



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0008649  
(43) 공개일자 2018년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4725 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7036061

(22) 출원일자(국제) 2016년05월18일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년12월14일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/061058

(87) 국제공개번호 WO 2016/184875

국제공개일자 2016년11월24일

(30) 우선권주장

15167922.2 2015년05월18일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하

독일 프라이징 85354, 리제마이트너 스트라세 30

(72) 발명자

히너, 말론

독일 뮌헨 81247 오이겐 뎀스트슈트라세 9

알러스도르퍼, 안드레아

독일 보른차흐 85283 모짜르트슈트라세 20에이

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 글리피칸-3(GPC3)에 대해 친화도를 갖는 인간 리포칼린 2의 뮤테인

(57) 요약

본 개시물은 글리피칸-3(GPC3)에 대한 신규한 특이-결합 치료 및/또는 진단 단백질에 관한 것으로, 상기 단백질은 바람직하게는 리포칼린 단백질의 뮤테인, 보다 바람직하게는 리포칼린 2(Lcn2 또는 NGAL)이다. 본 개시물은 또한 그러한 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 및 그러한 단백질 및 핵산 분자의 생성 및 사용 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 개시물은 또한 이들 단백질의 용도를 포함하여 그러한 리포칼린 단백질을 포함하는 약학 및/또는 진단 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

**벨 아이바, 라시다, 시함**

독일 뮌헨 80469 에르하르트슈트라쎄 15

**알로예, 미카엘라**

독일 프라이징 85354 뮌헨베르크 3에이

**비텐만, 알렉산더**

독일 울름 89077 쾰스테네커슈트라쎄 5

**맛쉬너, 가브리엘**

독일 뮌헨 80333 가벨스베르거슈트라쎄 70

**쉴스메이어, 마틴**

독일 뢰머베르크 67354 린다-소머-슈트라쎄 12/2

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)과 비교하여 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치들에서 적어도 20 개의 돌연변이 된 아미노산 잔기들을 포함하고, 약 1 nM 이하의  $K_D$ 의 친화도로 글리피칸-3(GPC3)에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

뮤테인의 아미노산 서열은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)과 비교하여 다음의 돌연변이 된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함하는, 뮤테인:

Leu 36 → Val 또는 Arg.; Ala 40 → Leu, Val 또는 Gly; Ile 41 → Leu, Arg, Met, Gly 또는 Ala; Gln 49 → Pro 또는 Leu; Tyr 52 → Arg 또는 Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val, Gly, Asn 또는 Ala; Leu 70 → Arg, Ser, Ala 또는 Val; Arg 72 → Asp, Trp, Ala, 또는 Gly; Lys 73 → Gly, Arg, Asn, Glu 또는 Ser; Cys 76 → Val 또는 Ile; Asp 77 → His, Met, Val, Leu, Thr 또는 Lys; Trp 79 → Lys, Ser 또는 Thr; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg, Asp, Gln 또는 Pro; Tyr 100 → Gly, Glu, Pro 또는 Gln; Leu 103 → Glu, Gln, Asn, Gly, Ser 또는 Tyr; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn, Ser 또는 Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg 또는 Tyr; Tyr 132 → Trp 또는 Ile; Lys 134 → Ala 또는 Phe; Thr 136 → Ile; 및 Cys 175 → Ala.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

실시에 4에 필수적으로 기술된 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때, 뮤테인은 SEQ ID NO: 3의 뮤테인보다 더 강한 친화도로 GPC3와 결합하는, 뮤테인.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

뮤테인은 실시에 5에 필수적으로 기술된 인간, 마우스 또는 필리핀 원숭이의 GPC3로 형질전환된 SK-HEP-1 세포에 기초한 분석에 의해 측정될 때, SEQ ID NO: 4의 뮤테인과 비교하여 개선된 EC50 값을 나타내는, 뮤테인.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

뮤테인은 실시에 6에 필수적으로 기술된 형광-기반 열 변성 분석에 의해 측정될 때, SEQ ID NO: 3의 뮤테인보다 생물물리화학적으로 훨씬 더 안정한, 뮤테인.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 28번 서열 위치에 대응하는 서열 위치에서 돌연변이를 포함하지 않는, 뮤테인.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서,

성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 65번 위치에서 천연 N-글리코실화 부위 Asn이 상기 뮤테인의 대응하는 서열 위치에서 제거되는, 뮤테인.

## 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

뮤테인의 아미노산 서열은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)과 비교하여 다음 세트의 아미노산 치환들 중 하나를 포함하는, 뮤테인:

(a) Leu 36 → Val; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Ala;

(b) Leu 36 → Val; Ala 40 → Val; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Lys 73 → Gly; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

(c) Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Met; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Ala; Lys 73 → Asn; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

(d) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

(e) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gly; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

(f) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

(g) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Tyr; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

(h) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Val; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

(i) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Ser; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe;

(j) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Cys 76 → Val; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Cys 175 → Ala;

(k) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68

→ Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Glu; Cys 76 → Ile; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Gln; Leu 103 → Asp; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala; 및

(1) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Ser; Cys 76 → Val; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

뮤테인은 N-글리코실화 부위를 갖지 않는, 뮤테인.

#### 청구항 10

SEQ ID NOs: 5-16으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하고, 상기 단편 또는 변이체는 제6항 내지 제28항 중 어느 한 항에 명시된 아미노산 잔기들을 포함하는, 리포칼린 뮤테인.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 SEQ ID NOs: 5-16으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는, 리포칼린 뮤테인.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

#### 청구항 13

제12항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 14

뮤테인은 유전 공학적 방법에 의해 뮤테인을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산되는, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 뮤테인의 생산방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 리포칼린 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 GPC3을 결합시키는 방법.

### 발명의 설명

### 배경 기술

[0001]

글리피칸-3(Glypican-3, GPC3)은 글리코실-포스파티딜이노시톨이 고정된 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(glycosyl-phosphatidylinositol-anchored heparin sulfate proteoglycans)의 글리피칸 패밀리에 속하는 종양 태아성 항원(oncofetal antigen)이다. 글리피칸은 헤파린 설페이트 글리코사아미노글리칸으로 불리는 복합체 다당류 사슬과의 공유 결합을 특징으로 한다. 글리피칸은 세포-세포의 기질 경계면에서 세포 신호전달에 관여한다(Sasisekharan et al., Nat. Rev. Cancer 2:521-528 (2002)). 현재까지 인간 글리피칸 패밀리의 여섯 개의 특징적인 구성원이 확인되었다. 세포막-결합 GPC3은 하나 이상의 이황화 결합에 의해 연결된 두 개의 서브유닛으로 구성된다.

[0002]

GPC3는 발생 동안 태아 간 및 태반에서 발현되며, 정상 성인 조직에서 하향-조절되거나 침묵된다. GPC3 유전자

에서 돌연변이 및 고갈은 인간의 Simpson-Golabi-Behmel 또는 심슨 변형장애 증후군의 원인이 된다. GPC3는 각종 암, 특히 간세포 암종("HCC"), 흑색종, 윌름스 종양 및 간모세포종에서 발현된다(Jakubovic and Jothy, Ex. MoI. Path. 82:184-189 (2007); Nakatsura and Nishimura, Biodrugs 19(2):71-77 (2005)).

[0003] HCC는 전 세계적으로 암 관련 사망의 세 번째 주요 원인이다. HCC는 매년 약 백만 명이 사망한다(Nakatsura and Nishimura, Biodrugs 19(2):71-77 (2005)). B형 간염바이러스, C형 간염바이러스 및 만성 과음은 간경화로 이어지고 HCC의 가장 흔한 원인으로 남아있다. HCC의 발병율은 부분적으로 C형 간염바이러스의 확산으로 인해 미국에서 급격히 증가하였다. HCC는 주로 간 이식이나 종양 절제술로 치료한다. 환자의 예후는 간 기능과 종양이 진단되는 병기 둘 다에 달려있다(Parikh and Hyman, Am J Med. 120(3):194-202 (2007)). HCC 그리고 GPC3를 발현하는 다른 종양의 치료를 위한 효과적인 전략이 필요하다. 따라서, GPC3, 바람직하게는 종양 세포에서 발현되는 GPC3를 표적으로 하는 이용 가능한 수단과 방법들을 갖는 것이 바람직할 것이다.

[0004] 국제특허출원 제PCT/EP2011/070119호는 GPC3에 결합할 수 있는 인간 리포칼린 2(인간 호중구 젤라티나아제-결합된 리포칼린(hNGAL))으로도 불림)로부터 유래된 리포칼린 뮤테인을 개시하였다. 그러나 본 개시물은 이들 단백질에 수반되는 진보된 특징들을 가진 추가의 GPC3-결합 단백질을 제공한다.

## 발명의 내용

### 과제의 해결 수단

[0005] 본 개시물의 일 구현에는 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 측정된 친화도로 인간 GPC3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인에 관한 것이다. 보다 바람직하게는, 뮤테인은 약 1 nM 또는 약 0.2 nM 이하의  $K_D$ 로 측정된 친화도를 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 뮤테인은 실시예 5에 필수적으로 기술된 분석과 같은 세포-결합 분석에서 바람직하게는, 약 25 nM, 10 nM 또는 3 nM 이하의 EC50 값으로 인간 GPC3에 결합하기 위해 경쟁할 수 있다.

[0006] 다른 구현예에서, 본 개시물은 리포칼린 뮤테인에 관한 것으로, 상기 뮤테인은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에 대응하는 하나 이상의 위치에서 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 바와 같은 치환을 포함한다.

[0007] 특정 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치에 대응하는 서열 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20, 또는 심지어 그 이상, 예컨대 21, 22, 23, 24, 25 또는 26개의 치환을 포함한다.

[0008] 추가 특정 구현예들에서, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NOs: 5-16로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 서열(SEQ ID NO: 1)에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는다. 바람직하게는, 상기 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치들에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20, 또는 심지어 그 이상, 예컨대 21, 22, 23, 24, 25 또는 26개의 돌연변이 된 아미노산 잔기들을 포함한다.

[0009] 일부 추가 구현예들에서, 진핵세포에서의 발현을 용이하게 하기 위해, 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 65번 위치에서 천연 N-글리코실화 부위 Asn이 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인의 해당 서열 위치에서 예를 들어, 65번 위치에서 Asn의 Asp로의 돌연변이에 의해 제거된다. 더욱이, N-글리코실화 부위(Asn-X-Ser/Thr)이 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인에 존재하지 않은 것이 바람직하다.

[0010] 일부 다른 구현예들에서, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 예를 들어, 추가로 안정성을 최적화하기 위해, 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 28번 서열 위치에 해당하는 서열 위치에서 돌연변이를 포함하지 않는다.

[0011] 다른 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 유기물, 효소 표지, 방사성 표지, 비색 표지, 형광 표지, 발색 표지, 발광 표지, 헵텐, 디곡시게닌, 비오틴, 세포중식억제제, 독소, 금속 복합체, 금속 및 콜로이드 골드로 구성된 군에서 선택된 화합물에 컨쥬게이트 된다. 뮤테인은 그의 N-말단 및/또는 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인, 또는 펩타이드인 융합 파트너와 융합될 수 있다.

- [0012] 다른 구현예에서, 뮤테인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 화합물에 컨쥬게이트 된다. 보다 바람직하게는, 뮤테인은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 및 알부민 결합 단백질로 구성된 군에서 선택된 화합물에 컨쥬게이트 된다.
- [0013] 다른 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 GPC3의 길항제이다.
- [0014] 다른 구현예에서, 본 개시물은 본 발명의 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0015] 또 다른 구현예에서, 본 개시물은 상기 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함한다.
- [0016] 본 개시물은 또한 여기에 기술된 뮤테인을 포함하는 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 종양, 바람직하게는 간 종양 또는 흑색종을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0017] 제1 양태에서, 본 개시물은 GPC3을 겨냥하거나 특이적인 신규한 특이-결합 단백질에 관한 것이다. 본 개시물의 단백질은 치료 및/또는 진단 목적을 위해 사용될 수 있다. 본 개시물의 단백질은 여기에 기술된 바와 같이 특히 hNGAL 뮤테인을 포함한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 본 개시물의 단백질은 결합 특이도가 절대적인 것은 아니라 상대적인 특성이기 때문에 그 표적과 하나 이상의 레퍼런스 표적을 구별할 수 있다면 표적(여기서는 GPC3)에 "특이적으로 결합한다". "특이적 결합"은 예를 들어, 웨스턴 블랏, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-검사, FACS, IHC 및 펩타이드 스캔에 따라 측정될 수 있다.
- [0018] 마찬가지로, 다른 양태에서, 본 개시물은 hNGAL 뮤테인에 관한 것으로, 상기 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 및/또는 134의 위치에 대응하는 하나 이상의 위치에서 치환, 바람직하게는, 여기에 기술된 바와 같은 치환을 포함한다.
- [0019] 다른 양태에서, 본 개시물은 hNGAL 뮤테인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것으로, hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치들에 대응하는 아미노산 위치들에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 또는 심지어 그 이상, 예컨대, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26개의 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 바와 같은 치환을 포함한다.
- [0020] 유사하게, 본 개시물은 8개의  $\beta$ -가닥이 하나의 말단에서 4개의 루프에 의해 쌍으로 연결되어 결합 포켓을 형성하는 것을 포함하는 실린더형  $\beta$ -주름진 시트 슈퍼세컨더리 구조 영역을 갖는 hNGAL 유래의 리포칼린 뮤테인에 관한 것으로, 상기 4개의 루프 중 적어도 3개 각각의 적어도 하나의 아미노산은 돌연변이되어 있으며, 상기 리포칼린은 검출 가능한 친화도로 비-천연 표적인 GPC3에 결합하는데 효과적이다. 유리하게는, 리포칼린 뮤테인은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에서 아미노산에 대응하는 아미노산 위치(들)에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 바와 같은 치환을 포함한다.
- [0021] 본 개시물은 또한 이들 단백질을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0022] 본 개시물에 따라 사용될 때, 용어 "위치"는 여기에 묘사된 아미노산 서열 내 아미노산 또는 여기에 묘사된 핵산 서열 내 뉴클레오타이드의 위치를 의미한다. 여기에 사용된 용어 "대응하는"은 한 위치가 선행하는 뉴클레오타이드/아미노산의 수로만 측정되는 것이 아닌 것도 포함한다. 따라서, 치환될 수 있는 본 개시물에 따른 주어진 아미노산의 위치는 (돌연변이 또는 야생형) 리포칼린의 다른 곳에서 아미노산의 결실 또는 첨가로 인해 다양할 수 있다. 유사하게, 치환될 수 있는 본 개시물에 따른 주어진 뉴클레오타이드의 위치는 프로모터 및/또는 임의의 다른 조절 서열 또는 유전자(엑손과 인트론을 포함하여)를 포함하여 뮤테인 또는 야생형 리포칼린 5'-비번역 영역(UTR)의 다른 곳에서 결실 또는 추가 뉴클레오타이드로 인해 다양할 수 있다.
- [0023] 따라서, 본 개시물에 따른 "대응하는 위치"에 대해, 뉴클레오타이드/아미노산은 표시된 수에서는 다를 수 있으나 여전히 유사한 이웃하는 뉴클레오타이드/아미노산을 갖는 것으로 이해하는 것이 바람직하다. 상기 교환, 결실 또는 첨가될 수 있는 뉴클레오타이드/아미노산 역시 용어 "대응하는 위치"에 의해 포함된다.
- [0024] 특히, 본 개시물의 hNGAL 리포칼린 뮤테인과 상이한 리포칼린의 뉴클레오타이드 잔기 또는 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 기술된 바와 같은 hNGAL 리포칼린 뮤테인의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열, 특히 임의



의 SEQ ID NOs: 5-16, 또는 NGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 가진 것에서 특정 위치에 대응하는지를 측정하기 위해, 숙련된 기술자는 당업계에서 잘 알려진 수단 및 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, 수동으로 또는 Basic Local Alignment Search Tool 또는 ClustalW를 나타내는 BLAST2.0 또는 서열 정렬을 생성하기에 적합한 임의의 다른 적당한 프로그램과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 정렬을 수행할 수 있다. 따라서, SEQ ID NOs: 1-8 중 어느 하나 또는 NGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에서 하나 이상 아미노산 치환을 가진 뮤테인을 "대상 서열"로 제공할 수 있고, hNGAL과 다른 리포칼린의 아미노산 서열은 "질의 서열"로 제공한다.

[0025] 위를 감안하면, 숙련된 기술자는 여기에 기술된 바와 같이 hNGAL에서 돌연변이 된 어느 아미노산 위치가 hNGAL 이외의 스캐폴드의 아미노산에 대응하는 지를 쉽게 측정할 수 있는 위치에 있다. 구체적으로, 숙련된 기술자는 상기 뮤테인의 어느 아미노산(들)이 상기 상이한 리포칼린의 아미노산 서열의 각각의 아미노산(들)에 대응하는 지를 측정하기 위해 다른 뮤테인의 아미노산 서열과 여기에 기술된 뮤테인 특히 본 개시물의 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열을 정렬시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 숙련된 기술자는 상기 상이한 리포칼린의 아미노산 서열의 어느 아미노산이 NGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치(들)에서 아미노산에 대응하는지를 측정할 수 있다.

[0026] GPC3를 겨냥하거나 특이적인 본 개시물의 단백질은 정의된 단백질 스캐폴드에 기초한 임의의 수의 특이-결합 단백질 뮤테인을 포함한다. 여기에 사용된 바와 같이, "뮤테인", "돌연변이 된" 개체(단백질 또는 핵산) 또는 "돌연변이체"는 자연적으로 발생하는(야생형) 핵산 또는 단백질 "레퍼런스" 스캐폴드와 비교하여 각각 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 바람직하게는, 교환, 결실 또는 삽입되는 각각의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 심지어 그 이상, 예컨대, 21, 22, 23, 24, 25 및 26개이다. 그러나 본 개시물의 뮤테인은 여전히 GPC3에 결합할 수 있는 것이 바람직하다.

[0027] 여기에 사용된 바와 같이, "리포칼린"은 대략 18-20 kDa 중량의 단량체 단백질로 정의되며, 하나의 말단에 복수의(바람직하게는 4개) 루프에 의해 복수의(바람직하게는 8개) b-가닥이 쌍으로 연결되어 결합 포켓으로 정의되는 것을 포함하는 실펴터형 b-주름진 시트 슈퍼세컨더리 구조 영역을 가진다. 그것은 각각 다른 크기, 형태 및 화학적 성질의 표적들을 수용할 수 있는 리포칼린 패밀리를 구성원 간의 다양한 상이한 결합 모드를 야기하는 다른 견고한 리포칼린 스캐폴드에서 루프의 다양성이다(예를 들어, Flower DR., The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem J.* 318:1-14 (1996); Flower DR., et al., The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:9-24 (2000); Skerra, A. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:337-350 (2000)를 참조할 것). 사실, 단백질의 리포칼린 패밀리는 고도로 보존된 전반적인 폴딩 패턴을 유지하나 비정상적으로 낮은 수준의 전반적인 서열 보존성(종종 20% 미만의 서열 동일성)을 공유하면서 넓은 범위의 리간드를 결합하기 위해 자연적으로 진화해 왔다. 다양한 리포칼린에서 위치들 간의 일치는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7,250,297호를 참조할 것.

[0028] 바람직한 구현예에서, 본 개시물의 단백질은 리포칼린 2의 뮤테인이다(Lcn 2; 인간 호중구 젤라티나아제-관련 리포칼린, hNGAL 또는 시테로칼린으로도 알려져 있음). 용어 "인간 호중구 젤라티나아제-관련 리포칼린", "hNGAL", "성숙한 hNGAL", "리포칼린 2", "인간 리포칼린 2", "성숙한 인간 리포칼린 2" 및 "Lcn2"는 상호교환적으로 사용되며 SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 등록 번호 P80188(Isoform 1)를 가진 성숙한 hNGAL를 지칭한다. SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 등록 번호 P80188(Isoform 1)에 제시된 아미노산 서열이 "레퍼런스 서열"로 바람직하다.

[0029] 가장 바람직하게는, SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열이 "레퍼런스 서열"로 바람직하다. SEQ ID NO: 1은 성숙한 hNGAL을 나타낸다. 용어 "레퍼런스 서열" 및 "야생형 서열"은 여기에서 상호교환적으로 사용된다. 아미노산 1-20의 시그널 펩타이드(MPLGLLWLGL ALLGALHAQA)가 절단되기 때문에 이 단백질의 성숙한 형태는 완전 서열의 아미노산 21 내지 198을 가진다. 이 단백질은 성숙 단백질의 76번 및 175번 위치의 아미노산 잔기 사이에 형성된 이황화 결합을 추가로 가진다.

[0030] 본 개시물의 뮤테인은 돌연변이 된 아미노산 서열 위치들 외에 "모체" 단백질 스캐폴드(예컨대, 리포칼린)의 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다: 대안으로, 또한, hNGAL 뮤테인은 뮤테인의 결합 활성 및 폴딩을



간섭하지 않는 돌연변이 유발을 받는 서열 위치들 외에 아미노산 돌연변이들을 포함할 수 있다. 그러한 돌연변이는 확립된 표준 방법들을 사용하여 DNA 수준에서 이루어질 수 있다(Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)). 아미노산 서열의 가능한 변경은 아미노산 치환뿐만 아니라 삽입 또는 결실이다.

[0031] 그러한 치환들은 보존적, 즉, 아미노산 잔기가 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체되는 것일 수 있다. 보존적 치환의 예는 다음의 그룹의 구성원 간의 대체물이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 이소루신, 루신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 반면에, 아미노산 서열에 비-보존적 변경을 도입하는 것 역시 가능하다. 또한, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 대신 모체 단백질 스캐폴드의 1차 구조의 하나 이상의 연속 아미노산들을 삽입 또는 결실시키는 것 역시 가능하며, 이들 결실 또는 삽입은 안정한 접힌/기능적 뮤테인을 초래하며, 숙련된 기술자에 의해 용이하게 시험될 수 있다.

[0032] 숙련된 기술자는 본 개시물에 의해 고려되는 단백질 뮤테인들을 제조하는데 유용한 방법들을 이해할 것이나, 그의 단백질 또는 핵산 서열은 여기에 명백하게 기술되어 있지는 않는다. 개요로서, 아미노산 서열의 그러한 변형들은 특정 제한 효소들에 대한 절단 부위를 포함함으로써 돌연변이 된 리포칼린 유전자 또는 그의 부분들의 서브클로닝을 단순화하기 위해 예를 들어 단일 아미노산 위치들의 지정 돌연변이 유발을 포함한다. 또한, 이들 돌연변이는 주어진 표적에 대한 리포칼린 뮤테인의 친화도를 더욱 개선하기 위해 포함될 수 있다. 또한, 필요하다면, 폴딩 안정성, 열적 안정성, 단백질 내성 또는 물 용해성을 개선하거나 응집 경향을 감소시키는 것과 같이 뮤테인의 특정 특징들을 조절하기 위해 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 발생하는 시스테인 잔기들은 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이 될 수 있다.

[0033] 따라서, 본 개시물은 여기에 개시된 단백질의 기능적 변이체들 역시 포함하며, 이들은 레퍼런스 단백질에 대해 임계 서열 동일성 또는 서열 상동성을 가진다. "동일성" 또는 "서열 동일성"은 그들의 유사성 또는 관계를 측정하는 서열의 특징을 의미한다. 본 개시물에 사용된 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 본 개시물의 폴리펩타이드의 서열을 문제의 서열과 (상동성의) 정렬 후 이들 두 서열 중 더 긴 부분에 있는 잔기의 수와 관련하여 쌍으로 동일한 잔기들의 비율을 의미한다. 동일성 비율은 동일한 잔기의 수를 총 잔기의 수로 나누고 생성물에 100을 곱하여 측정한다. 용어 "상동성"은 여기에서 그것의 통상적인 의미로 사용되며, 두 개의 단백질의 선형 아미노산 서열에서 동등한 위치에서 보존적 치환으로 간주되는 아미노산뿐만 아니라 동일한 아미노산을 포함한다.

[0034] 서열 상동성 또는 서열 동일성의 비율은 여기에서 예를 들어, 프로그램 BLASTP, version blastp 2.2.5(2002.11.16)를 사용하여 측정될 수 있다(Altschul, S. F. et al. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402(1997) 참조). 이 구현예에서, 상동성의 비율은 바람직하게는 야생형 단백질 스캐폴드를 쌍 비교에서 레퍼런스로 사용하여 프로펩타이드 서열을 포함하는 전체 폴리펩타이드 서열의 정렬(매트릭스: BLOSUM 62; 갭 코스트: 11.1; 컷 오프 값은  $10^{-3}$ 로 설정)에 기초한다. 이것은 BLASTP 프로그램 결과로 표시되는 "양"의 수(상동의 아미노산)를 정렬을 위한 프로그램에 의해 선택된 아미노산의 총수로 나눈 비율로 계산된다.

[0035] 예를 들어, 다른 화합물, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 스타치(HES), 비오틴, 펩타이드 또는 단백질과의 컨쥬게이션을 위해, 또는 비-자연적으로 발생하는 이황화 결합의 형성을 위해 새로운 반응기를 도입하기 위해 다른 아미노산 서열 위치들을 의도적으로 시스테인으로 돌연변이하는 것 역시 가능하다.

[0036] 인간 리포칼린 2의 뮤테인과 관련하여, 시스테인 잔기를 인간 리포칼린 2 뮤테인을 포함하는 리포칼린의 아미노산 서열에 도입하는 그러한 돌연변이의 예시적 가능성은 hNGAL의 야생형 서열의 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 또는 158의 서열 위치에 대응하는 서열 위치들 중 적어도 하나에 시스테인 잔기를 도입하는 것을 포함한다. 본 개시물의 인간 리포칼린 2 뮤테인이 SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 등록번호 P80188의 서열과 비교하여 시스테인이 다른 아미노산 잔기로 대체된 서열을 가진 일부 구현예들에서, 대응하는 시스테인이 서열에 다시 도입될 수 있다. 예시적인 예로서, 87번 아미노산 위치의 시스테인 잔기는 SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 등록번호 P80188의 서열에 원래 존재하는 시스테인으로 복귀함으로써 그러한 경우에 도입될 수 있다. 임의의 아미노산 위치들, 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 및/또는 158의 측면에 생성된 티올 모이어티는 예를 들어, 각각의 인간 리포칼린 2 뮤테인의 열적 반감기를 증가시키기 위해 뮤테인에 PEG 또는 HES를 결합하는데 이용될 수 있다.

[0037] 일부 바람직한 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 인간 또는 마우스 GPC3와 0.5 nM 이하, 0.3 nM 이하

및/또는 0.2 nM 이하를 포함하여 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 본 개시물의 뮤테인은 GPC3의 성숙한, 접힌 생 활성 형태의 하나 이상의 연속, 불연속 또는 구조 에피토프(들)과 특이적으로 결합할 수 있다.

[0038] 선택된 표적(본 경우에는 GPC3)에 대한 본 개시물의 단백질(예를 들어, 리포칼린의 뮤테인)의 결합 친화도는 당 업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(그리하여, 뮤테인-리간드 복합체의  $K_D$  값을 측정할 수 있다). 그러한 방법으로 형광 적정, 경쟁적 ELISA, 등은 적정 열량계(ITC)와 같은 열량 측정 방법들 그리고 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 그러한 방법들은 당업계에 잘 확립되어 있으며, 이의 예시도 아래에 구체적으로 기재되어 있다.

[0039] 본 개시물의 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙한 인간 리포칼린 2에 대해 높은 서열 동일성을 가질 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시물의 단백질은 SEQ ID NO: 1의 서열로 구성된 군에서 선택된 단백질에 대해 적어도 95% 동일성을 포함하여 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90% 동일성을 가질 수 있고, 아미노산 서열의 그러한 뮤테인은 SEQ ID NOs: 5-16으로 구성된 군에서 선택된다.

[0040] 본 개시물은 SEQ ID NOs: 5-16의 서열로 구성된 군에서 선택된 단백질의 구조 동족체 역시 포함하며, 이에 관하여, 약 60% 이상, 바람직하게는 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상 및 가장 바람직하게는 95% 이상의 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가진다.

[0041] 용어 "글리피칸-3", "글리피칸 프로테오글리칸 3", "GPC3", "OTTHUMP00000062492", "GTR2-2", "SGB", "DGSX", "SDYS", "SGBS", "OCI-5", 및 "SGBS1"는 상호교환적으로 사용되며, 인간 글리피칸-3의 변이체, 이소폼 및 중 동족체들을 포함한다. 예시적인 인간 글리피칸-2의 전체 아미노산 서열은 Genbank/NCBI 등록번호 NM\_004484를 가진다.

[0042] 상기와 비슷하게, 본 개시물의 뮤테인은 바람직하게는 GPC3의 길항제로 작용한다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 뮤테인은 GPC3 분자가 그의 동족 리간드에 결합하거나 그렇지 않고 상호작용하는 능력을 억제함으로써 GPC3의 길항제로 작용할 수 있다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 GPC3에 특이적으로 결합하는 인간 리포칼린 2의 뮤테인을 포함한다. 이러한 의미에서, GPC3는 야생형 인간 리포칼린 2의 비-천연 리간드로 간주될 수 있고, 여기서 "비-천연 리간드"는 생리학 적 조건하에서 인간 리포칼린 2에 결합하지 않는 화합물을 지칭한다. 본 발명자들은 특정 위치들에서 돌연변이를 갖도록 인간 리포칼린 2와 같은 야생형 리포칼린을 조작함으로써 비-천연 리간드에 대한 높은 친화도와 높은 특이도가 가능함을 입증하였다. 한 양태에서 성숙한 인간 리포칼린 2의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 임의의 서열 위치들을 인코딩하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및/또는 20개의 뉴클레오타이드 삼중항(들)에서, 뉴클레오타이드 삼중항의 서브세트에 의해 이들 위치에서 치환을 허용함으로써 무작위 돌연변이 유발이 수행될 수 있다.

[0044] 또한, 리포칼린은 성숙한 인간 리포칼린 2의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치들에 대응하는 서열 위치들의 적어도 임의의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개를 포함하여 임의의 하나 이상에서 돌연변이 된 아미노산 잔기를 갖는 뮤테인을 생성하는데 이용될 수 있다.

[0045] 서열 위치 36에서의 치환은 예를 들어 Leu 36 → Val 또는 Arg 치환일 수 있다. 서열 위치 40에서의 치환은 예를 들어 Ala 40 → Leu, Val 또는 Gly 치환일 수 있다. 서열 위치 41에서의 치환은 예를 들어 Ile 41 → Leu, Arg, Met, Gly 또는 Ala 치환일 수 있다. 서열 위치 49에서의 치환은 예를 들어 Gln 49 → Pro 또는 Leu 치환일 수 있다. 서열 위치 52에서의 치환은 예를 들어 Tyr 52 → Arg 또는 Trp 치환일 수 있다. 서열 위치 65에서의 치환은 예를 들어 Asn 65 → Asp 치환일 수 있다. 서열 위치 68에서의 치환은 예를 들어 Ser 68 → Val, Gly, Asn 또는 Ala 치환일 수 있다. 서열 위치 70에서의 치환은 예를 들어 Leu 70 → Arg, Ser, Ala 또는 Val 치환일 수 있다. 서열 위치 72에서의 치환은 예를 들어 Arg 72 → Asp, Trp, Ala, 또는 Gly 치환일 수 있다. 서열 위치 73에서의 치환은 예를 들어 Lys 73 → Gly, Arg, Asn, Glu 또는 Ser 치환일 수 있다. 서열 위치 76에서의 치환은 예를 들어 Cys 76 → Val 또는 Ile 치환일 수 있다. 서열 위치 77에서의 치환은 예를 들어 Asp 77 → His, Met, Val, Leu, Thr 또는 Lys 치환일 수 있다. 서열 위치 79에서의 치환은 예를 들어 Trp 79 → Lys, Ser 또는 Thr 치환일 수 있다. 서열 위치 81에서의 치환은 예를 들어 Arg 81 → Gly 치환일 수 있다. 서열 위치 87에서의 치환은 예를 들어 Cys 87 → Ser 치환일 수 있다. 서열 위치 96에서의 치환은 예를 들어 Asn 96 →

Arg, Asp, Gln 또는 Pro 치환될 수 있다. 서열 위치 100에서의 치환은 예를 들어 Tyr 100 → Gly, Glu, Pro 또는 Gln 치환될 수 있다. 서열 위치 103에서의 치환은 예를 들어 Leu 103 → Glu, Gln, Asn, Gly, Ser 또는 Tyr 치환될 수 있다. 서열 위치 105에서의 치환은 예를 들어 Ser 105 → Ala 치환될 수 있다. 서열 위치 106에서의 치환은 예를 들어 Tyr 106 → Asn, Ser 또는 Thr 치환될 수 있다. 서열 위치 125에서의 치환은 예를 들어 Lys 125 → Glu 치환될 수 있다. 서열 위치 127에서의 치환은 예를 들어 Ser 127 → Arg 또는 Tyr 치환될 수 있다. 서열 위치 132에서의 치환은 예를 들어 Tyr 132 → Trp 또는 Ile 치환될 수 있다. 서열 위치 134에서의 치환은 예를 들어 Lys 134 → Ala 또는 Phe 치환될 수 있다. 서열 위치 136에서의 치환은 예를 들어 Thr 136 → Ile 치환될 수 있다. 서열 위치 175에서의 치환은 예를 들어 Cys 175 → Ala 치환될 수 있다. 현저하게, 레퍼런스 서열에서 대응하는 아미노산을 치환하는 임의의 아미노산은 대응하는 보존적 아미노산에 의해 교환될 수 있다. 특히, 보존적 치환은 다음 그룹의 구성원들 사이의 대체물이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판.

[0046] 일 구현예에서, GPC3에 결합하는 본 개시물의 뮤테인은 다음의 아미노산 대체물을 포함한다:

[0047] (a) Leu 36 → Val; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Ala;

[0048] (b) Leu 36 → Val; Ala 40 → Val; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Lys 73 → Gly; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

[0049] (c) Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Met; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Ala; Lys 73 → Asn; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

[0050] (d) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0051] (e) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gly; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0052] (f) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0053] (g) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Tyr; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0054] (h) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Val; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0055] (i) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys

87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Ser; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe;

[0056] (j) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Cys 76 → Val; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Cys 175 → Ala;

[0057] (k) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Glu; Cys 76 → Ile; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Gln; Leu 103 → Asp; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala; 또는

[0058] (l) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Ser; Cys 76 → Val; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala.

[0059] 넘버링은 바람직하게는 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)에 관련된다. 따라서, 본 개시물의 교시에 따르면, 숙련된 기술자는 성숙한 hNGAL의 바람직한 레퍼런스 서열(SEQ ID NO: 1)에서 어느 아미노산이 상기 (a) 내지 (1)에서 기술된 것들에 대응하는지 쉽게 측정할 수 있다; 레퍼런스 서열에서 상기 아미노산을 돌연변이시키기 위해.

[0060] 일부 특정 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO: 3의 뮤테인 및/또는 SEQ ID NO: 4의 뮤테인보다 더 강한 결합 친화도로 인간 또는 마우스 GPC3에 결합하며, 예를 들어, 그러한 뮤테인은 실시예 4에 필수적으로 기술된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명 분석으로 측정될 때 SEQ ID NO: 3 또는 4의 뮤테인보다 더 낮은  $K_D$  값을 가질 수 있다.

[0061] 일부 또 다른 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO: 3 및/또는 4의 뮤테인과 비교하여 개선된 EC50 값을 나타내며, 예를 들어, 그러한 뮤테인은 실시예 5에 필수적으로 기술된 바와 같이 인간, 마우스 또는 필리핀 원숭이의 GPC3로 형질전환된 SK-HEP-1 세포를 기초로 한 분석에 의해 측정될 때 SEQ ID NO: 3 또는 4의 뮤테인보다 더 낮은 nM을 가질 수 있다.

[0062] 일부 추가 구현예들에서, 본 개시물의 뮤테인은 예를 들어, 그러한 뮤테인이 실시예 6에 필수적으로 기술된 바와 같이 형광-기반 열 변성 분석에 의해 측정된 SEQ ID NO: 3 또는 4의 뮤테인과 비교하여 녹는점을 증가시킬 때 SEQ ID NO: 3의 뮤테인 및/또는 SEQ ID NO: 4의 뮤테인보다 생물물리학적으로 훨씬 더 안정하다.

[0063] 각각의 뮤테인 및 그것의 리간드 간의 복합체 형성은 각각의 결합 파트너의 농도, 경쟁자의 존재, pH 및 사용된 버퍼 시스템의 이온 강도, 및 해리 상수  $K_D$ 의 측정에 사용된 실험 방법(예를 들어 몇 가지 말하자면, 형광 적정, 경쟁적 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명), 또는 심지어 실험 데이터의 평가에 사용되는 수학적 알고리즘과 같은 많은 상이한 인자들에 의해 영향을 받는다는 것을 특히 덧붙인다.

[0064] 따라서,  $K_D$  값(각각의 뮤테인과 그것의 표적/리간드 간에 형성된 복합체의 해리 상수)은 주어진 리간드에 대한 특이 리포칼린 뮤테인의 친화도를 측정하는데 사용되는 방법 및 실험 설정에 의존하여 특정 실험 범위 내에서 변할 수 있음이 숙련된 자에게는 역시 명백하다. 이는  $K_D$  값이 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(Biacore), 경쟁적 ELISA 또는 "직접 ELISA"에 의해 측정되는지에 따라 측정된  $K_D$  값 또는 허용 범위에서 약간의 오차가 있을 수 있음을 의미한다.

[0065] 일 구현예에서, 여기에 개시된 뮤테인은 융합 파트너, 바람직하게는 단백질, 또는 단백질 도메인 또는 펩타이드의 N- 또는 C-말단에 연결될 수 있다. 융합 파트너의 예는 펜타히스티딘 태그, 헥사히스티딘 태그 또는 스트렙타비딘 태그(예컨대, Streptag<sup>®</sup>)와 같은 친화성 태그이다. 따라서, 본 출원은 그러한 태그를 갖춘 모든 명시적으로 및 일반적으로 기술된 뮤테인 역시 포함한다.

[0066] 특징적인 리포칼린 뮤테인 단편과 관련하여 본 개시물에 사용된 용어 "단편"은 성숙한 Lcn2 전장에서 유래된 N-



말단 및/또는 C-말단이 짧은, 즉, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산의 적어도 하나가 부족한 단백질 또는 펩타이드에 관한 것이다.

- [0067] 그러한 단편들은 성숙한 Lcn2의 1차 서열의 바람직하게는 적어도 10, 보다 바람직하게는 20, 가장 바람직하게는 30 이상의 연속 아미노산을 포함하며, 보통 성숙한 Lcn2의 면역분석법으로 검출 가능하다. 여기에 사용되는 단어 "검출하다" 또는 "검출하는"은 정량적 및 정성적 수준 둘 다, 그리고 이의 조합으로 이해된다. 그리하여, 이것은 관심 분자의 정량적, 반-정량적 및 정성적 측정을 포함한다. 따라서, 예를 들어 시료에서 GPC3와 같은 분자의 존재 또는 부재, 그리고 그것의 농도 또는 수준이 측정될 수 있다.
- [0068] 또한, 당업자에게 공지된 방법들을 사용하여 임의의 검출된 면역원성을 줄이기 위해 그들의 면역원성과 관련하여 변경된 상기 뮤테인들 역시 본 개시물의 범위에 포함된다.
- [0069] 세포독성 T-세포는 주 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자와 관련하여 항원-제시세포의 세포 표면의 펩타이드 항원을 인식한다. MHC 분자에 결합하는 펩타이드의 능력은 대립유전자 특이적이며, 그들의 면역원성과 관련이 있다. 주어진 단백질의 면역원성을 줄이기 위해, 단백질에서 어떤 펩타이드가 주어진 MHC 분자에 결합할 가능성이 있는지를 예상하는 것은 매우 중요하다. MHC 클래스 I 분자에 대한 주어진 펩타이드 서열의 결합을 예상하기 위해 잠재적 T-세포 에피토프들을 확인하기 위한 컴퓨터 스테딩 접근법을 사용한 접근법들이 이미 기술되어 있다(Altuvia et al., J. Mol. Biol. 249:244-250 (1995)). 그러한 접근법은 또한 본 개시물의 뮤테인에서 잠재적 T-세포 에피토프들을 확인하고, 사용 목적에 따라 그것의 예상된 면역원성에 기초하여 특이 뮤테인을 선별하는데 이용될 수 있다. 또한, T-세포 에피토프들을 포함하는 것으로 예상된 펩타이드 영역에 추가적인 돌연변이 유발을 받도록 하여 이들 T-세포 에피토프를 감소 또는 제거하여 면역원성을 최소화하는 것이 가능할 수 있다. 유전적으로 조작된 항체들로부터 양친매성 에피토프들을 제거하는 것이 기술되어 있고(Mateo et al., Hybridoma 19(6):463-471 (2000)), 본 개시물의 뮤테인에 적용될 수 있다. 따라서, 수득된 뮤테인들은 최소화된 면역원성을 가질 수 있으며, 후술하는 바와 같이 치료 및 진단 적용에서의 사용에 바람직하다.
- [0070] 일부 적용들을 위해, 본 개시물의 뮤테인을 컨쥬게이트 된 형태로 사용하는 것도 유용하다. 컨쥬게이션은 당업계에 공지된 임의의 통상적인 커플링 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0071] 비-천연 표적에 대해 여기에 사용된 용어 "유기물" 또는 "작은 유기물"은 적어도 2개의 탄소 원자, 바람직하게는 7 또는 12개 이하의 회전 가능한 탄소 결합을 포함하고, 분자량이 100 내지 2000 달톤, 바람직하게는 100 내지 1000 달톤이며, 선택적으로 1개 또는 2개의 금속 원자를 포함하는 유기물을 의미한다.
- [0072] 일반적으로, 화학적, 물리적, 광학적 또는 효소 반응에서 검출 가능한 화합물 또는 시그널을 직접 또는 간접적으로 생성하는 임의의 적당한 화학적 기질 또는 효소로 여기에 기술된 리포칼린 뮤테인을 표지하는 것이 가능하다. 물리적 반응 그리고 동시에 광학적 반응/마커에 대한 예시는 조사(irradiation) 시 형광의 방출이다. 알칼라인 포스파타아제, 호스래디쉬 페록시다아제 또는  $\beta$ -갈락토시다아제는 발색 반응 산물의 형성을 촉매하는 효소 표지(그리고 동시에 광학 표지)의 예시이다. 일반적으로, 항체(면역글로불린의 Fc 부분에서 당 모이어티와 배타적으로 사용되는 것을 제외)에 일반적으로 사용되는 모든 표지 역시 본 개시물의 뮤테인과의 컨쥬게이트에 사용될 수 있다. 본 개시물의 뮤테인은 임의의 적당한 치료적 활성 체제, 예컨대, 주어진 세포, 조직 또는 기관에 그러한 체제의 표적화 된 전달을 위해, 또는 주변의 정상세포에 영향을 주지 않으면서 세포, 예를 들어, 종양 세포의 선택적 표적화를 위해 컨쥬게이트될 수 있다. 그러한 치료적 활성 체제의 예시는 방사성핵종, 독소, 작은 유기물 및 치료적 펩타이드(예컨대, 세포 표면 수용체의 작용제/길항제로 작용하는 펩타이드 또는 주어진 세포 표적의 단백질 결합 부위와 경쟁하는 펩타이드)를 포함한다. 적당한 독소의 예시는 백일해-독소, 디프테리아 독소, 리신, 사포린, 슈도모나스 외독소, 칼리케아미신 또는 이의 유도체, 탁소이드, 메이탄시노이드, 튜블라이신 또는 돌라스타틴 유사체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 돌라스타틴 유사체는 아우리스타틴 E, 모노메틸아우리스타틴 E, 아우리스타틴 PYE 및 아우리스타틴 PHE일 수 있다. 세포증식억제제의 예시는 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 탁소테레(도세탁셀), 파클리탁셀, 안트라사이클린(독소루비신), 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 다카바진, 사이클로포스파마이드, 에토포사이드, 아드리아마이신, 캄프토테신, 콰레타스틴 A-4 관련 화합물, 설포나마이드, 옥사디아졸린스, 벤조[b]티오펜성 합성 스피로케탈 파이판, 모노테트라하이드로푸란 화합물, 쿠라신 및 쿠라신 유도체, 메톡시스트라디올 유도체 및 루코보린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 안티센스 핵산 분자, 작은 간섭 RNAs, 마이크로 RNA 또는 리보솜과 같은 치료적 활성 핵산과도 컨쥬게이트될 수 있다. 그러한 컨쥬게이트는 당업계에 널리 공지된 방법들에 의해 생산될 수 있다.
- [0073] 일 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 체내 원하는 영역 또는 지역에 본 발명의 뮤테인을 전달하기 위해 특정

체내 영역을 표적으로 하는 표적 모이어티에도 커플링될 수 있다. 그러한 변형이 바람직할 수 있는 일 예는 혈액-뇌-장벽의 횡단이다. 혈액-뇌-장벽을 횡단하기 위해, 본 개시물의 뮤테인은 이 장벽을 횡단하는 활성 트랜스포터를 촉진하는 모이어티와 커플링될 수 있다(Gaillard PJ, et al., International Congress Series. 127:185-198 (2005); Gaillard PJ, et al., Expert Opin Drug Deliv. 2(2):299-309 (2005)). 그러한 화합물은 예를 들어 상표명 2B-Trans™ (to-BBB technologies BV, Leiden, NL) 하에서 입수 가능하다. 본 개시물의 뮤테인이 커플링될 수 있는 다른 예시적 표적 분자는 원하는 표적 분자에 대해 친화도를 갖는 항체, 항체 단편 또는 리포칼린 뮤테인을 포함한다. 표적 모이어티의 표적 분자는 예를 들어 세포-표면 항원일 수 있다. 세포-표면 항원은 예컨대, 암세포와 같은 세포 또는 조직에 특이적일 수 있다. 그러한 세포 표면 단백질의 예시적 예로 HER-2 또는 NEU-2와 같은 프로테오글리칸이 있다.

[0074] 상기 지시된 바와 같이, 본 개시물의 뮤테인은 일부 구현예들에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 화합물에 컨쥬게이트될 수 있다(이와 관련하여, 그러한 컨쥬게이션 전략은 CTLA-4에 대해 결합 친화도를 갖는 인간 호중구 젤라티나아제-관련 리포칼린의 뮤테인과 관련하여 기술된 PCT 공개 W02006/56464를 참조할 것). 혈청 반감기를 연장하는 화합물은 단지 몇 가지만 지칭하자면 폴리알킬렌 글리콜 분자, 예컨대 폴리에틸렌("PEG") 또는 이의 활성화 유도체; 하이드록시에틸 스타치, 지방산 분자, 예컨대 팔미트산(Vajo & Duckworth *Pharmacol. Rev.* 52:1-9 (2000)), 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 C<sub>H</sub>3 도메인, 면역글로불린의 C<sub>H</sub>4 도메인, 알부민 또는 이의 단편, 알부민 결합 펩타이드, 알부민 결합 단백질, 트랜스페린, 또는 태그 Pro-Ala-Ser일 수 있다. 알부민 결합 단백질은 세균성 알부민 결합 단백질, 도메인 항체를 포함하는 항체 단편(예를 들어, 미국 특허 제 6,696,245호 참조), 또는 알부민에 대해 결합 활성을 갖는 리포칼린 뮤테인일 수 있다. 따라서, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인의 반감기를 연장하는 적당한 컨쥬게이션 화합물은 알부민(Osborn et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303:540-548 (2002)), 또는 알부민 결합 단백질, 예를 들어 세균성 알부민 결합 도메인, 예컨대 스트렙토코컬 단백질 G 중 하나(Konig, T. and Skerra, A., *J. Immunol. Methods* 218:73-83 (1998))를 포함한다. 컨쥬게이션 파트너로 사용될 수 있는 알부민 결합 펩타이드의 다른 예시는 예를 들어 미국 특허 출원 공개 제 2003/0069395호 또는 Dennis et al.(Dennis et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002))에 기술된 바와 같이, Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 컨센서스 서열을 가진 것들이고, 여기서, Xaa<sub>1</sub>는 Asp, Asn, Ser, Thr 또는 Trp이고; Xaa<sub>2</sub>는 Asn, Gln, His, Ile, Leu 또는 Lys이며; Xaa<sub>3</sub>는 Ala, Asp, Phe, Trp 또는 Tyr이고; 및 Xaa<sub>4</sub>는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser 또는 Thr이다.

[0075] 다른 구현예들에서, 알부민 자체 또는 알부민의 생리 활성 단편은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 본 개시물의 리포칼린 뮤테인의 화합물로 사용될 수 있다. 용어 "알부민"은 인간 혈청 알부민 또는 소태아 혈청 알부민 또는 랫트 알부민과 같은 모든 포유동물의 알부민을 포함한다. 알부민 또는 이의 단편은 미국 특허 제 5,728,553호 또는 유럽 특허 출원 제 EP 0 330 451호 및 제 EP 0 361 991호에 기술된 바와 같이 재조합으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 단백질 안정화제로 사용하기 위한 재조합 인간 알부민(Recombunin®)이 Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)로부터 입수 가능하다.

[0076] 알부민-결합 단백질이 항체 단편인 경우, 그것은 도메인 항체일 수 있다. 도메인 항체(dAbs)는 생물물리학적 특성들 및 인 비보 반감기를 정밀하게 제어하여 최적의 안전성 및 효능 제품 프로파일을 생성하도록 설계된다. 도메인 항체는 예를 들어 Domantis Ltd.(Cambridge, UK and MA, USA)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0077] 본 개시물의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 모이어티로서 트랜스페린을 이용하여 글리코실화되지 않은 트랜스페린의 N- 또는 C-말단 또는 둘 다에 뮤테인이 유전적으로 융합될 수 있다. 글리코실화되지 않은 트랜스페린은 14 내지 17일의 반감기를 가지며, 트랜스페린 융합 단백질은 유사하게 연장된 반감기를 가질 것이다. 트랜스페린 담체는 높은 생체이용률, 생체분포 및 순환 안정성 역시 제공한다. 이 기술은 BioRexis(BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)로부터 상업적으로 입수 가능하다. 단백질 안정화제로 사용하기 위한 재조합 인간 트랜스페린(DeltaFerrin™) 역시 Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0078] 면역글로불린의 Fc 부분이 본 개시물의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하기 위한 목적으로 사용되는 경우, Syntonix Pharmaceuticals Inc(MA, USA)로부터 상업적으로 입수 가능한 *SynFusion™* 기술이 사용될 수 있다. 이 Fc-융합 기술의 이용을 통해 더 오래-작용하는 생물약제를 생성할 수 있으며, 예를 들어 약물 동력학, 용해도 및 생산 효율을 개선하기 위해 항체의 Fc 영역에 연결된 뮤테인의 2개의 카피를 포함할 수 있다.

[0079] 본 개시물의 뮤테인의 반감기를 연장하기 위한 또 다른 대안은 본 개시물의 뮤테인의 N- 또는 C-말단을 길고,

구조화되지 않은 유연한 글리신이 풍부한 서열(예를 들어, 약 20 내지 80개의 연속 글리신 잔기를 갖는 폴리-글리신)에 융합시키는 것이다. 예를 들어 PCT 공개 W02007/038619에 개시된 이 접근법은 "rPEG" (재조합 PEG)로도 불려왔다.

[0080] 폴리알킬렌 글리콜이 뮤테인의 반감기를 연장하는 화합물로 사용되는 경우, 폴리알킬렌 글리콜은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 또한, 활성화된 폴리알킬렌 유도체일 수 있다. 적당한 화합물의 예시는 인터페론과 관련하여 W099/64016, 미국 특허 제6,177,074호 또는 미국 특허 제6,403,564호에 기술된 바와 같이, 또는 PEG-수식된 아스파라기나아제, PEG-아데노신 디아미나아제(PEG-ADA) 또는 PEG-슈퍼록사이드 디스뮤타아제와 같은 다른 단백질에 대해 기술된 바와 같이(예를 들어, Fuertges et al., The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins, J. Control. Release 11:139-148 (1990)를 참조), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 그러한 고분자, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 예를 들어 약 10,000, 약 20,000, 약 30,000 또는 약 40,000 달톤의 분자량을 가진 폴리에틸렌 글리콜을 포함하여 약 300 내지 약 70,000 달톤일 수 있다. 더욱이, 예를 들어, 미국 특허 제6,500,930호 또는 제6,620,413호에 기술된 바와 같이 스타치 또는 하이드록시에틸 스타치("HES")와 같은 탄수화물 올리고- 및 폴리머는 혈청 반감기 연장의 목적으로 본 개시물의 뮤테인에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0081] 다른 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인에 상기 화합물 중 하나를 컨쥬게이팅하기 위한 적당한 아미노산 측쇄를 제공하기 위해 돌연변이 유발에 의해 인공 아미노산이 도입될 수 있다. 일반적으로, 그러한 인공 아미노산은 보다 반응성이 있게 설계되어 원하는 모이어티로의 컨쥬게이션을 용이하게 한다. 인공 tRNA를 통해 도입될 수 있는 그러한 인공 아미노산의 일 예는 파라-아세틸-페닐알라닌이다.

[0082] 여기에 개시된 뮤테인의 몇몇 적용의 경우, 융합 단백질의 형태로 그들을 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 뮤테인은 그것의 N-말단 및/또는 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 시그널 서열과 같은 펩타이드 및/또는 친화성 태그와 융합된다.

[0083] 약학적 용도의 경우, 본 개시물의 뮤테인은 뮤테인의 인 비보 혈청 반감기를 연장하는 융합 파트너에 융합될 수 있다(CTLA-4에 대해 결합 친화도를 갖는 인간 호중구 젤라티나아제-관련 리포칼린의 뮤테인과 관련하여 적당한 융합 파트너가 기술된 PCT 공개 W02006/56464를 다시 참조할 것). 진술한 컨쥬게이트된 화합물과 유사하게, 융합 파트너는 단지 몇 가지만 지칭하자면, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 C<sub>H</sub>3 도메인, 면역글로불린의 C<sub>H</sub>4 도메인, 알부민, 알부민 결합 펩타이드 또는 알부민 결합 단백질일 수 있다. 다시, 알부민 결합 단백질은 세균성 알부민 결합 단백질 또는 알부민에 대해 결합 활성을 갖는 리포칼린 뮤테인일 수 있다. 따라서, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인의 반감기를 연장하기 위한 적당한 융합 파트너는 알부민(Osborn, B.L. et al. *supra* J. Pharmacol. Exp. Ther. 303:540-548 (2002)), 또는 알부민 결합 단백질, 예를 들어, 세균성 알부민 결합 도메인, 예컨대 스트렙토코컬 단백질 G(Konig, T. and Skerra, A. J. Immunol. Methods 218:73-83 (1998))을 포함한다. Dennis et al, *supra* (2002) 또는 미국 특허 출원 공개 제2003/0069395호에 기술된 Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 컨센서스 서열을 가지며, 여기서, Xaa<sub>1</sub>는 Asp, Asn, Ser, Thr 또는 Trp이고; Xaa<sub>2</sub>는 Asn, Gln, His, Ile, Leu 또는 Lys이며; Xaa<sub>3</sub>는 Ala, Asp, Phe, Trp 또는 Tyr이고; 및 Xaa<sub>4</sub>는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser 또는 Thr인 알부민 결합 펩타이드가 융합 파트너로서 사용될 수도 있다. 본 개시물의 리포칼린 뮤테인의 융합 파트너로서 알부민 그 자체 또는 알부민의 생리 활성 단편을 사용하는 것 역시 가능하다. 용어 "알부민"은 인간 혈청 알부민 또는 소태아 혈청 알부민 또는 랫트 혈청 알부민과 같은 모든 포유동물의 알부민을 포함한다. 알부민 또는 이의 단편의 재조합 생산은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 제5,728,553호, 유럽 특허 출원 제EP 0 330 451호 또는 제EP 0 361 991호에 기술되어 있다.

[0084] 융합 파트너는 다른 분자들에 대해 효소 활성 또는 결합 친화도와 같이 본 발명의 리포칼린 뮤테인에 새로운 특징들을 부여할 수 있다. 적당한 융합 단백질의 예시는 알칼라인 포스파타아제, 호스래디쉬 페록시다아제, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제, 단백질 G의 알부민 결합 도메인, 단백질 A, 항체 단편, 올리고머화 도메인, 같거나 다른 결합 친화도의 리포칼린 뮤테인("듀오칼린")의 형성을 초래한다. Schlehuber, S., and Skerra, A., Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold (*Biol. Chem.* 382:1335-1342 (2001)를 참조) 또는 독소이다.

[0085] 특히 본 개시물의 리포칼린 뮤테인을 별도의 효소 활성 부위와 융합시켜 그 결과로 생긴 융합 단백질의 "성분들" 둘 다 주어진 치료적 표적에 함께 작용하는 것이 가능할 수 있다. 리포칼린 뮤테인의 결합 도메인은 질환-유발 표적에 부착하여 효소 도메인이 표적의 생물학적 기능을 폐지하도록 한다.



- [0086] 재조합 단백질의 쉬운 검출 및/또는 정제를 가능하게 하는 Strep-tag<sup>®</sup> 또는 Strep-tag<sup>®</sup> II(Schmidt, T.G.M. et al., J. Mol. Biol. 255:753-766 (1996)), myc-태그, FLAG-태그, His<sub>6</sub>-태그 또는 HA-태그와 같은 친화성 태그 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제와 같은 단백질 역시 바람직한 융합 파트너의 추가 예시들이다. 마지막으로, 녹색형광단백질("GFP") 또는 황색형광단백질("YFP")와 같은 발색 또는 형광 특징들을 갖는 단백질들 역시 본 개시물의 리포칼린 뮤테인에 대한 적당한 형광 파트너들이다.
- [0087] 여기에 사용된 용어 "융합 단백질" 역시 시그널 서열을 포함하는 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인을 포함한다. 폴리펩타이드의 N-말단의 시그널 서열은 이 폴리펩타이드를 특정 세포 구획, 예를 들어, 대장균(*E. coli*)의 페리플라즈م 또는 진핵세포의 소포체로 유도한다. 다수의 시그널 서열은 당업계에 공지되어 있다. 폴리펩타이드를 대장균(*E. coli*)의 페리플라즈프로 분비하기 위한 바람직한 시그널 서열은 OmpA-시그널 서열이다.
- [0088] 본 개시물은 또한 여기에 기술된 바와 같이 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자(DNA 및 RNA)에 관한 것이다. 유전자 암호의 축퇴성은 동일한 아미노산을 특정하는 다른 코돈에 의해 특정 코돈의 치환들을 허용하기 때문에, 본 개시물은 본 개시물의 뮤테인을 인코딩하는 특정 핵산 분자에 제한되지 않고, 기능적 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 모든 핵산 분자를 포함한다.
- [0089] 이 출원에서 개시된 핵산 분자는 조절 서열에 "작동 가능하게 연결되어" 이 핵산 분자의 발현을 가능하게 할 수 있다.
- [0090] 전사 및/또는 번역 조절에 관한 정보를 포함하는 서열 요소들을 포함하고, 그러한 서열이 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 "작동 가능하게 연결되는" 경우 DNA 같은 핵산 분자는 "핵산 분자를 발현할 수 있다" 또는 "뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 할 수 있다"로 지칭된다. 작동 가능한 결합은 조절 서열 요소들 및 발현될 서열이 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되어 있는 결합이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 종마다 다를 수 있지만, 일반적으로 이들 영역은 원핵생물에서 프로모터 그 자체, 즉, 전사의 개시를 지시하는 DNA 요소들과 RNA로 전사될 때 번역의 개시를 신호할 DNA 요소들을 둘 다 포함하는 프로모터를 포함한다. 그러한 프로모터 영역은 일반적으로 전사 및 번역의 개시에 관련된 5' 비-코딩 서열, 예컨대 원핵생물에서 -35/-10 박스 및 샤인-달가노 요소, 또는 진핵생물에서 TATA 박스, CAAT 서열 및 5'-캡핑 요소들을 포함한다. 이들 영역은 또한 천연 폴리펩타이드를 숙주 세포의 특정 구획으로 표적화 하기 위한 번역된 시그널 및 리더 서열뿐만 아니라 인핸서 또는 리프레서 요소들을 포함할 수 있다.
- [0091] 또한, 3' 비-코딩 서열은 전사 종결, 폴리아데닐화 등과 관련된 조절 요소들을 포함할 수 있다. 그러나 이들 종결 서열이 특정 숙주 세포에서 기능적으로 만족스럽지 못하다면 그들은 그 세포에서 기능적 시그널로 치환될 수 있다.
- [0092] 그러므로 본 개시물의 핵산 분자는 조절 서열, 바람직하게는 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 개시물의 핵산 분자는 프로모터 서열 및 전사 종결 서열을 포함한다. 적당한 원핵생물 프로모터는 예를 들어 *tet* 프로모터, *lacUV5* 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 진핵세포에서 발현에 유용한 프로모터의 예시는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.
- [0093] 본 개시물의 핵산 분자는 또한 벡터 또는 임의의 다른 종류의 클로닝 비히클의 일부, 예컨대, 플라스미드, 파지미드, 파지, 배큘로바이러스, 코스미드 또는 YAC 또는 BAC와 같은 인공 염색체일 수 있다.
- [0094] 본 개시물의 리포칼린 뮤테인을 인코딩하는 DNA 분자 및 특히 그러한 리포칼린 뮤테인의 코딩 서열을 포함하는 클로닝 벡터는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포에 형질전환될 수 있다. 형질전환은 표준 기술들을 사용하여 수행될 수 있다(Sambrook, J. et al. (2001), *supra*).
- [0095] 그리하여, 본 개시물은 또한 여기에 개시된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0096] 본 개시물은 또한 본 개시물의 뮤테인의 생산 방법에 관한 것으로, 뮤테인, 뮤테인의 단편 또는 뮤테인과 다른 폴리펩타이드의 융합 단백질은 유전 공학적 방법들에 의해 뮤테인을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산된다. 방법은 인 비보에서 시행될 수 있고, 뮤테인은 예를 들어 세균 또는 진핵 숙주 유기체에서 생산된 다음 이 숙주 유기체 또는 그것의 배양물로부터 농축, 정제 또는 분리될 수 있다. 예를 들어 인 비트로 번역 시스템을 사용하여 인 비트로에서 단백질을 생산하는 것 역시 가능하다. 용어 "농축된"은 뮤테인 또는 이의 기능적 단편이 취해진 시료 또는 용액에서보다 관심 있는 시료 또는 용액에서 존재하는 전체 단백질의 분획을 유의적으로 더 많이 구성함을 의미한다. 농축은 예를 들어 세포 추출물로부터 특정 분획의 분리를 포함한다. 이는 원심분리 같은 표준 기술들에 의해 얻을 수 있다. 농축의 다른 수단의 예시는 여과 또는 투석이며, 예를 들어 특정 분자량 이하

의 원치 않는 분자들을 제거하거나, 유기용매 또는 암모늄 설페이트를 사용하여 침전을 유도할 수 있다. 정제는 예를 들어 크로마토그래피 기술, 예를 들어 젤 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 정제, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 소수성 전하 유도 크로마토그래피를 포함한다. 정제의 다른 예시는 전기영동 기술, 예컨대 예비 모세관 전기영동이다. 분리는 유사한 방법들의 조합을 포함할 수 있다. 여기에 사용된 바와 같이, "실질적으로 순수한" 또는 "실질적으로 정제된"은 존재하는 우세한 종인 화합물 또는 종을 의미한다(즉, 물 기준으로 조성물에서 임의의 다른 개별 종보다 더 풍부하다). 일부 구현예들에서, 실질적으로 정제된 조성물은 종이 존재하는 모든 분자 종 또는 적용 가능한 경우 모든 거대분자 종들의 적어도 약 50%(물 기준으로)를 포함하는 조성물이다. 특정 구현예들에서, 실질적으로 순수 조성물은 조성물에 존재하는 모든 분자 종 또는 적용 가능한 경우 모든 거대분자 종의 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99% 이상을 가질 것이다.

[0097] 인 비보에서 뮤테인을 생산할 때, 본 개시물의 뮤테인을 인코딩하는 핵산은 재조합 DNA 기술(이미 전술한 바와 같이)에 의해 적당한 세균 또는 진핵 숙주 유기체에 도입된다. 이 목적을 위해, 숙주 세포는 우선 확립된 표준 방법들을 사용하여 본 개시물의 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 벡터로 형질전환된다(Sambrook, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual (1989)). 그리고 나서, 숙주 세포는 이중 DNA의 발현 및 대응하는 폴리펩타이드의 합성을 가능하게 하는 조건하에서 배양된다. 이어서, 폴리펩타이드는 세포 또는 배양 배지로부터 회수된다.

[0098] 제1 양태에서, 본 개시물은 리포칼린을 인코딩하는 핵산 분자에 돌연변이를 유발시켜 하나 이상의 뮤테인 핵산 분자(들)를 생성하는 것을 포함하는 GPC3에 결합하는 뮤테인의 생성 방법에 관한 것이다.

[0099] 방법은 적당한 발현 시스템에서 상기에서 얻은 하나 이상의 뮤테인 핵산 분자(들)을 발현시키는 단계;

[0100] 복수의 뮤테인과 GPC3의 적어도 단편 또는 성숙한 형태와 접촉시키는 단계; 및

[0101] 선별 및/또는 분리에 의해 주어진 표적에 대해 검출 가능한 결합 친화도를 갖는 하나 이상의 뮤테인(들)을 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0102] 여기에 사용된 용어 "돌연변이 유발"은 hNGAL을 포함하여 리포칼린의 주어진 서열 위치에서 자연적으로 발생하는 아미노산이 각각의 천연 폴리펩타이드 서열에서 이 특정 위치에 존재하지 않은 적어도 하나의 아미노산으로 치환될 수 있는 실험 조건이 선택됨을 의미한다. 용어 "돌연변이 유발"은 또한 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 삽입에 의해 서열 세그먼트의 길이의 (추가) 변형을 포함한다. 그리하여, 예를 들어 선택된 서열 위치에서 하나의 아미노산은 3개의 무작위 돌연변이의 스트레치에 의해 대체되어 야생형 단백질의 각각의 세그먼트의 길이와 비교하여 2개의 아미노산 잔기의 삽입을 유도하는 것도 본 개시물의 범위 내에 있다. 그러한 삽입 또는 결실은 본 개시물에서 돌연변이 유발을 받을 수 있는 임의의 펩타이드 세그먼트에서 서로 독립적으로 도입될 수 있다. 본 개시물의 일 예시적 구현예에서, 선택된 리포칼린 스캐폴드의 루프 AB에 몇 개의 돌연변이의 삽입이 도입될 수 있다(여기에 그 전체가 참고로 포함된 PCT 공개 W02005/019256를 참조할 것). 용어 "무작위 돌연변이 유발"은 특정 서열 위치에서 미리 결정된 단일 아미노산(돌연변이)이 존재하지 않지만 돌연변이 유발 동안 내장된 서열 위치에 적어도 두 개의 아미노산이 특정 확률로 포함될 수 있음을 의미한다.

[0103] 하나의 비-제한적 접근법에서, 인간 리포칼린 2의 코딩 서열이 본 개시물에서 선택된 펩타이드 세그먼트의 돌연변이 유발을 위한 개시 지점으로 사용될 수 있다. 열거된 아미노산 위치들의 돌연변이 유발을 위해, 당업자는 부위-지정 돌연변이 유발을 위해 다양한 확립된 표준 방법들을 뜻대로 관장한다(Sambrook, J. et al. (2001), *supra*). 통상적으로 사용되는 기술은 원하는 서열 위치들에서 퇴화된 염기 조성을 가진 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 사용한 PCR(polymerase chain reaction)에 의한 돌연변이의 도입이다. 다른 유사한 기술들이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0104] 상기 정의된 핵산 분자들은 리포칼린 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산의 결핍 5'- 및 3'-서열 및/또는 벡터에 라이게이션에 의해 연결될 수 있고, 공지된 숙주 유기체에 클로닝될 수 있다. 라이게이션과 클로닝을 위해 수많은 확립된 과정들을 이용할 수 있다(Sambrook, J. et al. (2001), *supra*). 예를 들어, 클로닝 벡터의 서열에 존재하는 제한 엔도뉴클레아제의 인식 서열 역시 합성 올리고뉴클레오타이드의 서열에 조작될 수 있다. 따라서, 각각의 PCR 산물의 증폭 및 효소 절단 후 생성된 단편은 대응하는 인식 서열을 사용하여 쉽게 클로닝될 수 있다.

[0105] 돌연변이 유발을 위해 선택된 단백질을 코딩하는 유전자 내 더 긴 서열 세그먼트들 역시 공지된 방법들을 통해, 예를 들어 증가된 오류 비율의 조건하에서 중합효소 연쇄 반응의 사용, 화학적 돌연변이 유발, 또는 세균성 돌연변이 균주를 사용하여 무작위 돌연변이 유발을 받을 수 있다. 그러한 방법들은 또한 리포칼린 뮤테인의 표적

친화도 또는 특이도의 추가적인 최적화를 위해 사용될 수 있다. 실험적인 돌연변이 유발의 세그먼트 외에 일어날 수 있는 돌연변이는 예를 들어 그들이 리포칼린 뮤테인의 개선된 폴딩 효율 또는 폴딩 안정성에 기여하는 경우 종종 용인되거나 심지어 유리한 것으로 입증될 수 있다.

[0106] 추가 구현예에서, 방법은 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열, 특히 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열 (SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치들에 대응하는 서열 위치들의 적어도 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 심지어 그 이상을 코딩하는 뉴클레오타이드 삼중항에서 핵산 분자가 돌연변이 유발을 받는 것을 포함한다. 그러한 핵산 분자는 돌연변이 유발을 받을 수 있고 재조합 DNA 기술을 사용하여 적당한 세균 또는 진핵 숙주 유기체에 도입될 수 있다. 리포칼린의 핵산 라이브러리를 얻는 것은 항체-유사 특성들을 가진 리포칼린 뮤테인들, 즉, 주어진 표적에 대해 친화도를 갖는 뮤테인들을 생성하기 위해 당업계에 공지된 임의의 적당한 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 그러한 조합 방법의 예는 예를 들어 PCT 출원 WO99/16873, WO00/75308, WO03/029471, WO03/029462, WO03/029463, WO2005/019254, WO2005/019255, WO 2005/019256, 또는 WO 2006/56464에 구체적으로 기술되어 있다. 이들 특허 출원 각각의 내용은 그 전체가 여기에 참고로 포함된다. 적당한 숙주에서 돌연변이 유발을 받은 핵산 서열의 발현 후 주어진 표적에 결합하는 복수의 각각의 리포칼린 뮤테인에 대한 유전자 정보를 가진 클론이 수득된 라이브러리로부터 선별될 수 있다. 이들 클론의 선별을 위해 파지 디스플레이(Adey, NB et al., Identification of calmodulin-binding peptide consensus sequences from a phage-displayed random peptide library, *Gene* 169:133-4 (1996)(1996); Lowman, H.B., Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 26:401-24 (1997); Rodi DJ et al., Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack *Curr Opin Biotechnol.* 10(1):87-93 (1999)), 콜로니 스크리닝(Pini, A. et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5:503-510 (2002)에서 검토됨), 리보솜 디스플레이(Amstutz, P. et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:400-405 (2001)에서 검토됨) 또는 Wilson, D.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-3755 (2001)에 기록된 mRNA 디스플레이 또는 PCT 공개 WO99/16873, WO00/75308, WO03/029471, WO03/029462, WO03/029463, WO2005/019254, WO2005/019255, WO2005/019256, 또는 WO2006/56464에 구체적으로 기술된 방법들과 같은 잘 알려진 기술들이 사용될 수 있다.

[0107] 본 개시물에 따라, 상기 방법들의 다른 구현예는 예를 들어 주어진 표적/리간드로서 GPC3의 적어도 한 단편을 제공하고, 상기 표적/리간드와 복수의 뮤테인을 접촉시켜 상기 리간드와 상기 표적/리간드에 대해 결합 친화도를 가진 뮤테인 간의 복합체를 형성하도록 하고, 및 결합 친화도가 없거나 실질적으로 없는 뮤테인을 제거하는 것을 포함한다.

[0108] 본 개시물의 방법의 일 구현예에서, 선택 결합 친화도는 경쟁적 조건하에서 수행된다. 여기에서 사용된 경쟁적 조건은 뮤테인의 선택이 뮤테인과 GPC3의 단편이 표적 GPC3에 대한 뮤테인의 결합과 경쟁하는 추가 리간드의 존재에서 접촉하게 되는 적어도 하나의 단계를 포함함을 의미한다. 다르게는, 추가 리간드가 알로스테릭 효과에 의해 뮤테인의 결합 부위와는 다른 에피토프와 표적이 복합체를 형성하여 뮤테인의 결합과 경쟁한다. 따라서, GPC3의 임의의 단편, 전구체 또는 성숙한 형태가 본 개시물의 뮤테인의 생성에 사용될 수 있다.

[0109] 본 개시물의 방법들의 추가 구현예는 주어진 리간드의 결합을 위한 적어도 하나의 뮤테인을 선택하기 위해 M13-패밀리의 필라멘트형 박테리오파지의 코트 단백질 pIII 또는 이 코트 단백질의 단편을 코딩하는 유전자와 3' 말단에서 돌연변이 유발로부터 생기는 본 개시물의 복수의 뮤테인을 코딩하는 핵산을 작동 가능하게 융합하는 것을 포함한다.

[0110] 융합 단백질은 융합 단백질 또는 그것의 일부의 고정, 검출 및/또는 정제를 위해 친화성 태그와 같은 추가 성분들을 포함할 수 있다. 더욱이, 리포칼린 또는 그것의 뮤테인을 인코딩하는 서열 영역과 파지 캡시드 유전자 또는 이의 단편들 사이에 종결 코돈이 위치할 수 있고, 종결 코돈은 바람직하게는 앰버 종결 코돈이고, 적당한 서프레서 균주에서 번역 동안 적어도 부분적으로 아미노산으로 번역된다.

[0111] 본 개시물의 뮤테인을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 두 개의 *Bst*XI 제한 부위를 사용하여 벡터에 삽입될 수 있다. 라이게이션 후, 대장균(*E. coli*) XL1-Blue 같은 적당한 숙주 균주는 생성된 핵산 혼합물로 형질전환되어 다수의 독립적인 클론들을 산출한다. 각각의 벡터는 원한다면 하이퍼파지미드 라이브러리의 제조를 위해 생성될 수 있다.

[0112] 주어진 표적에 대해 친화도를 가진 뮤테인이 선택될 때, 이후 심지어 더 높은 친화도를 가진 변이체들 또는 개선된 특징들, 예컨대, 더 높은 열 안정성, 개선된 열충 안정성, 열역학적 안정성, 개선된 용해도, 개선된 단량

체 거동, 열적 변성, 화학적 변성, 단백질 분해 또는 세제 등에 대한 개선된 내성을 가진 변이체들을 선별하기 위해 그러한 뮤테인이 추가로 다른 돌연변이 유발을 받도록 하는 것이 가능하다. 더 높은 친화도를 목표로 하는 경우 인 비트로 "친화도 성숙화"로 간주될 수 있는 이 추가 돌연변이 유발은 합리적인 설계 또는 무작위 돌연변이에 기초한 부위 특이적 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 더 높은 친화도 또는 개선된 특성들을 얻기 위한 다른 가능한 접근법은 리포칼린 뮤테인의 서열 위치의 선택된 범위에 걸쳐 점돌연변이를 일으키는 오류-유발 PCR의 사용이다. 오류-유발 PCR은 Zaccolo et al., J. Mol. Biol. 255:589-603 (1996)에 기술된 것과 같은 임의의 알려진 프로토콜에 따라 수행될 수 있다. 그러한 목적에 적당한 무작위 돌연변이 유발의 다른 방법들은 Murakami et al., Nat. Biotechnol. 20:76-81 (2002)에 기술된 바와 같은 무작위 삼입/결실(RID) 돌연변이 유발, 또는 Bittker et al., Nat. Biotechnol. 20:1024-1029 (2002)에 기술된 바와 같은 비균질 무작위 재조합(NRR)을 포함한다. 원한다면, 친화도 성숙화는 디곡시게닌에 대해 높은 친화도를 가진 빌린-결합 단백질의 뮤테인이 수득된 PCR 공개 WO00/75308 또는 Schlehuber et al., J. Mol. Biol. 297:1105-1120 (2000)에 기술된 과정에 따라 수행될 수도 있다. 친화도를 개선하기 위한 추가 접근법은 위치 포화 돌연변이 유발을 수행하는 것이다. 이 접근법에서 임의의 4개의 루프 세그먼트 내 단일 위치에만 아미노산 교환/돌연변이가 도입되어 "작은" 핵산 라이브러리가 생성될 수 있다. 그런 다음 이들 라이브러리는 추가 패닝 라운드 없이 선별 단계(친화도 스크리닝)를 거친다. 이 접근법은 원하는 표적의 개선된 결합에 기여하는 잔기들의 동정을 가능하게 하고, 결합에 중요한 "핫 스팟"의 동정을 가능하게 한다.

[0113] 일 구현예에서, 뮤테인을 변형하는 상기 방법은 인간 리포칼린 2의 야생형 서열의 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 또는 158의 서열 위치에 대응하는 적어도 하나의 임의의 서열 위치에서 Cys 잔기를 도입하고, hNGAL의 야생형의 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 또는 158의 서열 위치에 대응하는 적어도 하나의 임의의 서열 위치에 도입된 Cys 잔기의 티올기를 통해 상기 뮤테인의 혈청 반감기를 변형할 수 있는 모이어티를 커플링하는 것을 추가로 포함한다. 상기 뮤테인의 혈청 반감기를 변형할 수 있는 모이어티는 폴리알킬렌 글리콜 분자 및 하이드록시에틸스타치로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0114] 본 개시물의 단백질이 본 개시물의 인간 리포칼린 2 뮤테인인 경우, Cys 76 및 Cys 175 사이의 자연적으로 발생하는 이황화 결합이 제거될 수 있다. 따라서, 그러한 뮤테인(또는 분자 내 이황화 결합을 포함하지 않은 임의의 다른 인간 리포칼린 2 뮤테인)은 환원 산화 환경을 가진 세포 구획, 예를 들어 그람-음성 세균의 세포질에서 생산될 수 있다.

[0115] 분자 내 이황화 결합을 포함하는 본 개시물의 리포칼린 뮤테인의 경우, 적당한 시그널 서열을 이용하여 산화 환원 환경을 갖는 세포 구획으로 신생 폴리펩타이드를 유도하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 산화 환경은 대장균(*E. coli*)과 같은 그람-음성 세균의 페리플라즈마에 의해, 그람-양성 세균의 세포외 환경 또는 진핵세포의 소포체의 내강에서 제공될 수 있고, 보통 구조적 이황화 결합의 형성을 선호한다.

[0116] 그러나 숙주 세포, 바람직하게는 대장균(*E. coli*)의 세포질에서 본 개시물의 뮤테인을 생산하는 것도 가능하다. 이 경우, 폴리펩타이드는 가용성의 접힌 상태에서 직접 수득되거나, 봉입체의 형태로 회수될 수 있고, 이어서 인 비트로에서 재생된다. 추가 선택은 산화 세포내 환경을 가진 특정 숙주 균주를 사용하는 것이며, 따라서 세포질에서 이황화 결합을 형성하게 할 수 있다(Venturi et al., J. Mol. Biol. 315:1-8 (2002)).

[0117] 그러나 본 개시물의 뮤테인이 유전 공학의 사용에 의해서만 생성되거나 생산될 필요는 없다. 오히려, 리포칼린 뮤테인은 메리필드 고체상 폴리펩타이드 합성 또는 인 비트로 전사 및 번역과 같은 화학적 합성에 의해서도 얻을 수 있다. 예를 들어, 가능성이 큰 돌연변이가 분자 모델링을 사용하여 확인된 후 인 비트로에서 원하는(디자인된) 폴리펩타이드를 합성하고 주어진 표적에 대한 결합 활성을 조사하는 것이 가능하다. 단백질의 고체상 및/또는 용액상 합성법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Lloyd-Williams et al. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton, Fields, GB, (1997); Colowick *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Academic Press, San Diego(1997); Bruckdorfer et al., Curr. Pharm. Biotechnol. 5:29-43 (2004)에서 검토됨).

[0118] 다른 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 당업자에게 공지된 잘-확립된 방법들을 사용하여 인 비트로 전사/번역에 의해 생산될 수 있다.

[0119] 본 개시물은 또한 청구 범위에서 언급된 적어도 하나의 본 발명의 뮤테인 또는 융합 단백질 또는 이의 컨쥬게이트 및 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0120] 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 단백질성 약물에 치료적으로 유효한 임의의 비경구 또는 비-비경구(예를



들어, 장) 경로를 통해 투여될 수 있다. 비경구 적용 방법들은 예를 들어 주사액, 주입액 또는 팅크 형태의 피부내, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사 또는 주입 기술들, 그리고, 예를 들어 에어로졸 혼합물, 스프레이 또는 분말 형태의 에어로졸 장치 및 흡입을 포함한다. 비-비경구 전달 방식은 예를 들어 경구로, 예를 들어, 환제, 정제, 캡슐, 용액 또는 현탁액의 형태로, 또는 직장 내로, 예를 들어, 좌약의 형태로 투여된다. 본 개시물의 뮤테인은 통상적인 비-독성의 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체, 첨가제 및 비히클을 원하는 대로 포함하는 제형으로 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0121] 본 개시물의 일 구현예에서, 제약은 포유동물을 포함하는 척추동물 특히 사람에게 비경구로 투여된다. 대응하는 투여 방법들은 예를 들어 주사액, 주입액 또는 팅크 형태의 예를 들어 피부내, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사 또는 주입 기술들, 그리고 예를 들어 에어로졸 혼합물, 스프레이 또는 분말 형태의 에어로졸 장치 및 흡입을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 정맥내 및 피하 주입 및/또는 주사의 조합은 비교적 짧은 혈청 반감기를 갖는 화합물의 경우에 가장 편리할 수 있다. 약학 조성물은 수용액, 수중유 에멀션 또는 유중수 에멀션일 수 있다.

[0122] 이와 관련하여, Meidan and Michniak, *Am. J. Ther.* 11(4):312-316 (2004)에 기술된 바와 같은, 경피 전달 기술, 예를 들어, 이온삼투요법, 초음파영동 또는 마이크로니들-강화 전달이 여기에 기술된 뮤테인의 경피 전달에도 사용될 수 있다. 비-비경구 전달 방식들은 예를 들어, 정제, 환제, 캡슐, 용액 또는 현탁액의 형태로 경구, 또는 예를 들어 좌약 형태의 직장 투여이다. 본 개시물의 뮤테인은 다양한 통상적인 비-독성의 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체, 첨가제 및 비히클을 포함하는 제형으로 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0123] 적용되는 뮤테인의 투여량은 원하는 예방 효과 또는 치료 반응을 달성하기 위해 넓은 범위 내에서 다양할 수 있다. 예를 들어, 선택된 리간드에 대한 화합물의 친화도 뿐만 아니라 인 비보에서 뮤테인과 리간드 간의 복합체의 반감기에 의존할 것이다. 또한, 최적의 투여량은 뮤테인 또는 그것의 용합 단백질 또는 그것의 컨쥬게이트의 생체 분포, 투여 방식, 치료되는 질병/장애의 중증도 및 환자의 의학적 상태에 좌우될 것이다. 예를 들어, 국소 적용을 위한 연고로 사용될 때, 고농도의 본 개시물의 단백질이 사용될 수 있다. 그러나 원한다면, 단백질은 서방형 제형, 예를 들어 PolyActive™ 또는 OctoDEX™ 같이 리포솜성 분산액 또는 하이드로젤-기반 고분자 마이크로스피어로도 제공될 수 있다(Bos et al., *Business Briefing: Pharmatech* 1-6 (2003) 참조).

[0124] 따라서, 본 개시물의 뮤테인은 약학적으로 허용 가능한 성분들 및 확립된 제조방법들을 사용하여 조성물로 제형화될 수 있다(예를 들어, Gennaro and Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000) 참조). 약학 조성물을 제조하기 위해, 약학적으로 불활성인 무기 또는 유기 부형제들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 정제, 분말, 젤라틴 캡슐 또는 좌약을 제조하기 위해, 예를 들어 락토오스, 탈크, 스테아르산 및 그것의 염, 지방, 왁스, 고체 또는 액체 폴리올, 천연 및 경화된 오일이 사용될 수 있다. 사용 전에 용액 또는 에어로졸 혼합물로 재구성하기 위한 용액, 현탁액, 에멀션, 에어로졸 혼합물 또는 분말을 생산하기에 적합한 부형제는 식물성 오일뿐만 아니라 물, 알코올, 글리세롤, 폴리올 및 이의 적합한 혼합물을 포함한다.

[0125] 약학 조성물은 또한 예를 들어 충전제, 바인더, 습윤제, 활택제, 안정화제, 방부제, 유화제 및 추가로 용매 또는 용해제 또는 저장 효과를 달성하기 위한 제제와 같은 첨가제를 포함할 수 있다. 후자는 용합 단백질이 리포솜 및 마이크로캡슐과 같은 느리거나 지속된 방출 또는 표적 전달 시스템에 포함될 수 있다는 것이다.

[0126] 제형은 세균-보유 필터를 통한 여과를 포함하여 다수의 수단에 의해, 또는 사용 직전에 멸균수 또는 다른 멸균 배지에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 살균제를 포함시켜 멸균될 수 있다.

[0127] 본 개시물의 뮤테인 또는 용합 단백질 또는 이의 컨쥬게이트는 많은 용도로 사용될 수 있다. 일반적으로, 그러한 뮤테인은 구체적으로 Fc 부분의 글리코실화에 의존하는 것을 제외하고 항체가 사용되는 모든 용도에 사용될 수 있다.

[0128] 여기에 기술된 뮤테인은 인간 환자 그 자체를 포함하여 유기체에 또는 약학적 활성 성분들 또는 적당한 담체 또는 부형제(들)을 포함하거나 혼합될 수 있는 약학 조성물로 투여될 수 있다. 각각의 리포칼린 뮤테인 조성물의 제형 및 투여 기술은 당업계에 잘 확립된 저분자량의 화합물의 것과 유사하거나 동일하다. 예시적인 경로는 경구, 경피 및 비경구 전달을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물은 캡슐 또는 튜브를 채우는데 사용될 수 있거나, 압축된 형태로 펠릿으로 제공될 수 있다. 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물은 또한 주사 가능하거나 분무 가능한 형태, 예를 들어 각각의 리포칼린 뮤테인의 현탁액으로 사용될 수 있다.

[0129] 본 개시물의 리포칼린 뮤테인을 포함하는 조성물은 예를 들어 피부 또는 상처에 적용될 수 있다. 추가의 적당한

투여 경로는 예를 들어, 저장소, 경구, 직장, 점막 또는 직장내 투여; 근육내, 피아, 정맥내, 골수내 주사, 그리고 척수강내, 직접 심실내, 복강내, 비강내 또는 안내 주사를 포함하여 비경구 전달을 포함한다. 일부 구현예들에서, 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물을 전신 방식보다는 국소적 방식, 예를 들어 주사를 통해 투여할 수 있다.

[0130] 본 개시물의 리포칼린 뮤테인을 포함하는 약학 조성물은 그 자체로 공지된 방식, 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정, 레비게이팅, 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 개시물에 따른 용도를 위한 약학 조성물은 하이드로젤 및/또는 펩타이드/펩토이드를 약학적으로 사용될 수 있는 제제로 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체를 사용하는 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 적당한 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0131] 주사의 경우, 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물은 예를 들어 한스 용액, 링거 용액 또는 생리식염수와 같은 생리학적으로 양립할 수 있는 버퍼 중 수용액으로 제형화될 수 있다. 경점막 투여를 위해, 침투되는 장벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 그러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0132] 경구 투여를 위해, 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물은 당업계에 공지된 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 용이하게 제형화될 수 있다. 그러한 담체는 존재하는 약학적 활성 화합물뿐만 아니라 리포칼린 뮤테인 또는 각각의 조성물을 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등과 같은 치료할 환자의 경구 섭취용으로 제형화될 수 있다. 경구용 약학 제제는 고체 부형제를 첨가하고, 선택적으로 생성된 혼합물을 분쇄하고, 원한다면 적당한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 핵을 얻음으로써 수득될 수 있다. 적당한 부형제는 특히 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 솔비톨을 포함하는 당과 같은 충전제; 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트라가칸트, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)와 같은 셀룰로오스 제제이다. 원한다면, 가교-결합된 폴리비닐피롤리돈, 한천 또는 알긴산 또는 소듐 알지네이트와 같은 이의 염과 같은 붕해제를 첨가할 수 있다.

[0133] 당의 핵에는 적당한 코팅이 제공된다. 이러한 목적을 위해, 농축된 당 용액이 이용될 수 있고, 선택적으로 검 아라빅, 탈크, 폴리비닐피롤리돈, 카보폴 젤, 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 티타늄 디옥사이드, 래커 용액 및 적당한 유기용매 또는 용매 혼합물을 포함할 수 있다. 염료 또는 안료를 정제 또는 당의 코팅에 첨가하여 활성 화합물 투여량의 상이한 조합을 확인하거나 특성규명을 할 수 있다.

[0134] 경구로 사용될 수 있는 약학 제제는 젤라틴 및 글리세롤 또는 솔비톨과 같은 가소제로 제조된 연질의 밀봉 캡슐뿐만 아니라 젤라틴으로 제조된 푸쉬-핏 캡슐을 포함한다. 푸쉬-핏 캡슐은 활성 성분을 락토오스와 같은 충전제, 전분과 같은 바인더 및/또는 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제 및 선택적으로 안정화제와 혼합하여 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 펩타이드/펩토이드는 지방 오일, 액체 파라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 액체에서 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 구강 투여를 위한 모든 제형은 그러한 투여에 적합한 투여량이어야 한다. 볼 점막 투여를 위해, 조성물은 통상의 방식으로 제형화된 정제 또는 로젠지의 형태로 취할 수 있다.

[0135] 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 주사에 의한 비경구 투여, 예를 들어 근육내 주사 또는 볼루스 주사 또는 연속 주입용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 첨가된 방부제와 함께 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플 또는 다회-투여 용기로 제공될 수 있다. 각각의 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀션과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 포함할 수 있다.

[0136] 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 또한 미리-선택된 부위로 화합물을 표적화하는데 사용될 수 있다. 그러한 일 구현예에서, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 유기체 또는 조직에서 미리-선택된 부위의 약학적 활성 화합물의 표적화에 사용되며,

[0137] a) 리포칼린 뮤테인과 상기 화합물을 컨주게이팅하고, 및

[0138] b) 리포칼린 뮤테인/화합물 복합체를 미리-선택된 부위로 전달하는 것을 포함한다.

[0139] 그러한 목적을 위해 뮤테인을 관심 있는 화합물과 접촉시켜 복합체를 형성하도록 한다. 그리고 나서, 뮤테인과 관심 있는 화합물을 포함하는 복합체는 미리-선택된 부위로 전달된다. 이는 예를 들어, 뮤테인을 표적 모이어티, 예컨대, 선택된 표적에 대해 결합 친화도를 가진 항체, 항체 단편 또는 리포칼린 뮤테인 또는 리포칼린 뮤테인 단편과 커플링하여 달성될 수 있다.

- [0140] 이는 약물로 치료해야 하는 유기체의 미리-선택된 부위, 예컨대 감염된 신체 부위, 조직 또는 기관에 약물(선택적으로)을 전달하는데 특히 적합하나, 이에 제한되지는 않는다. 뮤테인과 관심 있는 화합물 간의 복합체 형성 외에도, 뮤테인은 또한 주어진 화합물과 반응하여 뮤테인과 화합물의 컨쥬게이트를 생성할 수 있다. 상기 복합체와 유사하게, 그러한 컨쥬게이트는 미리-선택된 표적 부위에 화합물을 전달하는데 적합할 수 있다. 뮤테인과 화합물의 그러한 컨쥬게이트는 뮤테인과 화합물을 서로 공유적으로 연결하는 링커를 또한 포함할 수 있다. 선택적으로, 그러한 링커는 혈류에서 안정하지만 세포 환경에서 절단 가능하다.
- [0141] 그리하여 여기에 개시된 뮤테인들과 그들의 유도체는 항체 또는 이의 단편들과 유사한 많은 분야에서 사용될 수 있다. 지지체에 결합하기 위한 그들의 용도 외에도, 주어진 뮤테인 또는 이 표적의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질의 표적이 고정되거나 분리되는 것이 가능하게 하면서, 뮤테인은 효소, 항체, 방사성 물질 또는 생화학적 활성 또는 정의된 결합 특징들을 가진 임의의 다른 그룹으로 표지하는데 이용될 수 있다. 그렇게 함으로써, 그들은 각각의 표적 또는 이의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질은 그들과 접촉하여 검출되거나 가지고 올 수 있다. 예를 들어, 본 개시물의 뮤테인은 확립된 분석 방법들(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블랏) 또는 현미경 또는 면역감지에 의해 화학적 구조를 검출하는 역할을 할 수 있다. 여기서, 검출 시그널은 적절한 뮤테인 컨쥬게이트 또는 융합 단백질의 사용에 의해 직접적으로 또는 항체를 통해 결합된 뮤테인의 면역화학적 검출에 의해 간접적으로 생성될 수 있다.
- [0142] 본 발명의 뮤테인에 대한 수많은 가능한 적용들 역시 의학에 존재한다. 진단 및 약물 전달에서의 그들의 용도 외에도, 예를 들어, 조직- 또는 종양-특이 세포 표면 분자와 결합하는 본 개시물의 돌연변이 폴리펩타이드가 생성될 수 있다. 그러한 뮤테인은 예를 들어 "종양 이미징"을 위한 컨쥬게이트 형태 또는 융합 단백질로 또는 항암요법을 위해 직접적으로 사용될 수 있다.
- [0143] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 또한 약학 조성물의 제조를 위한 본 개시물에 따른 뮤테인의 용도를 포함한다. 그리하여, 약학 조성물은 빈혈의 치료에 적합할 수 있다. 약학 조성물은 단일 요법 또는 병용 요법으로 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시물은 또한 빈혈과 같은 GPC3의 변경된 예를 들어 증가하거나 감소한 수준과 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위한 상기 정의된 바와 같은 뮤테인에 관한 것이다.
- [0144] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 본 개시물에 따른 뮤테인의 진단에서의 용도에 관한 것이다. 본 개시물에 따른 뮤테인의 용도는 통상 각각의 진단 방법뿐만 아니라 GPC3의 변경된 수준과 관련된 질환 또는 장애의 진단을 위한 것이다.
- [0145] 따라서, 본 개시물은 또한 GPC3의 변경된 예를 들어 증가하거나 감소한 수준과 관련된 질환 또는 장애의 진단을 위한 상기 정의된 바와 같은 뮤테인에 관한 것이다. 일부 구현예들에서, 질환은 간암 또는 흑색종을 포함하는 암이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 진단되는 암은 특히 제한되는 것은 아니며, 특정 예로 간암, 췌장암, 담관암, 폐암, 대장암, 악성 대장암, 신경섬유육종, 신경아세포종, 유선종양, 유방암, 난소암, 전립선암, 백혈병 및 림프종, 윌름스 종양을 포함할 수 있고, 바람직하게는, 간암 또는 (1차/조기) 간세포 암종이다(Sinnett D., GPC3 (glypican 3), Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2002;6(3):206-208 (2002) 참조).
- [0146] 또한, 본 개시물은 본 개시물의 뮤테인을 포함하는 여기에 기술된 약학 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 종양 또는 암의 치료방법에 관한 것이다. 마찬가지로, 본 개시물은 종양 또는 암을 치료하는데 사용하기 위한 본 개시물의 뮤테인(방법)에 관한 것이다. 유사하게, 본 개시물은 종양 또는 암을 치료하기 위한 약학 조성물의 제조를 위한 본 개시물의 뮤테인의 용도에 관한 것이다. 치료할 암 또는 종양은 특별히 제한하지는 않으며, 특정 예시로, 간암, 췌장암, 담관암, 폐암, 대장암, 악성 대장암, 신경섬유육종, 신경아세포종, 유선종양, 유방암, 난소암, 전립선암, 백혈병 및 림프종, 윌름스 종양을 포함할 수 있고, 바람직하게는, 간암 또는 (1차/조기) 간세포 암종이다(Sinnett D., GPC3 (glypican 3), Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2002;6(3):206-208 (2002) 참조).
- [0147] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 본 개시물에 따른 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트를 특징으로 한다.
- [0148] 그러한 치료를 필요로 하는 대상체는 단지 몇 가지 예시적 예를 들자면, 포유동물, 예컨대, 인간, 개, 마우스, 랫트, 돼지, 필리핀 원숭이 같은 유인원일 수 있다.
- [0149] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 본 개시물의 뮤테인 또는 본 개시물의 뮤테인을 포함하는 약학 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 인 비보 이미징 방법을 특징으로 한다. 대상체는 상기과 같이 정의될 수 있다.



- [0150] 본 개시물의 뮤테인은 유기물, 효소 표지, 방사성 표지, 비색 표지, 형광 표지, 발색 표지, 발광 표지, 헵텐, 디곡시게닌, 비오틴, 세포증식억제제, 독소, 금속 복합체, 금속 및 콜로이드달 골드로 구성된 군으로부터 선택된 화합물과 컨주게이트될 수 있다.
- [0151] 본 개시물의 뮤테인은 그것의 N-말단 및/또는 C-말단에서 단백질 또는 단백질 도메인 또는 펩타이드인 융합 파트너와 융합될 수 있다.
- [0152] 본 개시물의 뮤테인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 화합물에 컨주게이트될 수 있다. 일부 구현예들에서, 혈청 반감기를 연장할 수 있는 화합물은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 및 알부민 결합 단백질로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 추가 구현예들에서, 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 또는 이의 활성화된 유도체이다.
- [0153] 일부 다른 구현예들에서, 뮤테인의 융합 파트너는 뮤테인의 혈청 반감기를 연장하는 단백질 도메인이다.
- [0154] 일부 추가 구현예들에서, 단백질 도메인은 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 또는 알부민 결합 단백질이다.
- [0155] 본 개시물의 뮤테인은 치료 또는 진단(방법); 예컨대 종양, 바람직하게는 간 종양의 치료(방법) 또는 진단(방법); 또는 종양 성장 억제(방법); 또는 간 종양의 치료 또는 진단(방법)에 사용될 수 있다.
- [0156] 본 개시물은 또한 본 개시물의 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 일부 구현예들에서, 핵산 분자는 상기 핵산 분자의 발현을 위해 조절 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 또 다른 구현예들에서, 핵산 분자는 벡터 또는 파지미드 벡터에 포함된다.
- [0157] 본 개시물은 또한 개시물의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 개시한다.
- [0158] 또한, 본 개시물은 본 개시물의 뮤테인의 생산 방법을 숙련자에게 제공하며, 여기서, 뮤테인, 뮤테인의 단편 또는 뮤테인과 다른 폴리펩타이드의 융합 단백질은 유전 공학적 방법들에 의해 뮤테인을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산된다. 일부 추가 구현예들에서, 뮤테인은 세균 또는 진핵 숙주 유기체에서 생산되며, 이 숙주 유기체 또는 그의 배양물로부터 분리된다.
- [0159] 본 개시물은 본 개시물의 뮤테인과 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 고려한다.
- [0160] 본 개시물은 (a) 뮤테인과 GPC3를 포함하는 것으로 의심되는 시험 시료를 접촉시켜 뮤테인과 GPC3 사이의 복합체가 형성되도록 하고, 및 (b) 적당한 시그널에 의해 뮤테인과 GPC3 사이의 복합체를 검출하는 것을 포함하는 GPC3의 결합/검출을 위한 본 개시물의 뮤테인의 용도를 설명한다.
- [0161] 본 개시물은 숙련자에게 종양을 치료하는 방법을 제시하고, 상기 방법은 본 개시물의 뮤테인 또는 이의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 일부 추가 구현예들에서, 종양은 간암, (1차/조기) 간세포 암종, 췌장암, 담관암, 폐암, 대장암, 악성 대장암, 신경섬유육종, 신경아세포종, 유선종양, 유방암, 난소암, 전립선암, 백혈병 및 림프종, 또는 윌름스 종양이다.
- [0162] 본 개시물은 뮤테인과 GPC3의 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 시료와 본 개시물의 뮤테인을 접촉시키는 것을 포함하는 생물학적 시료에서 GPC3의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 구현예들에서, 방법은 뮤테인과 GPC3의 복합체를 검출하는 것을 더 포함한다. 일부 추가 구현예들에서, 생물학적 시료는 인간에서 분리된다. 일부 추가 구현예들에서, 시료는 체액을 포함한다.
- [0163] 본 개시물은 본 개시물의 하나 이상의 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물의 유효량을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 GPC3를 결합시키는 방법을 공지한다.
- [0164] 여기에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에 달리 명시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다는 것을 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "시약"에 대한 언급은 이러한 상이한 시약 중 하나 이상을 포함하고, "방법"은 여기에 기술된 방법들에 대해 변형 또는 치환될 수 있는 당업자에게 공지된 등가의 단계 및 방법들에 대한 참조를 포함한다.
- [0165] 달리 지시되지 않은 한, 일련의 요소들에 선행하는 용어 "적어도"는 일련의 모든 요소들을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 여기에 기술된 본 개시물의 특정 구현예들에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 등가물은 본 개시물에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0166] 본 명세서 및 후속하는 청구 범위 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)" 그리고 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이나, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 제외하지는 않는다. 여기에서 사용된 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는(containing)" 또는 때로는 용어 "가지는(having)"과 함께 사용될 수 있다.
- [0167] 여기에 사용될 때, "구성되는"은 청구 요소에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분은 배제한다. 여기에 사용될 때, "필수적으로 구성되는"은 청구항의 기본적인 새로운 특징들에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다. 여기 각각의 예에서, 임의의 용어 "포함하는", "필수적으로 구성되는" 및 "구성되는"은 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다.
- [0168] 본 명세서의 본문 전체에 걸쳐 여러 문헌이 인용되어 있다. 여기에 인용된 각각의 문헌들(모든 특허, 특허출원, 과학 출판물, 제조사의 설명서, 지침 등을 포함하여)은 상기 또는 아래에 상관없이 그 전체가 참조로 포함되어 있다. 참고 문헌에 수록된 내용이 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 경우 본 명세서가 임의의 그러한 자료를 대신할 것이다. 여기의 어떠한 내용도 본 개시물이 선행 발명에 의한 그러한 개시보다 시기 적절하지 않다는 인정으로 해석되어서는 안 된다.
- [0169] 달리 명시하지 않는 한, 예를 들어 Sambrook et al. (2001), *supra*에 기술된 바와 같이 재조합 유전자 기술의 확립된 방법들이 사용되었다.
- [0170] 본 개시물의 추가적인 목적, 이점 및 특징들은 하기 실시예 및 첨부된 도면들을 검토함으로써 당업자에게 명백해질 것이며, 이에 제한하는 것은 아니다. 따라서, 본 개시물이 예시적 구현예들 및 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었으나, 여기에 구현된 개시물의 변형 및 변이는 당업자에 의해 가능할 수 있고, 그러한 변형 및 변이들은 본 개시물의 범위 내에 있는 것으로 간주된다고 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0171] 도 1은 MSD-기반 분석에서 측정된 바와 같이 인간 GPC3로 형질감염된 SK-HEP-1 세포에서 선택된 최적화된 GPC3 특이 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NOs: 7, 9 및 10)의 결합을 나타낸다. 최적화된 클론은 나노몰 이하 내지 낮은 나노몰 EC50 값으로 GPC3 양성 세포와 결합하지만 음성 대조군 리포칼린(SEQ ID NO: 2)의 특이 결합은 검출되지 않는다. 유사한 결합이 마우스 또는 필리핀 원숭이의 GPC3로 형질감염된 SK-HEP-1 세포에서 관찰되나, 리포칼린 뮤테인은 대조군 세포(SK-HEP-1:: 벡터)와 결합하지 않는다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0172] **실시예 1: 성숙 라이브러리의 생성 및 GPC3에 특이적으로 결합하는 최적화된 뮤테인의 선별**
- [0173] GPC3-특이 뮤테인의 최적화를 위해, 선택된 위치의 편향된 무작위화 또는 오류-유발 PCR 기반 방법을 사용하여 뮤테인 SEQ ID NOs: 3 및 4의 뮤테인에 기초하여 라이브러리를 생성하였다. 편향된 디자인은 선택된 각각의 위치에 대해 암호화 된 아미노산이 50-70%의 비율로 각각의 마더 클론에서 발견되는 아미노산에 대응하도록 만들어지지만, 50-30% 비율로 다른 아미노산일 수 있다. 표적 위치의 수 N과 바이어스 B를 사용하여, 클론당 가장 많은 교환 수는  $N \times (1-B)$ 이다. 진핵세포에서 발현을 용이하게 하기 위해, hNGAL 유래의 천연 N-글리코실화 부위 N65를 돌연변이 N65D에 의해 제거하였다; 그리고 다른 잠재적 N-글리코실화 부위(Asn-X-Ser/Thr)에 관해서는, 이들 라이브러리 위치에서 바이어스를 설정함으로써 발생할 가능성이 감소하였다. 선별된 라이브러리에서 SS-브릿지의 제거는 C76 위치에서 주 아미노산으로 발린을 50% 바이어스로 설정하고, C175A의 돌연변이에 의해 달성되었다.
- [0174] 개선된 열 안정성 및 결합 친화도를 가진 최적화된 뮤테인을 선별하기 위해 파지 디스플레이를 사용하였다. 파지미드 선별은 초기의 뮤테인 선별과 비교하여 증가된 엄격함으로 수행되었고, 상승된 온도에서 다른 것들 중에서 표적 농도를 제한하여 전-인큐베이션 단계를 수행하였다.
- [0175] **실시예 2: high-throughput ELISA 스크리닝을 사용하여 GPC3에 대한 개선된 결합 및 개선된 열 안정성을 가진 뮤테인의 동정**
- [0176] 각각의 콜로니를 2xYT/Amp 배지에 접종하고 밤새도록(14-18 시간) 정지 상까지 배양하였다. 이후에, 50 $\mu$ L의 2xYT/Amp를 고정상 배양물로부터 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 인큐베이션 한 다음, OD<sub>595</sub>가 0.6-0.8에 도달할 때까지 22 $^{\circ}$ C로 옮겼다. 뮤테인의 생산은 1.2 $\mu$ g/mL의 무수 테트라사이클린이 보충된 10 $\mu$ L의 2xYT/Amp의 첨가에

의해 유도되었다. PBS/T 중의 5%(w/v) BSA 40 $\mu$ l를 첨가하고 25℃에서 1시간 동안 인큐베이션 한 후, 배양물은 스크리닝 분석에 사용할 준비가 되었다. 20 $\mu$ l의 배양물을 스크리닝 ELISA 플레이트에 직접 적용하는 동안, 나머지 부피는 65℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다.

[0177] 분리된 뮤테인의 GPC3에 대한 결합은 뉴트라비딘과 스트렙타비딘의 1:1 혼합물(PBS 중 5 $\mu$ g/mL)을 밤새도록 4℃에서 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하여 시험하였다. PBST 중의 2% BSA로 플레이트를 차단한 후, 비오틴화된 GPC3를 PBS/T 중 1 $\mu$ g/mL의 농도로 코팅된 마이크로타이터 플레이트 상에서 포획하였다. 이후에, 20 $\mu$ l의 BSA-차단된 배양물(이전의 열 처리가 있거나 없는)을 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고 25℃에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 결합된 뮤테인은 호스래디쉬 페록시다아제가 컨쥬게이트 된 항-스트렙타그 항체(1시간 인큐베이션: 2-1509-001; IBA)로 검출하였다. 정량화를 위해, QuantaBlu 형광성 페록시다아제 기질 20 $\mu$ l를 첨가하고 여기 파장 330nm 및 방출 파장 420nm에서 형광을 측정하였다.

[0178] 또한, 항-스트렙타그 항체가 코팅된 마이크로타이터 플레이트 상에 스트렙타그를 통해 뮤테인이 포획된 곳에 역 스크리닝 포맷을 적용하고 비오틴화 된 표적을 농도별로 첨가하여 엑스트라비딘-HRP(E2886; Sigma)를 통해 검출하였다.

[0179] 이후, 스크리닝 결과에 기초하여 클론을 시퀀싱하고 추가 특성 규명을 위해 뮤테인을 선별하였다. 최적화된 리포칼린 뮤테인의 선별 후, His 28  $\rightarrow$  Gln 돌연변이를 도입하여 안정성을 더욱 최적화하였다.

### [0180] 실시예 3: 뮤테인의 발현

[0181] 대장균(*E. coli*)에서 2YT-Amp 배지에서 SA 링커 및 Strep-tag® II, WSHPOFEK(SEQ ID NO: 18)를 포함하여 C-말단 서열 SAWSHPOFEK(SEQ ID NO: 17)을 가진 독특한 뮤테인이 발현된 후 스트렙타틴 친화도 크로마토그래피 및 예비 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

### [0182] 실시예 4: 표면 플라즈몬 공명을 통한 인간 및 쥐의 GPC3에 대한 결합 친화도의 측정

[0183] 여기에 개시된 최적화된 리포칼린 뮤테인의 결합 카이네틱스 및 친화도를 측정하기 위해 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하였다.

[0184] 최적화된 Lcn2 뮤테인의 인간 및 마우스 GPC3에 대한 결합의 SPR 분석은 러닝 버퍼로 HBS-EP+(1x; BR-1006-69; GE Healthcare)를 사용하여 Biacore T200 instrument(GE Healthcare) 상에서 25℃에서 수행하였다. 칩 표면에 비오틴화 된 GPC3를 고정하기 위해 Biotin CAPture Kit(GE Healthcare)를 사용하였다. 인간 GPC3(2119-GP; R&D systems) 및 쥐의 GPC3(6938-GP; R&D systems)는 표준 NHS 화학을 사용하여 비오틴화 되었다. 희석하지 않은 비오틴 캡처 시약(ss-DNA 올리고와 컨쥬게이트된 스트렙타비딘)은 미리-고정된 상보적 ss-DNA 올리고를 사용하여 센서 칩 CAP 상에 포획되었다. 그 후 1 $\mu$ g/mL의 비오틴화 된 인간 또는 쥐의 GPC3를 5 $\mu$ g/mL의 유속에서 300초 동안 적용하였다.

[0185] Lcn2 뮤테인은 30 $\mu$ l/min의 유속에서 10 nM, 40 nM 및 160 nM의 농도로 적용되었다. 희석은  $k_a$ 와  $k_d$  정보를 얻기 위해 180초의 결합 시간과 600초의 해리 시간으로 주입되었다. 칩 표면의 재생은 10 $\mu$ l/min의 유속으로 6 M 구아니디늄-HCl + 0.25 M NaOH(120초)를 주입함으로써 달성되었다. 재생 용액의 주입 후에 H<sub>2</sub>O를 사용하여 여분의 세척 단계를 거치고 120초의 안정화 기간을 거쳤다.

[0186] 데이터는 대조 채널(Biotin CAPture 시약만으로 로드 됨)에 대해 측정된 대응하는 시그널의 감산에 의해 그리고 결합 반응으로부터 버퍼 주입의 감산에 의해 이중 참조되었다. Biacore T200 평가 소프트웨어 V2.0을 사용한 데이터 처리 및 동역학 조정(kinetic fitting)을 위해 결합 반응에 대한 결합 속도 상수  $k_a$  및 해리 속도 상수  $k_d$ 를 측정하였다. 데이터는 1:1 결합 모델을 사용하여 전반적으로 조정하였다.

[0187] SEQ ID NOs: 3 및 4 그리고 SEQ ID NOs: 5 내지 16의 최적화된 뮤테인에 대한  $k_a$ ,  $k_d$  및 산출된 평형 해리 상수( $K_D$ )에 대해 측정된 값은 표 1에 요약하였다. 최적화된 GPC3 특이 리포칼린 뮤테인은 피코 몰부터 낮은 나노 몰 친화도로 쥐의 GPC3뿐만 아니라 인간과도 결합하고, 친화도는 최적화 후 30배까지 개선된다.

## 표 1

[0188] 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된 인간 및 쥐의 GPC3에 대한 최적화 된 뮤테인의 친화도, 결합 속도 상수  $k_a$  및 해리 속도 상수  $k_d$

	인간 GPC3			쥐 GPC3		
SEQ ID NO:	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]	$k_a$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
3	5.6E+05	2.2E-04	0.387	4.5E+05	3.0E-04	0.674
7	1.3E+06	1.3E-04	0.097	1.0E+06	1.5E-04	0.145
5	1.6E+06	2.0E-04	0.119	1.3E+06	2.6E-04	0.207
6	1.8E+06	3.3E-05	0.019	2.2E+06	4.2E-05	0.019
4	2.5E+06	2.2E-03	0.877	2.6E+06	2.8E-03	1.091
13	2.6E+06	1.8E-04	0.070	2.7E+06	2.4E-04	0.090
9	1.8E+06	9.8E-05	0.054	2.0E+06	1.5E-04	0.075
8	2.0E+06	1.3E-04	0.068	1.9E+06	1.8E-04	0.096
10	1.8E+06	1.2E-04	0.063	1.8E+06	1.7E-04	0.093
12	6.5E+06	2.4E-04	0.037	5.1E+06	3.0E-04	0.058
11	1.7E+06	4.6E-05	0.027	2.9E+06	3.2E-05	0.011
14	2.4E+06	2.0E-03	0.819	2.0E+06	3.1E-03	1.594
15	1.4E+06	4.9E-05	0.035	1.3E+06	9.1E-05	0.072
16	6.7E+05	1.1E-04	0.171	6.1E+05	1.9E-04	0.311

[0189] 실시예 5: 인간, 필리핀 원숭이 및 마우스 GPC3가 형질감염된 SK-HEP-1 세포에 대한 최적화된 리포칼린 뮤테인의 결합

[0190] 플로우 사이토메트리에 의해 평가될 때 내재적 GPC3가 검출 가능한 수준으로 발현하지 않는 DSMZ 세포 은행에서 얻은 SK-HEP-1 세포를 인간, 필리핀 원숭이 또는 마우스 GPC3를 인코딩하는 발현 벡터로 안정하게 형질감염시켰다. 또한, 빈 벡터 대조군 세포를 얻고 병행하여 분석하였다.

[0191] SEQ ID NOs: 3 및 4와 비교하여 인간, 필리핀 원숭이 및 마우스 GPC3에 대한 SEQ ID NOs: 5-16의 최적화된 리포칼린 뮤테인의 결합을 ECL 포맷을 사용하여 SK-HEP-1 세포에서 시험하였다(도 1). 이 실험에서, 리포칼린 뮤테인의 희석 계열을 인간, 필리핀 원숭이 또는 마우스 GPC3를 과발현하는 SK-HEP-1 세포가 코팅된 MSD 플레이트 상에서 인큐베이션 하였다.

[0192] 모든 인큐베이션 단계를 실온에서 수행하고 각 배양 단계 후 Biotek EL405 select CW washer를 사용하여 80 $\mu$ l의 PBS 버퍼로 플레이트를 2회 세척하였다.

[0193] 제1단계에서, 384 웰 플레이트를 폴리-D-라이신으로 5분 동안 예비 코팅하고 PBS로 2회 세척하였다. 웰 당 10,000 SK-HEP-1 세포를 씨앗하고, 37°C에서 밤새 접착시켰다. 세척 후, 세포 코팅된 웰을 60 $\mu$ l의 PBS/카세인(PBS 중 0.1% 카세인)으로 차단시켰다.

[0194] SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 및 16(개시 농도로 1000 nM 사용)을 PBS/카세인에서 1:3의 비율로 피코 몰 범위로 연속적으로 희석하였다. 20 $\mu$ l의 희석 계열을 실온에서 1시간 동안 SK-HEP-1이 코팅된 플레이트에 옮겼다.

[0195] 결합된 GPC3 특이 리포칼린 뮤테인의 검출 및 정량화를 가능하게 하기 위해, 남아 있는 상등액을 버리고 토끼 항 스캐폴드 항체(2 $\mu$ g/mL) 및 설포태그 표지 항 토끼 항체(5 $\mu$ g/mL)을 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 35 $\mu$ l의 계면활성제가 없는 판독 버퍼를 각 웰에 첨가하고 모든 웰의 ECL 강도를 MSD 판독기를 사용하여 판독하였다.

[0196] 곡선 조정은 GraphPad Prism 4 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

[0197] 최적화된 GPC3 특이 Lcn2 뮤테인 대부분은 SEQ ID NOs: 3 및 4와 비교하여 개선된 EC50 값으로 인간, 마우스 또는 필리핀 원숭이 GPC3로 형질감염된 SK-HEP-1 세포에 결합한다. 예시적 결합 곡선은 도 1에 나타내었고, SK-HEP-1::인간 GPC3, SK-HEP-1::마우스 GPC3 및 SK-HEP-1::필리핀 원숭이 GPC3에 대한 결합에 대한 EC50 값은 표 2에 요약하였다.

## 표 2

[0198] MSD-기반 세포 결합 분석에서 수득된 바와 같이, 각각 인간, 쥐 또는 필리핀 원숭이 GPC3로 형질감염된 고정된 SK-HEP-1 세포에 대해 SEQ ID NOs: 3 및 4와 비교하여 최적화된 리포칼린 뮤테인의 결합에 대한 EC50 값. 대부분의 최적화된 뮤테인은 SEQ ID NOs: 3 및 4와 비교하여 더 낮은 EC50 값을 나타내며, 이는 세포 상에 발현된

GPC3에 대한 개선된 결합을 나타낸다. 모든 뮤테인은 마우스 및 필리핀 원숭이 GPC3와 교차 반응성을 보인다.

SEQ ID NO:	EC50 [nM] SK-HEP-1:: human GPC3	EC50 [nM] SK-HEP-1:: mouse GPC3	EC50 [nM] SK-HEP-1:: cyno GPC3
3	24.3	29.8	29.9
7	2.5	4.8	2.8
5	24.1	25.6	33.9
4	10.2	7.1	5.7
13	0.9	2.9	0.6
9	1.1	4.1	1.9
8	1.4	5.3	2.3
10	0.8	3.8	0.8
12	2.0	5.3	1.7
14	9.5	6.7	15.4
15	1.6	4.8	1.6
16	2.2	4.4	2.5

[0199] 실시예 6: 형광-기반 열 변성 분석을 통한 열 안정성의 측정

[0200] 인간 GPC3 특이 Lcn2 뮤테인의 열 안정성을 측정하기 위해 Mx3005P qPCR 시스템(Agilent Technologies)을 이용하여 형광-기반 열 변성 분석(일반적으로 시차 주사 형광 측정법의 열적 이동 분석이라고 함)을 사용하였다.

[0201] 리포칼린 뮤테인 용액을 인산염 완충 생리 식염수(PBS; pH 7.4; 10010; Life Technologies)에서 10  $\mu$ M의 농도로 희석하고, 형광 염료 SYPRO 오렌지(DMSO 중 5000x 농축물; S-6650, Life technologies)의 PBS 중 15배 스톱 용액을 제조하였다. 20 $\mu$ l의 단백질 희석액을 qPCR 플레이트(Frame Star 96 non skirted; Cat No 4ti-0711; 4titude)에서 5 $\mu$ l의 SYPRO Orange 스톱과 혼합하고, 플레이트를 캡(Flat Optically Clear Caps; No 4Ti-0751; 4titude)으로 밀봉하였다. Mx3005P qPCR 시스템을 사용하여 플레이트를 25℃에서 100℃(45s/step)까지 점차 가열하는 한편 형광 시그널을 492 nm의 여기 파장과 610 nm의 방출 파장에서 기록하였다.

[0202] SYPRO Orange는 비특이적으로 소수성 표면에 결합하고 물은 Sypro Orange의 형광을 강력하게 소거하므로 형광이 증가하면 단백질의 언폴딩이 나타난다(Kranz J. and Schalk-Hihi, C., Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments, Methods Enzymol. 493: 277-298 (2011) 참조).

[0203] Savitzky-golay smoothing(5x savitzky golay 필터)을 원시 데이터(온도에 따른 형광 신호)에 적용하고 1차 미분을 계산하였다. 녹는점(melting temperature) <sup>TM</sup>의 측정을 위해, 1차 도함수의 최대값(형광 대 온도 선의 변곡점에 해당)을 판독하여 대응하는 온도(=T<sub>m</sub>)와 일치시켰다. 전체 평가는 Microsoft Excel에서 수행되었다.

[0204] 상기 기술된 열적 이동 분석에서 측정된 리포칼린 뮤테인의 녹는점(T<sub>m</sub>)은 표 3에 정리되어있다.

표 3

[0205] SYPRO Orange dye를 이용한 열적 이동 분석에 의해 측정된 GPC3에 특이적인 최적화된 리포칼린 뮤테인의 녹는점(T<sub>m</sub>). 최적화된 리포칼린 뮤테인의 경우 녹는점의 증가는 최적화되지 않은 뮤테인과 비교하여 최대 14℃까지이다.

SEQ ID NO:	T <sub>m</sub> [℃]
3	58
7	67
5	65
6	65
4	55
13	68
9	68
8	68
10	69
12	64
11	58



14	61
15	52
16	53

**[0206] 실시예 7: 선별된 최적화된 GPC3 특이 리포칼린 뮤테인의 버퍼 및 혈장에서 저장 안정성의 평가**

**[0207]** 비-최적화된 제형(PBS pH 7.4) 그리고 인간 및 쥐의 혈장에서의 예시적인 선별된 뮤테인(SEQ ID NOs: 7, 9 및 10)의 저장 안정성을 평가하기 위해 하기 안정성 연구가 수행되었다:

**[0208]** 버퍼에서의 저장 안정성의 조사를 위해 뮤테인을 PBS(phosphate-buffered saline pH 7.4, 10010, Life Technologies)에서 1μg/mL의 농도로 희석하고, 1개의 앨리퀼트를 42℃에서 1주간 인큐베이션 하고, 레퍼런스 앨리퀼트를 -20℃에서 동결시켰다. 활성 뮤테인은 정량적 ELISA 세팅에서 측정하였다. 단량체 단백질은 분석적 크기 배제 크로마토그래피에서 측정하였다.

**[0209]** 혈장 시료의 안정성을 평가하기 위해 0.5mg/mL 농도의 PBS에서 50% 인간 또는 쥐의 혈장에서의 뮤테인 희석액을 준비하고 37℃에서 1주간 인큐베이션 하였다(레퍼런스 앨리퀼트의 준비는 -20℃에서 즉시 동결됨). 활성 뮤테인 농도는 qELISA에 의해 평가되었다.

**[0210]** 단백질 활성을 분석하기 위해, 다음의 ELISA를 적용하였다: 384-웰 폴리스티렌 플레이트(Greiner FLUOTRAC™ 600; 검은 평면 바닥; 높은 결합)를 20μL의 GPC3(2119-GP; R & D Systems)를 PBS 중의 5μg/mL 농도로 처리하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 세척 후, 웰을 100μL의 차단 버퍼(0.1% v/v 트윈-20을 함유하는 PBS 중의 2% w/v BSA)으로 차단하였다. 플레이트를 세척하고 스트레스를 받지 않은 레퍼런스 시료(준비 후 -20℃에서 보관) 또는 스트레스가 가해진 시료의 적당히 희석된 단백질 표준물질 20μL를 ELISA 플레이트에 옮기고 인큐베이션 하였다. 플레이트에 결합된 단백질을 검출하기 위해 ELISA 플레이트를 세척하고, 남아 있는 상등액을 버리고, 20μL의 HRP 표지된 항 hNGAL 항체를 차단 버퍼에 소정의 최적 농도로 첨가하고 인큐베이션 하였다. 세척 후, 20μL의 형광 HRP 기질(QuantaBlu; Pierce)을 각 웰에 첨가하고 5분 동안 반응을 진행시켰다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Tecan)를 사용하여 플레이트의 모든 웰의 형광 강도를 판독하였다.

**[0211]** 별도의 언급이 없는 한, 모든 인큐베이션 단계는 실온에서 1시간 동안 수행하고, 각 인큐베이션 단계 후에 Biotek ELx405 select CW washer를 사용하여 플레이트를 100μL의 PBS-T 버퍼(PBS; 0.05% 트윈 20)로 5회 세척하였다.

**[0212]** 상기 기술된 ELISA의 경우, 일반적으로 0.01-1000ng/mL 범위의 11개의 뮤테인 희석액을 포함하는 검량 곡선을 작성하고 각 시료에 대해 검량 곡선의 직선 범위 내에서 3개의 다른 독립 희석액을 제조하였다. 선택적으로 1% 인간 또는 마우스 혈장이 보충된 차단 버퍼를 희석에 사용하였다.

**[0213]** 검량 곡선은 4 Parameter Logistic(4PL) 비선형 회귀 모델을 사용하여 적용되고, 시험된 시료에 대해 활성 단백질 농도를 계산하는 데 사용된다. 측정된 활성 단백질 농도는 동일한 농도와 동일한 매트릭스에서 -20℃에서 보관된 스트레스를 받지 않는 레퍼런스 시료에 대해 참조되었다.

**[0214]** 분석적 크기 배제 크로마토그래피는 0.3mL/min의 유속에서 용출액으로 PBS(10010; Life Technologies)를 사용하여 2개의 Superdex 75 5/150 GL 컬럼(GE Healthcare)을 연속적으로 사용하는 Agilent HPLC 시스템에서 수행되었다.

**[0215]** PBS pH 7.4 그리고 인간 및 쥐의 혈장에서의 저장 안정성 시험의 결과는 표 4에 요약되어있다.

**표 4**

**[0216]** qELISA의 활성 회복 및 분석적 SEC의 단량체 함량에 의해 평가된 비-최적화된 제형(PBS; 1주, 42℃), 인간 및 마우스 혈장(1주, 37℃)에서의 저장 안정성: qELISA = 100 +/- 15%에서 안정(스트레스 받지 않은 시료와 비교하여 뮤테인 활성의 회복); aSEC = 100 +/- 5%에서 안정(스트레스 받지 않은 시료와 비교하여 단량체 피크 면적의 회복); 레퍼런스를 포함하는 모든 시료에 대해, 100 면적 %의 단량체 함량이 검출되었다.

	인간 혈장: 37℃에서 1주간	마우스 혈장: 37℃에서 1주간	PBS: 42℃에서 1주간	
SEQ ID NO:	뮤테인 활성의 회복[%]	뮤테인 활성의 회복[%]	뮤테인 활성의 회복[%]	단량체 피크 영역의 회복[%]
7	98	105	93	103

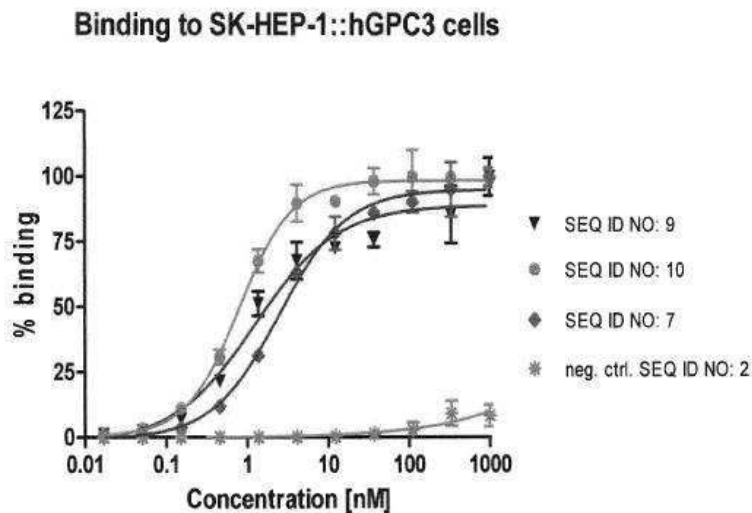
9	92	101	96	105
10	105	95	101	98

[0217] 여기에 예시적으로 기술된 구현예들은 여기에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들이 없이 적당히 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, "포함하는", "함유하는", "내포하는" 등의 용어는 광범위하고 제한 없이 읽혀져야 할 것이다. 또한, 여기에서 사용된 용어들 및 표현들은 설명의 용어로서 사용되었지만 제한이 아니며, 도시되고 기술된 특징들 또는 이의 일부의 등가물을 배제하는 그러한 용어들 및 표현들의 사용에 대한 의도는 없으나, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형들이 가능한 것으로 간주된다. 따라서, 본 구현예들이 바람직한 구현예들 및 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었다고는 하나 이의 변형 및 변이들이 당업자에 의해 이루어질 수 있고, 그러한 변형 및 변이들은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다는 것으로 이해되어야 한다. 여기에 기술된 모든 특허, 특허 출원, 교과서 및 동료 평가를 거친 간행물은 그들의 전체가 여기에 참조로 포함된다. 또한, 여기에 참조로 포함된 참고 문헌의 용어 정의 또는 사용이 일관성이 없거나 여기에 제공된 그 용어의 정의와 상반되는 경우, 그 용어의 정의는 여기에서 제공된 것을 적용하고, 참고 문헌에서의 그 용어의 정의는 적용하지 않는다. 일반적인 개시물 내에 속하는 더 좁은 종 및 아속(subgeneric) 그룹화 각각 역시 본 발명의 일부를 형성한다. 삭제된 물질이 구체적으로 여기에 인용되는 지의 여부와 무관하게 속(genus)으로부터 임의의 대상을 제거하는 단서 또는 부정적 제한을 가진 발명의 일반적인 설명이 포함된다. 또한, 특징이 마쿠쉬 그룹으로 기재되는 경우, 당업자는 개시물이 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원들의 서브그룹의 관점에서 기재됨을 인식할 것이다. 추가의 구현예들은 다음의 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0218] 등가물: 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 여기에 기재된 발명의 특정 구현예들에 대한 많은 등가물을 인식할 수 있거나 확인할 수 있다. 그러한 등가물은 하기 청구범위에 포함되도록 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 여기에 참조로 포함되는 것처럼 동등한 정도로 본 명세서에 참조로 포함된다.

## 도면

### 도면1



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Pieris AG

<120> Muteins of human lipocalin 2 with affinity for Glypican-3 (GPC3)



<130> PIE15296PCT

<150> EP15167922.2

<151> 2015-05-18

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Wildtype NGAL

<400> 1

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 2

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Wildtype NGAL98

<400> 2

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein - parental NGAL (P019-Seq2 - S375.1 M1.1 A16)

<400> 3

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Gly Val Ser Phe Trp Arg Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Gln Thr Ser Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein - parental NGAL (P019-Seq 3 - S375.2 M1.1 M2)

<400> 4

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Met Lys Lys Cys Met Tyr Ser Ile

65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.05N06M1)

<400> 5

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Val Val Ser Phe Trp Arg Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Gln Thr Ser Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.05K19M1)

<400> 6

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Arg Gly Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.05004M1)

<400> 7

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

1                      5                      10                      15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr  
  
                     20                      25                      30  
 Val Val Gly Val Ala Gly Asn Gly Met Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
                     35                      40                      45  
 Leu Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
                     50                      55                      60  
 Asp Val Thr Ser Val Ala Phe Arg Asn Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln  
  
                     85                      90                      95  
 Ile Lys Ser Gly Pro Gly Glu Thr Ser Asn Leu Val Arg Val Val Ser  
                     100                      105                      110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln  
                     115                      120                      125  
 Asn Arg Glu Trp Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
                     130                      135                      140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
                     165                      170                      175  
 Asp Gly

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02J22M1)

<400> 8

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

1                      5                      10                      15



Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Leu Tyr Ser Ile

65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln

85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02B06M1)

<400> 9

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

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

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

145 150 155 160  
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
165 170 175  
Asp Gly

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02L21M1)

<400> 10

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
1 5 10 15  
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

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

35 40 45  
 Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asp Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Val Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Pro  
  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn Thr Ala Ser Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
 165 170 175  
 Asp Gly

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02A11M1)

<400> 11

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30  
 Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50                      55                      60  
Asp Val Thr Ala Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Leu Tyr Ser Ile  
65                      70                      75                      80  
Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg

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

145                      150                      155                      160  
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
  
                        165                      170                      175  
Asp Gly

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.09P24M1)

<400> 12

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
1 5 10 15  
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Asn Val Val Phe Ala Gly Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg

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

145                      150                      155                      160  
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
  
                                165                      170                      175  
Asp Gly

<210> 13

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02N03M1)

<400> 13

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
1 5 10 15  
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

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

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln

85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Ser Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.10I10M1)

<400> 14

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Gly Lys Lys Val Lys Tyr Thr Ile

65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln



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

145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile  
 165 170 175

Asp Gly

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.10D09M1)

<400> 15

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

1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

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

35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Arg Phe Gly Glu Lys Lys Ile Lys Tyr Ser Ile

65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln

85 90 95  
 Ile Lys Ser Gln Pro Gly Asp Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile  
 165 170 175  
 Asp Gly

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.04M18M2)

<400> 16

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

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

85 90 95  
 Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile  
 165 170 175  
 Asp Gly

<210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> SA linker and Strep-tag II  
 <400> 17

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> Strep-tag II  
 <400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5  
 <210> 19  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220><223> Lipocalin mutein (S0569.05N06M1)  
 <400> 19

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60  
 aacttcagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggcgttgc cggaaatgct 120

ctgctgcgtg aggataagga tccgcttaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac cgttgtgtct ttttggagga agaaatgcca ttacaagatt 240  
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtggg 300

ccgggccaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
gtgtttctta aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttg ctatcacact gtacgggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 20

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.05K19M1)

<400> 20

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
aacttcagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcgttgc cggaaatgtt 120

cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgtct tttcggggga agaaatgcca ttacaagatt 240  
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtgg 300  
ccgggcgaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
gtgtttctta aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 21

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.05004M1)

<400> 21

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
aacttcagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcgttgc cggaaatggt 120  
atgctgcgtg aggataagga tccgcttaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac cagtgtggct tttcgggaata agaaatgcca ttacaagatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgt 300

ccgggcgaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 22

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02J22M1)

<400> 22

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg 120

gggctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaaatgctt gtactcgatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgtg 300

ccgggcgaata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatttttt ttatcatact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 23

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02B06M1)

<400> 23

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg 120

ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaaatgcac gtactcgatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgtg 300

ccgggcggtg cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca aggagggtga tcagaaccgc gagatttttt ttatcatact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 24

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02L21M1)

<400> 24

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatggg 120

gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctagga agaaatgcgt gtactcgatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcccgat taaaagttag 300

ccgggcaata cagcatcttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca aggagggtga tcagaaccgc gagatttttt ttatcatact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 25

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02A11M1)

<400> 25

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cgctgtgagg ttgctagga agaaatgcct gtactcgatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcccgat taaaagttag 300

ccgggctata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360



gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 26

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.09P24M1)

<400> 26

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg 120  
gtctctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac caatgtggtg ttgtctggga agaaatgcaa gtactcgatt 240  
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccggat taaaagtcg 300  
ccgggcaata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcatact gtacgggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 27

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.02N03M1)

<400> 27

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatctg 120  
ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgtctagga agaaatgcat gtactctatt 240  
ggtagctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagttag 300  
ccgggcagta cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatTTTTT ttatcacact gtacgggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 28

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.10I10M1)

<400> 28

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg 120

ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac caatgtgagg ttgctggga agaaagttaa gtacacgatt 240

gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagttag 300

ccgggcaata cagcaacttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatttttt ttatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggtatcga cggc 534

<210> 29

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.10D09M1)

<400> 29

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtc tgggcagggc cggaaatgtg 120

ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgaggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgagg ttggtgaga agaaaattaa gtactcgatt 240

ggtacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtcag 300

ccgggcgata cagcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca aggaggtgta tcagaaccgc gagatttttt ttatcatact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc aggtatcga cggc 534

<210> 30

<211> 534

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein (S0569.04M18M2)

<400> 30

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatatgtcg tgggccgggc cggaaatgtg	120
ggtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180

gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgagg ttgtattcta agaaagtgac gtactctatt	240
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgag	300
ccgggcaata cagcgaatth ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttctca aggaggtgta tcagaaccgc gagatthttt ttatcatact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatthttatcc gctthttcaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc aggtatcga cggc	534