI-제한효소 자리 및 구조 유전자에 인접하는 제한효소 자리 모두를 표지하였다. 유전자 발현은 테트라사이클린 프로모터/작동자(operator) ($tet^{p/o}$)의 조절 하에서 일어났다. 전사는 리포단백질 전사 종결자(t_{lpp})에서 종결되었다. 상기 벡터는 복제기원(ori), 사상형(filamentous) 파지 f1 (f1-IG) 의 인터제닉 영역, 암피실린 저항성 유전자 (amp) 및 테트라사이클린 억제 유전자 (tetR)를 추가로 포함한다. 서열번호 1과 같이 pTLPC10 핵산 서열과 관련된 부분은 서열목록에서 암호화된 아미노산 서열과 함께 나타난다. 상기 부분은 *Xba*I 제한 효소 자리로 시작해서 *Hin*dIII 제한효소 자리로 끝난다. 이 영역 외의 상기 벡터 부위는 독일 특허 공개공보 DE 44 17 598 A1 에 나온 완전한 뉴클레오티드 서열인 벡터 pASK75 와 동일하다.

[0225] **도 2** 는 IL-4 수용체 알파와 결합친화도를 나타내는 본 발명의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질(S148.3 J14) 의 1차 구조를 보여준다. 처음 21 잔기들 (밑줄) 은 주변세포질 발현에 의해 잘리는 신호 서열을 이룬다. N-말단 T7-표지 (이태릭) 및 C-말단 Streptag-II (볼드) 는 동정된 단백질의 일부이다. 또한 도 2는 2개의 마지막 C-말단 아미노산 잔기들 (S157 및 D158)뿐 아니라 4개의 N-말단 아미노산 잔기들 (H1 H2 L3 A4) 이 본 발명의 예시적인 돌연변이 단백질에서 삭제되었다는 것을 보여준다.

[0226] **도 3**은 친화도 스크리닝 실험의 결과이다. 모노크로날 항 -StrepTag 항체(Qiagen) 가 발현된 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 포착하기 위하여 ELISA 플레이트에 코팅되고, IL-4 수용체 알파-Fc (R&D Systems; 3 nM and 0.75 nM) 의 상기 포착된 돌연변이 단백질에의 결합을 IL-4 수용체 알파-Fc 의 Fc 도메인에 대한 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제 (HRP)-연결 폴리크로날 항체를 이용하여 검출하였다. 친화도가 향상된 클론들은 더 높은 신호를 나타냈 (좌측). IL-4 는 ELISA 플레이트에 코팅되고, IL-4 수용체 알파 -Fc (3 nM) 는 발현된 돌연변이 단백질과 함께 배양시켰다. 비어있는 IL-4 결합자리를 갖는 IL-4 수용체 알파-Fc의 결합은 IL-4 수용체 알파-Fc 의 Fc 도메인에 대한 HRP-연결 폴리크로날 항체를 이용하여 측정하였다. 길항적 친화도 증가 클론들은 더 낮은 신호들을 보여주었다 (우측). 본 발명의 돌연변이 단백질 S148.3 J14 (서열번호: 2) 에 대응하는 신호들은 화살표로 표시하였고, 개별 클론들의 신호들은 다이아몬드로 나타내었다.

[0227] **도 4** 는 IL-4 수용체 알파에 대해 가장 높은 결합 친화도를 갖는 서열번호2 (S148.3 J14)의 친화도 성숙에 의해 얻은 6개의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 폴리펩티드 서열들(S191.5 K12, S148.3 J14AM2C2, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, and S197.8 D22 [서열번호: 3-8])을 보여준다. 대표적인 1차 구조의 처음 21잔기들(밑줄)은 신호서열을 이루고, 이것은 주변세포질 발현에 의해 잘린다. C-말단 StrepTag-II (볼드) 은 동정된 단백질의 일부이다. 또한 도 4는, 예를 들어 마지막 2개의 C-말단 아미노산 잔기 (SD) 뿐 아니라 처음 4개의 N-말단 아미노산 잔기들 (HHLA)이 단백질의 생물학적 기능에 영향을 미치지 않고 본 발명의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질에서 삭제될 수 있다는 것을 보여준다.

[0228] **도 5-11** 은 IL-4 수용체 알파 (S148.3 J14, S191.5 K12, S148.3 J14AM2C2, S191.4 B24, S191.4 K19, S191.5 H16, 및 S197.8 D22 [서열번호: 2-8])에 대해 친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 Biacore 측정이다. IL-4 수용체 알파-Fc 의 ~400 RU 를 CM-5 칩에 캡쳐하였고, 이것은 이전에 항 사람-Fc 모노크로날 항체로 코팅하였다. 연속적으로, 다른 농도의 (도 5: 20 nM; 40 nM; 80 nM; 160 nM; 320 nM) 또는 25 nM 의 단일

농도의 (도 6-11) 상기 돌연변이 단백질을 플로셀(flowcell) 위를 지나게 하였고, 변화들을 공명(resonance) 단위로 기록하였다. 어떠한 IL-4 수용체 알파-Fc 를 갖지 않는다는 것을 제외하고 똑같이 처리된 플로셀로부터의 참조신호들을 빼고, 결과 데이터를 BIA측정 소프트웨어를 사용하여 1:1 Langmuir 모델에 맞추었다. 도 6-11에 도시된 실험들에서 상호작용의 느린 해리 동역학 때문에, IL-4 수용체 알파-Fc 가 없는 것을 제외하고는 동등하게 처리된 플로셀로부터 신호를 빼고, 상기 신호를 시료 버퍼만이 주입된 실험으로부터 뺌으로써 중복 참조(double referencing)가 사용되었다. 결과 데이터는 BIA측정 소프트웨어를 이용하여 대량수송 제한을 가진 1:1 Langmuir 모델에 맞추었다. 도 6-11 에서 5개의 실험들 중 1개의 대표적인 결과를 보였다.

[0229] **도 12** 는 IL-4 수용체 알파에 결합 친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (S148.3 J14; 서열번호:2)의 경쟁 ELISA 측정을 보여준다. IL-4 (20 ㎍/ml) 는 ELISA 플레이트에 코팅되고, IL-4 수용체 알파-Fc (15 nM) 를 다양한 농도의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 또는 IL-4 수용체-특이적 모노크로날 항체 (MAB230, R&D Systems)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양시켰다. IL-4 수용체 알파-Fc 및 돌연변이 단백질 혼합물을 IL-4 코팅된 플레이트에 30 분간 놓았다. 결합된 IL-4 수용체 알파-Fc 를 염소 항-사람-Fc-HRP-연결 항체로 탐지하였다. 데이터를 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0+m2-m1)^ 2+4*m1*m2))로 표현하였다. Ki 는 가변성 m1에 의해 주어진다. 3개 중 대표적인 1개의 실험 결과를 나타내었다.

[0230]

[0231] **도 13-18** 은 IL-4 수용체 알파에 결합친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 및 대조구로 야생형 눈물 리포칼린 (TLPC10; pTLPC10의 유전자 산물)의 경쟁 ELISA 측정을 보여준다. IL-4 수용체에 대한 IL-4 수용체 알파-특이적 모노크로날 항체 MAB230 (R&D Systems)을 ELISA 플레이트에 코팅하고, biotinylated IL-4 수용체 알파 (IL-4R 알파-bio; 0.5 nM) 를 다양한 농도의 본 발명의 돌연변이 단백질들 또는 TLPC10 과 함께 1시간 동안 주변 기온과 같게 배양하였다. IL-4R 알파-바이오 및 돌연변이 단백질 혼합물을 MAB230-코팅된 플레이트에서 30분간 주변 공기와 같게 배양시켰다. Bound IL-4R 알파-바이오는 Extravidin-HRP로 검출하였다. 상기 데이터는 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0+m2-m1)^ 2+4*m1*m2)) 로 표현하였다. K_D 는 변화가능한 m1에 의해 주어진다. 3개 중 1개의 대표적인 실험결과를 보였다.

[0232] **도 19**는 TF-1 세포 증식 측정 결과를 나타낸다. 72시간 동안 0.8 ng/ml IL-4 (a, b) 또는 12 ng/ml IL-13 (c, d)의 첨가 전에 희석 시리즈에서 TF-1 세포들을 1시간 동안 37 ℃에서 표시한 돌연변이 단백질, IL-4 수용체 알파-특이적 모노크로날 항체 또는 IgG2a 항체 이소타입 대조구와 함께 배양하였다. 증식은 ^{3}H-티미딘(thymidine) 삽입으로 측정하였다.

[0233] **도 20**은 OmpA 신호서열(OmpA), Strep-tag II 가 따르는 Tlc, 및 아미노산 217부터 406 (pIII)을 포함하는 M13 외피단백질 pIII의 양 끝이 생략된 형태를 포함하는 융합단백질을 암호화하는 파스미드(phasmid) 벡터 pTLPC27를 보여준다. SupE 앰버(amber) 억제자 숙주 균주에서 Gln으로 부분적으로 번역되는 앰버 정지코돈은, 비-억제자 *E. coli* 균주를 사용할 때 외피 단백질 pIII없이 Tlc 돌연변이 단백질의 가용성 발현을 허용하도록 Strep-tagII을 포함한 Tlc 암호화 영역과 양 끝이 잘린 파지 외피단백질 pIII의 암호화 영역의 사이에 위치한다. 돌연변이 유전자 카세트의 클로닝에 사용된 *Bst*XI-제한효소 부위 및 구조유전자에 인접하는 제한효소 부위 모두 표지되었다. 유전자 발현은 테트라사이클린 프로모터/작동자(operator)($tet^{p/o}$)의 조절하에 일어났다. 전사는 리포단백질 전사 종결자(t_{lpp})에서 종결되었다. 상기 벡터는 추가로 복제기원(ori), 사상형 파지 f1 (f1-IG)의 인터제닉 영역, 클로람페니콜 아세틸 트란스퍼라제(chloramphenicol acetyl transferase)를 암호화하는 클로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 유전자(cat) 및 테트라사이클린 억제 유전자 (tetR)를 포함한다. pTLPC27의 핵산 서열에 관련있는 부분은 서열번호:9 와 같이 서열목록에서 암호화된 아미노산과 함께 나타나 있다.

[0234] **도 21**은 사람 VEGF, 야생형 눈물 리포칼린 (TLPC10) 또는 VEGF-특이적 치료 항체 Avastin과 결합친화도가 있는 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질을 사용한 증식 측정 결과이다. 약 1.400 HUVEC 세포들을 완전배지(complete medium)에 배양시키고, 37℃에서 오버나잇 배양 후에, 세포들을 세척하고 0.5% FCS, 히드로코르티손 및 젠타마이신/암포테리신을 포함하는 기초배지(basal medium)를 넣었다. VEGF-특이적 돌연변이 단백질 S209.2-C23, S209.2-D16, S209.2-N9, S209.6-H7, S209.6-H10, S209.2-M17, S209.2-O10 (서열번호:27-33), 야생형 눈물 리포칼린 (pTLPC10의 유전자 산물; 대조구) 또는 치료적 VEGF-특이적 모노크로날 항체 Avastin(Roche; 대조구) 를 트리플리케이트 웰(triplicate wells)에 지정된 농도만큼 첨가하였다. 30 분 후에, 사람 VEGF165 또는 사람 FGF-2의 어느 하나를 VEGF 에 의해 유도되지 않는 증식에 대한 대조구로 첨가하였고, 상기 세포들의 생존은 6일 후에 CellTiter 96 Aqueous One chromogenic assay (Promega)로 측정하였다.

[0235] **도 22** 는 IL-4 수용체 알파에 친화도를 갖는 사람 눈물 리포칼린의 PEG화 돌연변이 단백질 S148.3 J14 (서열번호:2)의 Biacore 측정을 나타낸다. IL-4 수용체 알파-Fc 의 ~400 RU 를 CM-5 칩에 캡쳐하였고, 이는 이전에 항 사람-Fc 모노크로날 항체로 코팅하였다. 연속적으로, 다른 농도의 돌연변이 단백질(200 nM; 67 nM; 22 nM)을 플로셀에 흘리고, 공명단위의 변화를 기록했다. 참조신호 IL-4 수용체 알파-Fc 를 갖지 않는 것을 제외하고는 동일하게 처리된 플로셀로부터의 참조신호를 빼고, 결과데이터를 BIA측정 소프트웨어를 이용하여 1:1 Langmuir 모델에 맞췄다.

[0236] **도 23** 은 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)의 고정된 $VEGF_{8-109}$ 에의 결합에 대한 예시적인 Biacore 측정이다. $VEGF_{8-109}$ 는 표준 아민 화학을 이용하여 CM5 칩에 고정되었다. 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 을 500nM 부터 16nM 사이의 6개의 농도에서 30㎕/분 의 흐름비율에 적용하였다. 돌연변이 단백질의 k_{on}, k_{off} 및 K_D 를 결정하기 위하여 BIA T100 소프트웨어로 센서그람의 측정을 수행하였다..

[0237] **도 24** 는 다른 형태의 VEGF를 가진 센서칩 상에 고정된 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)의 친화도 측정이다. 친화도 측정은 돌연변이 단백질이 고정되고, VEGF 변형체를 포함하는 70㎕의 시료가 250 nM의 농도로 주입된 것을 제외하고, WO 2006/56464 의 실시예 9에 기술된 바와 같이 수행되었다. 결과의 정량적 비교는 양끝이 잘린 형태의 $hVEGF_{8-109}$ 및 $hVEGF_{121}$ 가 기본적으로 동일한 센서그람(sensorgrams)을 나타냈고, 이는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)에 대한 유사한 친화도를 나타낸다. 각각의 마우스 오솔로그 $mVEGF_{164}$ 는 약간 감소한 친화도를 갖는 반면, 스플라이스(splice) 형태 역시 $hVEGF_{165}$ 리포칼린 돌연변이 단백질에 대한 강한 결합을 나타낸다.

[0238] **도 25** 는 37℃ PBS 및 사람 혈장에서의 VEGF-결합 돌연변이 단백질 S236.1-A22의 안정성 시험을 나타낸다. 이것은 사용된 농도가 1 mg/ml이라는 것을 제외하고 국제특허출원 WO2006/056464의 실시예 15에 기술된대로 수행하였다. HPLC-SEC 의 측정결과에 따르면 PBS에서의 7일간의 배양 동안 돌연변이 단백질의 변화를 검출할 수 없었다. 사람 혈장에서의 리포칼린 돌연변이 단백질의 배양에서는 7 일 후에 친화도가 대조구에 비해 약 70% 떨어졌다(도 25a). S236.1-A22 (서열번호: 51) 의 ABD-융합의 사람 혈장내 안정성 역시 상술한 바와 같이 측정하였다. 7일간의 배양 동안 활성의 변화를 관찰할 수 없었다(도 25b).

[0239] **도 26** 은 OmpA 신호서열 (OmpA), 알부민-결합 도메인(abd)에 융합되고, Strep-tag II가 따라붙는 돌연변이된 사람 눈물 리포칼린 (Tlc)을 포함하는 융합단백질을 암호화하는 발현벡터 pTLPC51을 나타낸다. 돌연변이 유전자 카세트의 클로닝에 사용되는 *Bst*XI-제한효소 부위 및 구조유전자에 인접하는 제한효소 부위 모두 표지하였다. 유전자 발현은 테트라사이클린 프로모터/작동자(operator)($tet^{p/o}$)의 조절하에 일어났다. 전사는 리포단백질 전사 종결자(t_{lpp})에서 종결되었다. 상기 벡터는 추가로 복제기원(ori), 사상형 파지 f1 (f1-IG)의 인터제닉 영역, 암피실린 저항성 유전자(amp) 및 테트라사이클린 억제 유전자(tetR)를 포함한다. 서열번호48 및 49와 같은 서열목록에서 암호화된 아미노산 서열과 함께 pTLPC51 의 관련 있는 핵산 서열 부분도 나타나 있다. 상기 부분은 *Xba*I 제한효소 자리에서 시작해서 *Hin*dIII 제한효소 자리에서 끝난다. 이 영역 이외의 상기 벡터 부분은 독일 특허 공개공보 DE 44 17 598 A1 에 나온 완전한 뉴클레오티드 서열인 벡터 pASK75 와 동일하다.

[0240] **도 27**은 표면 플라즈몬 공명 (Biacore)을 이용한 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (A22-ABD) (서열번호: 51) (200 pM)의 ABD-융합단백질의 재조합 $VEGF_{8-109}$에 대한 친화도 측정을 보여준다. 친화도 측정은, 약 250 RU의 재조합 $VEGF_{8-109}$ 가 표준 아민 화학을 이용하여 센서 칩에 직접적으로 결합되었다는 점을 제외하고, WO 2006/56464 의 실시예 9에 기술된 바에 따라 수행하였다. 40㎕의 돌연변이 단백질을 400 nM의 농도로 주입했다. 상기 친화도가 기본적으로 변경되지 않았다는 것을 확인했고, 260 pM으로 측정됐다.

[0241] **도 28**은 VEGF 유발 HUVEC 증식을 억제하는 능력을 측정함으로써 사람 혈장내 알부민의 존재 하에 리포칼린 돌연변이 단백질 A22-ABD (S236.1-A22의 ABD-융합)의 기능성 시험을 보여준다. HUVEC (Promocell)은 젤라틴-코팅 접시에 뿌려졌고, 흐름 P2 및 P8 사이에 사용되었다. 첫째날, 96 웰 플레이트에서 웰마다 1400 세포들을 완전배지에서 접종했다. 둘째날, 세포들을 세척하고 0.5% FCS, 하이드로코르티손 및 젠타마이신/암포테리신을 포함하는 100㎕의 기본배지에 첨가하였다. 증식은 리포칼㎕㎕린 돌연변이 단백질 S236.1-A22-ABD (서열번호:51)과 섞인 20ng/ml $VEGF_{165}$ 또는 10ng/ml FGF-2 로 자극시켰고, 30분간 배양하고 웰들에 첨가되었다. 생존율은 6일째 결정하였고 결과들은 % 억제로 표현하였다. 사람 혈장내 알부민(HSA, 5uM)을 지시된 곳에 첨가하였다. 5uM HSA에서, >99.8% A22-ABD 가 주어진 시간에서 HAS와 섞였다.

[0242] **도 29**는 본 발명의 돌연변이 단백질에 의한 VEGF 유발 HUVEC 증식의 억제를 보여준다. HUVEC (Promocell) 를 젤라틴-코팅 접시에 뿌렸고, 패시지 P2 및 P8 사이에서 사용되었다. 첫째날, 96 웰 플레이트에서 웰마다 1400 세포들을 완전배지에서 접종했다. 둘째날, 세포들을 세척하고 0.5% FCS, 하이드로코르티손 및 젠타마이신/암포테리신을 포함하는 100㎕의 기본배지에 첨가하였다. 증식은 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)와 섞인 20ng/ml $VEGF_{165}$ 또는 10ng/ml FGF-2 로 자극시켰고, 30분간 배양하고, 웰들에 첨가되었다. 생존율은 6일째 결정하였고 결과들은 % 억제로 표현하였다.

[0243] **도 30**은 HUVEC 에서의 본 발명의 돌연변이 단백질에 의한 VEGF-매개 MAP 키나아제 활성의 억제를 보여준다. 표준배지(Promocell, Heidelberg)에서, HUVEC 을 96-웰 플레이트에 웰당 1,400 세포들씩 접종했다. 그 다음 날, FCS 는 0.5% 감소했고, 배양은 16시간동안 계속되었다. 그 후 세포들을 기본 배지에서 5시간 동안 0.5% BSA에서 굶겼다. 투여량-반응 곡선을 얻기 위해 HUVEC 은 증가된 농도의 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 A22 또는 Avastin (bevacizumab, Genentech/Roche)의 존재 하에 $VEGF_{165}$ (Reliatech, Braunschweig)로 10분간 자극받았다. MAP 키나아제 ERK1 및 ERK2 의 인산화는 생산자의 매뉴얼(Active Motif, Rixensart, Belgium)에 따라 ELISA로 정량화하였다. IC 50 값은 돌연변이 단백질 A22 (서열번호:44)에 대해 4.5 nM로, Avastin에 대해 13 nM로 측정되었다.

[0244] **도 31**은 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 국부적 투여에 따른 혈관투과성 측정 결과를 보여준다. 무게 350±50g의 Duncan-Hartley 기니아 돼지들의 어개 및 등의 털을 깎았다. 상기 동물들에 대해 1 ml 의 1% Evan's Blue 염색약을 귀 혈관을 통해 정맥주사하였다. 30분 후에 20ng $VEGF_{165}$ (Calbiochem) 를 시험 물질 또는 대조구와 10배의 몰 과량으로 섞었고, 3 x 4 격자에서 피내주사하였다. 30분 후에, 동물들을 CO_2 질식으로 안락사시켰다. VEGF 주사 1시간 후에, 격자 패턴을 갖는 피부를 제거하고, 연결조직을 제거하였다. 염색약 분출 지역을 이미지 분석장치를 이용하여 정량화하였다 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics).

[0245] **도 32**는 CAM(chick chorioallantoic membrane) 측정결과를 보여준다. FGF-2 (500 ng), VEGF (150 ng) 및 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 (1.35 ㎍) 또는 Avastin (10 ㎍ 포함하는 콜라겐 온플랜트(Collagen onplants)를 10일된 닭 배(embryos) CAM에 올렸다(4/animal, 10 animals/group). 24시간째, 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 또는 Avastin 을 상기 온플랜트에 같은 양만큼 국부적으로 재투여하였다. 72시간 후, 상기 온플랜트들을 수집하고, 이미지를 얻었다. 적어도 하나의 혈관을 가진 양성 격자들의 비율은 블라인디드 옵져버로 결정했다. 중간혈관신생지표(median angiogenic index)가 양성 격자의 파편으로 야생형 눈물 리포칼린 대조구뿐 아니라 VEGF 길항자 S209.2-010 (서열번호:33) 및 Avastin에 대해 보고되었다.

[0246] **도 33**은 마우스에서 A22 및 A22-ABD에 대한 파마코키네틱(PK) 지표의 측정을 보여준다. i.v. 후에 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S236.1 A22 (서열번호:44) (4mg/kg)에 대한 파마코키네틱(PK) 지표 (반감기 플라즈마 농도, 생물 이용가능성) 및 i.v. 를 따르는 돌연변이 단백질 S236.1 A22 과 ABD의 융합단백질(서열번호:51) (5.4mg/kg) 또는 i.p. 단일 환약(bolus) 투여를 NMRI 마우스로 측정했다. 플라즈마는 기-설정된 시간에 얻은 말단 혈액 시료로부터 준비했고, 리포칼린 돌연변이 단백질의 농도는 ELISA로 측정했다. 결과들은 WinNonlin 소프트웨어(Pharsight Corp., Mountain View, USA)를 이용하여 측정했다. $T_{1/2}$ A22 i.v.: 0.42h; $T_{1/2}$ A22-ABD i.v.: 18.32h; $T_{1/2}$ A22-ABD i.p.: 20.82h. 융합단백질 A22-ABD의 i.p. 투여에 따른 생물 이용가능성은 82.5% 였다.

[0247] **도 34**는 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 전신투여에 따른 혈관투과성 측정을 보여준다. 실험 12시간 전에, 시험물질 또는 대조구를 그룹당 3 동물들에 정맥주사하였다. 그룹 1: PBS 운반체; 그룹 2: Avastin, 10mg/kg; 그룹 3: 돌연변이 단백질 S236.1 A22-ABD, 6.1mg/kg; Group 4: TLPC51: 6.1 mg/kg. 0시간에서 Evan's Blue를 주입했다. 30분 후, 4개의 다른 투여량의 VEGF (5, 10, 20 or 40ng)를 3 x 4 격자에서 트리플리케이트에 피내주사했다. VEGF 주사 30분 후에, 상기 동물들은 희생되고, 염료 분출을 이미지 분석기(Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics)를 이용해 정량화하였다.

[0248] **도 35**는 본 발명의 돌연변이 단백질이 종양 제노그라프트(xenograft) 모델에 미치는 영향을 보여준다. 조사된 (2.5 Gy, Co^{60}) 스위스 누드 마우스에 $1x10^7$ A673 횡문근육종(rhabdomyosarcoma) 세포들 (ATTC)로 매트리겔(matrigel)에서 오른쪽으로 (그룹당 n=12) 피하주사하였다. 처리는 복막투여시켰고, 같은 날 시작되어 21일간 지속되었다. 그룹 1: PBS 운반체, 매일; 그룹 2: Avastin (bevacizumab, Genentech/Roche), 5mg/kg 3일마다; 그룹 3: 리포칼린 돌연변이 단백질 A22-ABD (서열번호:51), 매일, 3.1 mg/kg; 그룹 4: TLPC51, 매일, 3.1 mg/kg. 리포칼린 돌연변이 단백질 A22-ABD의 투여량은 A22-ABD PK 데이터 및 마우스에서 예측된 항체의 혈장내

반감기에 근거한 돌연변이 단백질의 동일한 몰수의 VEGF 결합 부위 및 Avastin 의 지속적인 존재가 가능하도록 선택되었다. 종양의 크기는 캘리퍼스(calliper)로 매주 두 번씩 측정하고, 종양 부피는 (length x width^2)/2 의 공식으로 측정했다. 2,000mm^3 을 초과하는 종양 크기를 가질 때 마우스를 죽였다.

[0249] **도 36**은 A549 세포들에 대한 Eotaxin-3 분비 측정 결과를 보여준다. A549 세포들은 증가된 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 존재 또는 부존재하에 각각 0.7 nM IL-4 또는 0.83 nM IL-13 로 자극받았다. Eotaxin-3 분비는 72 시간 후에 상용화된 키트를 이용하여 세포배양 상등액에서 Eotaxin 3 농도를 측정함으로써 측정하였다.

[0250] **도 37**은 증가된 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 존재 또는 부존재하에 자극받은 주변 혈액 단핵 세포들(PBMCs)에서 48시간 후에 IL-4/IL-13 유발 CD23 발현을 보여준다. 총 사람 PBMCs 는 버피 코트(buffy coat)에서 분리하였다. 증가된 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 를 첨가하였고, 세포들은 최종 농도가 각각 1.0 nM 또는 2.5 nM이 되도록 IL-4 또는 IL-13으로 자극받았다. 48시간 후에, 활성화된, CD23 발현 CD14$^+$ 단핵 세포들은 플로 사이토메트리(flow cytometry)로 정량화했다.

[0251] **도 38**은 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 Schild 분석결과를 보여준다. TF-1 세포들의 IL-4 투여량 의존적 증식은 여러 고정된 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24의 존재 또는 부존재 하에 측정되었다(도 38A). 얻은 결과들의 Schild 분석(도 38B)은 192 pM(linear regression) 및 116 pM (non-linear regression)의 K_d 를 낳는다.

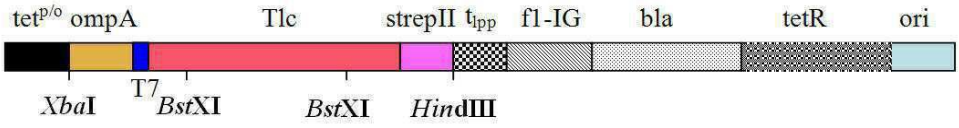
[0252] **도 39** 는 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 사람 1차 B 세포들에 대한 친화도 측정 결과이다. PBMCs 를 사람 혈액에서 분리하였고 다른 농도의 IL-4 수용체 알파 결합 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질 S191.4 B24 또는 야생형 사람 눈물 리포칼린 (TLPC26)으로 배양하였다. 그 후 세포들을 항-CD20-FITC 모노크로날 항체들과 스트렙타비딘(streptavidin)-PE가 따르는 비오틴화 항-리포칼린 항혈장으로 염색하였다. 야생형 리포칼린 및 IL-4 수용체 알파 결합 리포칼린 돌연변이 단백질 S191.4 B24 에 대한 결과들을 도 39 A 및 B에 각각 나타내었다. PE-양성 B 세포들에 대해 결정된 백분율은 그 농도의 리포칼린에 대해 맞추었고 (도 39C), EC_{50} 은 얻은 곡선으로부터 계산되었다. IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24 (서열번호:4)의 EC_{50} 는 105 pM에서 계산되었다.

[0253] **도 40**은 정맥, 피하 또는 기관내 투여 후의 IL-4 수용체 알파 결합 돌연변이 단백질 S191.4 B24의 생물 이용가능성 시험 결과이다. Sprague-Dawley 랫(rats)에 단일 투여량의 돌연변이 단백질 S191.4 B24을 지정된 경로를 통해 4 mg/kg에서 투여하였다. 기관투여는 마이크로스프레이 투여 장치(PennCentury, USA)로 수행하였다. 플라즈마 시료들은 이미 결정된 시간지점에서 얻었고, 기능적으로 활성적인 돌연변이 단백질의 잔류농도를 결정하기 위하여 샌드위치 ELISA 분석에 사용하였다. 농도들은 비구획 PK 분석으로 분석하였다. 생물 이용가능성은 피하 투여 후 100%, 기관내 전달의 경우 13.8% 였다.

[0254] **도 41**은 PEG20, PEG30 또는 PEG40으로 PEG화되거나 되지 않은 돌연변이 단백질 S236.1-A22 (서열번호:44)의 사람 눈물 리포칼린 wt와 비교한 시험관내 포텐시(potency) 측정이다. IC_{50} 값은 VEGF-자극 HUVEC 증식 측정에서의 각각의 사람 눈물 리포칼린 돌연변이 단백질의 적정 및 증식억제 측정을 통해 측정하였다.

도면

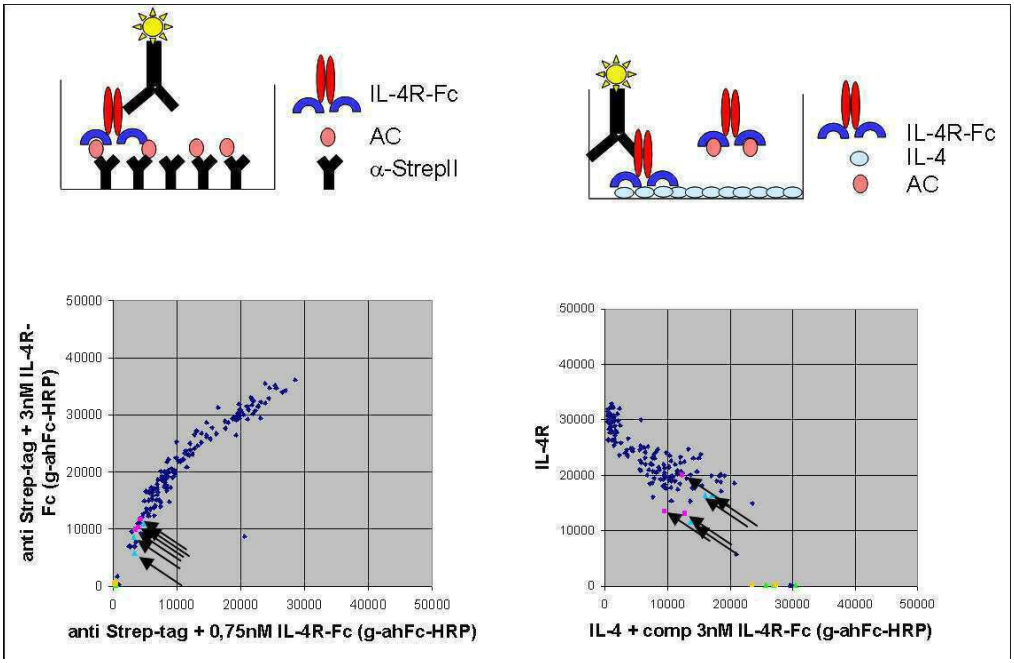
도면1



도면2

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AASDEEIQDV SGTWYLKAMT VDSRCPRAYY
GSVTPMTLTT LEGGNLEAKV TMQRIGRSQE VKAVLEKTDE PGKYTASGGR
HVAYIIRSHV KDHYIFYSEG LCPGQPVPGV WLVGRDPKNN LEALEDFEKA
AGARGLSTES ILIPRQSETS SPG**SAWSHPQ** **FEK**

도면3



도면4

S191.5 K12:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAYYKSVTPMTLTTLEGGNLEAKFTAQ
RNGRWQELKLVLEKTDEPGKYAASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFYSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

S148.3 J14AM2C2:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAYYESVTPMTLTTLEGGNLEAKFTLQ
RRGRWQEGKLVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFYSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

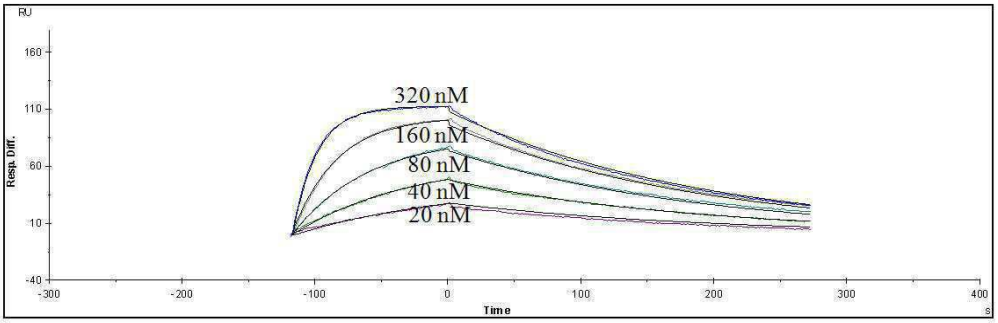
S191.4 B24:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAYYSSVTPMTLTTLEGGNLEAKFTAQ
RSGRWQEYKLVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFHSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

S191.4 K19:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAHYSSVTPMTLTTLEGGNLEAKLTLQ
RAGRWQEGKIVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFYSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

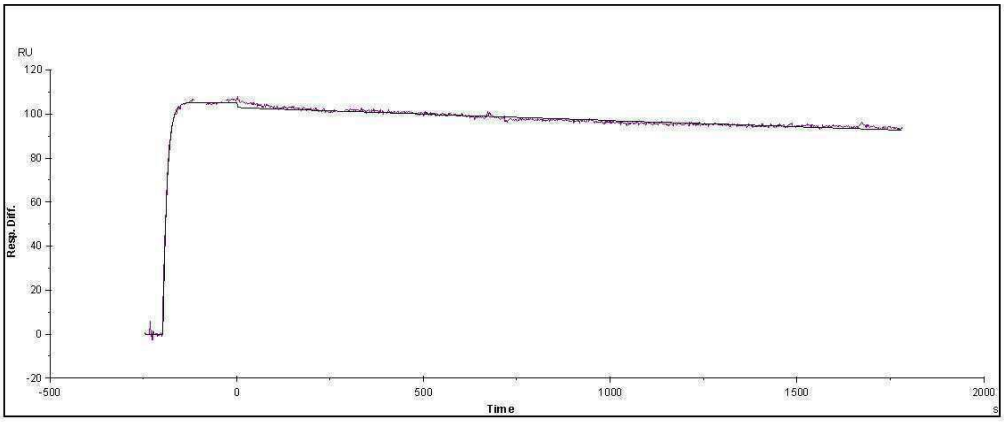
S191.5 H16:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAYYDSVTPMTLTTLEGGNLEAKGTLQ
RKGRPQEMKLVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFYSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

S197.8 D22:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDSRCPRAYYGSVTPMTLTTLEGGNLEAKLTLQ
RSGRWQESKVVLEKTDEPGKYTASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFYSEGLCPGQPVPGVWLVGRDPKNNLEALED
FEKAAGARGLSTESILIPRQSETSSPG**SAWSHPQFEK**

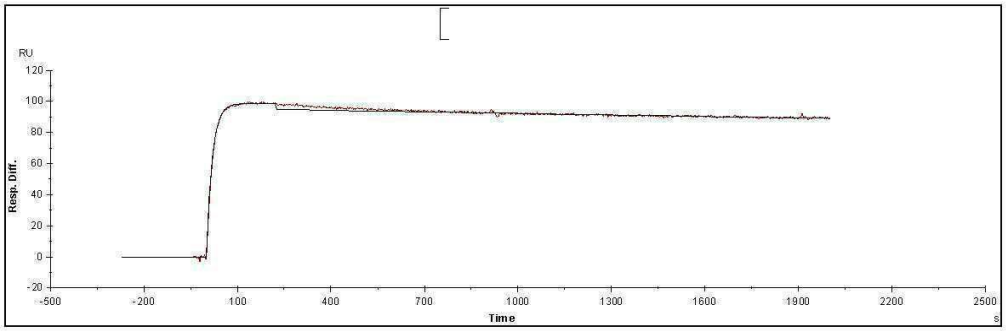
도면5



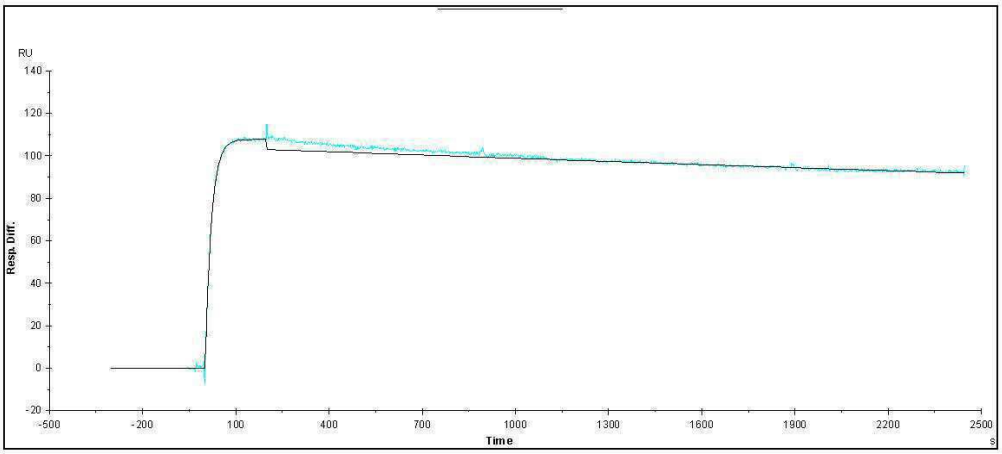
도면6


RU
120
100
80
60
40
20
0
-20
Resp. Diff.
-500
0
500
1000
1500
2000
Time
s

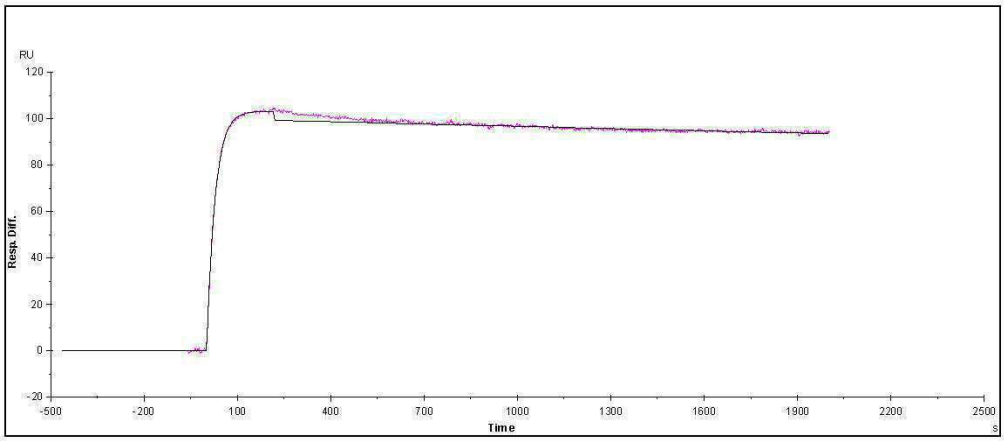
도면7


RU
120
100
80
60
40
20
0
-20
Resp. Diff.
-500
-200
100
400
700
1000
1300
1600
1900
2200
2500
Time
s

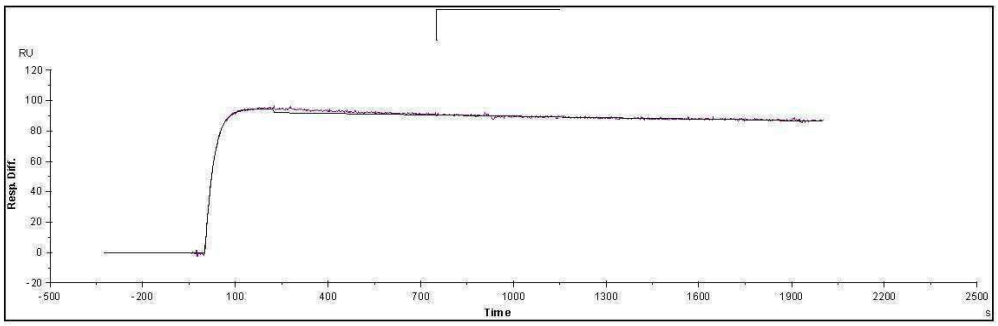
도면8


RU
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
Resp. Diff.
-500
-200
100
400
700
1000
1300
1600
1900
2200
2500
Time
s

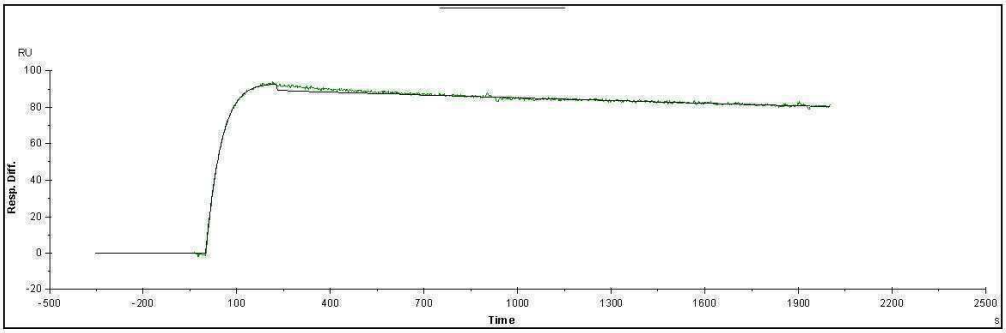
도면9



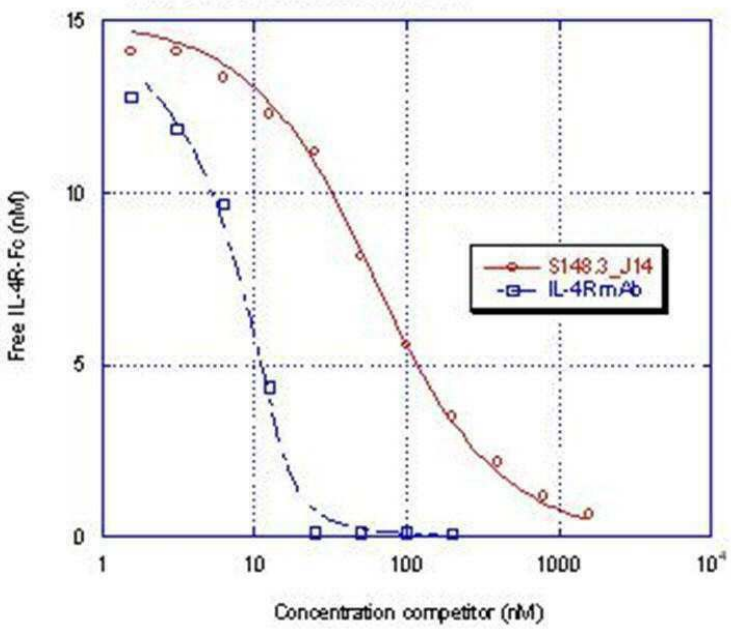
도면10



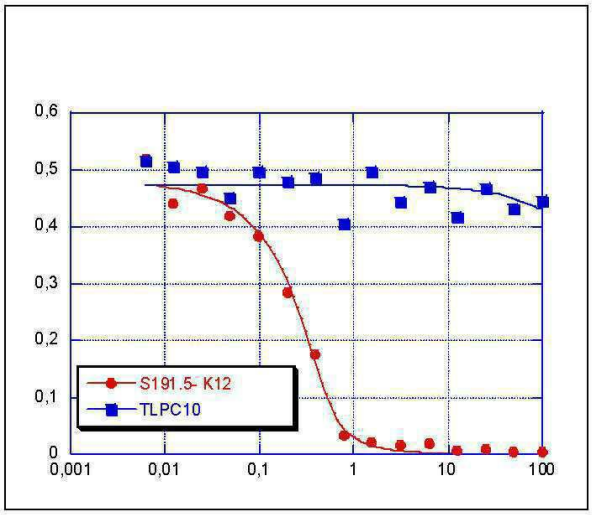
도면11



도면12

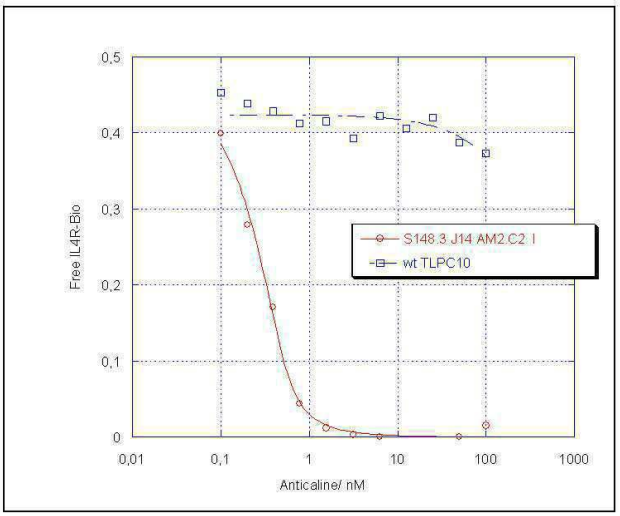


도면13



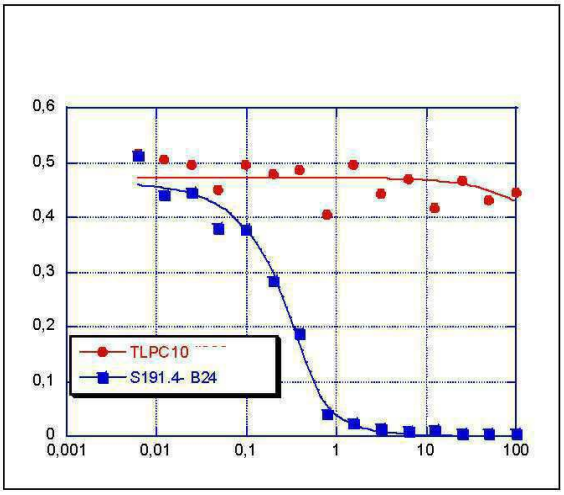
y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,03715	0,012294
m2	0,47887	0,0082153
Chisq	0,0045061	NA
R	0,99618	NA

도면14



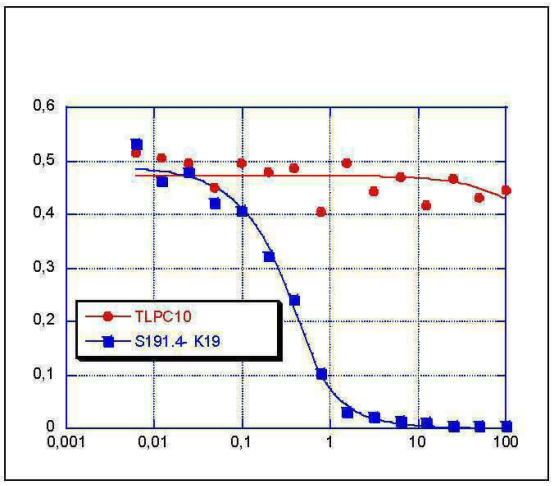
y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,037134	0,0082609
m2	0,47752	0,0089865
Chisq	0,00098348	NA
R	0,99744	NA

도면15



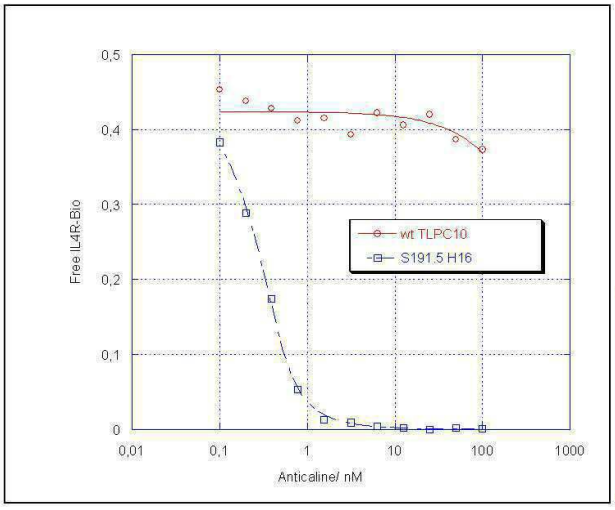
y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,052369	0,01679
m2	0,46505	0,0095265
Chisq	0,0058732	NA
R	0,99474	NA

도면16



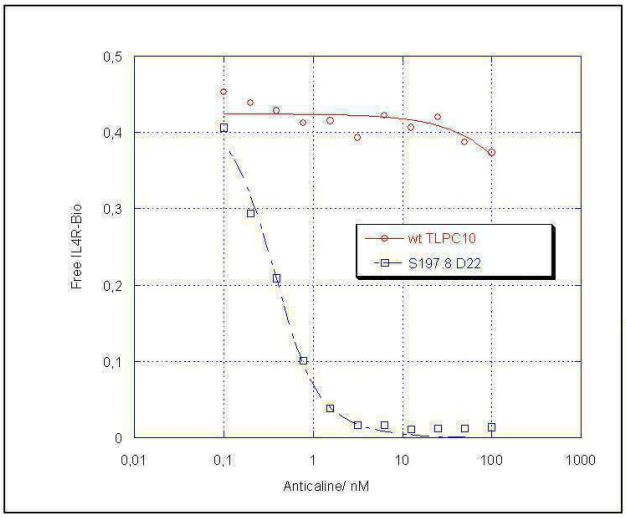
y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,10445	0,020528
m2	0,49066	0,0083334
Chisq	0,0043991	NA
R	0,99645	NA

도면17



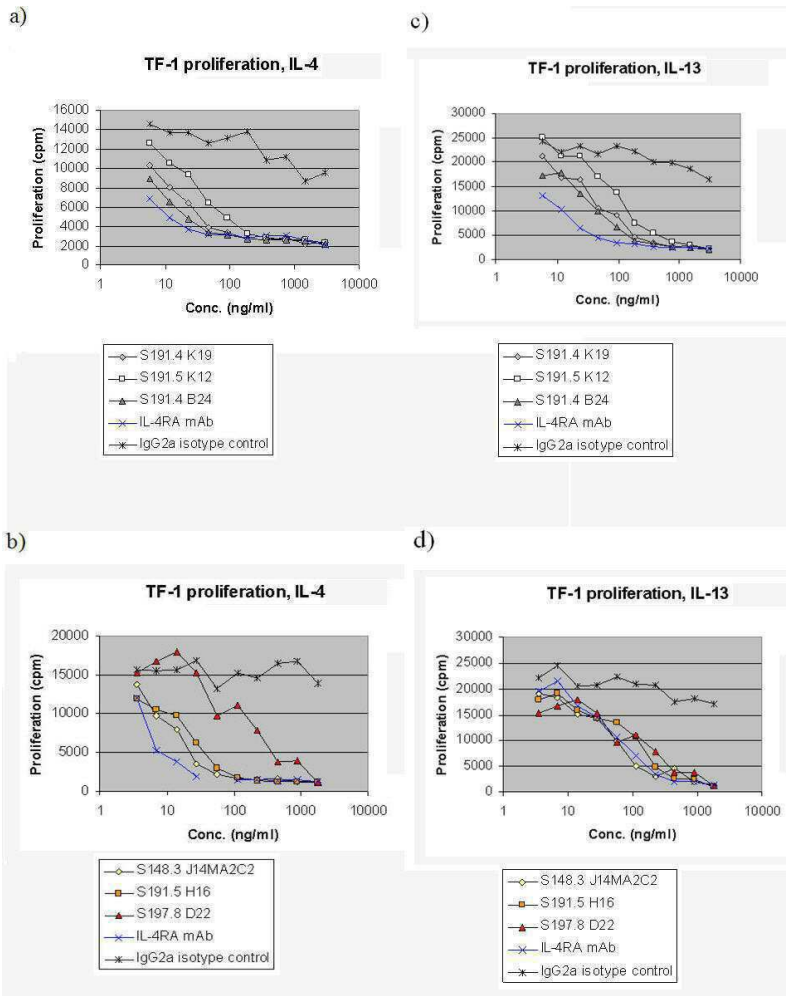
y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,048704	0,0040592
m2	0,46864	0,0039151
Chisq	0,00017517	NA
R	0,99953	NA

도면18

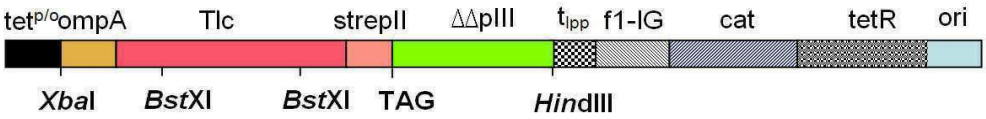


y = 0.5*(-m0+m2-m1+sqrt((-m0...		
	Value	Error
m1	0,10652	0,018248
m2	0,46605	0,011723
Chisq	0,001392	NA
R	0,99636	NA

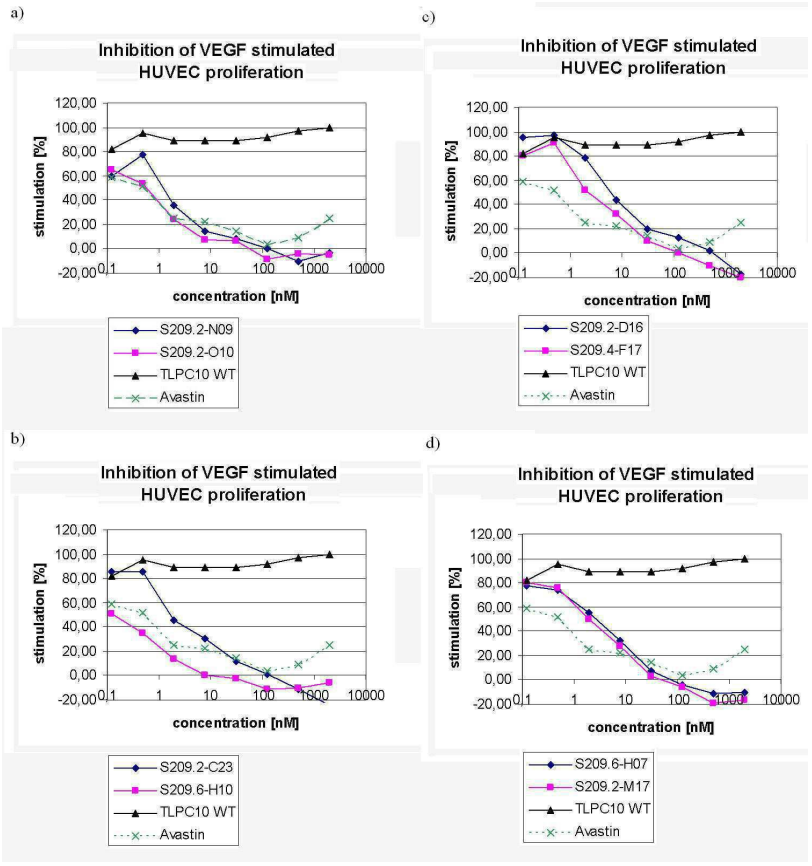
도면19



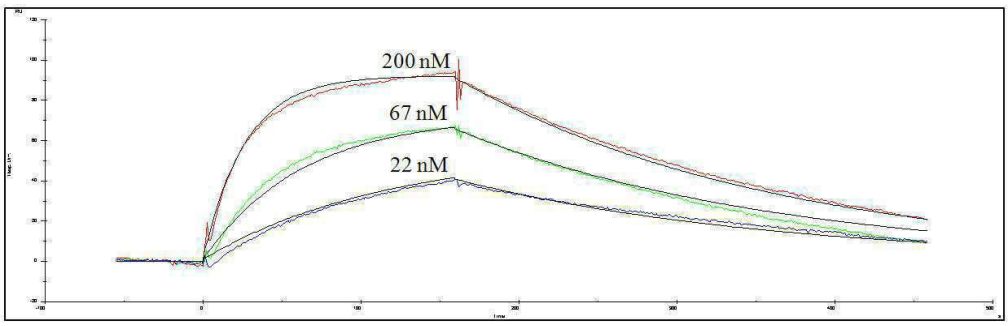
도면20



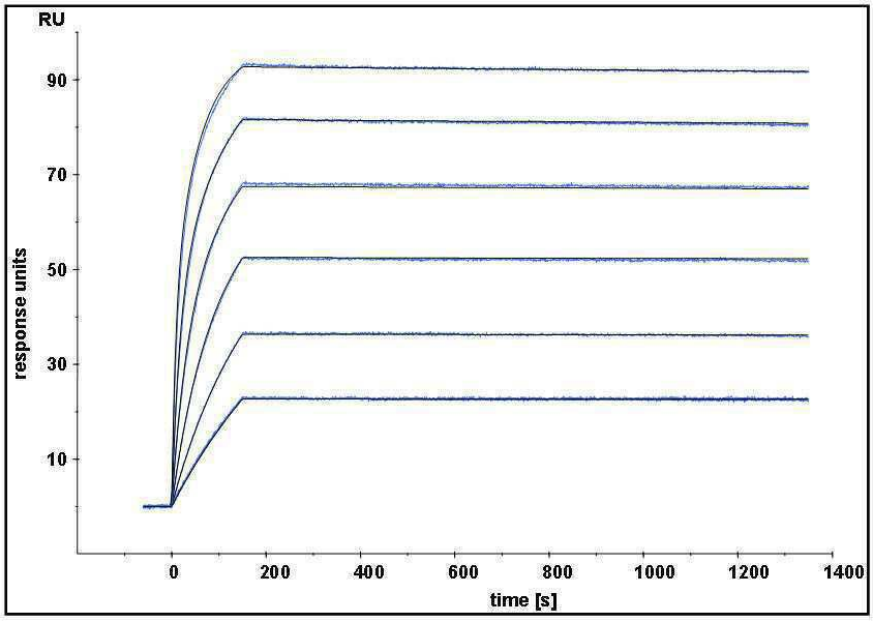
도면21



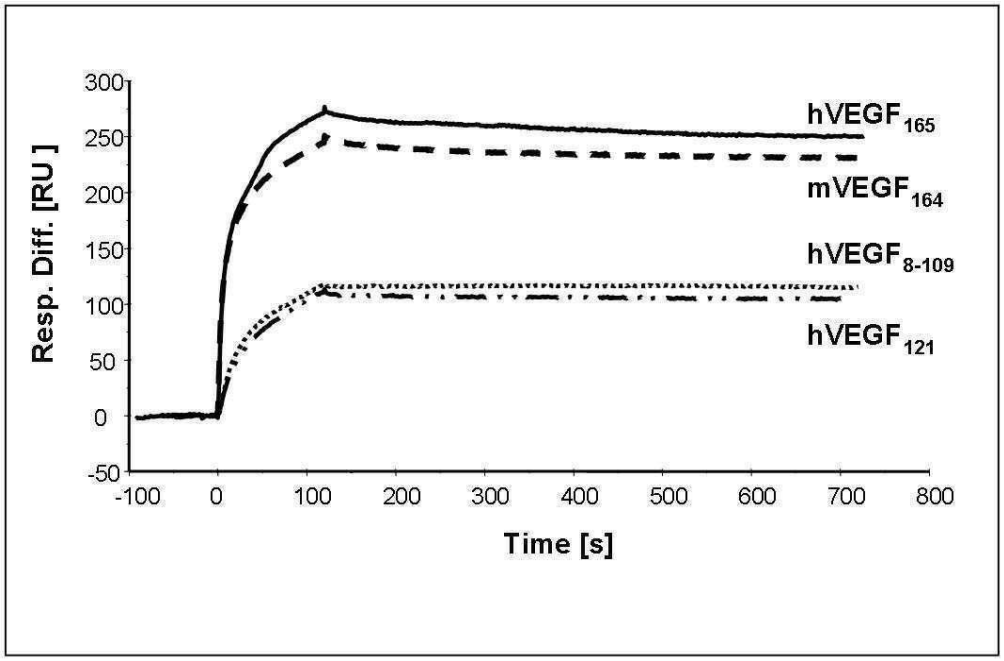
도면22



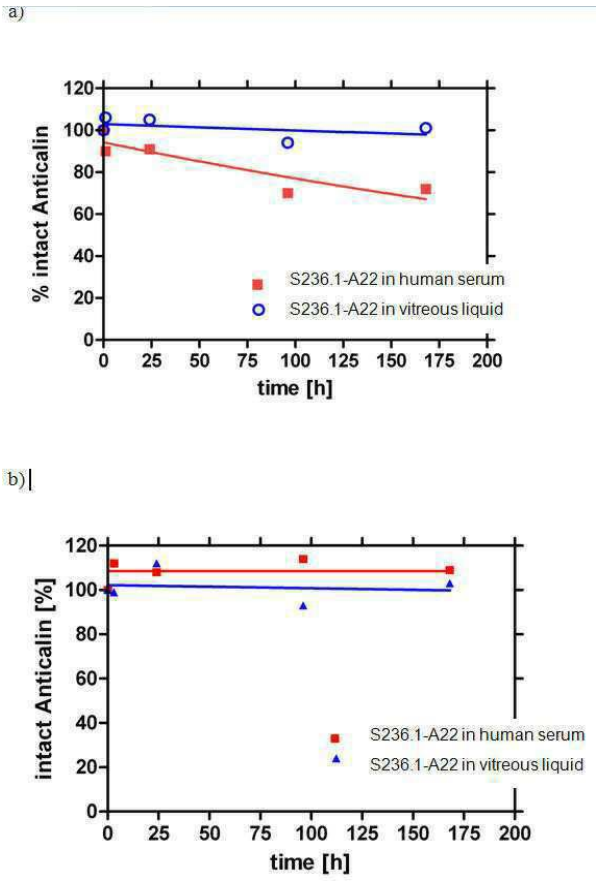
도면23


RU
90
70
50
30
10
response units
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
time [s]

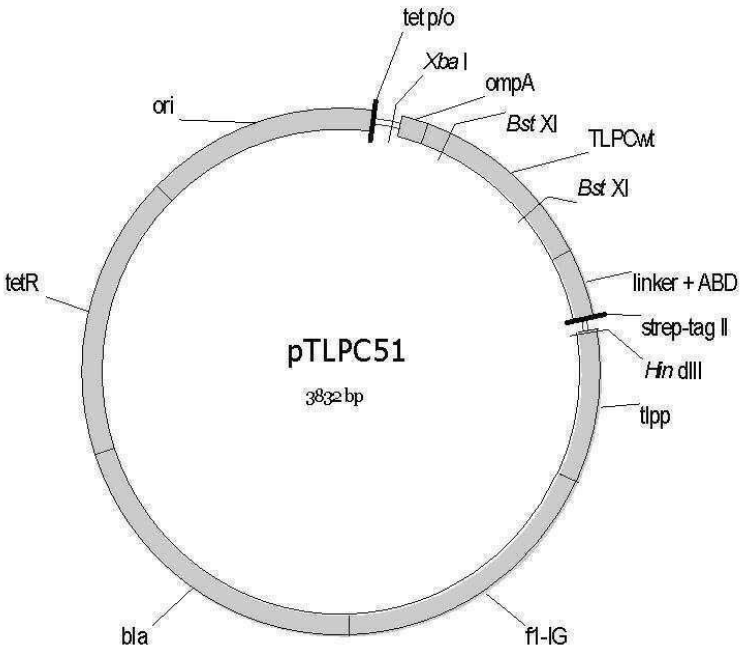
도면24


300
250
200
150
100
50
0
-50
Resp. Diff. [RU]
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
Time [s]
hVEGF165
mVEGF164
hVEGF8-109
hVEGF121

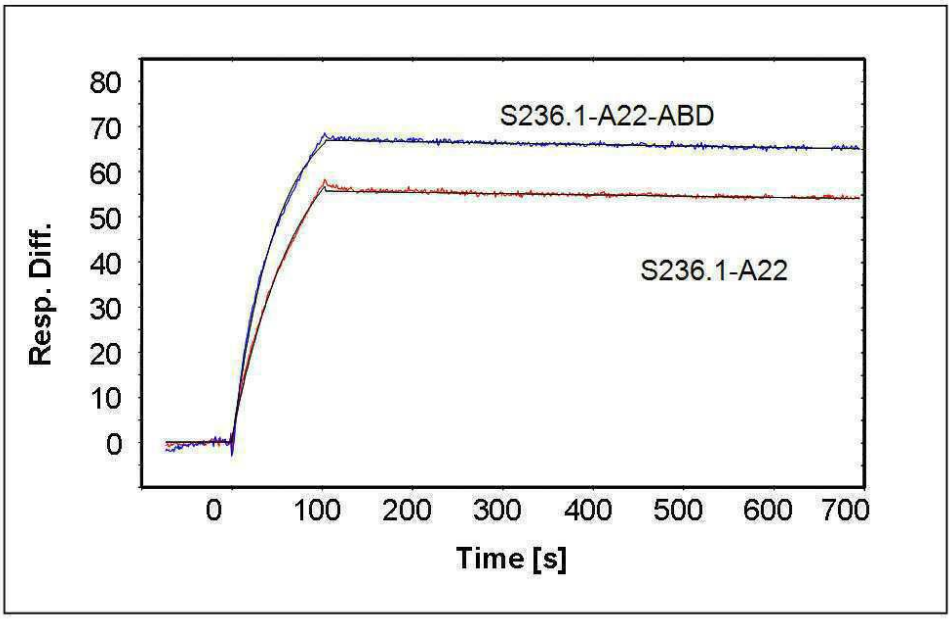
도면25


a)
% intact Anticalin
time [h]
S236.1-A22 in human serum
S236.1-A22 in vitreous liquid
b)
intact Anticalin [%]
time [h]
S236.1-A22 in human serum
S236.1-A22 in vitreous liquid

도면26


tet p/o
Xba I
ompA
Bst XI
TLPCwt
Bst XI
linker + ABD
strep-tag II
Hin dIII
tlpp
f1-IG
bla
tetR
ori
pTLPC51
3832 bp

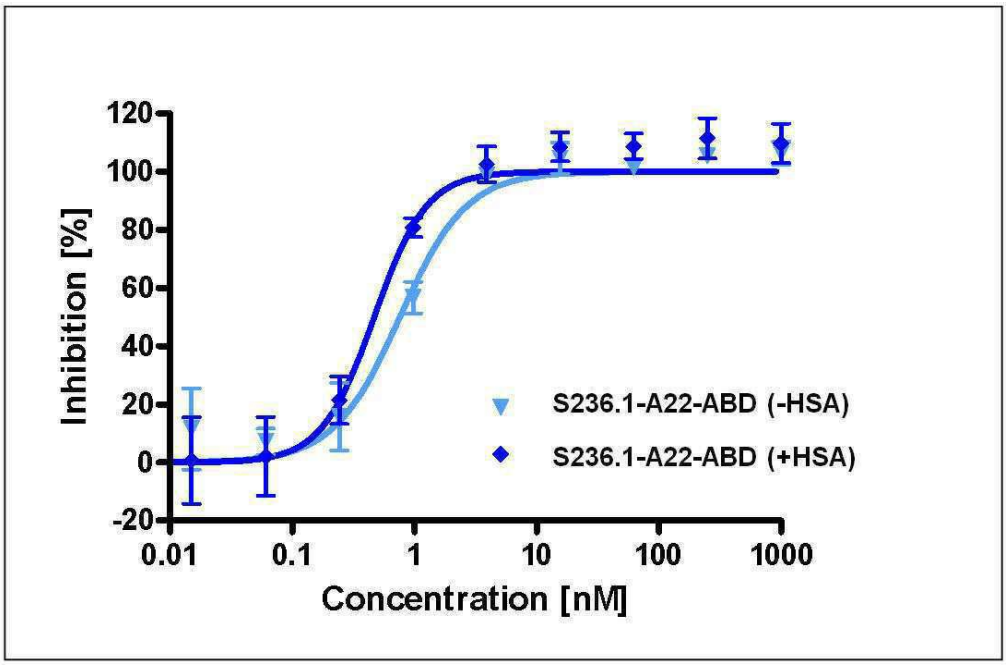
도면27



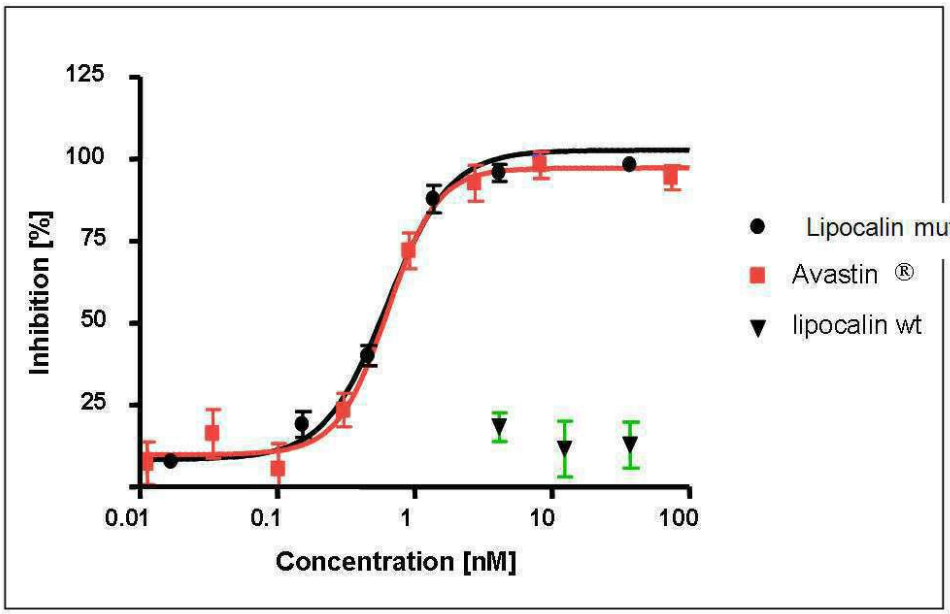
Biacore-measurements

S236.1-A22 (tear lipocalin mutein)	KD: 200pM
S236.1-A22-ABD (tear lipocalin mutein-ABD)	KD: 260pM

도면28

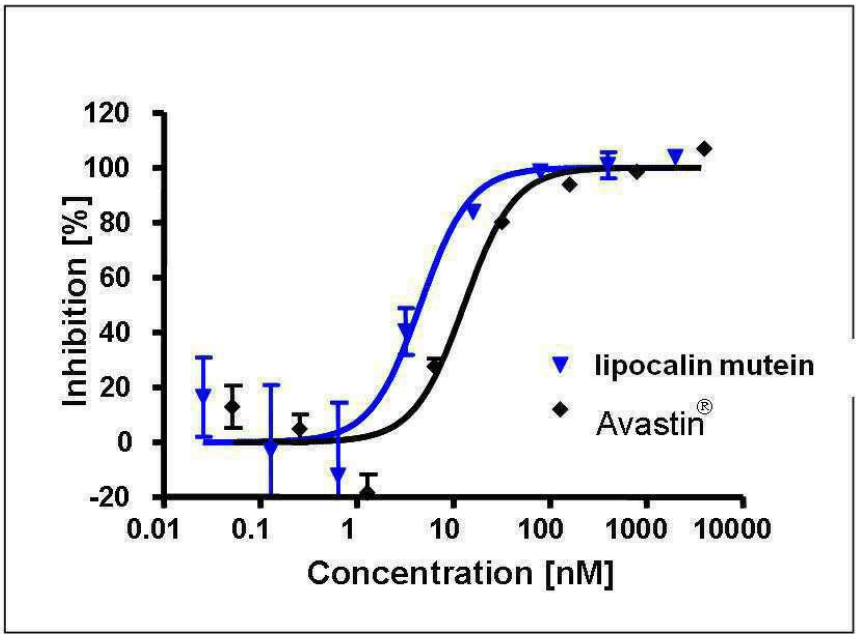


도면29



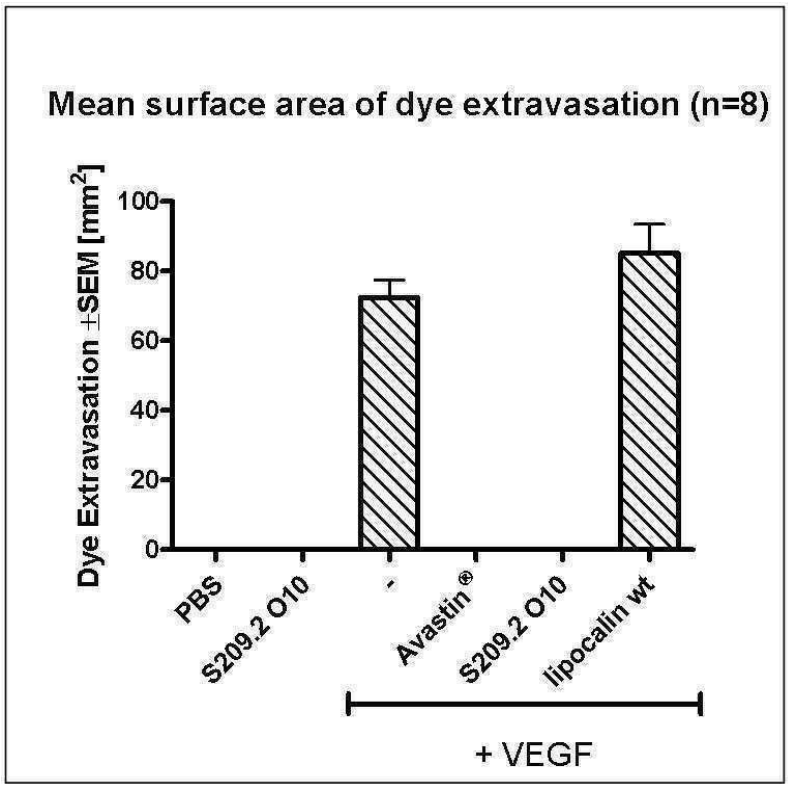
Compound	**IC50** [nM]
S236.1-A22 (lipocalin mutein)	0.51
Avastin	0.56

도면30

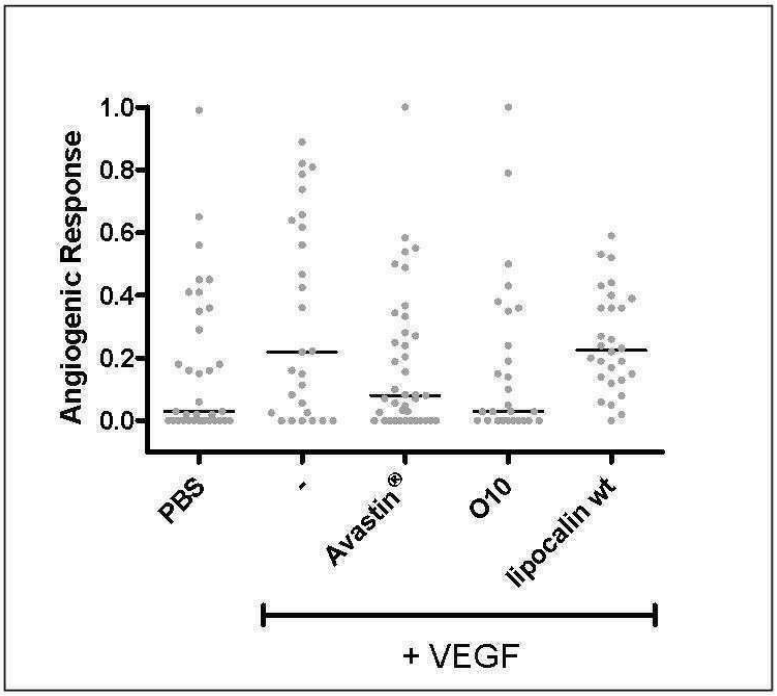


Compound	**IC50** [nM]
S236.1-A22 (lipocalin mutein)	4.5
Avastin	13

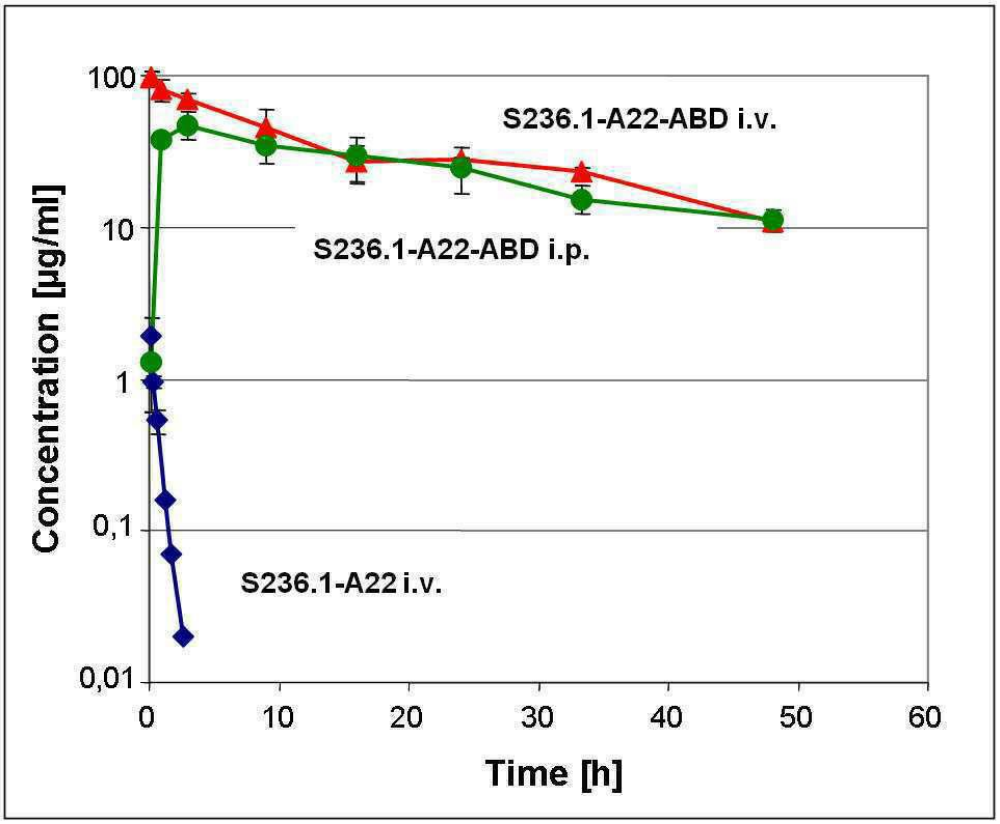
도면31


Mean surface area of dye extravasation (n=8)
Dye Extravasation ±SEM [mm²]
100
80
60
40
20
0
PBS
S209.2 O10
-
Avastin®
S209.2 O10
lipocalin wt
+ VEGF

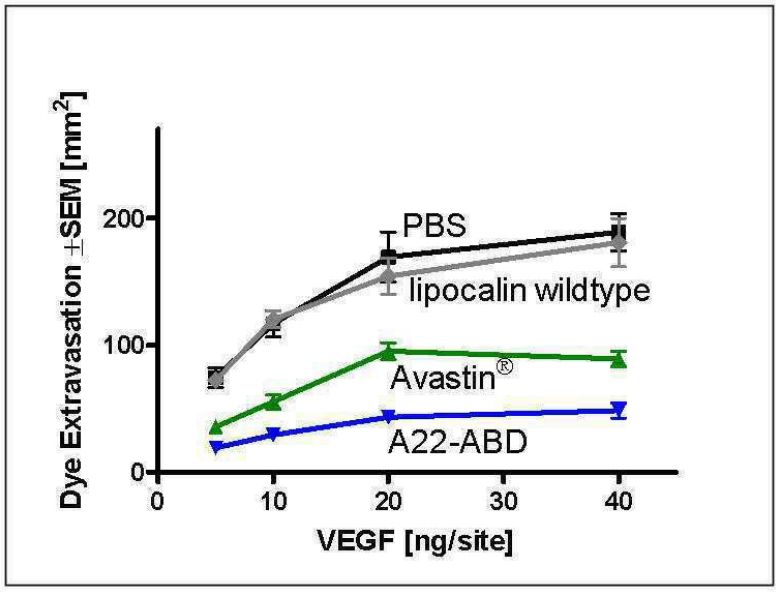
도면32


Angiogenic Response
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS
-
Avastin®
O10
lipocalin wt
+ VEGF

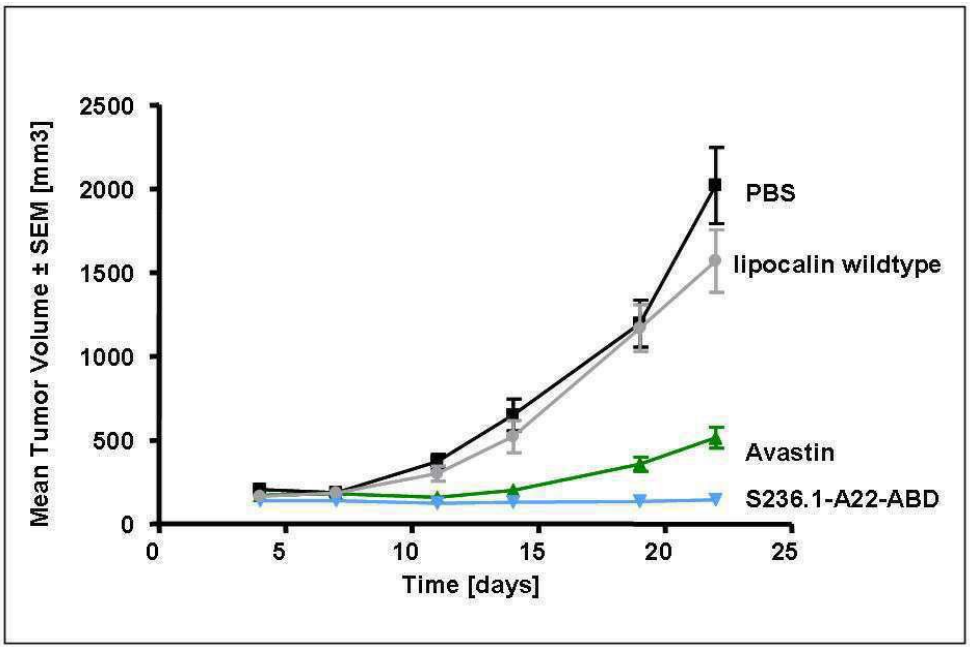
도면33


100
10
1
0,1
0,01
Concentration [µg/ml]
S236.1-A22-ABD i.v.
S236.1-A22-ABD i.p.
S236.1-A22 i.v.
0
10
20
30
40
50
60
Time [h]

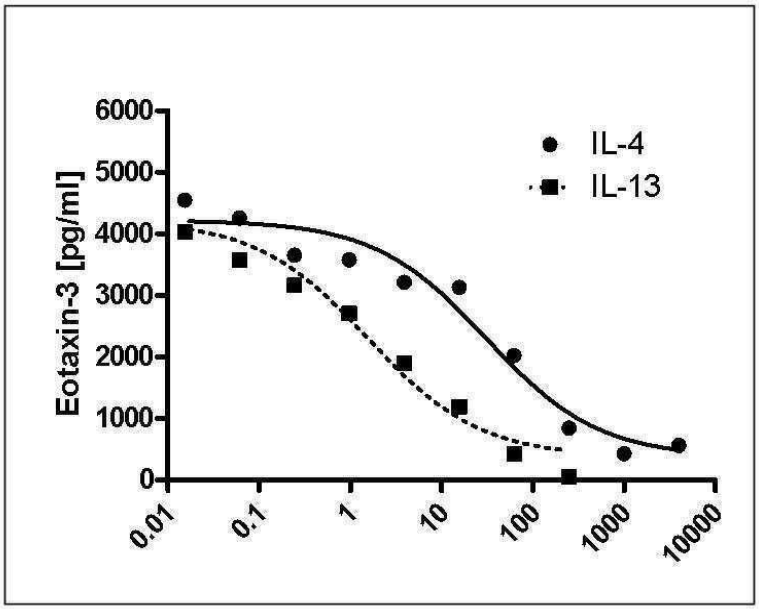
도면34


Dye Extravasation ±SEM [mm²]
200
100
0
PBS
lipocalin wildtype
Avastin®
A22-ABD
0
10
20
30
40
VEGF [ng/site]

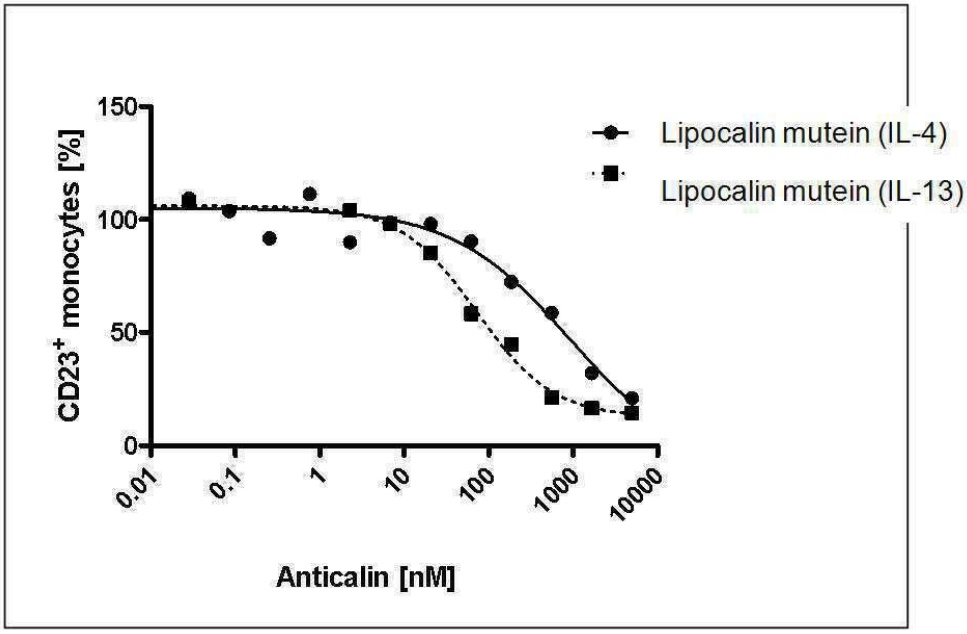
도면35


Mean Tumor Volume ± SEM [mm3]
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
Time [days]
PBS
lipocalin wildtype
Avastin
S236.1-A22-ABD

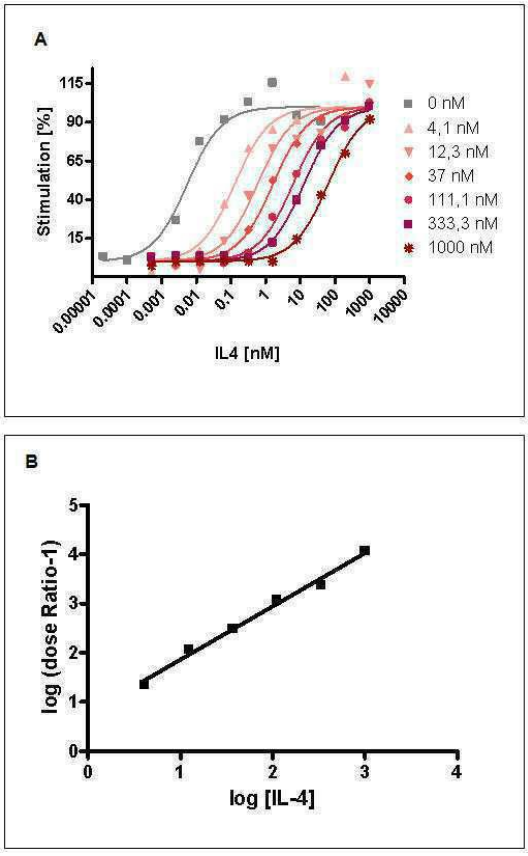
도면36


Eotaxin-3 [pg/ml]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
IL-4
IL-13

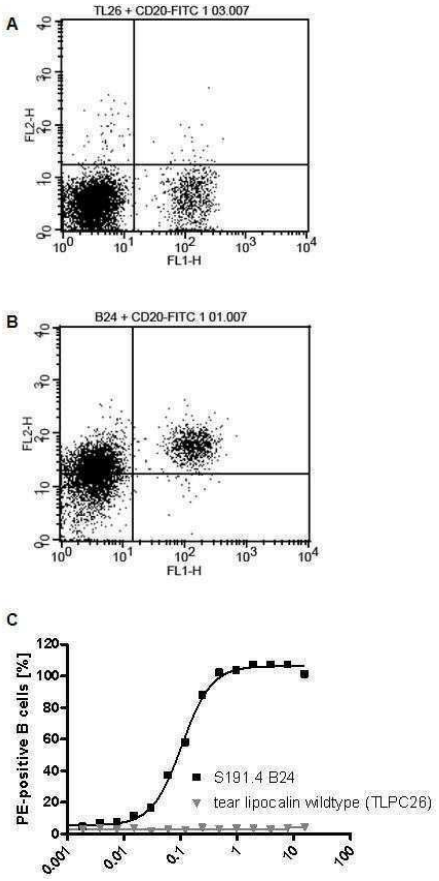
도면37


150
100
50
0
CD23+ monocytes [%]
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Anticalin [nM]
Lipocalin mutein (IL-4)
Lipocalin mutein (IL-13)

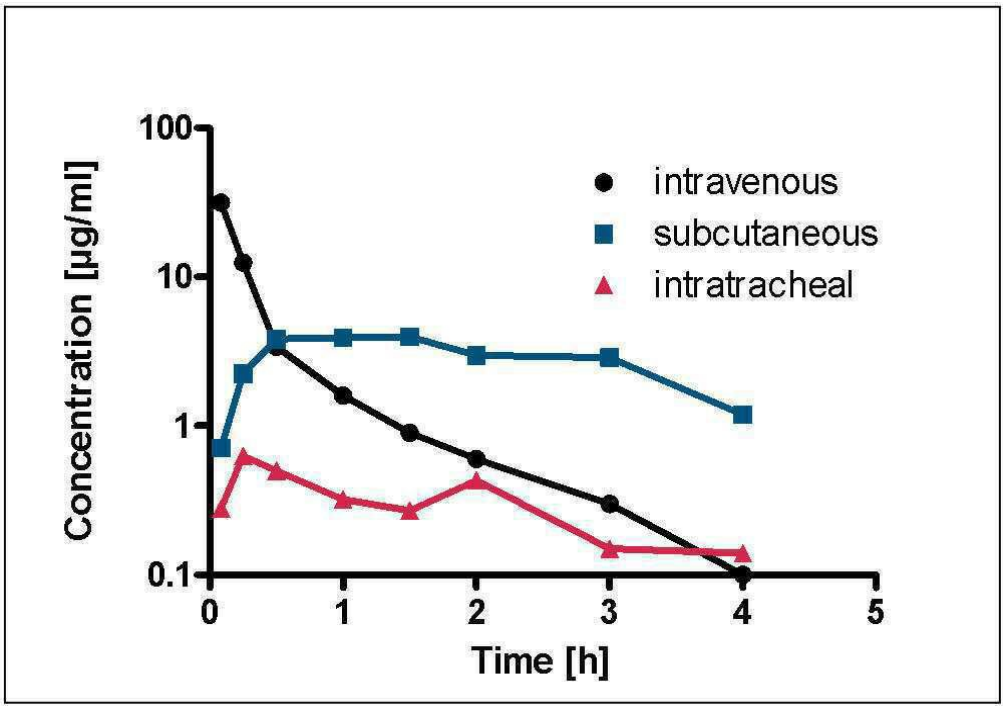
도면38


A
115
90
65
40
15
Stimulation [%]
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
IL4 [nM]
0 nM
4,1 nM
12,3 nM
37 nM
111,1 nM
333,3 nM
1000 nM
B
5
4
3
2
1
0
log (dose Ratio-1)
0
1
2
3
4
log [IL-4]

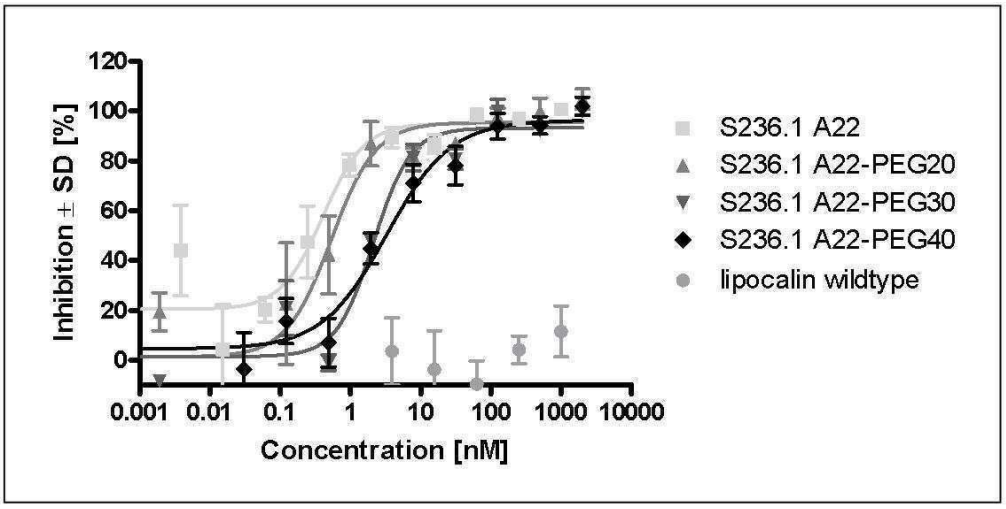
도면39


A
TL26 + CD20-FITC 1 03.007
FL2-H
FL1-H
B
B24 + CD20-FITC 1 01.007
FL2-H
FL1-H
C
PE-positive B cells [%]
S191.4 B24
tear lipocalin wildtype (TLPC26)

도면40



도면41



서 열 목 록

<110> Pieris Proteolab AG

<120> Muteins of human tear lipocalin

<130> P30056

<160> 70

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 3700
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Expression vector pTLPC10

<400> 1
ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60

tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttcg acaaaaatct 120

agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcga ttgcagtggc actggctggt 180

ttcgctaccg tagcgcaggc cgacgcatcg atgaccggtg gtcagcagat gggtgcctca 240

gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg tggtatctga aggccatgac ggtggacagg 300

gagttccctg agatgaatct ggaatcggtg acacccatga ccctcacgac cctggaaggg 360

ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc 420

gtcctggaga aaactgacga gccgggaaaa tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca 480

tacatcatca ggtcgcacgt gaaggaccac tacatctttt actctgaggg cgagctccac 540

gggaagccgg tcccaggggt gtggctcgtg ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc 600

ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc cgcggactca gcacggagag catcctcatc 660

cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg agcgcttggt ctcacccgca gttcgaaaaa 720

taataagctt gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg 780

ccgtttaccg ctactgcgtc acggatctcc acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg 840

cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc 900

ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa 960

atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac 1020

ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 1080

tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 1140

accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt 1200

taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta 1260

caatttcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 1320

aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 1380

attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 1440

cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 1500

aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 1560

ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 1620

gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 1680

attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 1740

tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 1800

tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 1860

atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 1920

agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 1980

aactacttac tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagttg 2040

caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 2100

ccggtgagcg tggctctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 2160

gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 2220

tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtagga attaatgatg tctcgtttag 2280

ataaaagtaa agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggtcgga atcgaaggtt 2340

taacaacccg taaactcgcc cagaagctag gtgtagagca gcctacattg tattggcatg 2400

taaaaaataa gcgggctttg ctcgacgcct tagccattga gatgttagat aggcaccata 2460

ctcacttttg ccctttagaa ggggaaagct ggcaagattt tttacgtaat aacgctaaaa 2520

gttttagatg tgctttacta agtcatcgcg atggagcaaa agtacattta ggtacacggc 2580

ctacagaaaa acagtatgaa actctcgaaa atcaattagc ctttttatgc caacaaggtt 2640

tttcactaga gaatgcatta tatgcactca gcgcagtggg gcattttact ttaggttgcg 2700

tattggaaga tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata 2760

gtatgccgcc attattacga caagctatcg aattatttga tcaccaaggt gcagagccag 2820

ccttcttatt cggccttgaa ttgatcatat gcggattaga aaaacaactt aaatgtgaaa 2880

gtgggtctta aaagcagcat aacctttttc cgtgatggta acttcactag tttaaaagga 2940

tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 3000

tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 3060

tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 3120

cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 3180

caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 3240

cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 3300

cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 3360

gaacgggggg ttcgtgcaca gcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 3420

acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 3480

atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 3540

cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 3600

gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 3660

tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgacccgaca 3700

<210> 2
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 2
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

```
Val Thr Met Gln Arg Ile Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
     50                  55                  60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
                85                  90                  95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
            100                 105                 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
        115                 120                 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
    130                 135                 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145                 150
```

<210> 3
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 3

```
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
  1               5                  10                  15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Lys Ser Val
             20                  25                  30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
         35                  40                  45

Phe Thr Ala Gln Arg Asn Gly Arg Trp Gln Glu Leu Lys Leu Val Leu
```

50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 4
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 4
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Phe Thr Leu Gln Arg Arg Gly Arg Trp Gln Glu Gly Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 5
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 5
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Ser Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Phe Thr Ala Gln Arg Ser Gly Arg Trp Gln Glu Tyr Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe His

85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 6
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 6
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala His Tyr Ser Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Leu Thr Leu Gln Arg Ala Gly Arg Trp Gln Glu Gly Lys Ile Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 7
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 7
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Asp Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Gly Thr Leu Gln Arg Lys Gly Arg Pro Gln Glu Met Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 8
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for IL-4R alpha

<400> 8
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Leu Thr Leu Gln Arg Ser Gly Arg Trp Gln Glu Ser Lys Val Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Cys Pro Gly Gln Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 9
<211> 4041
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Phasmid vector pTlc27

<400> 9
ccataacgct cggttgccgc cgggcgtttt ttattggcca gatgattaat tcctaatttt 60

tgttgacact ctatcattga tagagttatt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag 120

tgaaatgaat agttcgacaa aaatctagat aacgagggca aaaaatgaaa aagacagcta 180

tcgcgattgc agtggcactg gctggtttcg ctaccgtagc gcaggccgcc tcagacgagg 240

agattcagga tgtgtcaggg acgtggtatc tgaaggccat gacggtggac agggagttcc 300

ctgagatgaa tctggaatcg gtgacaccca tgaccctcac gaccctggaa gggggcaacc 360

tggaagccaa ggtcaccatg ctgataagtg gccggagcca ggaggtgaag gccgtcctgg 420

agaaaactga cgagccggga aaatacacgg ccgacggggg caagcacgtg gcatacatca 480

tcaggtcgca cgtgaaggac cactacatct tttactctga gggcgagctc cacgggaagc 540

cggtcccagg ggtgtggctc gtgggcagag accccaagaa caacctggaa gccttggagg 600

actttgagaa agccgcagga gcccgcggac tcagcacgga gagcatcctc atccccaggc 660

agagcgaaac cagctctcca gggagcgctt ggtctcaccc gcagttcgaa aaataggctg 720

gcggcggctc tggtggtggt tctggcggcg gctctgaggg tggtggctct gagggtggcg 780

gttctgaggg tggcggctct gagggaggcg gttccggtgg tggctctggt tccggtgatt 840

ttgattatga aaagatggca aacgctaata agggggctat gaccgaaaat gccgatgaaa 900

acgcgctaca gtctgacgct aaaggcaaac ttgattctgt cgctactgat tacggtgctg 960

ctatcgatgg tttcattggt gacgtttccg gccttgctaa tggtaatggt gctactggtg 1020

attttgctgg ctctaattcc caaatggctc aagtcggtga cggtgataat tcacctttaa 1080

tgaataattt ccgtcaatat ttaccttccc tccctcaatc ggttgaatgt cgccctttg 1140

tctttggcgc tggtaaacca tatgaatttt ctattgattg tgacaaaata aacttattcc 1200

gtggtgtctt tgcgtttctt ttatatgttg ccacctttat gtatgtattt tctacgtttg 1260

ctaacatact gcgtaataag gagtcttaat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc 1320

acattgtgcg acatttttt tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc 1380

gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 1440

acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt 1500

cgccggcttt ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 1560

tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc 1620

gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact 1680

cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg 1740

gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc 1800

gaattttaac aaaatttggc gaaaatgaga cgttgatcgg cacgtaagag gttccaactt 1860

tcaccataat gaaataagat cactaccggg cgtatttttt gagttatcga gattttcagg 1920

agctaaggaa gctaaaatgg agaaaaaaat cactggatat accaccgttg atatatccca 1980

atggcatcgt aaagaacatt ttgaggcatt tcagtcagtt gctcaatgta cctataacca 2040

gaccgttcag ctggatatta cggccttttt aaagaccgta aagaaaaata agcacaagtt 2100

ttatccggcc tttattcaca ttcttgcccg cctgatgaat gctcatccgg aattccgtat 2160

ggcaatgaaa gacggtgagc tggtgatatg ggatagtgtt cacccttgtt acaccgtttt 2220

ccatgagcaa actgaaacgt tttcatcgct ctggagtgaa taccacgacg atttccggca 2280

gtttctacac atatattcgc aagatgtggc gtgttacggt gaaaacctgg cctatttccc 2340

taaagggttt attgagaata tgtttttcgt ctcagccaat ccctgggtga gtttcaccag 2400

ttttgattta aacgtggcca atatggacaa cttcttcgcc cccgttttca ctatgggcaa 2460

atattatacg caaggcgaca aggtgctgat gccgctggcg attcaggttc atcatgccgt 2520

ttgtgatggc ttccatgtcg gcagaatgct taatgaatta caacagtact gcgatgagtg 2580

gcagggcggg gcgtaatagg aattaatgat gtctcgttta gataaaagta aagtgattaa 2640

cagcgcatta gagctgctta atgaggtcgg aatcgaaggt ttaacaaccc gtaaactcgc 2700

ccagaagcta ggtgtagagc agcctacatt gtattggcat gtaaaaaata agcgggcttt 2760

gctcgacgcc ttagccattg agatgttaga taggcaccat actcactttt gcccttaga 2820

aggggaaagc tggcaagatt ttttacgtaa taacgctaaa agttttagat gtgctttact 2880

aagtcatcgc gatggagcaa aagtacattt aggtacacgg cctacagaaa aacagtatga 2940

aactctcgaa aatcaattag ccttttttatg ccaacaaggt ttttcactag agaatgcatt 3000

atatgcactc agcgcagtgg ggcattttac tttaggttgc gtattggaag atcaagagca 3060

tcaagtcgct aaagaagaaa gggaaacacc tactactgat agtatgccgc cattattacg 3120

acaagctatc gaattatttg atcaccaagg tgcagagcca gccttcttat tcggccttga 3180

attgatcata tgcggattag aaaaacaact taaatgtgaa agtgggtctt aaaagcagca 3240

taacctttt ccgtgatggt aacttcacta gtttaaaagg atctaggtga agatcctttt 3300

tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc 3360

cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt 3420

gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac 3480

tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt 3540

gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct 3600

gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga 3660

ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac 3720

acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg 3780

agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt 3840

cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc 3900

tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg 3960

gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctggcc 4020

ttttgctcac atgacccgac a 4041

<210> 10
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer TL46 (loop 1/2 forward)

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(29)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(38)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(41)

<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 10
aaggccatga cggtggacnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnstcggt gacacccatg 60

acc 63

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL47 (loop 1/2 reverse)

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(24)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 11
cacctcctgg gaccggccsn nsnnsnncat ggtgaccttg gcttc 45

<210> 12

<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL48 (loop 3/4 forward)

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 12
gacgagccgg gaaaatacac ggccnnsggg ggcnnscacg tggcatacat catc 54

<210> 13
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oliogonucleotide primer TL49 (loop 3/4 reverse)

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(31)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(34)

<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 13
cgagccacac ccctgggacc ggsnncccsn nsnnsnngcc ctcagagtaa aagatg 56

<210> 14
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer AN-14

<400> 14
gtattttccc ggctcatcag ttttctccag gacggccttc acctcctggg accggc 56

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL50bio (assembly 5')

<400> 15
tatctgaagg ccatgacggt ggac 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL51bio (assembly 3')

<400> 16
tgcccacgag ccacacccct ggga 24

<210> 17
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL70 random primer loop 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(45)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 17
gaaggccatg acggtggact cccgctgccc gcgggcgtac tacnnstcgg tgacacccat 60

gacc 64

<210> 18
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL71 random primer loop 2

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(46)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(55)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(61)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 18
catcagtttt ctccaggacs nncttsnnct cctgsnnccg gccsnnccgc tgsnnggtsn 60

ncttggcttc caggttgc 78

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL72 assembly primer

<400> 19
tcctggagaa aactgatgag ccggg 25

<210> 20
<211> 825

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

```
Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
  1               5                  10                  15

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro
             20                  25                  30

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met
         35                  40                  45

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu
     50                  55                  60

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly
 65                  70                  75                  80

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala
                 85                  90                  95

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys
            100                 105                 110

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn
        115                 120                 125

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser
    130                 135                 140

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala
145                 150                 155                 160

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn
                165                 170                 175

Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys
            180                 185                 190

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr
        195                 200                 205

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser
```

```
    210                 215                 220

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser
225                 230                 235                 240

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr
                245                 250                 255

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
            260                 265                 270

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu
        275                 280                 285

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn
    290                 295                 300

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg
305                 310                 315                 320

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
                325                 330                 335

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp
            340                 345                 350

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro
        355                 360                 365

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
    370                 375                 380

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu
385                 390                 395                 400

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly
                405                 410                 415

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu
            420                 425                 430

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe
        435                 440                 445
```

```
Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro
    450                 455                 460

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp
465                 470                 475                 480

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala
                485                 490                 495

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu
            500                 505                 510

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
        515                 520                 525

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
    530                 535                 540

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
545                 550                 555                 560

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
                565                 570                 575

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
            580                 585                 590

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
        595                 600                 605

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
    610                 615                 620

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
625                 630                 635                 640

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
                645                 650                 655

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
            660                 665                 670

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
        675                 680                 685
```

```
Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
    690                 695                 700

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
705                 710                 715                 720

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
                725                 730                 735

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
            740                 745                 750

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
        755                 760                 765

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly
    770                 775                 780

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
785                 790                 795                 800

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
                805                 810                 815

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
            820                 825
```

<210> 21
<211> 1356
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 21
Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
  1               5                  10                  15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
             20                  25                  30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
         35                  40                  45
```

```
Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
     50                  55                  60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
 65                  70                  75                  80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
                 85                  90                  95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
            100                 105                 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
        115                 120                 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
    130                 135                 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
145                 150                 155                 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
                165                 170                 175

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
            180                 185                 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
        195                 200                 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
    210                 215                 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
225                 230                 235                 240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
                245                 250                 255

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
            260                 265                 270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
        275                 280                 285
```

```
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
    290                 295                 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
                325                 330                 335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
            340                 345                 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
        355                 360                 365

Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
    370                 375                 380

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
385                 390                 395                 400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
                405                 410                 415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
            420                 425                 430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
        435                 440                 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu
    450                 455                 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr
465                 470                 475                 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
                485                 490                 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
            500                 505                 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
```

```
        515                 520                 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
    530                 535                 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
545                 550                 555                 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
                565                 570                 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
            580                 585                 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
        595                 600                 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
    610                 615                 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
625                 630                 635                 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
                645                 650                 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
            660                 665                 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
        675                 680                 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
    690                 695                 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
705                 710                 715                 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
                725                 730                 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
            740                 745                 750
```

```
Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
        755                 760                 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
    770                 775                 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
785                 790                 795                 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
                805                 810                 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
            820                 825                 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
        835                 840                 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
    850                 855                 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
865                 870                 875                 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
                885                 890                 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
            900                 905                 910

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
        915                 920                 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
    930                 935                 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
945                 950                 955                 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
                965                 970                 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
            980                 985                 990
```

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys
1010 1015 1020

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn
1025 1030 1035 1040

Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp
1045 1050 1055

Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met
1060 1065 1070

Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val
1075 1080 1085

Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser
1090 1095 1100

Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys
1105 1110 1115 1120

Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr
1125 1130 1135

Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr
1140 1145 1150

Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala
1155 1160 1165

Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu
1170 1175 1180

Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser
1185 1190 1195 1200

Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn
1205 1210 1215

Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg

1220 1225 1230

Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
1235 1240 1245

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu
1250 1255 1260

Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro
1265 1270 1275 1280

Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser
1285 1290 1295

Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp
1300 1305 1310

Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys
1315 1320 1325

Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln
1330 1335 1340

Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val
1345 1350 1355

<210> 22
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

```
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65                  70                  75                  80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
                85                  90                  95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
            100                 105                 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
        115                 120                 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
    130                 135                 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145                 150                 155                 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
                165                 170                 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
            180                 185                 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
        195                 200                 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
    210                 215                 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225                 230
```

<210> 23
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

```
Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
  1               5                  10                  15
```

```
Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
            20                  25                  30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
        35                  40                  45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
    50                  55                  60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65                  70                  75                  80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
                85                  90                  95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
            100                 105                 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
    130                 135                 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
145                 150                 155                 160

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

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
            180                 185                 190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
        195                 200                 205
```

<210> 24
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

```
Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
```

```
  1               5                  10                  15

Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Phe
            20                  25                  30

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
        35                  40                  45

Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
    50                  55                  60

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
65                  70                  75                  80

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
                85                  90                  95

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
            100                 105                 110

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
        115                 120                 125

Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
    130                 135                 140

Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
145                 150                 155                 160

Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
                165                 170                 175

Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
            180                 185                 190

Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
        195                 200                 205

Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
    210                 215                 220

Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
225                 230                 235                 240
```

```
Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
                245                 250                 255

Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
            260                 265                 270

Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
        275                 280                 285

Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
    290                 295                 300

Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
305                 310                 315                 320

Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
                325                 330                 335

Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
            340                 345                 350

Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
        355                 360                 365

Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
    370                 375                 380

Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
385                 390                 395                 400

Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro
                405                 410                 415

Gln Met Ser
```

<210> 25
<211> 354
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

```
Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
```

```
  1               5                  10                  15

Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
            20                  25                  30

Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
        35                  40                  45

Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
    50                  55                  60

Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg
65                  70                  75                  80

Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile
                85                  90                  95

Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr
        115                 120                 125

Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
    130                 135                 140

Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
145                 150                 155                 160

Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
            180                 185                 190

Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln
        195                 200                 205

Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
    210                 215                 220

Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu
225                 230                 235                 240
```

Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala
245 250 255

Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
260 265 270

Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
275 280 285

Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
290 295 300

Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
305 310 315 320

His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
325 330 335

Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
340 345 350

Asn Pro

<210> 26
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 26
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Asn Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 27
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 27
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Glu Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Val Val Leu
50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 28
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 28
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Val Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Gly Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala His Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Val Phe Tyr

85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Asn Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 29
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 29
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Ala
20 25 30

Thr Pro Met Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Arg
35 40 45

Val Thr Val Arg Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Ile Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Arg Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 30
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 30
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ala Pro Met Ala Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Ile Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Arg Ile Ile Gly Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 31
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 31
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Val Val His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Arg Ala Val Leu
50 55 60

Gly Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 32
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 32
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Pro Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

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

Gly Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Val Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Glu Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala

145 150

<210> 33
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGF

<400> 33
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala His Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 34

<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 34
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Lys Phe Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 35
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 35
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Arg Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 36
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 36
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ala Phe Arg Gly Arg Ser Gln Glu Met Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 37
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 37
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

```
Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
            20                  25                  30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
        35                  40                  45

Val Thr Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
    50                  55                  60

Glu Lys Thr Gly Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Pro Gly Gly Glu His
65                  70                  75                  80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
                85                  90                  95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Gly Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
            100                 105                 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
        115                 120                 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
    130                 135                 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145                 150
```

<210> 38
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 38

```
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
  1               5                  10                  15

Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
            20                  25                  30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
```

35 40 45

Val Thr Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Thr Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Lys Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 39
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mutein of human tear lipocalin with binding affinity for VEGFR2

<400> 39
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Ile Phe Pro Ser Gly Arg Ile Tyr Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Gln Lys Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

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

Val Ala Tyr Ile Ile Lys Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Leu Ala Val Glu Thr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL 107

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 40
gaaggccatg acggtggacn nsggcgcgct gaggtgcctc 40

<210> 41
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL 109

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 41
ggccatcggg ggcatccacg tggcannsat cnnsaggtcg cacgtgaagg ac 52

<210> 42
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL 110

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(24)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 42
caccctggg accgggaccc csnncaagca gccctcagag 40

<210> 43
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer TL 111

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(41)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 43
cccccgatgg ccgtgtasnn ccccggctca tcagttttsn ncaggacggc cctcacctc 59

<210> 44
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22

<400> 44
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 45
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-J20

<400> 45
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

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

Thr Lys Thr Asp Glu Pro Gly Ala Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Gln Ile His Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 46
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-M11

<400> 46
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Leu Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Ser Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asp Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Ser Lys Thr Asp Glu Pro Gly Met Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Arg Ile Met Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 47
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-L03

<400> 47
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ile Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Val Val His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Arg Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Lys Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 48
<211> 745
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTLPC51 118-862 XbaI/HindIII nt

<400> 48
tctagataac gagggcaaaa aatgaaaaag acagctatcg cgattgcagt ggcactggct 60

ggtttcgcta ccgtagcgca ggccgcctca gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg 120

tggtatctga aggccatgac ggtggacagg gagttccctg agatgaatct ggaatcggtg 180

acacccatga ccctcacgac cctggaaggg ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg 240

ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc gtcctggaga aaactgacga gccgggaaaa 300

tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca tacatcatca ggtcgcacgt gaaggaccac 360

tacatctttt actctgaggg cgagctccac gggaagccgg tcccaggggt gtggctcgtg 420

ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc 480

cgcggactca gcacggagag catcctcatc cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg 540

agcgctggtg ccgtcgacgc taactctctg gctgaagcta aagttctggc taaccgtgaa 600

ctggacaaat acggtgtttc cgactactac aaaaacctca tcaacaacgc taaaaccgtt 660

gaaggtgtta aagctctgat cgacgaaatt ctcgcagcac tgccgagcgc ttggtctcac 720

ccgcagttcg aaaaataata agctt 745

<210> 49
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein OmpA signal sequence - human tear lipocalin - albumin-binding domain (abd) - Strep-Tag II

<400> 49
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly
20 25 30

Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met
35 40 45

Asn Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly
50 55 60

Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Ser Gln Glu
65 70 75 80

Val Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala
85 90 95

Asp Gly Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp
100 105 110

His Tyr Ile Phe Tyr Ser Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Pro
115 120 125

Gly Val Trp Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu
130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Gly
165 170 175

Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
180 185 190

Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu
210 215 220

Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
225 230 235

<210> 50
<211> 745
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pTLPC51_S236.1-A22 118-862 XbaI/HindIII (nt sequence encoding a fusion protein of ompA, human tear lipocalin mutein S236.1-A22, abd and Strep-Tag II)

<400> 50
tctagataac gagggcaaaa aatgaaaaag acagctatcg cgattgcagt ggcactggct 60

ggtttcgcta ccgtagcgca ggccgcctca gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg 120

tggtatctga aggccatgac ggtggacgtg ggcgcgctga ggtgcctcgc ggggtcggtg 180

atacccacga ccctcacgac cctggaaggg ggcaacctgg aagccaaggt caccatgcat 240

atcaagggcc ggtcccagga ggtgaaggcc gtcctgagca aaactgatga gccggggatc 300

tacacggcca tcgggggcat ccacgtggca aagatcggga ggtcgcacgt gaaggaccac 360

tacatctttt actctgaggg ctgcttgagc ggggtcccgg tcccaggggt gtggctcgtg 420

ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc 480

cgcggactca gcacggagag catcctcatc cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg 540

agcgctggtg ccgtcgacgc taactctctg gctgaagcta aagttctggc taaccgtgaa 600

ctggacaaat acggtgtttc cgactactac aaaaacctca tcaacaacgc taaaaccgtt 660

gaaggtgtta aagctctgat cgacgaaatt ctcgcagcac tgccgagcgc ttggtctcac 720

ccgcagttcg aaaaataata agctt 745

<210> 51
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fusion protein of ompA, human tear lipocalin mutein S236.1-A22, albumin-binding domain (abd) and Strep-Tag II

<400> 51
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly
20 25 30

Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys
35 40 45

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

Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu
65 70 75 80

Val Lys Ala Val Leu Ser Lys Thr Asp Glu Pro Gly Ile Tyr Thr Ala
85 90 95

Ile Gly Gly Ile His Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp
100 105 110

His Tyr Ile Phe Tyr Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro
115 120 125

Gly Val Trp Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu
130 135 140

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

Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Gly
165 170 175

Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
180 185 190

Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu
210 215 220

Ala Ala Leu Pro Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
225 230 235

<210> 52
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22-strep

<400> 52
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 53
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-J20-strep

<400> 53
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

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

Thr Lys Thr Asp Glu Pro Gly Ala Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Gln Ile His Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 54
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-M11-strep

<400> 54
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Leu Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

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

35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Ser Lys Thr Asp Glu Pro Gly Met Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Arg Ile Met Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 55
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-L03

<400> 55
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ile Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Val Val His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Arg Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Lys Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
145 150 155 160

Glu Lys

<210> 56
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_D95C forward

<400> 56
gaggtcgcac gtgaagtgcc actacatctt ttactctgag g 41

<210> 57
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_D95C reverse

<400> 57
cctcagagta aaagatgtag tggcacttca cgtgcgacct c 41

<210> 58
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_T40C forward

<400> 58
gggtcggtga tacccacgtg cctcacgacc ctggaaggg 39

<210> 59
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_T40C reverse

<400> 59
cccttccagg gtcgtgaggc acgtgggtat caccgaccc 39

<210> 60
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_E73C forward

<400> 60
ccgtcctgag caaaactgat tgcccgggga tctacacgg 39

<210> 61
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> .

<400> 61
ccgtcctgag caaaactgat tgcccgggga tctacacgg 39

<210> 62
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_E131C forward

<400> 62
gccttggagg acttttgtaa agccgcagga g 31

<210> 63
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_E131C reverse

<400> 63
ctcctgcggc tttacaaaag tcctccaagg c 31

<210> 64
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer A22_R90C forward

<400> 64
cgtggcaaag atcgggtgct cgcacgtgaa ggacc 35

<210> 65
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer A22_R90C reverse

<400> 65
ggtccttcac gtgcgagcac ccgatctttg ccacg 35

<210> 66
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22 Thr 40-Cys

<400> 66
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Cys Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 67
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22 Glu73-Cys

<400> 67
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Ser Lys Thr Asp Cys Pro Gly Ile Tyr Thr Ala Ile Gly Gly Ile His
65 70 75 80

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 68
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22 Asp95-Cys

<400> 68
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Cys His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 69
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22 Arg90-Cys

<400> 69
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Cys Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 70
<211> 154
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S236.1-A22 Glu131-Cys

<400> 70
Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Val Gly Ala Leu Arg Cys Leu Ala Gly Ser Val
20 25 30

Ile Pro Thr Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met His Ile Lys Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

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

Val Ala Lys Ile Gly Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Cys Leu Ser Gly Val Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Cys Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150