



(21)申請案號：105140113

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 05 日

(51)Int. Cl. : C07K14/81 (2006.01)

C12N15/15 (2006.01)

A61K38/55 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2015/12/10 美國

62/265,792

(71)申請人：第一三共股份有限公司(日本)DAIICHI SANKYO CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：馬欽內爾 加布里埃爾 MATSCHINER, GABRIELE (DE)；羅特 克莉絲汀 ROTHE, CHRISTINE (DE)；維登曼 亞歷山大 WIEDENMANN, ALEXANDER (DE)；貝萊巴 哈齊達西哈姆 BEL AIBA, RACHIDASIHAM (FR)；漢納 馬龍 HINNER, MARLON (DE)；阿勒施托費爾 安德烈 ALLERSDORFER, ANDREA (DE)；倫德 布拉德利 LUNDE, BRADLEY (US)；窪田一史 KUBOTA, KAZUFUMI (JP)；牧野充裕 MAKINO, MITSUHIRO (JP)；高橋咲子 TAKAHASHI, SAKIKO (JP)；橋本隆二 HASHIMOTO, RYUJI (JP)；高橋亘 TAKAHASHI, TOHRU (JP)；大豐衛 OTOYO, MAMORU (JP)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：5 共 124 頁

(54)名稱

特異性於降鈣素基因相關胜肽的新穎蛋白

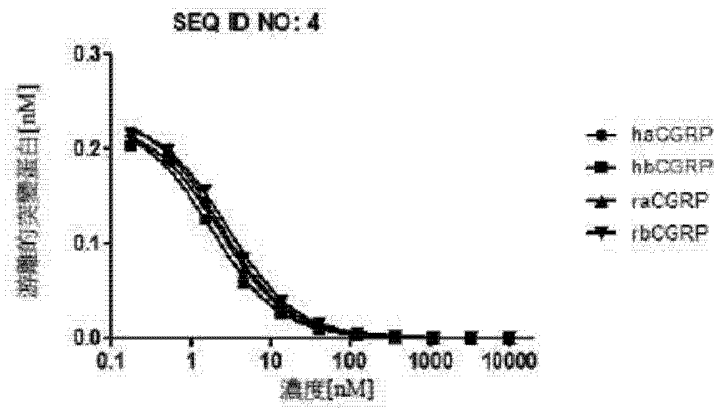
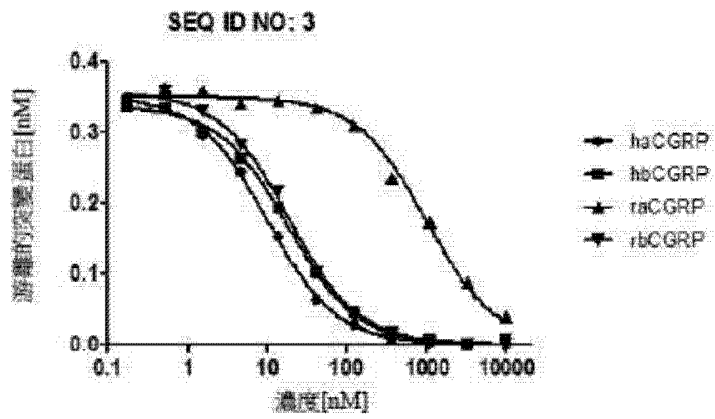
NOVEL PROTEINS SPECIFIC FOR CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE

(57)摘要

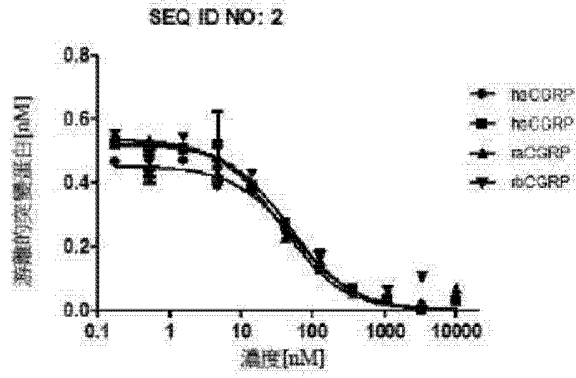
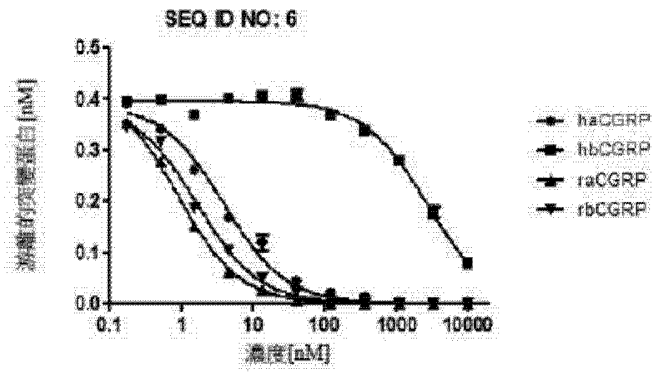
本發明提供結合 CGRP 的 hNGAL 突變蛋白，且該突變蛋白可以用於各種應用，包括醫藥應用，例如偏頭痛。本發明還涉及製備本文所述之一或多種突變蛋白的方法以及包含一或多種該等突變蛋白之組合物及組合。本發明進一步涉及編碼這種突變蛋白的核酸分子以及產生這種突變蛋白及核酸分子的方法。此外，本申請公開了這些突變蛋白的治療及/或診斷的用途以及包含一或多種這種突變蛋白的組合物及組合。

The present disclosure provides hNGAL muteins that bind CGRP and can be used in various application including pharmaceutical applications, for example, migraine. The present disclosure also concerns methods of making one or more muteins described herein as well as compositions and combinations comprising one or more of such muteins. The present disclosure further relates to nucleic acid molecules encoding such muteins and to methods for generation of such muteins and nucleic acid molecules. In addition, the application discloses therapeutic and/or diagnostic uses of these muteins as well as compositions and combinations comprising one or more of such muteins.

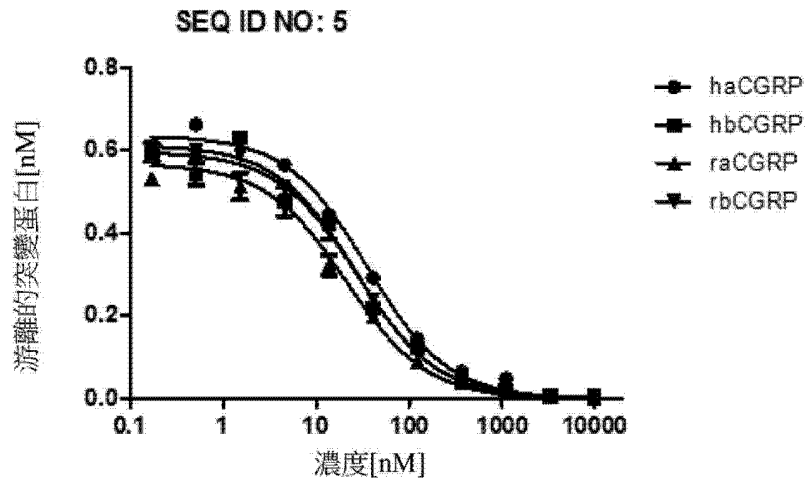
指定代表圖：



【圖1】



【圖1】 (續)



【圖1】(續)

【發明說明書】

【中文發明名稱】 特異性於降鈣素基因相關胜肽的新穎蛋白

【英文發明名稱】 NOVEL PROTEINS SPECIFIC FOR CALCITONIN

GENE-RELATED PEPTIDE

【技術領域】

本發明係關於特異性於降鈣素基因相關胜肽的新穎蛋白。

【先前技術】

【0001】 降鈣素基因相關胜肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)是由中樞以及周圍神經系統的神經分泌的血管活性神經胜肽，其中含CGRP的神經元與血管緊密相關。CGRP媒介的血管擴張也與神經性發炎反應相關，作為導致血漿外滲與微血管的血管擴張並存在於偏頭痛中的事件級聯反應的一部分。

【0002】 CGRP以高度相似的 α 及 β 二種同功型存在於人類及大鼠中，儘管每種都由不同的基因所編碼。CGRP胜肽的 α 及 β 同功型在人類中相差三個胺基酸，而在大鼠中則相差一個胺基酸。CGRP胜肽的胺基酸序列在物種之間是保守的，而且被認為是屬於包括澱粉素、降鈣素與腎上腺髓素的胜肽家族的成員。

【0003】 因此，CGRP分為至少二種亞型，以 α -CGRP或CGRP1以及 β -CGRP或CGRP2表示(Pharmacol. Rev 54: 233-246, 2002)。根據在多種體內與體外生物分析中所得到的差異拮抗劑親和力以及激動劑效力，已經有報告提出至少存在二種CGRP亞型。(Dennis等人，hCGRP8-37, A calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain

and periphery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 254:123-128 (1990) ; Dennis 等人 , Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251 :718-725 (1989) ; Dumont等人 , A potent and selective CGRP agonist, [Cys(Et)_{2,7}]hCGRP alpha: comparison in prototypical CGRP1 and CGRP2 in vitro bioassays, *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 75:671-676 (1997)) 。

【0004】 CGRP1亞型被發現對拮抗劑CGRP(8-37)片段敏感。(Chiba等人 , Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP- (8-37), *Am. J. Physiol*, 256:E331-E335 (1989) ; Dennis等人(1990) ; Mimeault等人 , Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258:1084-1090 (1991))。相較之下，CGRP對線性人類CGRP (hCGRP)類似物敏感，其中在位置2及7上的半胱胺酸殘基被衍生化(例如，以乙醯胺基甲基[Cys(ACM)_{2'7}]或乙醯胺[Cys(Et)_{2'7}]進行衍生化)，但CGRP受體對CGRP(8-37)片段則不敏感。(Dennis等人(1989) ; Dennis等人(1990) ; Dumont等人 (1997))。三種降鈣素受體刺激胜肽(calcitonin receptor stimulating peptides , CRSPs)也已在許多哺乳類動物物種中被鑑定出來；CRSPs可以在CGRP家族中形成新的亞家族。(Katafuchi, T與Minamino, N, Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family, *Peptides*, 25(11):2039- 2045 (2004)) 。

【0005】 CGRP透過由稱為類降鈣素受體的受體(calcitonin receptor-like receptor , CALCRL)以及受體活性修飾蛋白(receptor activity-modifying protein ,

RAMP1)的G蛋白偶合受體所組成的異聚受體調節其效用。CGRP受體已經在幾種組織及細胞中(包括腦、心血管、內皮以及平滑肌)中被鑑定並進行藥理學評估。多種CGRP受體已經基於不同的藥理學性質而被定性了。降鈣素超家族胜肽透過七個跨膜結構域的G蛋白偶合受體(G-protein-coupled receptors, GPCRs)進行作用。降鈣素受體(calcitonin receptor, 「CT」、「CTR」或「CT受體」)以及CGRP受體為第II型(「家族B」) GPCRs, 該家族包括其他GPCRs, 這些GPCRs識別調節性胜肽如胰泌素、升糖素以及激脈腸多胜肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)。人類降鈣素受體的最佳定性的剪接變體根據在第一細胞內環中的16個胺基酸的有(以前稱為CTR_{n+}或CTR1, 現在稱為CT[^])或無(主要剪接變體, 以前稱為CTR_π或CTR2, 現在稱為CT(a))而異。(Gorn等人, Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone: the first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction, J. Clin. Invest., 95:2680-2691 (1995); Hey等人, Amylin receptors: molecular composition and pharmacology, Biochem. Soc. Trans., 32:865-867 (2004); Poyner等人, 2002)。

【0006】 CGRP廣泛地分佈在感覺神經中, 在周圍以及中樞神經系統中, 並且顯現出大量不同的生物活性。當從三叉神經以及其他神經纖維釋出時, CGRP被認為透過結合特異性細胞表面受體來調節其生物反應。CGRP的生物活性包括調節神經肌肉接合處、免疫系統內的抗原呈現、血管緊張性以及感覺神經傳遞。(Poyner, D. R., Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors, Pharmacol. Ther., 56:23-51 (1992); Muff等人, Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions, Eur. J. Endocrinol., 133: 17-20 (1995))。

【0007】 因此，鑑定特異性識別並結合CGRP的新化合物是非常需要的。這樣的化合物可用於診斷篩選以及治療干預與CGRP活性相關的疾病狀態。據此，本發明之一目的在於提供CGRP的特異性結合化合物以用於調節CGRP的活性。本文公開的這些化合物採取衍生自人類脂質運載蛋白2 (也稱為嗜中性白血球明膠酶相關脂質運載蛋白，neutrophil gelatinase associated lipocalin，「hNGAL」) 的突變蛋白的形式。

【發明內容】

【定義】

【0008】 以下列表定義了在本說明書中使用的術語、詞彙以及縮寫。本文列出以及定義的所有術語目的在包括所有文法形式。

【0009】 本文所用之「CGRP」，除非明確指明來自非人類物種(例如，「大鼠CGRP」、「猴CGRP」等)，否則指的就是人類 α -CGRP及/或人類 β -CGRP。

【0010】 本文所用之「 α -CGRP」或「alpha CGRP」，除非明確指明來自非人類物種(例如，「大鼠 α -CGRP」、「猴 α -CGRP」等)，否則指的就是人類CGRP1，係由Swiss Prot P06881定義的全長蛋白或其生物活性片段(例如，能夠在體外或體內誘導血漿蛋白外滲的CGRP1蛋白的片段)。

【0011】 本文所用之「 β -CGRP」或「beta CGRP」，除非明確指明來自非人類物種(例如，「大鼠 β -CGRP」、「猴 β -CGRP」等)，否則指的就是人類CGRP2，係由Swiss Prot P10092定義的全長蛋白或其生物活性片段(例如，能夠在體外或體內誘導血漿蛋白外滲的CGRP2蛋白的片段)。

【0012】如本文所用，「大鼠CGRP」係指大鼠 α -CGRP及/或大鼠 β -CGRP。大鼠 α -CGRP (alpha CGRP)或大鼠CGRP1是由Swiss Prot P01256定義的全長蛋白或其生物活性片段。大鼠 β -CGRP (beta CGRP)或大鼠CGRP2是由Swiss Prot P10093定義的全長蛋白或其生物活性片段。

【0013】如本文所用，「可被偵測到的親和力」是指以通常至少約 10^{-5} M或更低的親和力常數來結合所選目標物的能力。更低的親和力通常無法以常用之方法如ELISA進行測量，因此具有次要的重要性。

【0014】如本文所用，本發明的蛋白質(例如人類脂質運載蛋白2的突變蛋白)與所選目標物(在本文的例子中為CGRP)的「結合親和力」，可以透過本領域技術人員已知的多種方法被測量(並且由此測定突變蛋白-配體複合物的 K_D 值)。這樣的方法包括，但不限於，螢光滴定、直接酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)、競爭性ELISA、量熱方法，例如等溫滴定量熱法(isothermal titration calorimetry，ITC)，以及表面電漿共振(surface plasmon resonance，SPR)。這些方法在本領域中是公知的，且其實例亦如下所詳述。

【0015】還注意到的是，各種結合子及其配體之間的複合物的形成受到許多不同因素的影響，例如各自結合配偶體的濃度、競爭物的存在、pH值以及所用緩衝系統的離子強度，以及用於測定解離常數 K_D 的實驗方法(例如螢光滴定、直接ELISA、競爭性ELISA或SPR，在此僅舉出幾個例子)或甚至是用於評價實驗數據的數學演算法。

【0016】因此，本領域技術人員也清楚， K_D 值(在各個結合子與其標的物/配體之間形成的複合物的解離常數)可以在某一實驗範圍內變化，這取決於用於確定特定突變蛋白對一給定配體的親和力的方法與實驗設置。這意味著所測量

的 K_D 值可能存在輕微的偏差或容許範圍，例如，取決於是否透過SPR、透過競爭性ELISA，或透過直接ELISA來確定 K_D 值。

【0017】如本文所用，若一化合物，如本發明的突變蛋白，能夠區分一目標物以及一或多個參考目標，則該化合物「特異性結合」該目標物(例如，CGRP)或對該目標物具有「結合特異性」，這是因為結合特異性並非是絕對的，而是具有相對的性質。「特異性結合」可以例如根據西方墨點法、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-測試、IHC以及胜肽掃描等方法來確定。

【0018】如本文所用之「人類脂質運載蛋白2」或「人類Lcn 2」或「人類NGAL」或「hNGAL」等詞係指具有SWISS-PROT/UniProt資料庫登錄號P80188的成熟人類嗜中性白血球明膠酶相關脂質運載蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)。本發明的人類脂質運載蛋白2的突變蛋白在本文中也可以稱為「hNGAL突變蛋白」。可以使用SWISS-PROT / UniProt資料庫登錄號P80188中所示的胺基酸序列作為較佳的「參考序列」，更佳則使用SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列作為參考序列。

【0019】如本文所用，「突變蛋白」、「突變的」實體(無論是蛋白質或核酸)，或是「突變體」係指，相較於天然存在的(野生型)核酸或蛋白質「參考」支架，交換、刪除或插入一個或多個核苷酸或胺基酸。本文所用之「突變蛋白」乙詞還包括其功能片段或變體。本發明中描述的特定突變蛋白的片段或變體較佳保留與CGRP結合的功能，例如，具有可被偵測到的或甚至更高的親和力，而且這樣的片段或變體為本文公開的參考突變蛋白的「功能片段或變體」。

【0020】如本文所用之與本發明的突變蛋白相關的「片段」乙詞涉及衍生自全長成熟人類脂質運載蛋白2的蛋白質或胜肽，其N-端及/或C-端縮短，亦即至

少缺少N-端及/或C-端胺基酸之一。這樣的片段可以包括成熟人類脂質運載蛋白2的一級序列的至少10個，更多個，例如20個或30個或更多個連續胺基酸，且通常在成熟人類脂質運載蛋白2的免疫分析中可被偵測到。

【0021】 一般而言，如本文所用之與本發明或根據本發明之組合的突變蛋白相對應的蛋白質配體有關的「片段」乙詞涉及N端及/或C端縮短的蛋白質或胜肽配體，其保留全長配體被根據本發明的突變蛋白識別及/或結合的能力。

【0022】 如本文所用之「誘變」乙詞係指選擇實驗條件，使得在成熟的人類脂質運載蛋白2的一給定序列位置上天然存在的胺基酸可以被至少一個不存在於該相應天然多胜肽序列中的該特定位置所取代。「誘變」乙詞還包括透過刪除或插入一或多個胺基酸以對序列區段的長度進行(額外)修飾。因此，在本發明的範圍內，例如，在所選序列位置處的一個胺基酸被一段三個隨機突變所替換，導致與其野生型蛋白質的相應區段之長度相比，多出二個插入的胺基酸殘基。在本發明中可以進行誘變的任何胜肽區段中可以彼此獨立地引入這種插入或刪除。

【0023】 「隨機誘變」乙詞係指在某個序列位置上不存在預定的單個胺基酸(突變)，但是在誘變過程中可以在預定序列位置以特定概率併入至少二個胺基酸。

【0024】 「同一性」為測量序列的相似性或關係的序列性質。本發明中使用之「序列同一性」或「同一性」等詞意指成對相同殘基的百分比 - 在本發明的多胜肽的序列與所討論的序列的(同源)比對之後 - 相對於這二個序列中較長者的殘基數。透過將相同胺基酸殘基的數目除以殘基的總數並將結果乘以100來測量序列同一性。

【0025】如本文所用之「同源性」乙詞，以其通常的含義被使用，並且包括在本發明多胜肽的直鏈胺基酸序列(例如，本發明的任何突變蛋白)的等同位置上的相同胺基酸以及被認為是保守取代的胺基酸(例如，麩胺酸殘基被天門冬胺酸殘基替換)。

【0026】序列同源性或序列同一性的百分比在本文中可以使用例如BLASTP程式，blastp 2.2.5版本(2002年11月16日；參見Altschul, S. F.等人(1997) *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402)來確定。在此具體實施例中，同源性的百分比係基於包含前胜肽序列的整個多胜肽序列(矩陣：BLOSUM 62；位移成本：11.1；截斷值設定為 10^{-3})的比對，在成對比較中較佳使用野生型蛋白質支架作為對照。其計算為：在BLASTP程式輸出中作為結果指示的「陽性」(同源胺基酸)的數目的百分比除以由該程式選擇用於比對的胺基酸的總數。

【0027】特定而言，為了確定不同於野生型人類脂質運載蛋白2的突變蛋白的胺基酸序列的胺基酸殘基是否對應於野生型人類脂質運載蛋白2的胺基酸序列中的某一位置，本領域技術人員可使用本領域熟知的手段及方法，例如比對，透過手動地或使用電腦程式，例如BLAST2.0，其代表基本局部比對搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)，或ClustalW或任何其他合適的程式，以產生序列比對。據此，野生型人類脂質運載蛋白2可以用作「對象序列」或「參考序列」，而不同於本文所述的野生型人類脂質運載蛋白2的突變蛋白的胺基酸序列則作為「查詢序列」。「參考序列」以及「野生型序列」等詞在本文中可互換使用。

【0028】「位移」是比對中的空間，其係為添加或刪除胺基酸的結果。因此，序列完全相同的二個複製備份具有100%的同一性，但是具有較低保守性，

以及具有刪除、添加或置換的序列可具有較低程度的序列同一性。本領域技術人員將認識到，幾種電腦程式可用於使用標準參數以確定序列同一性，例如Blast (Altschul等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 33989-3402)、Blast2 (Altschul等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410)以及Smith-Waterman (Smith等人(1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197)。

【0029】 本發明中使用之「變體」乙詞涉及包括胺基酸序列修飾的蛋白質或胜肽的衍生物，例如透過取代、刪除、插入或化學修飾。這樣的修飾於一些具體實施例中不降低蛋白質或胜肽的功能。這樣的變體所包括的蛋白質，其中一或多個胺基酸已被其各自的D-立體異構體或除了天然存在的20個胺基酸之外的胺基酸，例如鳥胺酸、羥脯胺酸、瓜胺酸、高絲胺酸、羥離胺酸、正纈胺酸，所替換。然而，這樣的取代也可以是保守的，亦即一胺基酸殘基被一化學上相似的胺基酸殘基取代。以下基團的成員之間的替換為保守取代的實例：1) 丙胺酸、絲胺酸以及蘇胺酸；2) 天門冬胺酸以及麩胺酸；3) 天門冬醯胺以及麩醯胺；4) 精胺酸以及離胺酸；5) 異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸以及纈胺酸；以及6) 苯丙胺酸、酪胺酸以及色胺酸。

【0030】 「天然序列」人類脂質運載蛋白2係指具有與來源於自然的相應多胜肽相同的胺基酸序列的人類脂質運載蛋白2。因此，天然序列人類脂質運載蛋白2可以具有各自天然存在的人類脂質運載蛋白2的胺基酸序列。這種天然序列多胜肽可以從自然界分離或可以透過重組或合成方法產生。「天然序列」多胜肽特別包括人類脂質運載蛋白2的天然存在的截短或分泌形式，天然存在的變體形式，例如人類脂質運載蛋白2的可變剪接形式以及天然存在的等位基因變體。多胜肽「變體」意指與天然序列多胜肽具有至少約50%、60%、70%、80%

或至少約85%胺基酸序列同一性的生物活性多胜肽。這樣的變體包括，例如，其中在該多胜肽的N-或C-端添加或刪除一或多個胺基酸殘基的多胜肽。通常，一變體具有與該天然序列多胜肽至少約70%、包括至少約80%、例如至少約85%的胺基酸序列同一性，包括至少約90%的胺基酸序列同一性或至少約95%的胺基酸序列同一性。

【0031】 當根據本發明所用時，「位置」乙詞係指本文所述之胺基酸序列內的胺基酸的位置或本文所述的核酸序列內的核苷酸的位置。為了理解在一或多個突變蛋白的胺基酸序列位置的上下文中本文所用之「對應」或「對應的」等詞，相應的位置不僅由前面的核苷酸/胺基酸的數目決定。據此，根據本發明可以被取代的給定的胺基酸的位置，可能因為在一(突變體或野生型)人類脂質運載蛋白2中其他位置的胺基酸的刪除或添加而有變化。類似地，根據本發明可以被取代的給定的核苷酸的位置，可能因為在一突變蛋白或野生型人類脂質運載蛋白2的5'非翻譯區(untranslated region, UTR)，其包括啟動子及/或任何其它調節序列或基因(包括外顯子與內含子)，中其他位置的核苷酸的刪除或添加而有變化。

【0032】 因此，對於根據本發明的相應位置，較佳地應理解為，核苷酸/胺基酸的位置在指定數目上可能與類似的相鄰核苷酸/胺基酸不同，但所述相鄰核苷酸/胺基酸，其可能被交換、刪除或添加，也包括在一或多個對應位置。

【0033】 此外，對於基於根據本發明的參考支架的突變蛋白中的相應位置，較佳地應理解為，核苷酸/胺基酸的位置在結構上對應於一突變蛋白或野生型人類脂質運載蛋白2中其他的位置，即使它們可能在指定數目上並不同。

【0034】本文中用於非天然目標物的「有機分子」或「小有機分子」等詞表示包含至少二個碳原子，但較佳不超過7或12個可旋轉的碳鍵的有機分子，其分子量在100至2000道爾頓之間，較佳在100至1000道爾頓之間，並且可選擇地包括一或二個金屬原子。

【0035】本文所用的「檢測(動詞)」、「檢測(名詞)」、「可被偵測到的」或「檢測(動名詞)」應理解為在定量及定性的層次上，及其組合。因此，其包括對目標分子的定量、半定量以及定性測量。

【0036】「個體」為脊椎動物，較佳為哺乳類動物，更佳為人類。「哺乳類動物」乙詞在本文中用於指歸類為哺乳類動物的任何動物，包括但不限於人類、家畜以及農場動物，以及動物園、運動或寵物動物，例如：綿羊、狗、馬、貓、牛、大鼠、豬，猿類如獼猴等，僅舉幾個說明性的實例而已。較佳地，本文之哺乳類動物為人類。

【0037】「有效量」為足以實現有益或期望結果的量。有效量可以在一次或多次施用中被施用。

【0038】「樣品」定義為取自任何個體的生物樣品。生物樣品包括，但不限於，血液、血清、尿液、糞便、精液或組織。

【0039】根據本發明的「轉移」乙詞係指癌細胞從原發性腫瘤向患者體內的一或多個其他部位傳播，其中這些部位發展繼發性腫瘤。確定癌症是否已轉移的方法為本領域已知的，包括骨掃描、胸部X射線、CAT掃描、MRI掃描，以及腫瘤標記物測試。「預防轉移」乙詞係指預防、延遲或減少原發性腫瘤或癌症的轉移，從而預防、延遲或減少繼發性腫瘤的發展。較佳地，預防或減少轉

移，亦即肺的繼發性腫瘤，代表預防或減少癌細胞從原發性腫瘤轉移性傳播到肺。

【0040】 本文所用之「癌症」乙詞係指增殖性疾病，例如淋巴瘤、淋巴細胞性白血病、肺癌、非小細胞肺癌(non-small cell lung, NSCL)、支氣管肺部細胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳腺癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(惡性淋巴肉瘤)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽管癌、中樞神經系統(central nervous system, CNS)的腫瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性神經膠質母細胞瘤、星狀細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤以及尤文氏肉瘤，包括上述任何癌症的難治療形式，或一或多種上述癌症之組合。

【0041】 「血管疾病」乙詞包括癌症、炎症疾病、動脈粥樣硬化、缺血、創傷、膿毒症、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、哮喘、糖尿病、年齡相關性黃斑變性(age-related macular degeneration, AMD)、視網膜病、中風、脂肪性肝炎、急性肺損傷、出血、血管滲漏，例如，細胞因子誘導的、過敏、格雷氏病(甲狀腺亢進)、橋本氏自身免疫性甲狀腺炎、原發性血小板缺乏紫斑症、巨大細胞動脈炎、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)、狼瘡性腎炎、選殖氏病(局部性迴腸炎)、多發性硬化症、潰瘍性結腸炎，特別是實質固態瘤，眼內新生血管綜合症(例如

增殖性視網膜病變或AMD)、類風濕性關節炎以及牛皮癬(Folkman, J.等人, J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931- 10934; Klagsbrun, M.等人, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239 ; 以及 Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G. K. (eds.), 第二版, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710)。

【0042】 本文所用之「抗體」乙詞意指包含通過雙硫鍵互連的四條多胜肽鏈、二條重(H)鏈以及二條輕(L)鏈的免疫球蛋白分子, 以及其多聚體(例如, IgM)。每個重鏈包含一重鏈可變區(本文縮寫為HCVR或 V_H)以及一重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域 C_{H1} 、 C_{H2} 以及 C_{H3} 。每條輕鏈包含一輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或 V_L)以及一輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域(C_{L1})。 V_H 與 V_L 區可進一步細分為稱為互補決定區(complementarity determining regions, CDRs)的高變區, 其與稱為框架區(framework regions, FR)的更保守的區域穿插。每個 V_H 與 V_L 由三個CDR以及四個FR所組成, 從胺基端到羧基端依照以下順序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本發明的不同具體實施例中, 抗CGRP抗體的FR (或其抗原結合部分)可以與人類種系的序列相同, 或者可以是天然或人工修飾的。胺基酸共有序列可以基於二個或更多個CDR的並列分析來定義。

【0043】 本文所用之「抗體」乙詞還包括全抗體分子的抗原結合片段。本文所用之抗體的「抗原結合部分」、抗體的「抗原結合片段」及其類似物包括任何天然存在的, 可透過酵素獲得的、合成的, 或遺傳工程改造的多胜肽或糖蛋白, 其特異性結合一抗原以形成一複合物。抗體的抗原結合片段可以例如使用任何合適的標準技術從全抗體分子衍生, 例如蛋白水解消化或重組基因工程

技術，該重組基因工程技術包括操縱與表現編碼抗體可變以及選擇性恆定結構域的DNA。這樣的DNA為已知的及/或可容易地從例如商業來源、DNA文庫(包括例如噬菌體抗體文庫)而獲得，或可以被合成產生。該DNA可以被定序並以化學方式操作，或透過使用分子生物學技術，例如，將一或多個可變及/或恆定結構域排列成合適的構型，或引入密碼子，產生半胱胺酸殘基，修飾、添加或刪除胺基酸等。抗原結合片段的非限制性實例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv (single-chain Fv, scFv)分子；(vi) dAb片段；以及(vii) 由模擬一抗體的高變區(例如，分離的互補決定區(CDR))的胺基酸殘基所組成的最小識別單位。其它工程化分子，例如雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體以及微型抗體也包括在本文所用之表現「抗原結合片段」內。抗體的抗原結合片段通常包含至少一個可變結構域。該可變結構域可以是任何大小或胺基酸組成，並且通常包含至少一個CDR，其與具有一或多個框架序列的框架相鄰或在框架內。在包含與一V_L結構域相關的V_H結構域的抗原結合片段中，V_H以及V_L結構域可以任何合適的排列相對於彼此定位。例如，該可變區可以是二聚的並且包含V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚體。或者，一抗體的抗原結合片段可含有單體V_H或V_L結構域。

【圖式簡單說明】

【0044】 **圖1**：顯示了在溶液結合競爭性ELISA中測量的所選之CGRP特異性脂質運載蛋白的突變蛋白(SEQ ID NOs: 2至6)與人類以及大鼠CGRP α 及 β 的結合。突變蛋白以低奈米莫耳數至雙位數奈米莫耳數EC₅₀值與所有四種CGRP種類

結合，除了SEQ ID NO: 3與SEQ ID NO: 6分別對大鼠 α CGRP以及人類 β CGRP具有較低親和力之外。所得之EC50值被總結於**實施例4**的**表1**中。

【0045】 圖2：透過SPR提供脂質運載蛋白突變蛋白SEQ ID NO: 4、SEQ ID NOs: 7至17，以及SEQ ID NO: 19至28的結合速率與解離速率的典型測量。對人類以及大鼠CGRP物種(α 以及 β)的結合速率(k_a)、解離速率(k_d)以及所得之解離常數(KD)分別總結在**實施例5**的**表2**中。

【0046】 圖3：所選之CGRP特異性脂質運載蛋白突變蛋白的功能活性的圖示。該脂質運載蛋白突變蛋白與CGRP的結合，導致藉由SK-N-MC細胞(人類腦神經上皮瘤)或L6細胞(大鼠骨骼肌成肌細胞)分別產生人類及大鼠CGRP物種(α 以及 β)的CGRP誘導的cAMP的減少。所有四種CGRP種類的IC50值在次奈米莫耳至低奈米莫耳的範圍內，並被總結於**實施例6**的**表3**中。

【0047】 圖4：顯示透過結合CGRP特異性突變蛋白，該突變蛋白中天然產生的半胱胺酸橋被以蛋白質工程技術移除，藉由SK-N-MC細胞(人類腦神經上皮瘤)產生由人類 α 及 β CGRP誘導的cAMP的抑制。與具有半胱胺酸橋的各自的親本突變蛋白(SEQ ID NO: 17以及SEQ ID NO: 27)的IC50值相較，不含半胱胺酸的突變蛋白(SEQ ID NO: 29至40)的IC50值保持不受影響，並且被總結於**實施例7**的**表4**中。

【0048】 圖5：提供透過SPR對脂質運載蛋白突變蛋白(SEQ ID NO: 87至93)的結合速率與解離速率的典型測量。所得之對人類 α CGRP的解離常數(KD)總結在**實施例9**的**表5**中。

【實施方式】

【0049】本發明提供了對CGRP具有結合特異性的多胜肽，其中該多胜肽包含以可被偵測到的親和力與CGRP結合的hNGAL突變蛋白。

【0050】於一些具體實施例中，以可被偵測到的親和力與CGRP結合的hNGAL突變蛋白可包括至少一個天然的半胱胺酸殘基被另一個胺基酸(例如絲胺酸殘基)取代的胺基酸。在一些其他的具體實施例中，以可被偵測到的親和力與CGRP結合的突變蛋白可包括取代野生型hNGAL的一或多個胺基酸的一或多個非天然半胱胺酸殘基。在另一個特定的具體實施例中，根據本發明的一個hNGAL突變蛋白包括由一個半胱胺酸殘基取代一天然胺基酸的至少二個胺基酸取代，從而形成一或多個半胱胺酸橋。於一些具體實施例中，該半胱胺酸橋可連接至少二個環區。在本文中所用的這些區域的定義係根據Flower (Flower, 1996, 同上, Flower等人, 2000, 同上) 以及Breustedt等人(2005, 同上)而來。

【0051】如本文所公開之對CGRP具有特異性的突變蛋白或其組合物，可具有針對CGRP的至少一種生物活性的拮抗劑，或中和或阻斷的活性。

【0052】於一方面，本發明包括以至少可被偵測到的親和力結合CGRP的各種hNGAL突變蛋白。在這個意義上，CGRP被認為是參考野生型hNGAL的非天然配體，其中「非天然配體」係指在生理條件下不與野生型人類脂質運載蛋白2結合的化合物。透過工程化在某些序列位置上使野生型hNGAL具有一或多個突變，本案發明人已經證明對於非天然配體CGRP的高親和力以及高特異性是有可能的。於一些具體實施例中，在編碼野生型1人類脂質運載蛋白2的某些序列位置的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或甚至更多個核苷酸三聯體處，可以藉由核苷酸三聯體的子集在這些位置的取代來進行隨機誘變。

【0053】此外，本發明的突變蛋白可以在任何一或多個位置具有突變的胺基酸殘基，包括至少在任何一個、二個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個或十二個對應於hNGAL的線性多胜肽序列的某些序列位置的序列位置上，例如人類NGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178。

【0054】本發明的突變蛋白可以包括突變的胺基酸序列位置外的「親本」蛋白質支架(例如hNGAL)的野生型(天然)胺基酸序列。於一些具體實施例中，根據本發明的一hNGAL突變蛋白還可以在一序列位置/多個位置處帶有一或多個胺基酸突變，只要這樣的突變確實至少基本上不妨礙或不干擾該突變蛋白的結合活性與折疊。這樣的突變很容易透過使用已經建立的標準方法(Sambrook, J. 等人(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第三版，冷泉港實驗室出版社，冷泉港，紐約)在DNA的層次上完成。插入或刪除以及胺基酸取代為胺基酸序列改變的說明性實例。這樣的取代可以是保守的，亦即一胺基酸殘基被一具有化學相似性質的胺基酸殘基替代，具體而言是關於極性以及大小。以下基團的成員之間的替換為保守取代的實例：1) 丙胺酸、絲胺酸以及蘇胺酸；2) 天門冬胺酸以及麩胺酸；3) 天門冬醯胺以及麩醯胺；4) 精胺酸以及離胺酸；5) 異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸以及纈胺酸；以及6) 苯丙胺酸、酪胺酸以及色胺酸。另一方面，也可能在胺基酸序列中引入非保守性改變。此外，除了單個胺基酸殘基的替代，也可以插入或刪除人類脂質運載蛋白2的一級結構的一或多個連續

胺基酸，只要這些刪除或插入產生穩定折疊/功能的突變蛋白(例如，具有截短的N-以及C-端的hNGAL突變蛋白)。在這樣的突變蛋白中，例如，在多胜肽的N-或C-端添加或刪除一或多個胺基酸殘基。通常，這樣的突變蛋白可與成熟hNGAL的胺基酸序列具有約至少70%、包括至少約80%、例如至少約85%的胺基酸序列同一性。

【0055】 當與其它脂質運載蛋白的序列同一性進行比較時，本文公開之hNGAL突變蛋白的胺基酸序列與成熟的hNGAL (SEQ ID NO: 1)具有高序列同一性。在該一般上下文中，本發明之突變蛋白的胺基酸序列至少基本上類似於天然野生型hNGAL的胺基酸序列，條件是在比對中可能存在位移(如下所定義)，其係為添加或刪除胺基酸的結果。於一些具體實施例中，本發明的突變蛋白的各自序列與成熟的hNGAL的序列基本相似，與成熟hNGAL的序列具有至少70%同一性或序列同源性、至少75%同一性或序列同源性、至少80%同一性序列同源性、至少82%同一性序列同源性、至少85%同一性或序列同源性、至少87%同一性或序列同源性，或至少90%同一性或序列同源性，包括至少95%同一性或序列同源性，條件是改變的位置或序列被保留，且可能具有一或多個位移。

【0056】 如本文所用，若本發明的突變蛋白能夠區分一目標物以及一或多個參考目標，則該突變蛋白「特異性結合」該目標物(例如，CGRP)，這是因為結合特異性並非是絕對的，而是具有相對的性質。「特異性結合」可以例如根據西方墨點法、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-測試、FACS、IHC以及胜肽掃描等方法來確定。

【0057】 於一具體實施例中，本發明的突變蛋白在其N端及/或其C端與融合配偶體融合，於一些特定的具體實施例中，該融合配偶體為一蛋白質或一蛋

白質結構域或一胜肽。於一些具體實施例中，該蛋白質結構域可以延長突變蛋白的血清半衰期。在另外的特定具體實施例中，該蛋白質結構域為一免疫球蛋白的Fc部分、一免疫球蛋白的CH3結構域、一免疫球蛋白的CH4結構域、一白蛋白結合胜肽，或一白蛋白結合蛋白。

【0058】 於另一具體實施例中，本發明的突變蛋白與一延長該突變蛋白之血清半衰期的化合物共軛結合。更佳地，該突變蛋白係與選自於由下列所組成之群組的化合物共軛結合：一聚亞烷基二醇分子、一氫乙基澱粉、一免疫球蛋白的Fc部分、一免疫球蛋白的CH3結構域、一免疫球蛋白的CH4結構域、一白蛋白結合胜肽，以及一白蛋白結合蛋白。

【0059】 於另一具體實施例中，本發明涉及包含編碼本文公開的突變蛋白的核苷酸序列的核酸分子。

【0060】 於另一具體實施例中，本發明涉及包含該核酸分子的表現載體。

【0061】 於另一具體實施例中，本發明涵蓋包含該核酸分子的宿主細胞或轉型細胞。

【0062】 於另一具體實施例中，本發明包括使用一宿主細胞或包含該核酸分子的轉型細胞以產生本文所公開之突變蛋白的方法。

【0063】 於另一具體實施例中，本發明涵蓋包含本文所公開之突變蛋白作為活性成分之醫藥組合物。

A. 對CGRP特異的示例性突變蛋白

【0064】 於一方面，本發明涉及對CGRP特異之新穎、特異性結合的人類脂質運載蛋白2 (人類Lcn2或hNGAL)的突變蛋白。

【0065】本發明之一具體實施例涉及能夠以可被偵測到的親和力結合人類 α -CGRP (SEQ ID NO: 80)與人類 β -CGRP (SEQ ID NO: 81)中的至少一種的hNGAL突變蛋白，例如當以基本上於實施例4中所述之競爭性ELISA測量時，測量的親和力為約200 nM或更低，例如約150 nM或更低的 K_D 。

【0066】於一方面，本發明提供了一種hNGAL突變蛋白，其可進一步能夠以約5 nM或更低，例如約2 nM或更低的 K_D 結合CGRP，例如，當透過Biacore T200儀器以基本上於實施例5中所述之基於SPR的分析測量時。

【0067】於一些其它的具體實施例中，以基本上於實施例6中所述之基於SK-N-MC細胞的功能分析法測量時，本發明之hNGAL突變蛋白可進一步能夠以約5 nM或更低的 IC_{50} 值，例如約1.7 nM或更低，來抑制或減少由CGRP所誘導產生的cAMP。

【0068】於一些特定的具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可進一步能夠以可被偵測到的親和力結合大鼠 α -CGRP (SEQ ID NO: 82)以及大鼠 β -CGRP (SEQ ID NO: 83)中的至少一種，例如當以基本上於實施例4中所述之競爭性ELISA測量時，測量的親和力為約200 nM或更低，例如約150 nM或更低的 K_D 。

【0069】於另一方面，本發明提供了例如當透過基本上於實施例5中所述之基於SPR的分析測量時，可進一步能夠以約5 nM或更低的 K_D 與大鼠CGRP結合的hNGAL突變蛋白。

【0070】於一些更進一步的具體實施例中，在以基本上於實施例6中所述之基於L6細胞的功能分析法測量時，本發明之hNGAL突變蛋白可進一步能夠以約5 nM或更低，例如約0.2 nM或更低的 IC_{50} 值來抑制或減少由大鼠CGRP誘導產生的cAMP。

【0071】於一些具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可以與人類CGRP以及大鼠CGRP二者進一步交叉反應。

【0072】於一些其他具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可以與人類 α -CGRP以及人類 β -CGRP二者進一步交叉反應。

【0073】於一些其他具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可以與大鼠 α -CGRP以及大鼠 β -CGRP二者進一步交叉反應。

【0074】就此而言，本發明涉及一或多種hNGAL突變蛋白，其中相較於成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白可以進一步在對應於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178的一或多個位置上包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或甚至更多個突變的胺基酸殘基，且其中該hNGAL突變蛋白以可被偵測到的親和力與CGRP結合。

【0075】於一些具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可以在對應於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132以及134的一或多個位置上進一步包含突變的胺基酸殘基。

【0076】於一些具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含至少一個以下突變的胺基酸殘基：Leu 36 → Ile、Phe、Trp、Arg或Glu；Ala 40 → Met、Trp或Thr；Ile 41 → Leu、Trp、

Gly或Glu；Gln 49 → Leu、Phe、Lys、Glu或Thr；Tyr 52 → Ala、Gly、Glu或Gln；Ser 68 → Trp、His或Asp；Leu 70 → Met、Trp、Tyr、Gly或Gln；Arg 72 → Met、Ile、Trp、Glu或Ser；Lys 73 → Ala、Glu、Thr或Gln；Asp 77 → Ile或Asn；Trp 79 → Val、Gly、His或Thr；Arg 81 → Gly、His、Glu或Asn；Asn 96 → Ala、Gly或Thr；Tyr 100 → Ile、Pro或Glu；Leu 103 → Met、Glu、Thr或Gln；Tyr 106 → Leu、Ile、Ala、His或Asn；Lys 125 → Val、Phe、Gly或Glu；Ser 127 → Phe、Trp或Arg；Tyr 132 → Leu、Ile或Trp；以及Lys 134 → Trp、His或Glu。

【0077】於一些具體實施例中，本發明之hNGAL突變蛋白可在位於該成熟hNGAL的這些序列位置上進一步包含二個或更多個，例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16，或甚至更多或所有突變的胺基酸殘基。

【0078】相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之hNGAL突變蛋白還可包含以下取代：Gln 28→His以及Cys 87→Ser。

【0079】於一些另外的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代的其中一組：

- (a) Gln 28 → His；Leu 36 → Glu；Ala 40 → Trp；Ile 41 → Gly；Gln 49 → Lys；Tyr 52 → Ala；Ser 68 → Asp；Leu 70 → Gln；Arg 72 → Ile；Lys 73 → Glu；Arg 81 → Gly；Cys 87 → Ser；Asn 96 → Ala；Tyr 100 → Glu；Leu 103 → Gln；Tyr 106 → Asn；Lys 125 → Glu；Ser 127 → Trp；Tyr 132 → Leu；Lys 134 → Trp；
- (b) Gln 28 → His；Leu 36 → Phe；Ala 40 → Met；Ile 41 → Trp；Gln 49 → Phe；Tyr 52 → Gly；Ser 68 → Trp；Leu 70 → Trp；Arg 72 → Glu；

Lys 73 → Ala ; Trp 79 → Gly ; Arg 81 → Asn ; Cys 87 → Ser ; Asn 96
 → Gly ; Tyr 100 → Pro ; Leu 103 → Met ; Tyr 106 → His ; Lys 125 →
 Glu ; Ser 127 → Phe ; Tyr 132 → Trp ; Lys 134 → Trp ;

(c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
 Thr ; Tyr 52 → Gln ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ;
 Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87
 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 →
 Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ;

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ile 41 → Glu ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 →
 Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Trp ; Lys 73 → Gln ;
 Asp 77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103
 → Thr ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Arg ; Tyr 132 →
 Trp ; Lys 134 → Glu ; 或

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Ile ; Ala 40 → Trp ; Ile 41 → Trp ; Gln 49 →
 Leu ; Ser 68 → His ; Leu 70 → Met ; Arg 72 → Met ; Lys 73 → Thr ;
 Trp 79 → Thr ; Cys 87 → Ser ; Tyr 100 → Ile ; Leu 103 → Met ; Tyr
 106 → Leu ; Lys 125 → Phe ; Ser 127 → Trp ; Tyr 132 → Trp ; Lys 134
 → His 。

【0080】 此外，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之
 hNGAL突變蛋白可進一步包含以下取代：Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 →
 Thr ; Ile 41 → Leu ; Leu 42 → Arg ; Asp 47 → Asn ; Gln 49 → Ile、Pro或Thr ; Tyr
 52 → Gln ; Thr 54 → Met、Ile或Lys ; Lys 62 → Arg ; Asn 65 → Asp ; Val 66 → Ala ;

Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Ala或Ser ; Lys 73 → Asp
 或Glu ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Arg或Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe
 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Leu或Thr ; Ile 97 → Thr ; Lys 98 → Gln ;
 Tyr 100 → His ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Val 111 → Met ;
 Lys 125 → Gly ; Val 126 → Met ; Ser 127 → Gly或Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 →
 Glu ; Thr 136 → Ile或Val ; Thr 145 → Ala , 以及Ser 146 → Asn 。

【0081】 於一些特定的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽
 序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代的
 其中一組：

- (a) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
 Ile ; Tyr 52 → Gln ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys
 73 → Glu ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 →
 Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ;
 Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ;
- (b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Leu 42 →
 Arg ; Asp 47 → Asn ; Gln 49 → Thr ; Tyr 52 → Gln ; Ser 68 → Trp ;
 Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79
 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ;
 Leu 103 → Glu ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys
 134 → Glu ;
- (c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
 Ile ; Tyr 52 → Gln ; Asn 65 → Asp ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ;

Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79
→ His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ;
Leu 103 → Glu ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Val 126 → Met ; Tyr
132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 145 → Ala ;

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Asp 47 →
Asn ; Gln 49 → Thr ; Tyr 52 → Gln ; Val 66 → Ala ; Ser 68 → Trp ;
Leu 70 → Tyr ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77
→ Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ;
Asn 96 → Thr ; Ile 97 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr
106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ;

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Ile ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu
70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 →
His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ;
Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr
132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(f) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
Pro ; Tyr 52 → Gln ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ;
Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Lys 98 →
Gln ; Tyr 100 → His ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Val 126 → Met ; Ser 127 → Gly ; Tyr 132 → Ile ;

Lys 134 → Glu ;

- (g) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Leu ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;
- (h) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;
- (i) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;
- (j) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Arg ; Trp 79 →

His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Tyr 100 → His ;
 Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser
 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146
 → Asn ;

(k) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
 Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg
 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 →
 Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ;
 Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys
 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; 或

(l) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 →
 Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Ile ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu
 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 →
 His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ;
 Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Val 111 → Met ; Lys 125 → Gly ; Ser
 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146
 → Asn 。

【0082】 另外，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之
 hNGAL突變蛋白還可包含以下取代：Cys 76→Leu、Met、Val、Ile、Phe、Arg、
 Lys或Asn以及Cys 175→Leu、Val、Phe、Trp、Tyr、Asp或Glu。

【0083】於一些特定的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代的其中一組：

- (a) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Phe ;
- (b) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Met ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Tyr ;
- (c) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Leu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Trp ;
- (d) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →

- Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu ;
- (e) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Val ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Tyr ;
- (f) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Trp ;
- (g) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Asn ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;

Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Leu ;

- (h) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Val ;
- (i) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Lys ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Asp ; 或
- (j) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 →
Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ;
Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Phe ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81
→ Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 →
Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Asp 。

【0084】此外，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下取代：Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp或Glu ; Ile 41 → Val、Thr、Ala、Arg或Glu ; Glu 44 → Lys

或Asp ; Lys 46 → Asn ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Val或Ser ; Lys 73 → Arg、Glu或Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met或Ile ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Val或Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser或Gly ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val或Thr ; Tyr 106 → Ala或Gly ; Val 108 → Ile ; Ser 112 → Asn ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu或Val ; Ser 127 → Gly、Arg或Lys ; Asn 129 → Ser ; Tyr 132 → Leu或Ser ; Lys 134 → Glu及 Ile 135 → Val。

【0085】 於一些特定的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代的其中一組：

- (a) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Glu ; Ile 41 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;
- (b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;
- (c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Arg ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ;

Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Arg ; Asp 77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Thr ; Tyr 106 → Gly ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Gly ; Tyr 132 → Ser ; Lys 134 → Glu ;

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Glu ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Gly ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Arg ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(f) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Glu 44 → Asp ; Lys 46 → Asn ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Ile 135 → Val ;

(g) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Thr ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ;

Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81
 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Asn 129 → Ser ; Tyr 132 → Leu ; Lys
 134 → Glu ;

- (h) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Thr ; Glu 44 →
 Lys ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ;
 Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81
 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;
- (i) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49 →
 Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ;
 Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 →
 Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Val 108 → Ile ; Ser 112 → Asn ;
 Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys
 134 → Glu ; 或
- (j) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49 →
 Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ;
 Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81
 → His ; Cys 87 → Gly ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ◦

【0086】另外，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之hNGAL突變蛋白還可包含以下取代：Cys 76→Leu或Tyr；Cys 175→Ile；Ile 176→Asp以及Asp 177→Gly。

【0087】於一些特定的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Leu 36 → Arg；Ala 40 → Asp；Ile 41 → Val；Gln 49 → Glu；Tyr 52 → Glu；Ser 68 → Asp；Leu 70 → Gly；Arg 72 → Val；Lys 73 → Gln；Lys 75 → Arg；Cys 76 → Leu；Asp 77 → Met；Trp 79 → Val；Ile 80 → Thr；Arg 81 → His；Cys 87 → Ser；Lys 98 → Glu；Leu 103 → Val；Tyr 106 → Ala；Asn 114 → Asp；Phe 123 → Val；Lys 125 → Leu；Ser 127 → Lys；Tyr 132 → Leu；Lys 134 → Glu；Cys 175 → Ile；Ile 176 → Asp；Asp 177 → Gly；或

(b) Leu 36 → Arg；Ala 40 → Asp；Ile 41 → Val；Gln 49 → Glu；Tyr 52 → Glu；Ser 68 → Asp；Leu 70 → Gly；Arg 72 → Val；Lys 73 → Gln；Lys 75 → Arg；Cys 76 → Tyr；Asp 77 → Met；Trp 79 → Val；Ile 80 → Thr；Arg 81 → His；Cys 87 → Ser；Lys 98 → Glu；Leu 103 → Val；Tyr 106 → Ala；Asn 114 → Asp；Phe 123 → Val；Lys 125 → Leu；Ser 127 → Lys；Tyr 132 → Leu；Lys 134 → Glu；Cys 175 → Ile；Ile 176 → Asp；Asp 177 → Gly。

【0088】此外，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，根據本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下取代與添加：Ile 8 → Lys；Pro 9 → His；Gln

28 → His ; Leu 36 → Trp或Arg ; Ala 40 → Thr或Asp ; Ile 41 → Leu或Val ; Gln 49 → Ile或Glu ; Tyr 52 → Gln或Glu ; Thr 54 → Met ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Trp或Asp ; Leu 70 → Tyr或Gly ; Arg 72 → Ala或Val ; Lys 73 → Asp或Gln ; Lys 75 → Arg ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn或Met ; Trp 79 → His或Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → Glu或His ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Glu或Val ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile或Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Gly或Leu ; Ser 127 → Asn或Lys ; Tyr 132 → Ile或Leu ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu ; Gly 178 → Asp且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1)。

【0089】 於一些特定的具體實施例中，相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，與CGRP結合的本發明之hNGAL突變蛋白可進一步包含以下胺基酸取代與添加的其中一組：

(a) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 87) ;

(b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80

→ Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ;
 Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ;
 Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu且N-端添加胺基酸Gly
 (Gln 1) (SEQ ID NO: 88) ;

(c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49
 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ;
 Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79
 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ;
 Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Gly
 178 → Asp且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 89) ;

(d) Ile 8 → Lys ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 →
 Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ;
 Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79
 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ;
 Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu且N-
 端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 90) ;

(e) Pro 9 → His ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 →
 Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ;
 Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79
 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ;

Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ;
 Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu 且 N-
 端添加胺基酸 Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 91) ;

- (f) Ile 8 → Lys ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 →
 Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ;
 Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77
 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ;
 Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe
 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134
 → Glu ; Gly 178 → Asp 且 N-端添加胺基酸 Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 92) ;
 或

- (g) Pro 9 → His ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 →
 Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ;
 Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77
 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ;
 Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe
 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134
 → Glu ; Gly 178 → Asp 且 N-端添加胺基酸 Gly (Gln 1) (SEQ ID NO:
 93) 。

【0090】 在殘基區域中，亦即與序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、
 44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、
 79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、

123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178不同的區域，本發明之hNGAL突變蛋白可包括在突變的胺基酸序列位置之外的野生型(天然)胺基酸序列。

【0091】 於另外的特定的具體實施例中，根據本發明的突變蛋白包含一選自於由SEQ ID NOs: 2-40、87-93及其功能性片段或變異體所組成之群組的胺基酸序列。於一些具體實施例中，此類片段或變體為SEQ ID NOs: 2-40、87-93中任一個所定義的突變蛋白的結構同源物。

【0092】 本發明之hNGAL突變蛋白的胺基酸序列可對一選自於由SEQ ID NOs: 2-40、87-93所組成之群組的序列具有高序列同一性，例如至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%的同一性，包括至少95%的同一性。

【0093】 仍然於一些具體實施例中，根據本發明，hNGAL突變蛋白與人類CGRP及/或大鼠CGRP為交叉反應或結合的，包含一選自於由SEQ ID NOs: 2-40、87-93及其功能性片段或變異體所組成之群組的胺基酸序列。

【0094】 本發明還包括包含一選自於由SEQ ID NOs: 2-40、87-93所組成之群組的胺基酸序列的hNGAL突變蛋白的結構同源物，相對於該hNGAL突變蛋白，其結構同源物具有大於約60%、較佳大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%、大於92%、最較佳大於95%的胺基酸序列同源性或序列同一性，並結合CGRP。

【0095】 根據本發明之hNGAL突變蛋白可透過誘變天然存在形式的人類脂質運載蛋白2的方式而獲得。於誘變的一些具體實施例中，取代(或置換)為保守取代。然而，只要該突變蛋白保留其結合CGRP的能力，及/或其與隨後被取代

的序列具有同一性，其中與該成熟人類脂質運載蛋白2的胺基酸序列 (SWISS-PROT資料庫登錄號P80188，SEQ ID NO: 1)具有至少60%、例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性，則任何取代 - 包括非保守取代或一或多個來自下文的示例性取代 - 都是可設想的。

【0096】 本發明還涉及包括至少一種本文公開的hNGAL突變蛋白或如本文所述之其共軛結合物或融合蛋白，以及醫藥上可接受的賦形劑之醫藥組合物。

【0097】 據此，本發明之hNGAL突變蛋白可使用醫藥上可接受之成分與已建立之製備方法(Gennaro and Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第20版，Lippincott Williams & Wilkins, 費城，賓州)而配製成組合物。為了製備該醫藥組合物，可以使用醫藥惰性的無機或有機賦形劑。

B. 特異於CGRP的突變蛋白之應用

【0098】 最近，Arulmozhi及其同事報告了關於偏頭痛的各種理論(*Vascular Pharmacology* 43 ; 176-187, 2005)。理論之一提出，目前未知的偏頭痛觸發物刺激支配頭部組織的三叉神經與神經節，導致神經胜肽信使分子從脈管系統上的軸突釋放。這些神經胜肽的釋放接著激活一系列事件，其結果之一為偏頭痛。此外，這些神經胜肽的釋放改變血管通透性，導致隨後的血漿蛋白在受刺激的三叉神經纖維支配的組織中的滲漏。這種滲漏導致造成偏頭痛的神經源性發炎。

【0099】 在這些神經胜肽中，CGRP已被報告在偏頭痛中具有作用，因為CGRP在感覺神經刺激時釋放並具有有效的血管擴張活性。(*Vascular Pharmacology* 43 ; 176-187, 2005)。此外，CGRP的釋放增加了在刺激這些纖維時由三叉神經纖維支配的組織中的血管滲透性以及隨後的血漿蛋白滲漏(血漿蛋白外滲)。(*Vascular Pharmacology* 43 ; 176-187, 2005)。此外，研究報告了在患有偏

頭痛的患者中輸注CGRP導致了類偏頭痛的症狀。(Cephalalgia 22(1) : 54-61, 2002)。

【0100】 歷史上，血清素5-HT_{1B}與5-HT_{1D}受體的小分子激動劑已經被用來作為偏頭痛的治療劑。這些所謂的曲坦類藥物(triptans)是有效的血管收縮劑，並且已顯示抑制由於在實驗動物偏頭痛模型中刺激三叉神經纖維引起的血漿蛋白外滲。此外，減少血漿蛋白外滲的曲坦類藥物的劑量也減弱了相同實驗動物模型中的CGRP含量。(Br. J. Pharmacology 99; 202-206, 1990; Neuropharmacology 30(11): 1193-1200, 1991)。

【0101】 儘管已經發現曲坦類藥物是有效的，但許多對曲坦類藥物治療有反應的患者在治療後數小時內經歷復發性頭痛。此外，由於曲坦類藥物為強效的血管收縮劑，它們在某些患者群體中是禁用的，例如患有高血壓或患有缺血性心臟病的患者群體。因此，可預防及/或治療偏頭痛而不帶有不想要的副作用，例如心血管相關效應，的治療化合物是需要的。

【0102】 因此，本發明之與CGRP具有結合親和力的突變蛋白的許多可能的應用存在於醫學中，例如偏頭痛、顛下頷關節疾病以及多種其他疾病，例如心臟衰竭、高血壓以及敗血症。於另一方面，本發明涉及本文公開的這種突變蛋白用於檢測樣品中的CGRP以及相應的診斷方法的用途。

【0103】 本發明還涉及所述的與CGRP具有結合親和力的一或多種突變蛋白與CGRP形成複合物的用途。

【0104】 因此，於本發明的另一方面，所公開之突變蛋白用於檢測CGRP。這樣的用途可以包括在合適的條件下使一或多種該突變蛋白與懷疑含有CGRP

的樣品接觸，從而允許在該突變蛋白以及CGRP之間形成複合物，以及通過合適的信號檢測該複合物。

【0105】 如上所述，可被偵測到的信號可以由標記所造成，或由於結合，亦即複合物形成本身的物理性質的變化所引起。其中一個實例為SPR，其數值在結合配偶體的過程中改變，其中一個配偶體固定在例如金箔的表面上。

【0106】 本文公開之突變蛋白也可用於分離CGRP。這種用途可包括在合適的條件下使一或多種該突變蛋白與假定含有CGRP的樣品接觸，從而允許在該突變蛋白與CGRP之間形成複合物，以及從樣品中分離該複合物。

【0107】 在所公開的突變蛋白用於檢測CGRP以及分離CGRP的用途中，突變蛋白及/或CGRP或其結構域或片段可以固定在合適的固相上。

【0108】 據此，可以確定分子例如CGRP在樣品中是否存在，及其濃度或含量。

【0109】 因此，本發明之突變蛋白可用於檢測及/或測量樣品中的CGRP，例如用於診斷目的。例如，突變蛋白可用於診斷以CGRP的異常表現(例如過量表現、表現不足、缺乏表現等)為特徵的病症或疾病。CGRP的示例性診斷測定可以包含，例如，使從患者體內獲得的樣品與一突變蛋白接觸，其中該突變蛋白以可被偵測到的標記或報告分子標記。或者，未標記的突變蛋白可以與自身可被偵測到標記的第二分子組合用於診斷應用中。可被偵測到的標記或報告分子可以是放射性同位素，例如³H、¹⁴C、³²P、³⁵S或¹²⁵I；螢光或化學發光部分體，例如異硫氰酸螢光素或玫瑰紅；或酵素，例如鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根過氧化物酶或螢光素酶。可用於檢測或測量樣品中CGRP的具體示例性測定法包

括酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)、放射免疫測定(RIA)以及螢光激活細胞分選(FACS)。

【0110】於另一方面，本發明之特徵在於包含根據本發明之與CGRP具有結合親和力的突變蛋白的診斷或分析檢測套組。

【0111】於另一方面，本發明還包括公開的hNGAL突變蛋白或包含本文所述之這些突變蛋白的組合用於製備醫藥組合物之用途。由此獲得之醫藥組合物可適用於降低游離的CGRP的循環含量，其可用於治療或預防個體，較佳為人類，的偏頭痛。醫藥組合物可以用來作為單一療法或組合療法。因此，本發明還提供了用於治療與失調的蛋白質血漿外滲相關的疾病或病症的hNGAL突變蛋白。

【0112】除了它們在診斷中的用途之外，於另一方面，本發明包括本發明的這種突變蛋白或包含這種突變蛋白的組合物或組合用於在個體中結合CGRP及/或減少個體體內蛋白質外滲的量。於一些具體實施例中，這樣的個體可能患有由神經胜肽釋放所引起的疾病或病症，其改變血管通透性，導致隨後由受刺激的三叉神經纖維支配的組織中血漿蛋白的滲漏。

【0113】於另一方面，本發明之特徵在於在一個體中結合CGRP的方法，包含向該個體施用一有效量的本發明之與CGRP具有結合親和力的一或多種突變蛋白或包含這種突變蛋白的一或多種組合物或組合。

【0114】於另一方面，本發明涉及用於抑制或減輕在一個體中偏頭痛之方法，包含向該個體施用有一效量的與CGRP或CGRP片段具有結合親和力的一或多種本發明之突變蛋白，或包含這種突變蛋白的一或多種組合物或組合。於一

些具體實施例中，該個體可能患有與游離的CGRP的失調含量相關的疾病或病症。

【0115】 本發明之突變蛋白或包含這樣的突變蛋白的組合物或組合可用於，特別是，個治療、預防及/或改善與CGRP活性相關的任何疾病或病症，包括與游離的CGRP的失調的含量相關的疾病或病症。

【0116】 於另一方面，本發明涉及用於抑制或降低一個體中血漿蛋白外滲之方法，包含向該個體施用一有效量的與CGRP具有結合親和力的本發明之一或多種突變蛋白或其片段，或包含這種突變蛋白的一或多種組合物或組合。

【0117】 例如，該突變蛋白或包含本發明之這種突變蛋白的組合物或組合可被用於降低游離的CGRP的循環含量。

【0118】 於一些其他的具體實施例中，本發明之突變蛋白或包含該突變蛋白的組合物或組合也可用於治療、預防及/或改善偏頭痛。

【0119】 根據本發明之hNGAL突變蛋白或包含這種突變蛋白的組合物或組合可通過治療上有效的任何腸胃外或非腸胃外(例如腸內)的途徑而被施用。治療上有效的途徑提供將一試劑遞送到所需的隔室、系統或位置。例如，治療上有效的途徑是可以通過該途徑施用一試劑，以在期望的作用部位上提供足以實現有益或期望的臨床結果的用量的試劑。

C. 本發明的突變蛋白

【0120】 當本文的上下文中使用結合CGRP的本發明突變蛋白時，「對...特異性」乙詞包括突變蛋白針對CGRP、結合CGRP或與CGRP反應。因此，涉及、結合或反應包括突變蛋白特異性結合CGRP。在本文中，「特異性」乙詞係指如本文所述之突變蛋白與CGRP反應，但基本上不與另一目標物反應。可以容易地

特別是透過比較本發明之hNGAL突變蛋白與CGRP的反應以及該突變蛋白與(一或多個)其他目標物的反應來測試突變蛋白是否如上文所定義的特異性地反應。

「特異性結合」也可以例如根據西方墨點法、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-測試、FACS、IHC以及勝肽掃描等方法來確定。

【0121】 當相較於另一種脂質運載蛋白(亦參閱上文)的序列同一性時，根據本發明之突變蛋白的胺基酸序列與人類脂質運載蛋白2具有高的序列同一性。在該一般上下文中，根據本發明之組合的突變蛋白的胺基酸序列至少基本上類似於對應脂質運載蛋白(野生型hNGAL)的胺基酸序列。根據本發明之組合的突變蛋白的對應序列基本上與成熟hNGAL的序列相似，例如與成熟hNGAL的序列有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少82%、至少85%、至少87%、至少90%的同一性，包括至少95%的同一性。於此方面，本發明之突變蛋白當然可以包含比較如本文所述之使得突變蛋白能夠結合CGRP的取代。通常，相對於hNGAL的天然序列，hNGAL的突變蛋白包括在hNGAL的配體結合位點的開放端處的四個環中胺基酸的一或多個突變。如上所述，這些區域在確定突變蛋白對CGRP的結合特異性中是必需的。突變蛋白衍生的hNGAL或其同源物可以在N端區域中及/或在佈置在位於與天然結合口袋相對的 β -桶狀結構的端部的三個勝肽環BC、DE以及FG中的任何序列位置處具有一個、二個、三個、四個或更多個突變的胺基酸殘基。於一些特定的具體實施例中，根據本發明之hNGAL突變蛋白包含SEQ ID NOs: 2-40、87-93之一的四個環，其係一起限定CGRP的結合口袋。

【0122】 相較於對應的天然hNGAL，根據本發明之突變蛋白包括一或多個，例如二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、

十五、十六、十七、十八、十九或甚至二十個取代，條件是這樣的突變蛋白應能夠結合CGRP。例如，一突變蛋白可以在對應於hNGAL的不同位置(即在相應位置)的位置具有取代。於一些具體實施例中，根據本發明之組合的突變蛋白包括透過精胺酸殘基對天然胺基酸的至少二個胺基酸進行取代，包括2、3、4、5或甚至更多個胺基酸取代。因此，本文所述之蛋白質「參考」支架的核酸進行誘變，目的是產生能夠結合CGRP的突變蛋白。

【0123】此外，本發明之突變蛋白可以在其N或C端，較佳在C端，包含異源胺基酸序列，例如Strep-標籤，例如Strep II標籤，而不影響生物活性(結合其目標物，例如CGRP)的突變蛋白。

【0124】特定而言，為了確定一突變蛋白胺基酸序列的胺基酸殘基是否在對應於野生型hNGAL的胺基酸序列中的某個位置與野生型hNGAL不同，本領域技術人員可以使用本領域習知的手段及方法，例如，手動地或使用電腦程式，例如BLAST2.0，其代表基本局部比對搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)或ClustalW或適合產生序列比對的任何其它合適的程式，而進行比對。據此，野生型hNGAL可作為「主題序列(subject sequence)」或「參考序列」，而不同於本文所述之野生型hNGAL的突變蛋白的胺基酸序列則作為「查詢序列」。「參考序列」與「野生型序列」等詞在本文中可互換使用。

【0125】於一些具體實施例中，取代(或置換)為保守取代。然而，只要該突變蛋白保留其結合CGRP的能力，及/或其與隨後被取代的序列具有同一性，其中與「原始」序列具有至少60%、例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或更高的同一性，則任何取代 - 包括非保守取代或一或多個來自下文的示例性取代 - 都是可設想的。

【0126】 保守取代通常是根據待突變的胺基酸列出的以下取代，每個胺基酸後面是可被認為是保守的一或多個替代：Ala → Gly、Ser、Val；Arg → Lys；Asn → Gln、His；Asp → Glu；Cys → Ser；Gln → Asn；Glu → Asp；Gly → Ala；His → Arg、Asn、Gln；Ile → Leu、Val；Leu → Ile、Val；Lys → Arg、Gln、Glu；Met → Leu、Tyr、Ile；Phe → Met、Leu、Tyr；Ser → Thr；Thr → Ser；Trp → Tyr；Tyr → Trp、Phe；Val → Ile、Leu。其他取代也是允許的，並且可以憑經驗或根據其他已知的保守或非保守取代來確定。作為進一步的定向，以下八組各自含有通常可用於定義彼此的保守取代的胺基酸：

- a. 丙胺酸(Ala)，甘胺酸(Gly)；
- b. 天門冬胺酸(Asp)，麩胺酸(Glu)；
- c. 天門冬醯胺(Asn)，麩醯胺(Gln)；
- d. 精胺酸(Arg)，離胺酸(Lys)；
- e. 異白胺酸(Ile)，白胺酸(Leu)，甲硫胺酸(Met)，纈胺酸(Val)；
- f. 苯丙胺酸(Phe)，酪胺酸(Tyr)，色胺酸(Trp)；
- g. 絲胺酸(Ser)，蘇胺酸(Thr)；以及
- h. 半胱胺酸(Cys)，甲硫胺酸(Met)。

【0127】 如果這樣的取代導致生物活性的改變，則可引入更實質性的改變，例如以下，或如下文關於胺基酸類別的進一步描述，並篩選所需特性的產物。這些更實質性的改變的例子為：Ala → Leu、Ile；Arg → Gln；Asn → Asp、Lys、Arg、His；Asp → Asn；Cys → Ala；Gln → Glu；Glu → Gln；His → Lys；Ile → Met、Ala、Phe；Leu → Ala、Met、正白胺酸(Norleucine)；Lys → Asn；

Met → Phe ; Phe → Val 、 Ile 、 Ala ; Trp → Phe ; Tyr → Thr 、 Ser ; Val → Met 、 Phe 、 Ala 。

【0128】 hNGAL的生物學性質的實質性修飾透過選擇在維持以下各方面有顯著不同效果的取代而達成：(a) 在取代區域中多胜肽骨架的結構，例如，作為片層或螺旋構象，(b) 在該目標點之分子的電荷或疏水性，或(c) 側鏈的體積。基於共同的側鏈特性將天然存在的殘基分成以下組別：(1) 疏水性：正白胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸；(2) 中性親水性：半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸；(3) 酸性：天門冬胺酸、麩胺酸；(4) 鹼性：天門冬醯胺、麩醯胺、組胺酸、離胺酸、精胺酸；(5) 影響鏈取向的殘基：甘胺酸、脯胺酸；以及(6) 芳香族：色胺酸、酪胺酸、苯丙胺酸。

【0129】 非保守性取代將需要將這些類別之一的成員交換為另一類別。不參與維持hNGAL的正確構象的任何半胱胺酸殘基也可被取代，通常以絲胺酸取代，以改善分子的氧化穩定性並防止異常交聯。相反地，可加入半胱胺酸鍵以提高其穩定性。

【0130】 任何突變，包括如上所述之插入，可以使用已建立的標準方法在核酸上，例如，DNA層次，非常容易地完成。胺基酸序列改變的說明性實例為插入或刪除以及胺基酸取代。這樣的取代可以是保守的，亦即胺基酸殘基被具有化學相似性質的胺基酸殘基替代，特別是關於極性以及大小。以下基團的成員之間的替換為保守取代的實例：1)丙胺酸、絲胺酸以及蘇胺酸；2)天門冬胺酸以及麩胺酸；3)天門冬醯胺以及麩醯胺；4)精胺酸以及離胺酸；5)異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸以及纈胺酸；以及6)苯丙胺酸、酪胺酸以及色胺酸。另一方面，也可能在胺基酸序列中引入非保守性改變。此外，除了單個胺基酸殘基的替代，

也可插入或刪除hNGAL的一級結構的一或多個連續胺基酸，只要這些刪除或插入導致具有穩定的折疊/功能的突變蛋白。

【0131】 胺基酸序列的修飾包括單個胺基酸位置的定向誘變，以便通過併入某些限制酶的切點來簡化突變的hNGAL基因或其部分的次選植株。此外，還可併入這些突變以進一步改善突變蛋白對於例如CGRP的給定目標物的親和力。此外，可以引入突變以調節突變蛋白的某些特徵，例如改善折疊穩定性、血清穩定性、蛋白質抗性或水溶性，或者如果必要的話，降低聚集傾向。例如，天然存在的半胱胺酸殘基可以突變成其它胺基酸以防止二硫橋的形成。亦可故意將其它胺基酸序列位置突變為半胱胺酸，以便引入新的反應性基團，例如用於与其它化合物如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、羥乙基澱粉(hydroxyethyl starch, HES)、生物素、胜肽或蛋白質的共軛結合，或用於形成非天然存在的雙硫鍵。所產生的硫醇部分體可用於將該突變蛋白聚乙二醇化(PEGylate)或羥乙基澱粉化(HESylate)，例如，以便增加相應突變蛋白的血清半衰期。

【0132】 還可將其它胺基酸序列位置突變為半胱胺酸，以便引入新的反應性基團，例如，用於与其它化合物如聚乙二醇(PEG)、羥乙基澱粉(HES)、生物素、胜肽或蛋白質的共軛結合，或用於形成非天然存在的雙硫鍵。

【0133】 於一些具體實施例中，若上述部分體之一與本發明之突變蛋白共軛結合，則與胺基酸側鏈的共軛結合可能是有利的。合適的胺基酸側鏈可以天然存在於hNGAL的胺基酸序列中，或者可以通過誘變引入。在通過誘變引入合適的結合位點的情況下，一種可能性是在合適位置的胺基酸被半胱胺酸殘基替代。

【0134】關於人類脂質運載蛋白2的突變蛋白，這種突變將半胱胺酸殘基引入脂質運載蛋白的胺基酸序列(包括人類脂質運載蛋白2突變蛋白)的示例性可能性包括，引入半胱胺酸(Cys)殘基在對應於人類NGAL的野生型序列的序列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146或158的至少一個序列位置。於一些具體實施例中，其中相較於SWISS-PROT/UniProt資料庫登錄號P80188的序列，本發明之人類脂質運載蛋白2突變蛋白具有一序列，其中一半胱胺酸已被另一胺基酸殘基替換，相應的半胱胺酸可以被重新引入到序列中。作為說明性實例，在這種情況下，可以透過回復到最初存在於SWISS-PROT登錄號P80188 (SEQ ID NO: 1)的序列中的半胱胺酸來引入胺基酸位置87處的半胱胺酸殘基。在任何胺基酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146及/或158的側面產生的硫醇部分體可被用於將該突變蛋白聚乙二醇化(PEGylate)或羥乙基澱粉化(HESylate)，例如，以增加相應的人類脂質運載蛋白2突變蛋白的血清半衰期。

【0135】於另一個具體實施例中，為了提供合適的胺基酸側鏈以用於將上述化合物之一共軛結合到根據本發明之突變蛋白上，可透過誘變引入人工胺基酸。通常，將這些人工胺基酸設計為更具反應性，從而促進與所需化合物的共軛結合。對乙醯基-苯丙胺酸為可透過人工tRNA導入的這種人工胺基酸的一個實例。

【0136】於一些具體實施例中，本發明之突變蛋白可在其N端或其C端融合至一蛋白質、蛋白質結構域或胜肽，例如信號序列及/或親和標籤。

【0137】親和標籤例如Strep-tag[®]或Strep-tag[®] II (Schmidt, T.G.M. 等人 (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766)、myc-tag、FLAG-tag、His₆-tag或HA-tag或蛋白

質，例如穀胱甘肽-S-轉移酶也允許容易地檢測及/或純化重組蛋白質，為合適的融合配偶體的另一實例。最後，具有產生顏色或螢光性質的蛋白質，例如綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)或黃色螢光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)也是本發明的突變蛋白的合適的融合配偶體。

【0138】 通常，可以用任何合適的化學物質或酵素來標記本發明之突變蛋白，其在化學、物理、光學或酶促反應中直接或間接產生可被偵測到的化合物或信號。物理反應以及同時光學反應/標記的實例為，當使用放射性標記時在照射時發射螢光或發射X射線。鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶以及 β -半乳糖苷酶則為催化顯色反應產物形成的酵素標記(同時為光學標記)的實例。一般而言，通用於抗體的所有標記(除了那些專門與免疫球蛋白的Fc部分中的糖部分體一起使用的除外)也可用於與本發明之突變蛋白共軛結合。本發明之突變蛋白還可與任何合適的治療活性劑共軛結合，例如用於將這些試劑有目標地遞送至給定的細胞、組織或器官，或用於選擇性標定細胞，例如腫瘤細胞，而不影響周圍的正常細胞。這種治療活性劑的實例包括放射性核素、毒素、小的有機分子以及治療性胜肽(例如作為細胞表面受體的激動劑/拮抗劑的胜肽或競爭給定細胞目標物上的蛋白質結合位點的胜肽)。然而，本發明之突變蛋白也可以與治療活性核酸共軛結合，例如反義核酸分子、小干擾RNA、微RNA或核酶。這樣的共軛結合物可通過本領域熟知的方法製備。

【0139】 如上所述，於一些具體實施例中，本發明之突變蛋白可與延長突變蛋白的血清半衰期的部分體共軛結合(在這方面，亦參閱PCT公開號WO 2006/56464，其中這樣的共軛結合策略以引用對CTLA-4具有結合親和力的人類嗜中性白血球明膠酶相關脂質運載蛋白的突變蛋白來描述)。延長血清半衰期的

部分體可為聚亞烷基二醇分子、羥乙基澱粉、脂肪酸分子，例如棕櫚酸(Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* **52**, 1-9)，免疫球蛋白的Fc部分、免疫球蛋白的CH3結構域、免疫球蛋白的CH4結構域、白蛋白結合胜肽或白蛋白結合蛋白、轉鐵蛋白，以上僅舉出幾個例子而已。白蛋白結合蛋白可為細菌白蛋白結合蛋白、抗體、包括結構域抗體的抗體片段(例如，參閱美國專利號6,696,245)或對白蛋白具有結合活性的突變蛋白。據此，用於延長本發明之突變蛋白半衰期的合適共軛結合配偶體包括，白蛋白結合蛋白，例如細菌白蛋白結合結構域，例如鏈球菌蛋白G (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83)。可作為共軛結合配偶體的白蛋白結合胜肽的其它實例為，例如包含Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys共有序列的那些，其中Xaa₁為Asp、Asn、Ser、Thr或Trp；Xaa₂為Asn、Gln、His、Ile、Leu或Lys；Xaa₃為Ala、Asp、Phe、Trp或Tyr；以及Xaa₄為如美國專利申請案2003/0069395(透過引用方式整體併入本文)中所述之Asp、Gly、Leu、Phe、Ser或Thr，或Dennis等人所述者(Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35035-35043)。

【0140】於其他具體實施例中，白蛋白本身(Osborn, B.L.等人, 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548)或白蛋白的生物活性片段可作為本發明突變蛋白的共軛結合配偶體。「白蛋白」乙詞包括所有哺乳類動物的白蛋白，例如人類血清白蛋白，或牛血清白蛋白，或大鼠白蛋白。白蛋白或其片段可以如美國專利號5,728,553或歐洲專利申請號EP 0 330 451以及EP 0 361 991(透過引用方式整體併入本文)中所述方式重組產生。重組人類白蛋白(Recombunin®)

(Novozymes Delta有限公司)(諾丁罕，英國)可與本發明之突變蛋白共軛結合或融合，以延長突變蛋白的半衰期。

【0141】 若白蛋白結合蛋白為抗體片段，其可為結構域抗體。結構域抗體(Domain Antibodies, dAbs)被工程化以允許精確控制生物物理性質以及體內半衰期，以產生最佳的安全性以及有效性產品概況。結構域抗體例如可從Domantis有限公司(英國劍橋以及美國麻州)購買而取得。

【0142】 使用轉鐵蛋白作為部分體以延長本發明之突變蛋白的血清半衰期，突變蛋白可以遺傳融合到非糖基化轉鐵蛋白的N或C端或二者。非糖基化的轉鐵蛋白具有14-17天的半衰期，轉鐵蛋白融合蛋白將類似地具有延長的半衰期。轉鐵蛋白載體還提供高的生物利用度、生物分佈以及循環穩定性。該技術可從BioRexis (BioRexis Pharmaceutical公司，賓州，美國)購買取得。作為蛋白質穩定劑/半衰期延伸的配偶體的重組人類轉鐵蛋白(DeltaFerrin™)也可從Novozymes Delta有限公司)(諾丁罕，英國)購買取得。

【0143】 若免疫球蛋白的Fc部分被用於延長本發明之突變蛋白的血清半衰期的目的，則可使用可從Syntonix Pharmaceuticals公司(麻州，美國)購買取得之SynFusion™技術。使用這種Fc-融合技術可產生更長效的生物藥物，並可例如由連接到抗體的Fc區的二個複製的突變蛋白組成，以改善藥物動力學、溶解度以及生產效率。

【0144】 延長本發明之突變蛋白的半衰期的另一替代方案為，將突變蛋白的N-或C-端融合為長的、非結構化的、柔性的富含甘胺酸的序列(例如具有約20個至80個連續的甘胺酸殘基的聚甘胺酸)。例如，WO2007/038619中公開的該方法也稱為「rPEG」(重組PEG)。

【0145】若聚亞烷基二醇被用來作為共軛結合配偶體，則聚亞烷基二醇可為被取代的、未被取代的、直鏈或支鏈的。它也可以是活化的聚亞烷基衍生物。合適的化合物的實例為如WO 99/64016、美國專利號6,177,074或美國專利號6,403,564中所描述之關於干擾素的聚乙二醇(PEG)分子，或如關於其它蛋白質所述之聚乙二醇(PEG)分子，例如PEG修飾的天門冬醯胺酶、PEG-腺苷脫胺酶(PEG-ADA)或PEG-超氧化物歧化酶(參閱例如Fuertges等人(1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release* **11**, 139-148)。這種聚合物如聚乙二醇的分子量可為約300至約70,000道爾頓，包括例如分子量為約10,000、約20,000、約30,000或約40,000道爾頓的聚乙二醇。此外，描述於美國專利號6,500,930或6,620,413中，為了延長血清半衰期之目的，碳水化合物低聚物以及聚合物，例如澱粉或經乙基澱粉(HES)可共軛結合至本發明之突變蛋白。

【0146】此外，本文公開之突變蛋白可與部分體融合，可賦予本發明之突變蛋白新的特徵，例如酵素活性或對其他分子的結合親和力。合適的融合配偶體的實例為鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、穀胱甘肽-S-轉移酶、蛋白G的白蛋白結合結構域、蛋白A、抗體片段、寡聚結構域或毒素。

【0147】具體而言，可能將本文公開之突變蛋白與單獨的酵素活性位點融合，使所得之融合蛋白的「組分」一起作用於給定的治療目標物。突變蛋白的結合結構域附著於致病目標物，使酵素結構域消除目標物的生物學功能。

【0148】本發明還涉及包括編碼本發明之突變蛋白的核苷酸序列的核酸分子(DNA以及RNA)。由於遺傳密碼的簡併性允許某些密碼子被指定相同胺基酸的其他密碼子取代，本發明不限於編碼本文所述之突變蛋白的特定核酸分

子，而是包括所有核酸分子，其包括編碼一功能突變蛋白的核苷酸序列。在這方面，本發明提供了編碼本發明之一些突變蛋白的核苷酸序列，如SEQ ID NOs: 41-79、94-100所示。

【0149】 於本發明之一具體實施例中，該方法包括使該核酸分子在編碼對應於該人類NGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178一或多個序列位置上胺基酸的核苷酸三聯體處進行誘變。

【0150】 本發明還包括編碼本發明之突變蛋白的核酸分子，其包括在實驗誘變的指定序列位置之外的額外突變。這樣的突變通常是耐受的或甚至可證明是有利的，例如若其有助於改進突變蛋白的折疊效率、血清穩定性、熱穩定性或配體結合親和力。

【0151】 本申請中公開的核酸分子可與一調節序列(或複數個調節序列)「可操作地連接」以允許該核酸分子的表現。

【0152】 核酸分子，例如DNA，被稱為「能夠表現核酸分子」或能夠「允許核苷酸序列表現」，如果它包括含有關於轉錄及/或轉譯調節訊息的序列元件，且這樣的序列與編碼多胜肽的核苷酸序列「可操作地連接」。可操作的連接為一種連接，其中調節序列元件以及待表現的序列以使得能夠進行基因表現的方式被連接。基因表現所需的調節區的精確性質可以隨著物種而變化，但是通常這些區域包括在原核生物中含有啟動子本身，亦即指導轉錄起始的DNA元件，

以及DNA元件其在轉錄為RNA時將發出轉譯起始的信號。此類啟動子區域通常包括涉及轉錄以及轉譯起始的5'非編碼序列，例如原核生物中的-35/-10盒以及Shine-Dalgarno元件或TATA盒、CAAT序列，以及在真核生物中的5'-封端元件。這些區域還可包括增強子或抑制子元件以及轉譯的信號與前導序列，用於將天然多胜肽把宿主細胞的特定區室作為目標。

【0153】此外，3'非編碼序列可含有涉及轉錄終止、多聚腺苷酸化或其類似物的調節元件。然而，若這些終止序列在特定宿主細胞中不具有令人滿意的功能，則它們可以被在該細胞中有作用的信號所取代。

【0154】因此，本發明之核酸分子可包括調節序列，例如啟動子序列。於一些具體實施例中，本發明之核酸分子包括啟動子序列以及轉錄終止序列。合適的原核啟動子為例如*tet*啟動子、*lacUV5*啟動子或T7啟動子。用於在真核細胞中表現的啟動子的實例為SV40啟動子或CMV啟動子。

【0155】本發明之核酸分子還可為載體或任何其他類型的選殖載體的一部分，例如質體、噬質體、噬菌體、桿狀病毒，黏粒或人工染色體。

【0156】於一具體實施例中，核酸分子包括在質體中。質體載體表示編碼一溫度噬菌體，例如M13或f1，的基因間區域或其與感興趣的cDNA融合的功能部分的載體。在以這樣的噬質體載體以及適當的輔助噬菌體(例如M13K07、VCS-M13或R408)重新感染細菌宿主細胞後，產生完整的噬菌體顆粒，從而使編碼的異源cDNA與其在該噬菌體表面上展示的相應多胜肽物理偶合(參見例如Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 401-424，或Rodi, D.J., 及Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87-93)。

【0157】除了上述調節序列以及編碼本文所述之突變蛋白的核酸序列之外，這樣的選殖載體可包括來源於與用於表現的宿主細胞相容的物種的複製與控制序列，以及選擇在轉化或轉染的細胞上賦予可選擇表型的標記。大量合適的選殖載體為本領域已知的，並可購買取得。

【0158】編碼本文所述之突變蛋白的DNA分子，特別是含有這種突變蛋白的編碼序列的選殖載體可以轉化到能夠表現該基因的宿主細胞中。可以使用標準技術進行轉化。因此，本發明還涉及含有本文公開之核酸分子的宿主細胞。

【0159】在適於表現編碼本發明融合蛋白的核苷酸序列的條件下培養轉化的宿主細胞。合適的宿主細胞可為原核的，例如大腸桿菌(*E. coli*)或枯草芽孢桿菌，或為真核的，例如釀酒酵母、巴斯德畢赤酵母、SF9或High5昆蟲細胞、永生哺乳類動物細胞株(例如HeLa細胞或CHO細胞)或原代哺乳類動物細胞。

【0160】本發明還涉及用於產生如本文所述之突變蛋白的方法，其中透過遺傳工程方法由編碼突變蛋白的核酸開始產生突變蛋白或多胜肽、突變蛋白的片段或突變蛋白的融合蛋白，或多胜肽。該方法可以在活體內進行，突變蛋白或多胜肽可以例如在細菌或真核宿主生物體中產生，然後從該宿主生物體或其培養物中分離。亦可在體外產生蛋白質，例如透過使用體外轉譯系統。

【0161】當在活體內產生突變蛋白時，透過重組DNA技術(如上所述)將編碼這種突變蛋白或多胜肽的核酸引入合適的細菌或真核宿主生物體中。為此目的，首先使用建立的標準方法，將包括編碼本文所述之突變蛋白的核酸分子的選殖載體轉化至宿主細胞中。然後在允許異源DNA表現並因此表現相應多胜肽合成的條件下培養該宿主細胞。隨後，從細胞或從培養基回收該多胜肽。

【0162】於一些具體實施例中，本申請中公開的核酸分子，例如DNA，可與本發明之另一核酸分子「可操作地連接」，以允許本發明之融合蛋白的表現。在這點上，可操作的連接為一種連接，其中第一核酸分子的序列元件以及第二核酸分子的序列元件以能夠使融合蛋白作為單個多胜肽表現的方式連接。

【0163】此外，於一些具體實施例中，可以在本發明之hNGAL突變蛋白中去除Cys 76以及Cys 175之間天然存在的雙硫鍵。因此，這樣的突變蛋白可以在具有還原性氧化還原環境的細胞區室中產生，例如在革蘭氏陰性細菌的細胞質中。

【0164】在本發明之突變蛋白包括分子內雙硫鍵的情況下，可較佳使用適當的信號序列將新生多胜肽導向具有氧化性氧化還原環境的細胞區室。這種氧化環境可由革蘭氏陰性細菌，如大腸桿菌，的周質、在革蘭氏陽性細菌的細胞外環境中，或在真核細胞的內質網的腔中提供，並且通常有利於形成結構雙硫鍵。

【0165】然而，亦可在宿主細胞，較佳為大腸桿菌，的胞質溶膠中產生本發明之突變蛋白。在這種情況下，突變蛋白或多胜肽可以可溶性及折疊狀態直接獲得，或以包涵體的形式回收，然後在體外復性。另一選擇為使用具有氧化細胞內環境的特異性宿主菌株，其因此可允許在胞質溶膠中形成雙硫鍵(Venturi等人(2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 1-8.)。

【0166】然而，本文所述之突變蛋白或多胜肽不一定僅透過使用遺傳工程產生或生產。相反地，這樣的突變蛋白或多胜肽也可透過化學合成如Merrifield固相多胜肽合成，或透過體外轉錄以及轉譯而獲得。例如可能為，使用分子模擬鑑定出有希望的突變，然後在體外合成想要的(設計的)多胜肽並研究CGRP的

結合活性。用於蛋白質的固相及/或溶液相合成的方法為本領域眾所周知的(參見例如Bruckdorfer, T.等人(2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 29-43)。

【0167】 於另一具體實施例中，本發明之突變蛋白或多胜肽可透過使用本領域技術人員已知的方法通過體外轉錄/轉譯來產生。

【0168】 本領域技術人員將理解可用於製備本發明考慮之突變蛋白或其多胜肽的方法，但其蛋白質或核酸序列未在本文中公開。作為概述，胺基酸序列的這種修飾包括，例如單個胺基酸位置的定向誘變，以便透過摻入某些限制酶的切點來簡化突變的hNGAL基因或其部分的次選殖。此外，亦可併入這些突變以進一步改善突變蛋白對其目標物(例如CGRP)的親和力。此外，如果需要，可引入突變以調節突變蛋白的某些特徵，例如改善折疊穩定性、血清穩定性、蛋白質抗性或水溶性或降低聚集傾向。例如，天然存在的半胱胺酸殘基可以被突變為其它胺基酸以防止形成二硫橋。

【0169】 本文公開之突變蛋白或其多胜肽及其衍生物可用於與抗體或其片段相似的許多領域。例如，突變蛋白可用於用酵素、抗體、放射性物質或具有生化活性或確定的結合特性的任何其它基團標記。透過這樣進行，可檢測其各自的目標物或其共軛結合物或其融合蛋白，或使其與之接觸。此外，本發明之突變蛋白或其多胜肽可用於透過已建立的分析方法(例如，ELISA或西方墨點法)，或透過顯微鏡或免疫傳感器來檢測其化學結構。在這方面，檢測信號可透過使用合適的突變蛋白共軛結合物或融合蛋白直接產生，或透過經由抗體結合突變蛋白的免疫化學檢測而間接產生。

【0170】 在研究了以下實施例及其附圖之後，本發明之額外的目的、優點以及特徵對本領域技術人員而言將變得顯而易見，所述實施例及附圖並非意圖

作為限制性的。因此，應當理解的是，雖然本發明透過示例性具體實施例與具有選擇性的特徵而具體公開，但本文所公開之內容的修改及變化可由本領域技術人員採取，並認為這樣的修改及變化在本發明的範圍內。

【實施例】

【0171】 實施例1：降鈣素基因相關胜肽的胜肽合成與生物素化作用

【0172】 降鈣素基因相關胜肽(CGRP)是一種神經活性胜肽。其具有二種不同的同功型， α 與 β CGRP，並透過胜肽合成(SEQ ID NOs: 80至83)產生來自人類與大鼠的二種同功型。將胜肽溶液均等分於矽化的1.5-mL管(ThermoFisher公司, No. 02-681-320)中，並在矽化的1.5-mL管(Thermo Fisher公司, No. 02-681-320)中透過速度真空濃縮系統凍乾。為了重新溶解胜肽，加入0.5% AcOH，並以輕敲或吸移方式徹底混合。

【0173】 為了選擇並篩選有興趣的突變蛋白，可將CGRP胜肽生物素化。關於此點，在合成期間，生物素基團直接偶合到胜肽的N-端胺基酸的NH₂基團。

【0174】 實施例2：使用噬菌體展示與高通量ELISA篩選來選擇並鑑定特異性結合CGRP的突變蛋白

【0175】 藉由成熟hNGAL的隨機誘變所產生的基於hNGAL的文庫被用來選擇特異性結合不同CGRP目標物的突變蛋白。四種生物素化的人類與大鼠CGRP α 及 β 形式在獨立的噬菌體展示以及選擇過程中，在整個四輪選擇中作為單一試劑，或交替使用。

【0176】 來自這些文庫的 2×10^{12} 噬質體與200或500 nM生物素化的目標物共同培養。以中性鏈親和素或鏈黴親和素包被的順磁珠被用於捕獲目標物/噬質體複合物，隨後以磁鐵分離。透過以PBST或PBS洗滌珠子以除去未結合的噬質

體。首先以300 μ l 70 mM三乙胺洗脫結合的噬質體10分鐘，然後以100 μ l 1M Tris-Cl pH 6.0立即中和該上清液。在一個中間洗滌循環後，剩餘的噬質體以100 mM甘胺酸pH 2.2洗脫10分鐘，然後以50 μ l 0.5M Tris-鹼立即中和。合併二個洗脫液收集的區段並用於感染4 mL大腸桿菌XL1-blue培養物(OD₅₅₀ 0.45-0.6)以進行再擴增。在攪拌下共同培養30分鐘後，透過在5000 \times g離心2分鐘以收集細菌，重新懸浮於1mL 2xYT培養基中，並鋪板於三個大的LB/Amp瓊脂平板上(10 g/l 細菌胰蛋白胨、5 g/l酵母萃取物、5 g/l NaCl，pH7.5，15 g/l瓊脂、100 μ g/mL氨苄青黴素)。將培養盤置於32 $^{\circ}$ C培養整夜。使用補充有100 μ g/mL氨苄青黴素的50mL 2xYT培養基(2xYT/Amp)從瓊脂平板上刮下感染的細胞。以適當體積的細菌懸浮液接種50 mL 2xYT/Amp培養基以達到OD₅₅₀為0.08。將培養物於37 $^{\circ}$ C下在振盪器(160 rpm)上培養直至OD₅₅₀達到0.5，然後通過在輕微攪拌下培養15分鐘並於37 $^{\circ}$ C下以振盪器培養45分鐘，以感染輔助噬菌體(1.5×10^{11} pfu)。隨後，加入卡那黴素至終濃度為70 μ g/mL，以選擇被輔助噬菌體感染的細菌。最後，藉由加入25 ng/mL脫水四環素以誘導pIII-hNGAL突變蛋白的表現。

【0177】 在24 $^{\circ}$ C下培養15小時後，以離心(5000xg，20分鐘)清除培養物的上清液。隨後，將20 mL上清液通過孔徑為0.22 μ m的聚醚砜膜。於濾液中加入5 mL含有20% (w/v) PEG-8000以及15% (w/v) NaCl的水溶液，並輕輕混合。將溶液在冰上靜置30分鐘，然後於4 $^{\circ}$ C下以5000xg離心20分鐘。將含有噬質體的沉澱物溶解在含有200 mM硼酸、160 mM NaCl以及1 mM EDTA的1 mL緩衝液中。以離心(5000xg，5分鐘)除去不溶性顆粒。將上清液轉移到新試管中，並與200 μ l含有20% (w/v) PEG-8000以及15% (w/v) NaCl的水溶液混合。將溶液在冰上靜置30分

鐘，隨後以離心(5000xg，5分鐘)收集沉澱的噬質體。將噬質體重新懸浮於補充有50 mM苯脒的PBS中，並用於下一輪噬質體選擇。進行四個連續循環的選擇。

【0178】 從以第四輪選擇輸出感染的大腸桿菌細胞製備噬質體DNA，透過以BstX1消化DNA並隨後使用標準方法以瓊脂糖凝膠電泳進行純化來分離hNGAL突變蛋白匣(Sambrook等人，(1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*)。將hNGAL突變蛋白匣插入同樣切割的載體中，這使得細菌在四環素啟動子的控制下產生hNGAL突變蛋白。CaCl₂-勝任TG1-F-細胞以該連接混合物進行轉型作用，並接種於LB/Amp培養盤上。

【0179】 為了優化CGRP特異性突變蛋白，使用選擇位置的偏向隨機化或基於易錯的聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction，PCR)之方法，基於突變蛋白SEQ ID NO: 4以及SEQ ID NO: 5產生文庫。進行偏向設計，使得每個選擇的位置上編碼的胺基酸對應於在相應的母選植株中發現的胺基酸之概率為50-70%，而其可為具有50-30%概率的不同胺基酸。N為目標位置數，B為偏倚，每個選殖最有可能的交換數為 $N \times (1-B)$ 。為了促進在真核細胞中的表現，以突變N65D除去hNGAL衍生的天然N-糖基化位點N65；而且對於其它潛在的N-糖基化位點(Asn-X-Ser/Thr)，藉由在那些文庫位置設置偏倚來降低發生的可能性。

【0180】 使用噬菌體展示來選擇具有改善的熱穩定性與結合親和力的優化突變蛋白。相較於初始突變蛋白選擇，以增加的嚴格性進行噬質體選擇，並涉及在升高的溫度與限制目標物濃度下的預培養步驟。

【0181】 為了進一步優化CGRP特異性突變蛋白的結合親和力，針對SEQ ID NO: 14使用基於易錯的聚合酶連鎖反應(PCR)的方法，針對SEQ ID NO: 11使

用所選位置的偏向隨機化，以產生基於突變蛋白SEQ ID NO: 14與SEQ ID NO: 11的額外的文庫。完全依照上述之方法進行偏置設計。

【0182】 使用噬菌體展示來選擇具有改善的熱穩定性與結合親和力的優化突變蛋白。相較於初始突變蛋白選擇，以增加嚴格性進行噬質體選擇，並涉及在升高的溫度與限制目標物濃度下的預培養步驟。

【0183】 為了促進在大腸桿菌中的表現，去除了內源性雙硫鍵。使用以運用TRIM寡核苷酸造成在位置半胱胺酸76與半胱胺酸175的偏向隨機化，以產生基於突變蛋白SEQ ID NO: 17與SEQ ID NO: 27的文庫。突變蛋白的選擇如所述進行，但具有增加的嚴格性。

【0184】 通過上述每個選擇過程獲得的單個菌落被用於接種在2xYT/Amp培養基，並培養使其生長整夜(14-18小時)至穩定期。隨後，從穩定相培養物接種到50 μ l 2xYT/Amp培養基中，並於37°C培養3小時，然後轉移至22°C，直到OD₅₉₅達到0.6-0.8。透過加入10 μ l補充有1.2 μ g/mL脫水四環素的2xYT/Amp誘導突變蛋白的產生。將培養物於22°C下培養直到第二天。加入40 μ l 5% (w/v) BSA的PBS/T溶液，並於25°C下培養1小時後，培養物準備用於篩選測定。雖然20 μ l的培養物直接應用於篩選ELISA盤，殘餘體積則在65°C下培養1小時。

【0185】 將中性親和素與鏈黴親和素(PBS中5 μ g/ mL)的1:1混合物於4°C下整夜包覆於微量滴定盤上以測試分離的突變蛋白與CGRP的結合。以在PBST中的2% BSA阻隔滴定盤後，生物素化的CGRP在包覆的微量滴定盤上以在PBS/T中1 μ g/mL的濃度被捕獲。隨後，將20 μ l的以BSA阻隔的培養物(有或無先前的熱培養)加入該微量滴定盤中，並於25°C下培養1小時。以與辣根過氧化物酶共軛結合的抗Streptag抗體(培養1小時；IBA, Boettingen)檢測結合的突變蛋白。為了定

量，加入20µl QuantaBlu螢光過氧化物酶基質，並於330 nm的激發波長以及420 nm的發射波長下測定螢光。

【0186】 此外，應用反向篩選形式，其中突變蛋白通過包覆有抗Streptag抗體的微量滴定盤上的strep標籤被捕獲，並加入不同濃度的生物素化的目標物，以及通過Extravidin-HRP (E2886；Sigma)偵測。

【0187】 為了選擇具有增加的親和力與穩定性的突變蛋白，使用以下方法進行篩選：i) 降低的抗原濃度，及/或 ii) 與未生物素化的目標物的競爭，及/或 iii) 在添加到該目標培養盤之前，於65°C或70°C下培養篩選的上清液，及/或 iv) 使用反向篩選形式，通過在包覆抗Streptag抗體的微量滴定盤上的Streptag來捕獲突變蛋白，並加入不同濃度的生物素化目標物，並通過extravidin-HRP (Sigma Aldrich公司，聖路易斯市，密蘇里州)偵測。

【0188】 在如上所述之ELISA篩選中顯示陽性訊號的選植株接著被定序，且選擇突變蛋白以進一步定性。所選之突變蛋白的胺基酸序列如SEQ ID NOs: 2-40所示。

【0189】 實施例3：突變蛋白的表現與純化

【0190】 從**實施例2**獲得的突變蛋白(SEQ ID NOs: 2-40)，其編碼的核苷酸序列如SEQ ID NOs: 41-79所示，以C端標籤SAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 84)表現；包括在2YT-Amp培養基中的大腸桿菌中的SA連接子以及Strep-tag® II, WSHPQFEK (SEQ ID NO: 85)，以在表現後使用鏈黴菌親和層析以及製備型尺寸排阻層析以純化該突變蛋白。

【0191】 實施例4：在基於ELISA的設置中測定的突變蛋白對可溶性人類與大鼠CGRP的親和力

【0192】 在體外使用競爭性ELISA測定形式(圖1)測試脂質運載蛋白突變蛋白與來自人類以及大鼠的 α 與 β CGRP在溶液中的結合。在該實驗中，將恆定濃度的非生物素化的CGRP (0.5 μ M)與可變濃度的脂質運載蛋白突變蛋白SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5以及SEQ ID NO: 6共同培養1小時。在溶液中預培養後，將脂質運載蛋白突變蛋白/CGRP混合物的等分轉移到以中性鏈親和素捕獲的人類 α CGRP-bio所包覆的ELISA盤上，以測量脂質運載蛋白突變蛋白的濃度，其未被非生物素化的人類 α CGRP (SEQ ID NO: 80)阻隔，因此仍可被固定的人類 α CGRP-bio結合(圖1)。對另一種相關的CGRP物種(人類 β CGRP (SEQ ID NO: 81)、大鼠 α CGRP (SEQ ID NO: 82)、大鼠 β CGRP (SEQ ID NO: 83))進行該程序。所有培養步驟皆在300 rpm搖動進行，且在每個培養步驟後，使用Biotek ELx405選擇CW洗滌器，以80 μ L PBS-T緩衝液 (PBS, 0.05% Tween 20)洗滌培養盤5次。在第一步驟中，一384孔ELISA盤以20 μ L濃度為5 μ g/mL的中性親和素的PBS在4°C下進行整夜包覆。洗滌後，該盤以60 μ L PBS-T/BSA (含有0.05% Tween 20的PBS含有2% BSA)在室溫下進行阻隔作用1小時。

【0193】 為了能檢測及定量與盤結合的脂質運載蛋白突變蛋白，去除殘餘上清液，並以預定的最佳濃度加入20 μ L HRP標記的抗hNGAL抗體，並在PBS-T/BSA中於室溫下培養1小時。透過以突變蛋白的混合物免疫兔子以獲得抗hNGAL抗體，然後根據製造商的說明書使用檢測套組(EZ-link Plus活化過氧化物酶，Thermo Scientific公司)將其偶合至HRP，以獲得抗體-HRP共軛結合物。洗滌後，對每個孔中加入20 μ L螢光HRP基質(QuantaBlu, Thermo)，並使反應進行15-60分鐘。使用螢光微量滴定盤讀數器(Tecan或Molecular Devices)讀取盤上每個孔的螢光強度。為了評估數據，基於標準曲線結果計算游離的突變蛋白的濃度，c(突

變蛋白)_{游離的} ($c(\text{muterin})_{\text{free}}$)，並相對於配體濃度 $c(\text{配體})(c(\text{Ligand}))$ 作圖。為了獲得配體/突變蛋白複合物的形成被50%阻隔時的配體濃度(IC50)，通過使用單位點結合模型的非線性回歸擬合曲線，根據 $c(\text{突變蛋白})_{\text{游離的}} = c(\text{突變蛋白})_{\text{總量}} / (1 + c(\text{配體}) / \text{IC50})$ ($c(\text{muterin})_{\text{free}} = c(\text{muterin})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{Ligand}) / \text{IC50})$)，其中總量追蹤劑濃度 $c(\text{突變蛋白})_{\text{總量}}$ 以及IC50值作為自由參數。使用GraphPad Prism 4軟體進行曲線擬合。

【0194】得到的IC50值總結於表1中。選擇的突變蛋白結合相應CGRP物種的所有亞型，如圖1所示。

【0195】表1：競爭性ELISA測定中的IC₅₀值

SEQ ID NO	人類 α CGRP IC50 [nM]	人類 β CGRP IC50 [nM]	大鼠 α CGRP IC50 [nM]	大鼠 β CGRP IC50 [nM]
SEQ ID NO: 2	55	46	35	47
SEQ ID NO: 3	7.5	14	>1000	12
SEQ ID NO: 4	2.1	1.8	2.6	3
SEQ ID NO: 5	36	28	21	27
SEQ ID NO: 6	3.1	>1000	0.77	1.6

【0196】實施例5：通過SPR測定的優化突變蛋白結合CGRP的親和力

【0197】SPR用於測量本文公開的優化的脂質運載蛋白突變蛋白的結合動力學以及親和力。

【0198】使用HBS-EP+ (1倍；BR-1006-69；GE Healthcare公司)作為運行緩衝液，於37°C下在Biacore T200儀器(GE Healthcare公司)上進行hNGAL突變蛋白與人類及大鼠CGRP α 與 β 的結合的SPR分析。

【0199】使用生物素CAPture檢測套組(GE Healthcare公司)將生物素化脂質運載蛋白突變蛋白固定到一晶片表面。使用標準NHS化學對突變蛋白進行生

物素化。未稀釋的生物素CAPture試劑(與ss-DNA寡核苷酸共軛結合的鏈黴親和素)被捕獲在具有預先固定的互補ss-DNA寡核苷酸的傳感晶片CAP上。然後，以5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速，以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生物素化突變蛋白施加300秒。

【0200】 以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速或以每個循環25 nM的單一濃度，將CGRP物種以30 nM、3 nM以及0.3 nM三種濃度施用，如圖2所示。將稀釋物以締合時間180秒以及解離時間5400秒注入，以獲得 k_a 以及 k_d 資訊。通過以10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注射6M胍-HCl + 0.25M NaOH (120秒)來實現晶片表面的再生。注射再生溶液後，以HBS-EP+ (1倍；BR-1006-69；GE Healthcare公司)運行緩衝液進行額外的洗滌步驟，穩定期為120秒。

【0201】 透過減去對照通道(僅加載有Biotin CAPture試劑)所測量的相應信號，並透過從結合反應中減去緩衝液注射以雙重參考數據。使用Biacore T200評估軟體V2.0來確定結合反應的結合速率常數 k_a 以及解離速率常數 k_d ，用於數據處理以及動力學擬合。用1：1結合模型全局擬合數據。

【0202】 對於SEQ ID NO: 4、SEQ ID NOs: 7至17以及SEQ ID NOs: 19至28測定的 k_a 、 k_d 以及所得平衡解離常數 K_D 的值總結在表2中。對於人類及大鼠 α 與 β CGRP，結果分別顯示在圖2A至2D中。優化的CGRP特異性脂質運載蛋白突變蛋白以微微莫耳至低奈米莫耳的親和力結合人類以及大鼠CGRP的二種同功型，親和力在優化後的改善高達120倍，而沒有檢測到作為對照組的hNGAL野生型(SEQ ID NO: 1)的顯著結合。

【0203】表2：透過SPR測定的人類與大鼠CGRP物種的優化突變蛋白的親

和力、結合速率常數ka以及解離速率常數Kd。

SEQ ID NO:	人類 α CGRP			人類 β CGRP			大鼠 α CGRP			大鼠 β CGRP		
	ka [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	Kd [s^{-1}]	KD [nM]	ka [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	Kd [s^{-1}]	KD [nM]	ka [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	Kd [s^{-1}]	KD [nM]	ka [$M^{-1}\cdot s^{-1}$]	Kd [s^{-1}]	KD [nM]
4	1.66E+06	3.02E-03	1.82	5.24E+06	3.95E-03	0.753	1.24E+06	6.21E-03	5.00	1.66E+06	3.65E-03	2.19
7	3.74E+06	2.49E-04	0.067	5.21E+06	1.88E-04	0.036	1.04E+06	3.13E-04	0.30	3.04E+06	2.76E-04	0.091
8	2.07E+06	5.95E-04	0.288	3.70E+06	5.29E-04	0.143	7.34E+05	8.37E-04	1.14	1.82E+06	6.36E-04	0.349
9	5.88E+06	2.57E-04	0.044	6.80E+06	1.81E-04	0.027	1.22E+06	3.18E-04	0.26	3.68E+06	2.75E-04	0.075
10	1.26E+06	2.05E-04	0.163	2.14E+06	1.62E-04	0.076	5.59E+05	3.07E-04	0.55	1.08E+06	2.24E-04	0.206
11	3.08E+06	4.55E-05	0.015	7.91E+06	5.63E-05	0.007	9.84E+05	7.60E-05	0.08	1.74E+06	7.30E-05	0.042
12	1.08E+06	1.62E-04	0.15	1.10E+06	1.04E-04	0.095	6.61E+05	2.99E-04	0.45	1.17E+06	2.05E-04	0.176
13	5.82E+06	4.36E-04	0.075	1.18E+07	3.66E-04	0.031	1.85E+06	5.25E-04	0.28	3.16E+06	3.50E-04	0.111
14	2.56E+06	1.41E-04	0.055	4.56E+06	1.41E-04	0.031	1.19E+06	3.39E-04	0.29	1.69E+06	1.81E-04	0.107
15	6.32E+06	2.38E-04	0.038	1.53E+07	2.73E-04	0.018	1.59E+06	2.74E-04	0.17	4.98E+06	1.93E-04	0.039
16	5.02E+06	2.59E-04	0.052	1.01E+07	3.64E-04	0.036	1.41E+06	3.98E-04	0.28	2.37E+06	2.29E-04	0.097
25	2.68E+06	1.65E-05	0.006	2.02E+06	1.01E-05	0.005	1.30E+06	2.12E-05	0.016	1.64E+06	1.33E-05	0.008
24	1.60E+06	1.40E-05	0.009	2.52E+06	9.01E-06	0.004	1.43E+06	2.08E-05	0.015	1.69E+06	1.22E-05	0.007
23	1.64E+06	1.84E-05	0.011	2.84E+06	4.11E-06	0.001	1.39E+06	1.30E-05	0.009	1.74E+06	1.34E-05	0.008
26	1.50E+06	1.99E-05	0.013	2.44E+06	7.60E-06	0.003	1.31E+06	2.01E-05	0.015	1.56E+06	9.98E-06	0.006
27	1.43E+06	2.59E-05	0.018	2.04E+06	2.26E-05	0.011	8.07E+05	3.10E-05	0.038	1.50E+06	2.64E-05	0.018
28	1.59E+06	4.99E-05	0.031	2.52E+06	3.41E-05	0.014	1.41E+06	6.88E-05	0.049	1.72E+06	5.48E-05	0.032
19	2.26E+06	1.07E-05	0.005	4.56E+06	6.67E-06	0.001	1.25E+06	3.02E-05	0.024	2.01E+06	1.21E-05	0.006
22	1.76E+06	1.56E-05	0.009	2.70E+06	9.32E-06	0.003	9.31E+05	3.05E-05	0.033	1.60E+06	2.02E-05	0.013
17	3.34E+06	3.66E-05	0.011	1.36E+07	1.44E-05	0.001	2.75E+06	8.44E-05	0.031	5.18E+06	5.99E-05	0.012
20	1.45E+06	1.75E-05	0.012	2.18E+06	7.89E-06	0.004	8.67E+05	2.41E-05	0.028	1.38E+06	1.84E-05	0.013
21	1.21E+06	1.71E-05	0.014	2.36E+06	8.74E-06	0.004	7.03E+05	3.70E-05	0.053	1.34E+06	2.36E-05	0.018

【0204】實施例6：在cAMP測定中突變蛋白與CGRP結合的功能測試

【0205】透過使用c-AMP評估SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NOs: 17至20以及SEQ ID NOs: 23至27的脂質運載蛋白突變蛋白中和人類以及大鼠CGRP的生物活性的能力；c-AMP為一種二級訊息，其分別於人類SK-N-MC (人類腦神經上皮瘤)細胞以及大鼠L6 (大鼠骨骼肌成肌細胞)細胞中產生，以回應使用HitHunter® c-AMP XS+檢測套組(DiscoverX公司)進行的CGPR處理。

【0206】 在該實驗中，將恆定濃度的人類或大鼠CGRP與不同濃度的脂質運載蛋白突變蛋白共同培養90分鐘。在溶液中預培養後，將脂質運載蛋白突變蛋白/CGRP混合物的等分試樣分別與SK-N-MC或L6細胞共同培養，以測量殘餘CGRP誘導的cAMP的產生。

【0207】 SK-N-MC細胞維持在補充有10%胎牛血清的EMEM培養基中，並根據製造商的設計(ATCC，37°C，含5% CO₂的空氣)在標準條件下，於細胞培養瓶中進行培養。

【0208】 將L6細胞維持在補充有10%胎牛血清的DMEM培養基中，並根據製造商的設計(ATCC，37°C，含5% CO₂的空氣)在標準條件下，於細胞培養瓶中進行培養。

【0209】 以下描述建立測定的詳細程序。

【0210】 將固定濃度的人類或大鼠CGRP在具有不同濃度的SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 17至20以及SEQ ID NOs: 23至27的溶液中使用合適的起始濃度培養，其在含有0.5mM IBMX以及0.1% BSA(工作緩衝液)的無血清培養基中，以1:3的比率連續稀釋至微微莫耳的範圍。在室溫下培養90分鐘後，將5 µl反應混合物轉移到白色384孔盤中，隨後在37°C、5% CO₂下預熱10分鐘，直到加入細胞。

【0211】 以accutase細胞消化液從人類SK-N-MC細胞或大鼠L6細胞的基質上分離這些貼壁細胞，並重新懸浮於PBS中。隨後，將細胞以300 g離心5分鐘，並根據製造商的說明，在抗體工作溶液(2/3工作緩衝液、1/3 HitHunter®抗體溶液)中，將細胞數調整為 3×10^6 個細胞/mL。

【0212】 向盤中加入30,000個細胞/孔(10 μ l)，並以氣體可滲透的黏性密封物覆蓋。

【0213】 然後於37°C、5% CO₂下允許cAMP產生30分鐘。

【0214】 隨後，加入20 μ l ED/Lysis/CL工作溶液(19份裂解緩衝液、1份Galacton Star、5份Emerald、25份cAMP XS+ ED試劑)，將盤置於室溫避光培養1小時。

【0215】 向每個孔中的細胞中加入20 μ l EA試劑，使用PheraStar在1-18小時後測量發光。

【0216】 使用GraphPad Prism 4軟體進行評估以及曲線擬合。圖3A至3D中分別顯示了人類及大鼠 α 與 β CGRP的結果的圖示。得到的IC₅₀值總結於以下表3中。

【0217】 表3：使用人類及大鼠CGRP物種的功能性cAMP測定的突變蛋白的IC₅₀值。

SEQ ID NO	人類 α CGRP IC ₅₀ [nM]	人類 β CGRP IC ₅₀ [nM]	大鼠 α CGRP IC ₅₀ [nM]	大鼠 β CGRP IC ₅₀ [nM]
11	0.11	0.22	0.08	0.06
27	0.1	0.12	—	—
25	0.15	0.19	0.06	0.16
24	0.12	0.19	0.07	0.16
23	0.18	0.2	0.07	0.17
26	0.16	0.26	0.05	0.16
14	0.15	1.5	0.12	0.09
19	0.14	0.21	0.07	0.17
20	0.14	0.17	0.08	0.11
18	0.19	0.29	0.06	0.14
17	0.11	0.23	0.06	0.11

【0218】 實施例7：對CGRP特異性的無半胱胺酸的脂質運載蛋白突變蛋白的定性

【0219】 透過使用如**實施例5**所述之相同的SPR方法測定CGRP特異性突變蛋白(SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 27以及無半胱胺酸的突變蛋白SEQ ID NOs: 29至40)對人類 α 與 β CGRP的Biacore親和力。得到的KD值列於**表4**中。

【0220】 以如**實施例6**中所述之相同的方式使用cAMP測定，以測定CGRP特異性突變蛋白SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 27以及無半胱胺酸的突變蛋白SEQ ID NOs: 29至40的功能效力(參閱**圖4A**以及**4B**)。人類 α 與 β CGRP物種的所得之IC50值總結於**表4**中。

【0221】 使用基於螢光的熱變性測定(通常稱為差示掃描螢光測定的熱位移測定)來測量CGRP特異性突變蛋白(SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 27，以及無半胱胺酸的突變蛋白SEQ ID NOs: 29至40)的熱穩定性，使用Mx3005P qPCR系統(Agilent Technologies公司)。

【0222】 因此，在磷酸鹽緩衝溶液(PBS；pH 7.4；10010；Life Technologies公司)中將脂質運載蛋白突變蛋白溶液稀釋至10 μ M的濃度，並製備15倍螢光染料SYPRO Orange溶於PBS的儲備溶液(5000倍濃縮物溶於DMSO中；S-6650；Life technologies公司)。將20 μ l蛋白質稀釋液與5 μ l SYPRO Orange儲備溶液在一qPCR盤(FrameStar 96無裙邊；型號4ti-0711；4titude公司)中混合，並以蓋子(Flat Optically Clear Caps；型號4Ti-0751；4titude公司)密封盤。使用Mx3005P qPCR系統，將該盤逐漸從25°C加熱至100°C (45秒/步)，同時在492 nm的激發波長以及610 nm的發射波長下記錄螢光信號。

【0223】 螢光增加表示蛋白質未折疊，因為SYPRO Orange非特異性地結合疏水性表面，且水強烈地淬滅Sypro Orange的螢光(James K. Kranz. Celine Schalk-Hihi (2011); "Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments"; Methods Enzymol. 493: 277–298; doi:10.1016/B978-0-12-381274-2.00011-X; PMID 21371595)。

【0224】 將Savitzky-golay平滑(5×savitzky golay濾波器)應用於原始數據(隨溫度變化的螢光信號)，並計算一階導數。為了測定解鏈溫度 T_m ，讀出一階導數的最大值(對應於隨溫度變化的螢光曲線的拐點)，並與相應的溫度(= T_m)匹配。在Microsoft Excel中進行完整的評估。

【0225】 在上述熱移位分析中測定的脂質運載蛋白突變蛋白的解鏈溫度(T_m)被彙編於表4中。

【0226】 表4：無半胱胺酸的突變蛋白的SPR親和力(KD)、功能效力(IC50)以及解鏈溫度(T_m)被總結於下表中。

SEQ ID NO:	SPR KD [nM]		cAMP 分析 IC50 [nM]		Tm [°C]
	h α CGRP	h β CGRP	h α CGRP	h β CGRP	
17	0.020	0.003	0.09	0.13	75
29	0.065	0.050	0.14	0.91	69
30	0.109	0.075	0.22	1.32	69
27	0.038	0.007	0.1	0.12	80
31	0.033	0.043	0.19	1.64	73
32	0.034	0.021	0.17	0.26	76
33	0.034	0.018	0.14	0.24	76
34	0.041	0.025	0.12	0.29	79
35	0.045	0.017	0.15	0.27	77
36	0.046	0.022	0.25	0.81	73
37	0.055	0.023	0.16	0.77	72
38	0.059	0.026	0.21	3.16	74
39	0.062	0.034	0.21	1.03	76
40	0.070	0.023	0.18	0.42	78

【0227】 實施例8：無標記脂質運載蛋白突變蛋白的製備

【0228】 參考脂質運載蛋白突變蛋白(SEQ ID NOs: 34以及17)的胺基酸序列，分別設計如SEQ ID NO: 87以及88所示的無標記脂質運載蛋白突變蛋白。加入N-端Gly以避免從Gln，其為成熟hNGAL (SEQ ID NO: 1)的原始N端胺基酸，形成焦麩胺酸。為了產生這些序列，將對應於無標記脂質運載蛋白突變蛋白的胺基酸序列(SEQ ID NOs: 87以及88)的核苷酸序列(SEQ ID NOs: 94以及95)次選殖到大腸桿菌表現載體中。此外，基於該核苷酸序列(SEQ ID NO: 95)，通過基於PCR的定點誘變取代二或更多個鹼基。將得到的編碼脂質運載蛋白突變蛋白(SEQ ID NOs: 89-93)的核苷酸序列(SEQ ID NOs: 96-100)次選殖到大腸桿菌表現載體中。

【0229】 使用上述載體，使用培養基(MagicMedia™ (Life Technologies公司))進行大腸桿菌表現。為了幫助純化，將N-端胺基酸為Gly的脂質運載蛋白突變蛋白(SEQ ID NOs: 87-93)以包括His₆標籤與TEV蛋白酶識別部分體的一部分之N-端標籤MRGSHHHHHGSENLYFQ (SEQ ID NO: 86)表現，該TEV蛋白酶識別部分體為由SEQ ID NO: 86的E(Glu) 13至Q(Gln) 18所組成之胺基酸序列，使得每個表現產物可以被TEV蛋白酶切割，其中胺基酸序列以及相應的核苷酸序列分別示於SEQ ID NOs: 101以及102中。透過使用TALON CellThru樹脂(Clontech公司)的固定化金屬親和層析法來純化表現的產物，隨後使用TEV蛋白酶除去標記。TEV蛋白酶在Q(Gln)以及G(Gly)之間切割，結果，純化的無標記脂質運載蛋白突變蛋白具有N-端Gly (SEQ ID NOs: 87-93)。通過使用HiTrap Q FF管柱(GE

Healthcare公司)的陰離子交換層析，以及使用HiLoad 16/600 Superdex 75pg管柱 (GE Healthcare公司)的尺寸排阻層析進行進一步純化。

【0230】 實施例9：無標記脂質運載蛋白突變蛋白的定性

【0231】 於 37°C 下在 Biacore T200 儀器 (GE Healthcare 公司) 上使用 HBS-EP+ 作為運行緩衝液，以進行無標籤突變蛋白與人類 α CGRP 結合的 SPR 分析。

【0232】 使用生物素 CAPture 檢測套組 (GE Healthcare 公司) 將生物素化脂質運載蛋白突變蛋白固定到晶片表面。使用標準 NHS 化學將突變蛋白進行生物素化。將 50 倍稀釋的 Biotin CAPture 試劑 (與 ss-DNA 寡核苷酸共軛結合的鏈黴親和素) 以預固定的互補 ss-DNA 寡核苷酸捕獲在傳感器晶片 CAP 上。然後，以 10 μ L/分鐘的流速將 200 nM 的生物素化突變蛋白施加 60 秒。

【0233】 以範圍為 0.0256 nM 至 5 nM 的濃度以 30 μ L/分鐘的流速施用人類 α CGRP。以 600 秒的結合時間以及 1800 秒的解離時間注射稀釋液。通過以 10 μ L/分鐘的流速注射 6M 胍-HCl+0.25M NaOH (120 秒)，隨後以 10 μ L/分鐘的流速注入 30% 乙腈+ 0.25M NaOH (120 秒) 來實現晶片表面的再生。注射再生溶液後，以 HBS-EP+ 運行緩衝液進行額外的洗滌步驟，穩定期為 60 秒。

【0234】 通過減去對於對照通道 (僅加載有 Biotin CAPture 試劑) 以及通過從結合反應中減去緩衝液注射所測量的相應信號以雙重參考數據。使用用於數據處理以及動力學擬合的 Biacore T200 評估軟體版本 1.0 確定結合反應的結合速率常數 k_a 以及解離速率常數 K_D 。以 1 : 1 結合模型全局擬合數據。

【0235】 無標籤突變蛋白 (SEQ ID NO: 87-93) 的所得 K_D 值顯示於表 5 中。該結果的圖示顯示於圖 5 中。

【0236】 為了測定無標記突變蛋白SEQ ID NOs: 87至93的功能效力，以與**實施例6**中所述相同的方式使用cAMP測定法，進行如下的微小改動：(1) 將5,000個/孔的細胞加入到盤中。(2) 使用EnSpire (Perkin Elmer公司)測量發光量。

【0237】 人類 α CGRP的所得IC50值總結在**表5**中。

【0238】 **表5**：無標籤突變蛋白的SPR親和力(KD)以及功能效力(IC50)。

SEQ ID NO:	SPR KD [nM]	cAMP 分析 IC50 [nM]
87	0.081	0.66
88	0.008	0.17
89	0.006	0.17
90	0.012	0.16
91	0.010	0.16
92	0.010	0.18
93	0.011	0.13

【0239】 **實施例10：脂質運載蛋白突變蛋白對由顯神經的電刺激誘導的大鼠皮膚血管舒張的影響**

【0240】 為了測試CGRP特異性脂質運載蛋白突變蛋白(SEQ ID NOs: 11、17、18、23、25、27、87以及89)的拮抗劑活性，通過刺激大鼠顯神經來測試突變蛋白對皮膚血管舒張的影響，使用大鼠模型(Br J Pharmacol., 1993, 110(2):772-6)，並具有以下修改。在實驗前一天，用硫酸胍乙啶(20 mg/kg，皮下)預處理Sprague Dawley大鼠以阻斷交感神經活性。用硫丁巴比妥(100 mg/kg，腹腔注射)麻醉大鼠並以0.5-1%異氟烷保持麻醉狀態。手術暴露後肢的顯神經，向近端切開並置於鉑雙極電極上以進行刺激。在實驗過程中，用浸在液體石蠟中的手術棉覆蓋神經以防止其乾燥。使用連接到激光多普勒流量計的皮膚探針在後爪的內側測量皮膚血液流量。在建立穩定的基線通量(小於5%的變化)之後，

在施用後125分鐘，以30個脈衝(2Hz，10V，1ms，15秒)電刺激顯神經的遠端。

所有突變蛋白以及載體以皮下方式施用。

【0241】 使用圖表軟體(LabChart 7，ADInstruments Pty.有限公司)記錄所有數據。通過對電脈衝刺激的每個通量反應的通量-時間曲線下面積(AUC)估計皮膚血液流量的累積變化。通過與載體處理組作為血流抑制相比，計算突變蛋白對電刺激的血流量增加(AUC)的抑制作用。(如表6所示)

【0242】 表6：大鼠皮膚血液流量測定

SEQ ID NO:	劑量 (mg/kg、皮下)	施用後時間(分 鐘)	血流抑制 (載體的%)
11	3	125	79.7
17	3	125	81.9
18	0.3	125	39.1
23	0.3	125	49.9
25	0.3	125	40
27	3	125	81.6
87	3	125	69.4
89	2.5	125	64.4

【0243】 本文說明性地描述的具體實施例可以適當地在沒有本文未特定公開的任何一或多個元件，一或多個限制的情況下實施。因此，例如，「包括」、「包含」、「含有」等詞將被廣泛地且無限制地理解。另外，本文中採用的術語以及表達已作為描述性而非限制性術語，且在使用這些術語以及表達時，不意圖排除所示與所描述之特徵或其部分的任何等同物，而是認識到在所要求保護的本發明之範圍內的各種修改是可能的。因此，應當理解的是，雖然本發明的具體實施例已經通過較佳具體實施例以及任選特徵特定公開，但本領域技術人員可以採用其修改與變化，且這樣的修改與變化被認為在本發明的範圍內。本文描述的所有專利、專利申請、教科書以及同行評審的出版物，係透過引用

而整體併入本文。此外，當透過引用併入本文中的參考文獻中的術語之定義，或使用與本文提供的該術語的定義不一致或相反時，適用本文提供之該術語的定義，而不適用參考文獻中該術語的定義。屬於一般公開內容中的每個更窄的種類以及亞屬分組也構成本發明的一部分。這包括本發明的一般性描述，其具有從該屬除去任何主題的附帶條件或否定限制，而不管所排除的材料是否在本文中特定描述。此外，在以馬庫西群組描述特徵的情況下，本領域技術人員將認識到，因此也根據馬庫西群組的任何單獨成員或成員亞組來描述本發明。根據所附申請專利範圍，其他具體實施例將變得顯而易見。

【0244】 等同物：本領域技術人員將使用不超過常規實驗來認識或能夠確定本文所述之本發明之特定具體實施例的許多等同物。這些等同物目的在被所附的申請專利範圍所涵蓋。本說明書中提及的所有出版物、專利以及專利申請係透過引用方式併入本說明書中，其程度如同每個單獨的出版物、專利或專利申請被特定且單獨地指示透過引用方式併入本文。

【符號說明】

【0245】 無

【生物材料寄存】

【0246】 無

【序列表】



【發明摘要】

【中文發明名稱】 特異性於降鈣素基因相關胜肽的新穎蛋白

【英文發明名稱】 NOVEL PROTEINS SPECIFIC FOR CALCITONIN

GENE-RELATED PEPTIDE

【中文】

本發明提供結合CGRP的hNGAL突變蛋白，且該突變蛋白可以用於各種應用，包括醫藥應用，例如偏頭痛。本發明還涉及製備本文所述之一或多種突變蛋白的方法以及包含一或多種該等突變蛋白之組合物及組合。本發明進一步涉及編碼這種突變蛋白的核酸分子以及產生這種突變蛋白及核酸分子的方法。此外，本申請公開了這些突變蛋白的治療及/或診斷的用途以及包含一或多種這種突變蛋白的組合物及組合。

【英文】

The present disclosure provides hNGAL muteins that bind CGRP and can be used in various application including pharmaceutical applications, for example, migraine. The present disclosure also concerns methods of making one or more muteins described herein as well as compositions and combinations comprising one or more of such muteins. The present disclosure further relates to nucleic acid molecules encoding such muteins and to methods for generation of such muteins and nucleic acid molecules. In addition, the application discloses therapeutic and/or diagnostic uses of these muteins as well as compositions and combinations comprising one or more of such muteins.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種人類嗜中性白血球明膠酶相關脂質運載蛋白 (human neutrophil gelatinase associated lipocalin, hNGAL)突變蛋白，當以基本上於實施例4中所述之競爭性酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)測量時，該突變蛋白能與降鈣素基因相關胜肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)以可被偵測到的親和力結合。

【第2項】如請求項1之hNGAL突變蛋白，其中當以基本上於實施例5中所述之基於表面電漿共振分析法測量時，該突變蛋白能與CGRP以約5 nM或更低的 K_D 結合。

【第3項】如請求項1之hNGAL突變蛋白，其中在基本上於實施例6中所述之基於SK-N-MC細胞的功能分析法測量時，該突變蛋白能以約5 nM或更低的 IC_{50} 值來抑制或減少由CGRP所誘導產生的cAMP。

【第4項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該突變蛋白與人類CGRP以及大鼠CGRP都有交叉反應。

【第5項】如請求項4之hNGAL突變蛋白，其中當以基本上於實施例4中所述之競爭性ELISA分析法測量時，該突變蛋白能與大鼠CGRP以可被偵測到的親和力結合。

【第6項】如請求項4之hNGAL突變蛋白，其中當以基本上於實施例5中所述之基於表面電漿共振分析法測量時，該突變蛋白能與大鼠CGRP以約5 nM或更低的 K_D 結合。

【第7項】如請求項4之hNGAL突變蛋白，其中在以基本上於實施例6中所述之基於L6細胞的功能分析法測量時，該突變蛋白能以約5 nM或更低的IC50值來抑制或減少由大鼠CGRP所誘導產生的cAMP。

【第8項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該突變蛋白與人類 α -CGRP、人類 β -CGRP、大鼠 α -CGRP以及大鼠 β -CGRP具有交叉反應。

【第9項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該突變蛋白在對應於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70-73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178的一或多個位置上包含突變的胺基酸殘基。

【第10項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白在對應於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列的序列位置36、40、41、49、52、68、70、72、73、77、79、81、96、100、103、106、125、127、132以及134的一或多個位置上進一步包含突變的胺基酸殘基。

【第11項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列包含至少一個以下突變的胺基酸殘基：Leu 36 → Ile、Phe、Trp、Arg或Glu；Ala 40 → Met、Trp或Thr；Ile 41 → Leu、Trp、Gly或Glu；Gln 49 → Leu、Phe、Lys、Glu或Thr；Tyr 52 → Ala、Gly、Glu或Gln；Ser 68 → Trp、His或Asp；Leu 70 → Met、Trp、Tyr、Gly或Gln；Arg 72 → Met、Ile、Trp、Glu或Ser；Lys 73 → Ala、Glu、Thr或Gln；Asp 77 → Ile或Asn；Trp 79 → Val、Gly、His或Thr；Arg 81 → Gly、His、Glu或

Asn ; Asn 96 → Ala、Gly或Thr ; Tyr 100 → Ile、Pro或Glu ; Leu 103 → Met、Glu、Thr或Gln ; Tyr 106 → Leu、Ile、Ala、His或Asn ; Lys 125 → Val、Phe、Gly或Glu ; Ser 127 → Phe、Trp或Arg ; Tyr 132 → Leu、Ile或Trp ; 以及Lys 134 → Trp、His或Glu。

【第12項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列包含以下取代：Gln 28→His；以及Cys 87→Ser。

【第13項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Gln 28 → His ; Leu 36 → Glu ; Ala 40 → Trp ; Ile 41 → Gly ; Gln 49 → Lys ; Tyr 52 → Ala ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gln ; Arg 72 → Ile ; Lys 73 → Glu ; Arg 81 → Gly ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Ala ; Tyr 100 → Glu ; Leu 103 → Gln ; Tyr 106 → Asn ; Lys 125 → Glu ; Ser 127 → Trp ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Trp ;

(b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Phe ; Ala 40 → Met ; Ile 41 → Trp ; Gln 49 → Phe ; Tyr 52 → Gly ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Trp ; Arg 72 → Glu ; Lys 73 → Ala ; Trp 79 → Gly ; Arg 81 → Asn ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Gly ; Tyr 100 → Pro ; Leu 103 → Met ; Tyr 106 → His ; Lys 125 → Glu ; Ser 127 → Phe ; Tyr 132 → Trp ; Lys 134 → Trp ;

(c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Thr ; Tyr 52 → Gln ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73

→ Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn
96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Tyr 132 → Ile ;
Lys 134 → Glu ;

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ile 41 → Glu ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52
→ Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Trp ; Lys 73 → Gln ; Asp
77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Thr ;
Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Arg ; Tyr 132 → Trp ; Lys 134
→ Glu ; 或

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Ile ; Ala 40 → Trp ; Ile 41 → Trp ; Gln 49
→ Leu ; Ser 68 → His ; Leu 70 → Met ; Arg 72 → Met ; Lys 73 → Thr ; Trp
79 → Thr ; Cys 87 → Ser ; Tyr 100 → Ile ; Leu 103 → Met ; Tyr 106 → Leu ;
Lys 125 → Phe ; Ser 127 → Trp ; Tyr 132 → Trp ; Lys 134 → His 。

【第14項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列包含以下取代：Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Leu 42 → Arg ; Asp 47 → Asn ; Gln 49 → Ile、Pro或Thr ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met、Ile或Lys ; Lys 62 → Arg ; Asn 65 → Asp ; Val 66 → Ala ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Ala或Ser ; Lys 73 → Asp或Glu ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Arg或Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Leu或Thr ; Ile 97 → Thr ; Lys 98 → Gln ; Tyr 100 → His ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Val 111 → Met ; Lys 125 → Gly ; Val 126 → Met ; Ser 127 →

Gly或Asn；Tyr 132 → Ile；Lys 134 → Glu；Thr 136 → Ile或Val；Thr 145 → Ala，
以及Ser 146 → Asn。

【第15項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Gln 28 → His；Leu 36 → Trp；Ala 40 → Thr；Ile 41 → Leu；Gln 49 → Ile；Tyr 52 → Gln；Ser 68 → Trp；Leu 70 → Tyr；Arg 72 → Ser；Lys 73 → Glu；Lys 75 → Arg；Asp 77 → Asn；Trp 79 → His；Arg 81 → Glu；Phe 83 → Ser；Cys 87 → Ser；Asn 96 → Thr；Leu 103 → Glu；Tyr 106 → Ile；Lys 125 → Gly；Tyr 132 → Ile；Lys 134 → Glu；

(b) Gln 28 → His；Leu 36 → Trp；Ala 40 → Thr；Ile 41 → Leu；Leu 42 → Arg；Asp 47 → Asn；Gln 49 → Thr；Tyr 52 → Gln；Ser 68 → Trp；Leu 70 → Tyr；Arg 72 → Ser；Lys 73 → Glu；Asp 77 → Asn；Trp 79 → His；Arg 81 → Glu；Phe 83 → Ser；Cys 87 → Ser；Asn 96 → Thr；Leu 103 → Glu；Tyr 106 → Ile；Lys 125 → Gly；Tyr 132 → Ile；Lys 134 → Glu；

(c) Gln 28 → His；Leu 36 → Trp；Ala 40 → Thr；Ile 41 → Leu；Gln 49 → Ile；Tyr 52 → Gln；Asn 65 → Asp；Ser 68 → Trp；Leu 70 → Tyr；Phe 71 → Leu；Arg 72 → Ser；Lys 73 → Glu；Asp 77 → Asn；Trp 79 → His；Arg 81 → Glu；Phe 83 → Ser；Cys 87 → Ser；Asn 96 → Thr；Leu 103 → Glu；Tyr 106 → Ile；Lys 125 → Gly；Val 126 → Met；Tyr 132 → Ile；Lys 134 → Glu；Thr 145 → Ala；

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Asp 47 → Asn ; Gln 49 → Thr ; Tyr 52 → Gln ; Val 66 → Ala ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Ile 97 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ;

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Ile ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(f) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Pro ; Tyr 52 → Gln ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Phe 83 → Ser ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Lys 98 → Gln ; Tyr 100 → His ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Val 126 → Met ; Ser 127 → Gly ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ;

(g) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Leu ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ;

Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(h) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(i) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(j) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Lys ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Arg ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Tyr 100 → His ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn ;

(k) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72

→ Ala ; Lys 73 → Asp ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys
87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ;
Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 →
Val ; Ser 146 → Asn ; 或

(l) Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49
→ Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Ile ; Lys 62 → Arg ; Ser 68 → Trp ; Leu 70
→ Tyr ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg
81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ;
Tyr 106 → Ile ; Val 111 → Met ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 →
Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Ile ; Ser 146 → Asn 。

【第16項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列進一步包含以下取代：Cys 76→Leu、Met、Val、Ile、Phe、Arg、Lys或Asn以及Cys 175→Leu、Val、Phe、Trp、Tyr、Asp或Glu。

【第17項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →

Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Phe ;

(b) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Met ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Tyr ;

(c) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Leu ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Trp ;

(d) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu ;

(e) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys

73 → Asp ; Cys 76 → Val ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Tyr ;

(f) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Trp ;

(g) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Asn ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Leu ;

(h) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52
→ Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys
73 → Asp ; Cys 76 → Arg ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ;
Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 →
Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr
136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Val ;

(i) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Lys ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Asp ; 或

(j) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Phe ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Asp 。

【第18項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列進一步包含以下取代：Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp或Glu ; Ile 41 → Val、Thr、Ala、Arg或Glu ; Glu 44 → Lys或Asp ; Lys 46 → Asn ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ; Arg 72 → Val或Ser ; Lys 73 → Arg、Glu或Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met或Ile ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Val或Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser或Gly ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val或Thr ; Tyr 106 → Ala或Gly ; Val 108 → Ile ; Ser 112 → Asn ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu或Val ; Ser 127 → Gly、Arg或Lys ; Asn 129 → Ser ; Tyr 132 → Leu或Ser ; Lys 134 → Glu及Ile 135 → Val 。

【第19項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Glu ; Ile 41 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Glu ; Asp 77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Arg ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Ser ; Lys 73 → Arg ; Asp 77 → Ile ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Thr ; Tyr 106 → Gly ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Gly ; Tyr 132 → Ser ; Lys 134 → Glu ;

(d) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Glu ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ;

Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Gly ; Lys 125 → Val ; Ser 127 → Arg ; Tyr 132
→ Leu ; Lys 134 → Glu ;

(e) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49
→ Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys
73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ;
Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 →
Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr
132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(f) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Gly 38 → Ala ; Ala 40 → Asp ; Ile 41
→ Val ; Glu 44 → Asp ; Lys 46 → Asn ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser
68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ;
Trp 79 → Val ; Ile 80 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Leu 103 →
Val ; Tyr 106 → Ala ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys
134 → Glu ; Ile 135 → Val ;

(g) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Thr ; Gln 49
→ Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ; Arg
72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ;
Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ; Lys 125 →
Leu ; Ser 127 → Lys ; Asn 129 → Ser ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(h) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Thr ; Glu 44
→ Lys ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg
72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ;

Cys 87 → Ser ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ; Lys 125 →
Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ;

(i) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49
→ Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys
73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ;
Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Val 108 → Ile ; Ser 112 → Asn ; Phe 123 →
Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; 或

(j) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Ala ; Gln 49
→ Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Phe 71 → Leu ; Arg
72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Arg 81 → His ;
Cys 87 → Gly ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Phe 123 → Val ; Lys 125 →
Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu 。

【第20項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列進一步包含以下取代：Cys 76 → Leu或Tyr；Cys 175 → Ile；Ile 176 → Asp及Asp 177 → Gly。

【第21項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代的其中一組：

(a) Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52
→ Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys
75 → Arg ; Cys 76 → Leu ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ;
Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 →

Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Cys 175 → Ile ; Ile 176 → Asp ; Asp 177 → Gly ; 或

(b) Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Cys 76 → Tyr ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Cys 175 → Ile ; Ile 176 → Asp ; Asp 177 → Gly 。

【第22項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多肽序列，該hNGAL突變蛋白的胺基酸序列進一步包含以下取代或添加：Ile 8 → Lys ; Pro 9 → His ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Trp或Arg ; Ala 40 → Thr或Asp ; Ile 41 → Leu或Val ; Gln 49 → Ile或Glu ; Tyr 52 → Gln或Glu ; Thr 54 → Met ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Trp或Asp ; Leu 70 → Tyr或Gly ; Arg 72 → Ala或Val ; Lys 73 → Asp或Gln ; Lys 75 → Arg ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn或Met ; Trp 79 → His或Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → Glu或His ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Glu或Val ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile或Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Gly或Leu ; Ser 127 → Asn或Lys ; Tyr 132 → Ile或Leu ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu ; Gly 178 → Asp且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) 。

【第23項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中相較於該成熟hNGAL的線性多胜肽序列，該hNGAL突變蛋白包含以下胺基酸取代與添加的其中一組：

(a) Leu 36 → Trp ; Ala 40 → Thr ; Ile 41 → Leu ; Gln 49 → Ile ; Tyr 52 → Gln ; Thr 54 → Met ; Ser 68 → Trp ; Leu 70 → Tyr ; Arg 72 → Ala ; Lys 73 → Asp ; Cys 76 → Ile ; Asp 77 → Asn ; Trp 79 → His ; Arg 81 → Glu ; Cys 87 → Ser ; Asn 96 → Thr ; Leu 103 → Glu ; Ser 105 → Pro ; Tyr 106 → Ile ; Lys 125 → Gly ; Ser 127 → Asn ; Tyr 132 → Ile ; Lys 134 → Glu ; Thr 136 → Val ; Ser 146 → Asn ; Cys 175 → Glu且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 87) ;

(b) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 88) ;

(c) Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Gly 178 → Asp且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 89) ;

(d) Ile 8 → Lys ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 90) ;

(e) Pro 9 → His ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 91) ;

(f) Ile 8 → Lys ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Gly 178 → Asp且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 92) ; 或

(g) Pro 9 → His ; Gln 28 → His ; Leu 36 → Arg ; Ala 40 → Asp ; Ile 41 → Val ; Gln 49 → Glu ; Tyr 52 → Glu ; Asn 65 → Gln ; Ser 68 → Asp ; Leu 70 → Gly ; Arg 72 → Val ; Lys 73 → Gln ; Lys 75 → Arg ; Asp 77 → Met ; Trp 79 → Val ; Ile 80 → Thr ; Arg 81 → His ; Cys 87 → Ser ; Lys 98 → Glu ; Leu 103 → Val ; Tyr 106 → Ala ; Asn 114 → Asp ; Phe 123 → Val ; Lys 125 → Leu ; Ser 127 → Lys ; Tyr 132 → Leu ; Lys 134 → Glu ; Gly 178 → Asp 且N-端添加胺基酸Gly (Gln 1) (SEQ ID NO: 93)。

【第24項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白在該成熟hNGAL的線性多胜肽序列(SEQ ID NO: 1)的序列位置8、9、28、36、38、40、41、42、44、46、47、49、52、54、62、65、66、68、70、71、72、73、75、76、77、79、80、81、83、87、96、97、98、100、103、105、106、108、111、112、114、123、125、126、127、129、132、134、135、136、145、146、175、176、177以及178的位置上包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21個突變的胺基酸殘基。

【第25項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白包含一選自於由SEQ ID NOs: 2-40、87-93及其功能性片段或變異體所組成之群組的胺基酸序列。

【第26項】 如申請專利範圍第1至3項任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白包含取代一野生型hNGAL的一或多個胺基酸的一或多個非天然半胱胺酸殘基。

【第27項】 如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白包含至少一個天然的半胱胺酸殘基被另一個胺基酸取代的胺基酸。

【第28項】如請求項27之hNGAL突變蛋白，其中該另一個胺基酸為絲胺酸殘基。

【第29項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白係與選自於由下列所組成之群組之一化合物共軛結合：一有機分子、一酵素標記、一放射性標記、一有色標記、一螢光標記、一顯色標記、一發光標記、一半抗原、一長葉毛地黃配質、一生物素、一細胞增殖抑制劑、一毒素、一金屬複合物、一金屬，以及一膠體金。

【第30項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白係在其N端及/或其C端與一融合配偶體融合，該融合配偶體為一蛋白質，或一蛋白質結構域或一胜肽。

【第31項】如請求項1至3中任一項之hNGAL突變蛋白，其中該hNGAL突變蛋白係與一延長該多胜肽的血清半衰期之化合物共軛結合。

【第32項】如請求項31之hNGAL突變蛋白，其中該延長該血清半衰期之化合物係選自於由下列所組成之群組：一聚亞烷基二醇分子、一氫乙基澱粉、一免疫球蛋白的Fc部分、一免疫球蛋白的CH3結構域、一免疫球蛋白的CH4結構域、一白蛋白結合胜肽，以及一白蛋白結合蛋白。

【第33項】如請求項32之hNGAL突變蛋白，其中該聚亞烷基二醇為聚乙烯 (polyethylene, PEG)或其活化衍生物。

【第34項】一種核酸分子，包含編碼如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白的核苷酸序列。

【第35項】如請求項34之核酸分子，其中該核酸分子係可操作地連接於一調節序列以使該核酸分子表現。

【第36項】 如請求項34或35之核酸分子，其中該核酸分子係包含在一載體或一噬質體載體中。

【第37項】 一種宿主細胞，包含如請求項34至36中任一項之核酸分子。

【第38項】 一種產生如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白的方法，其中該多胜肽係藉由遺傳工程方法從編碼該多胜肽的核酸開始產生。

【第39項】 如請求項38之方法，其中該多胜肽係在一細菌或真核宿主生物體中產生，且從該宿主生物體或其培養物中分離。

【第40項】 一種醫藥組合物，包含如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白。

【第41項】 如請求項40之組合物，其中該組合物進一步包含至少一種醫藥上可接受之佐劑、稀釋劑或載體。

【第42項】 一種診斷或分析套組，包含如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白。

【第43項】 一種如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白在偵測及/或測量一樣品中CGRP的用途。

【第44項】 一種如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白在製備適用於治療、預防及/或改善與游離的CGRP含量失調相關的疾病或病症的醫藥組合物的用途。

【第45項】 如請求項44之用途，其中該疾病或病症係選自於由偏頭痛、顳顎關節症候群、心臟衰竭、高血壓以及敗血症所組成之群組。

【第46項】 一種如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白在製備適用於在一個體中結合CGRP的醫藥組合物的用途。

【第47項】 一種如請求項1至33中任一項之hNGAL突變蛋白在製備適用於抑制或減輕一個體的偏頭痛或血漿蛋白外滲的醫藥組合物的用途。

