



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0029238
(43) 공개일자 2018년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7004176
(22) 출원일자(국제) 2016년07월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년02월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/066909
(87) 국제공개번호 WO 2017/009456
국제공개일자 2017년01월19일
(30) 우선권주장
15176740.7 2015년07월15일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하
독일 프라이징 85354, 리제마이트너 스트라세 30
(72) 발명자
로테, 크리스틴
독일 다하우 85221 하인리히-니콜라우스-슈트라세 26
알러스도르퍼, 안드레아
독일 보른차흐 85283 모짜르트슈트라세 20에이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 LAG-3에 특이적인 신규 단백질

(57) 요약

본원은 LAG-3에 특이적으로 결합하는 인간 리포칼린 뮤테인을 제공한다. 이러한 단백질은 예를 들어 암, 감염성 질병, 자가 면역 질환 등과 같은 인간 질병의 치료 또는 예방을 위한 항암제 및/또는 면역 조절제와 같은 많은 약제학적 응용 분야에서 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 인간 리포칼린 뮤테인이 MHC 클래스 II를 과발현하는 세포에서 MHC 클래스 II에 대한 LAG-3의 결합을 억제할 수 있음을 보여준다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인을 제조하는 방법 및 상기 리포칼린 뮤테인을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 핵산 분자 및 이러한 리포칼린 뮤테인 및 핵산 분자의 생성 방법에 관한 것이다. 추가로, 본원은 이러한 리포칼린 뮤테인의 치료적 및/또는 진단적 용도뿐만 아니라 하나 또는 그 이상의 이러한 리포칼린 뮤테인을 포함하는 조성물을 개시한다.

(52) CPC특허분류

C07K 2319/30 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

G01N 2333/70539 (2013.01)

(72) 발명자

비텐만, 알렉산더

독일 올름 89077 쾰스테네커슈트라쎄 5

벨 아이바, 라시다, 시함

독일 뮌헨 80469 에르하르트슈트라쎄 15

울월, 쉐인

독일 프라이징 85354 암 발트랜드 23에이

아이히너, 티모

독일 프라이징 85354 비스마르크슈트라쎄 22

명세서

청구범위

청구항 1

약 500 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 LAG-3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 뮤테인은 약 160 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 LAG-3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 뮤테인은 약 30 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 LAG-3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 뮤테인은 약 1 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 LAG-3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 K_d 값은 실시예 5 또는 6에 필수적으로 기술된 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 인간 눈물 리포칼린(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열의 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 서열 위치에서 하나 이상 돌연변이된 아미노산 잔기들을 포함하는 리포칼린 뮤테인.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 뮤테인의 아미노산 서열은 인간 눈물 리포칼린(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기들 중 하나 이상을 포함하는 리포칼린 뮤테인: Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Phe, Gly, Ala, Asp 또는 Glu; Glu 27 → Asp, Val 또는 Thr; Phe 28 → Cys or Asp; Pro 29 → Phe, Leu 또는 Trp; Glu 30 → Trp, Asn 또는 Tyr; Met 31 → Ile, Val, Asp, Leu 또는 Tyr; Asn 32 → Asp, Glu, Tyr, Trp, Val, Thr 또는 Met; Leu 33 → Asp, Glu 또는 Pro; Glu 34 → Val, Trp 또는 His; Val 36 → Ala; Asn 48 → Asp; Lys 52 → Glu, Ser, Arg 또는 Asn; Val 53 → Ala; Met 55 → Ala 또는 Val; Leu 56 → Asp,

Gln 또는 Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Phe, Trp 또는 Asp; Arg 60 → Phe 또는 Glu; Cys 61 → Trp, Pro, Leu 또는 Trp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Val 85 → Ala; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Ser 또는 Phe; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys 또는 Gly; His 106 → Ala, Glu, Thr, Tyr, Gln 또는 Val; Lys 108 → Tyr, Phe, Thr 또는 Trp; Val 110 → Gly 또는 Ala; Arg 111 → Pro; Gly 112 → Met 또는 Thr; Lys 114 → Trp 또는 Ala; Lys 121 → Thr; Ser 140 → Gly 및 Cys 153 → Ser.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리포칼린 뮤테인은 약 109 nM 이하의 EC_{50} 값으로 LAG-3에 결합하는 리포칼린 뮤테인.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 EC_{50} 값은 실시예 8 또는 9에 필수적으로 기술된 형광-활성화 세포 분류에 의해 측정되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 LAG-3은 인간 LAG-3인 리포칼린 뮤테인.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 인간 LAG-3 및 사이노몰거스 LAG-3(서열번호 2) 모두와 교차-반응성인 리포칼린 뮤테인.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 약 160 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 사이노몰거스 LAG-3(서열번호 2)에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 II에 대한 인간 LAG-3의 결합을 간접할 수 있는 리포칼린 뮤테인.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 II에 대한 인간 LAG-3의 결합을 간접하는 능력이 필수적으로 실시예 11에 기술된 형광-활성화 세포 분류에 의해 분석되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인의 아미노산 서열은 다음 세트의 아미노산 치환들 중 하나를 포함하는 리포칼린 뮤테인:

(a) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(b) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Asn; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(c) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Tyr; Met 31 → Asp; Asn 32 → Val; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Leu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Val; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(d) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Thr; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Trp; Glu 30 → Trp; Met 31 → Tyr; Asn 32 → Val; Leu 33 → Asp; Glu 34 → His; Leu 56 → Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Gln; Lys 108 → Trp; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Asn 48 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 140 → Gly; Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Glu; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(i) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Lys 52 → Glu; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(j) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Val; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(k) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Trp; Lys 52

→ Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Tyr; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(l) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Val; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; 또는

(p) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Asn; Met 31 → Asp; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Pro; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Thr; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 서열번호 7-22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 리포칼린 뮤테인.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 서열번호 7-22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 리포칼린 뮤테인.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 유기 분자, 효소 표지, 방사성 표지, 비색 표지, 형광 표지, 발색 표지, 발광 표지, 합텐, 디곡 시게닌, 비오틴, 세포증식 억제제, 독소, 금속 복합체, 금속 및 콜로이드달 골드로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물과 컨쥬게이트되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 펩타이드인 융합 파트너와 융합되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 C-말단에서 항체 또는 항체 단편인 융합 파트너에 융합되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인은 상기 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물과 컨쥬게이트되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 혈청 반감기를 연장시키는 화합물은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역 글로불린의 Fc 부분, 면역 글로불린의 C_H3 도메인, 면역 글로불린의 C_H4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 및 알부민 결합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 리포칼린 뮤테인.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

상기 폴리알킬렌 글리콜이 폴리에틸렌(PEG) 또는 이의 활성화된 유도체인 리포칼린 뮤테인.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 25

제 24 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제 24 항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

뮤테인은 유전공학적 방법에 의해 뮤테인 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산되는 것인,

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 리포칼린 뮤테인의 제조 방법.

청구항 28

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 리포칼린 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 대상체에서 LAG-3를 결합시키는 방법.

청구항 29

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 리포칼린 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 리포칼린 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 대상체에서 T 임파구 증식을 유도하는 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 하나 이상에 따른 리포칼린 뮤테인 또는 그러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 대상체에서 MHC 클래스 II에 대한 인간 LAG-3의 결합을 간섭하는 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뮤테인이 필수적으로 실시예 11에 기술된 FACS 분석에서 측정될 때 MHC 클래스 II를 발현하는 세포에 대한 인간 LAG-3의 결합과 경쟁하는 리포칼린 뮤테인.

청구항 33

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 리포칼린 뮤테인 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 34

치료제에 연결된 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 리포칼린 뮤테인 또는 이의 단편을 포함하는 면역접합체 또는 융합 단백질.

청구항 35

LAG-3의 결합/검출을 위한 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 뮤테인의 용도로서,

(a) 상기 뮤테인을 LAG-3을 함유하는 것으로 의심되는 시험 샘플과 접촉시켜, 뮤테인과 LAG-3 사이에 복합체를 형성시키는 단계; 및

(b) 적절한 신호에 의해 상기 뮤테인과 LAG-3 사이의 복합체를 검출하는 단계.

청구항 36

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트.

청구항 37

생물학적 샘플에서 LAG-3의 존재를 검출하는 방법으로서, 뮤테인 및 LAG-3의 복합체 형성을 허용하는 조건 하에 샘플을 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 뮤테인과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 38

제 37 항에 있어서,

상기 뮤테인과 LAG-3의 복합체를 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 인간으로부터 분리된 방법.

청구항 40

제 37 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플은 체액을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 LAG-3에 특이적으로 결합하는 인간 눈물 리포칼린 뮤테인에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 림프구 활성화 유전자-3 또는 LAG-3 (Cluster of Differentiation 223 또는 CD223으로도 알려짐)는 면역글로불린 슈퍼유전자 계열의 막 단백질이다. LAG-3은 CD4와 구조적 및 유전적으로 관련이 있으며, CD4 유전자 근처 염색체 12번의 짧은 팔(short arm) 말단 부분에 이의 인코딩 유전자가 위치하며, LAG-3 유전자가 유전자 중복을 통해 진화되었을 가능성이 있음을 시사한다(Triebel *et al.*, J Exp Med, 1990). LAG-3은 휴지 말초혈액 림프구에서는 발현되지 않지만 활성화된 T 세포 및 NK 세포(Triebel *et al.*, J Exp Med, 1990)에서 발현되며 활성화된 B 세포(Kisielow *et al.*, Eur J Immunol, 2005) 및 형질세포 모양(plasmacytoid) 수지상 세포(Workman *et al.*, J Immunol, 2009)에서도 발현되는 것으로 보고되었다.

[0003] CD4와 마찬가지로, LAG-3은 주요 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 클래스 II 분자에 결합하지만, 2배 높은 친화도를 가지며 다른 결합 부위에 결합한다 (Huard *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997). LAG-3에 의한 수지상 세포에 대한 MHC 클래스 II 관계는 수지상 세포의 사이토카인 및 케모카인 프로파일의 변화를 유도한다 (Buisson and Triebel, Vaccine, 2003). 또한, LAG-3은 수지상 세포의 성숙을 일으키는 것으로 보고되었지만, 이러한 세포에 의한 IL-12 및 TNF- α 의 생성과, 동종 이형성 T 세포에 의한 증식 및 IFN- γ 반응을 자극하는 수지상 세포의 능력의 증가에 의해 입증된다 (Andreae *et al.*, J Immunol, 2002). LAG-3 신호 전달 및 MHC 클래스 II 교차-결합은 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 일차 활성화에서 초기 사건을 억제한다고 보고되었다 (Macon-Lemaitre and Triebel, Immunology, 2005). 이는 음성적으로 T 세포의 세포 증식, 활성화 및 항상성을 조절한다.

[0004] CTLA-4 및 PD-1과 마찬가지로 LAG-3는 억제 면역 수용체이다. LAG-3의 T 세포 반응의 음성 조절 인자로서의 탁월한 역할은 특히 녹아웃 마우스와 표적-특이적 항체 모두를 기반으로 한 연구에서 PD-1과 함께 인상적으로 입

증되었다 (Woo *et al.*, Cancer Res, 2012). 이러한 연구에서, 이중(dual) 항-LAG-3/항-PD-1 항체 치료는 단일 항체 치료에 크게 저항하는 확립된 종양의 대부분 마우스를 치료하였다. 또한, LAG-3/PD-1 이중(double) 녹아웃 마우스는 다중 이식 가능한 종양의 현저히 증가된 생존 및 클리어런스(clearance)를 보였다. 면역 체크포인트로서의 PD-1과 LAG-3의 강력한 결합된 역할에 대한 더욱 강력한 실험적 지원은 이중 녹아웃 마우스가 치명적 자가 염증 질환을 일으키기 매우 쉽다는 사실에 의해 제공되었다.

[0005] 따라서, 암, 장기 이식 거부 치료 또는 예방, 또는 자가 면역 또는 자가 염증 질환의 치료에 중요한 용도를 가질 수 있는, T 세포, NK 세포, B 세포 및 형질세포 모양 수지상 세포와 같은 LAG-3⁺ 림프구의 반응을 조절하는 화합물에 대한 요구가 당업계에서 충족되지 않고 있다. 이와 관련하여, 본 발명은 LAG-3에 특이적으로 결합하여 면역 반응을 조절하는 신규 화합물 그룹을 제공한다. 이러한 화합물은 리포칼린으로부터 유래된 뮤테인이다. 리포칼린의 뮤테인은 급속하게 확대되는 치료법이며, 원하는 표적에 대해 높은 친화성 및 특이성을 나타내도록 구성될 수 있다 (예를 들어, 국제 특허 공개 번호 WO 99/16873, WO 00/75398, WO 03/029471, WO 05/19256를 참조하시오).

발명의 내용

[0006] II. 정의

[0007] 다음의 목록은 본 명세서 전체적으로 사용되는 용어, 어구 및 약어를 정의한다. 본 명세서에 열거되고 정의된 모든 용어는 모든 문법적 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0008] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, "LAG-3"은 인간 LAG-3(huLAG-3)을 의미하며, 인간 LAG-3의 변이체, 이소형(isoform) 및 종 상동체를 포함한다. LAG-3은 "림프구-활성화 유전자 3", "분화 클러스터 223" 또는 "CD223"로도 알려져 있으며, 이들은 상호 교환적으로 사용된다. 인간 LAG-3은 UniProt P18627 (2009년 7월 7일자 버전 5), 이의 단편 또는 이의 변이체로 정의된 전장 단백질을 의미한다. 사이노몰구스(Cynomolgus) LAG-3 (cyLAG-3) 게놈이원숭이(cynomolgus monkeys)의 LAG-3를 의미한다. CyLAG-3은 또한 서열번호 2의 위치 1-428에 개시된 cyLAG-3의 세포 외 도메인을 지칭하는데 사용될 수 있다.

[0009] 본 명세서에 사용되는 "검출 가능한 친화도"는 일반적으로 적어도 약 10^{-5} M 이하의 K_d 또는 EC_{50} 에 의해 측정되는 친화도로 선택된 표적에 결합하는 능력을 의미한다. 더 낮은 친화도는 ELISA와 같은 통상적인 방법에 의해 더 이상 측정 가능하지 않으며, 따라서 2차적 중요성을 가진다.

[0010] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 선택된 표적(본원의 경우에, LAG-3)에 대해 개시내용의 단백질(예를 들어, 리포칼린 뮤테인) 또는 이의 융합 폴리펩타이드의 "결합 친화도"는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(이에 의해 뮤테인-리간드 복합체의 K_d 값이 측정될 수 있다). 이러한 방법은 형광 적정, 경쟁 ELISA, 등온적정열량계(ITC)와 같은 열량 측정 방법, 및 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 방법은 당업계에 잘 확립되어 있으며, 이의 예를 또한 다음에 상술한다.

[0011] 각각의 바인더와 이의 리간드 사이의 복합체 형성은 많은 상이한 인자들, 예컨대 각각의 결합 파트너들의 농도, 경쟁자의 존재, 사용되는 버퍼 시스템의 pH 및 이온 강도, 및 해리상수 K_d 의 측정을 위해 사용되는 실험 방법(예를 들어, 형광 적정, 경쟁 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명 등의 단지 몇 가지 예) 또는 심지어 실험 데이터의 평가를 위해 사용된 수학적 알고리즘에 의해 영향을 받음을 주목한다.

[0012] 따라서, 또한 K_d 값(각각의 바인더와 이의 표적/리간드 사이에 형성된 복합체의 해리상수)은 주어진 리간드에 대한 특정 리포칼린 뮤테인의 친화도를 측정하기 위해 사용한 방법 및 실험 설정에 따라서, 특정 실험 범위 내에서 다를 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 이는, 예를 들어, K_d 값이 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해, 경쟁 ELISA에 의해, 또는 "직접적 ELISA"에 의해 결정되었는지의 여부에 따라서 측정된 K_d 값 또는 허용 범위에서 약간의 편차가 있을 수 있다는 것을 의미한다.

[0013] 본 명세서에서 사용된 "뮤테인", "돌연변이된" 독립체(단백질이든 또는 핵산이든) 또는 "돌연변이체"는 천연 유래(야생형) 핵산 또는 단백질 "기준" 스캐폴드에 비해 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입을 지칭한다. 상기 용어는 또한 본 명세서에서 기술된 용어 뮤테인의 단편 및 변이체를 포함한다. 본원의 리포칼린 뮤테인, 이의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같이 LAG-3에 결합하는 기능을 보유한다.

- [0014] 본원의 뮤테인과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "단편"은 N-말단 및/또는 C-말단이 단축된, 즉, N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산의 적어도 하나가 없는 전장 성숙한 인간 눈물 리포칼린으로부터 유래된 단백질 또는 펩타이드에 관한 것이다. 이러한 단편은 N-말단 및/또는 C 말단 아미노산의 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 또는 30 (중간의 모든 수 포함)까지 부족할 수 있다. 예시적인 예로서, 그러한 단편은 4개의 N-말단 및 2개의 C-말단 아미노산을 갖지 않을 수 있다. 단편은 바람직하게는 전장 눈물 리포칼린 (뮤테인)의 기능적 단편이며, 이는 바람직하게는 그것이 유래된 전체 길이의 눈물 리포칼린 (뮤테인)의 결합 포켓을 포함하는 것을 의미한다. 예시적인 예로서, 그러한 기능은 천연 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 적어도 아미노산 7-153을 포함할 수 있다. 그러한 단편은 성숙한 리포칼린의 1차 서열의 적어도 10개 이상, 예컨대 20 또는 30개 또는 더 연속적인 아미노산을 포함할 수 있고, 보통 성숙한 리포칼린의 면역 분석에서 검출 가능하다. 일반적으로, 본원의 리포칼린 뮤테인의 또는 본원에 따른 조합물의, 또는 본원에 기술된 융합 단백질의 대응하는 단백질 리간드 LAG-3에 대해 본 명세서에서 사용되는 용어 "단편"은 본원에 따른 뮤테인에 의해 인식되고/되거나 결합될 전장 리간드의 능력을 보유하는 N-말단 및/또는 C-말단이 단축된 단백질 또는 펩타이드 리간드에 관한 것이다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "돌연변이유발"은 성숙한 리포칼린의 주어진 서열 위치에서 천연 유래 아미노산이 각각의 천연 폴리펩타이드 서열 내 이 특정 위치에 존재하지 않는 적어도 하나의 아미노산으로 치환될 수 있도록 실험 조건이 선택된다는 것을 의미한다. 용어 "돌연변이유발"은 또한 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 삽입에 의한 서열 세그먼트 길이의 (추가적인) 변형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 선택된 서열 위치에서 하나의 아미노산은 3개의 무작위 돌연변이의 신장에 의해 대체되어, 야생형 단백질의 각각의 세그먼트 길이에 비해 2개의 아미노산 잔기의 삽입을 야기한다는 것은 본 개시내용 범주 내이다. 이러한 삽입 또는 결실은 본원에서 돌연변이 유발이 실시될 수 있는 임의의 펩타이드 세그먼트에서 서로 독립적으로 도입될 수 있다. 본 발명의 하나의 예시적인 구현예에서, 선택된 리포칼린 스캐폴드의 루프 AB에 몇 가지 돌연변이의 삽입을 도입할 수 있다 (본원에 참고로 인용된 국제 특허 공개 번호 WO 2005/019256 참조).
- [0016] 용어 "무작위 돌연변이유발"은 미리 결정된 단일 아미노산(돌연변이)이 특정 서열 위치에서 존재하지 않지만, 적어도 2개의 아미노산이 돌연변이 유발 동안 미리 정해진 서열 위치에서 특정 확률로 도입될 수 있음을 의미한다.
- [0017] "동일성"은 서열의 유사성 또는 관계를 측정하는 서열의 특성이다. 본 개시내용에서 사용되는 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은-당해 서열을 갖는 본원의 폴리펩타이드의 서열의 다음 (상동성) 정렬 후에 이들 두 서열 중 더 긴 것에서 잔기 수에 대해-쌍별로 동일한 잔기의 백분율을 의미한다. 서열 동일성은 동일한 아미노산 잔기의 수를 잔기의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 측정한다.
- [0018] 용어 "상동성"은 본 명세서에서 이의 일반적인 의미로 사용되며, 동일한 아미노산뿐만 아니라 본원의 폴리펩타이드(예를 들어, 본 개시내용의 임의의 리포칼린 뮤테인)의 선형 아미노산 서열 내 동등한 위치에서 보존적 치환(예를 들어, 글루타메이트 잔기의 아스파르테이트 잔기에 의한 교환)으로 간주되는 아미노산을 포함한다.
- [0019] 서열 상동성 또는 서열 동일성 백분율은, 예를 들어, 프로그램 BLASTP, 버전 blastp 2.2.5(문헌[November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402])를 이용하여 본원에서 측정할 수 있다. 이 구현예에서, 상동성 백분율은 바람직하게는 쌍별 비교에서 레퍼런스로 바람직하게는 야생형 단백질 스캐폴드를 이용하여 프로펩타이드 서열을 포함하는 전체 폴리펩타이드 서열(매트릭스: BLOSUM 62; 갭 코스트: 11.1; 컷 오프 값은 10^{-3} 으로 설정)의 정렬에 기반한다. 이는 BLASTP 프로그램 산출물에서의 결과로서 표시한 "양성" (상동성 아미노산)의 수를 정렬을 위한 프로그램에서 선택된 아미노산의 총 수로 나눈 백분율로서 계산된다.
- [0020] 구체적으로, 리포칼린(뮤테인)의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 리포칼린의 아미노산 서열에서 특정 위치에 상응하여 야생형 리포칼린과 상이한지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 당업계에 잘 공지된 수단 및 방법, 예를 들어, 수동으로 또는 컴퓨터 프로그램, 예컨대, 기본적 국소 정렬 검색 툴(Basic Local Alignment Search Tool)을 나타내는 BLAST2.0 또는 클러스탈W(ClustalW) 또는 서열 정렬을 생성하는데 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램을 이용하는 것에 의한 정렬을 사용할 수 있다. 따라서, 리포칼린의 야생형 서열은 "대상 서열" 또는 "레퍼런스 서열"로서 작용할 수 있는 반면, 본 명세서에 기재된 야생형 리포칼린과 상이한 리포칼린의 아미노산 서열은 "질의 서열"로서 작용한다. 용어 "야생형 서열" 및 "레퍼런스 서열" 및 "대상 서열"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 바람직한 야생형 리포칼린은 서열번호 1에 나타낸 hTlc의 서열이다.
- [0021] "갭"은 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 정렬에서의 간격이다. 따라서, 정확하게 동일한 서열의 두 복제물

은 100% 동일성을 갖지만, 덜 고도로 보존되고, 결실, 첨가 또는 대체를 갖는 서열은 더 낮은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다. 당업자는 몇몇 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 Blast(Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), 및 스미스-워터만 (Smith-Waterman)(Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197)이 표준 매개변수를 이용하여 서열 동일성을 결정하는 데 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다.

[0022] 본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 아미노산 서열의 변형, 예를 들어 치환, 결실, 삽입 또는 화학적 변형을 포함하는 단백질 또는 펩타이드의 유도체에 관한 것이다. 이러한 변형은 일부 구현예에서 단백질 또는 펩타이드의 작용기를 감소시키지 않는다. 이러한 변이체는 단백질을 포함하되, 하나 이상의 아미노산은 그들 각각의 D-입체 이성질체에 의해 또는 천연 유래 20종의 아미노산, 예를 들어, 오르니틴, 하이드록시프롤린, 시트룰린, 호모세린, 하이드록시라이신, 노르발린 이외의 아미노산에 의해 대체되었다. 그러나, 이러한 치환은 또한 보존적일 수 있으며, 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환의 예는 다음의 그룹의 구성원 중에서의 대체이다: 1) 알라닌, 세린, 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 본원의 리포칼린 뮤테인의 또는 본원에 따른 조합물의, 및/또는 본원에 기술된 융합 단백질의 대응하는 단백질 표적 LAG-3과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 LAG-3 또는 이의 단편과 관련이 있고, 본원에 기술된 바와 같이 UniProt에 기탁된 LAG-3 레퍼런스 단백질과 같은 야생형 LAG-3 단백질과 비교하여, 하나 이상, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 하나 이상 가진다. LAG-3 변이체는 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같이 UniProt에 기탁된 인간 LAG-3 레퍼런스 단백질과 같은 야생형 LAG-3과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 아미노산 서열 동일성을 가진다.

[0023] "천연 서열" 리포칼린은 자연으로부터 유래된 대응하는 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 리포칼린을 의미한다. 따라서, 천연 서열 리포칼린은 임의의 유기체, 특히 포유동물로부터 각각의 자연-발생 리포칼린의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 천연 서열 폴리펩타이드는 자연으로부터 분리될 수 있거나 또는 재조합체 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열" 폴리펩타이드는 구체적으로는 리포칼린의 자연-발생 절단 또는 분비 형태, 리포칼린의 자연-발생 변이체 형태, 예컨대 대안적으로 스플라이싱된 형태 및 자연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 폴리펩타이드 "변이체"는 천연 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 변이체는, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상기 폴리펩타이드의 N- 또는 C-말단에서 첨가되거나 또는 결실되는 폴리펩타이드를 포함한다. 일반적으로 변이체는 천연 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 70%, 예를 들어 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 약 95% 아미노산 서열 동일성을 가진다. 예시적인 예로서, 본원의 hTlc 뮤테인에서 처음 4개의 N-말단 아미노산 잔기(His-His-Leu-Leu, 서열번호 55) 및 마지막 2개의 C-말단 아미노산 잔기(Ser-Asp)는 예를 들어, 서열번호 7-22의 단백질의 생물학적 기능에 영향을 주지 않으면서 결실될 수 있다.

[0024] 본원에 따라 사용될 때 용어 "위치"는 본원에 도시된 아미노산 서열 내의 아미노산의 위치 또는 본원에 도시된 핵산 서열 내의 뉴클레오타이드 위치를 의미한다. 본원에서 사용되는 하나 이상의 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열 위치와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "상응한다" 또는 "상응하는"을 이해하기 위해, 상응하는 위치는 선행하는 뉴클레오타이드/아미노산의 수에 의해서만 결정되지는 않는다. 따라서, 치환될 수 있는 본원에 따른 주어진 아미노산의 위치는 (돌연변이체 또는 야생형) 리포칼린에서 다른 곳에서의 아미노산의 결실 또는 첨가에 기인하여 다를 수 있다. 유사하게, 치환될 수 있는 본원에 따른 주어진 뉴클레오타이드의 위치는 프로모터 및/또는 임의의 다른 조절 서열 또는 유전자(엑손 및 인트론을 포함)를 포함하는 뮤테인 또는 야생형 리포칼린 5'-비번역 영역(UTR) 내 다른 곳에서의 결실 또는 첨가 뉴클레오타이드에 기인하여 다를 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명에 따른 "상응하는 위치"에 있어서, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치는 유사 이웃 뉴클레오타이드/아미노산과 표시된 번호가 상이할 수 있지만, 교환되거나 삭제되거나 추가될 수 있는 상기 이웃 뉴클레오타이드/아미노산은 하나 이상의 "상응하는 위치"에 의해 포함되는 것으로 이해하는 것이 바람직하다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 레퍼런스 서열에 기초한 리포칼린 뮤테인 내 상응하는 위치에 있어서, 비록 리포칼린 중에서도 고도로 보존된 전체 접힘 패턴에 비추어 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이 그들의 표시된 숫자가 다를지라도, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치는 구조적으로 (돌연변이 또는 야생형) 리포칼린 내에서 다른 위치에 상응하는 것으로 이해하는 것이 바람직하다.

- [0027] 용어 "알부민"은 인간 혈청 알부민 또는 소 혈청 알부민 또는 랫트 혈청 알부민과 같은 모든 포유류 알부민을 포함한다.
- [0028] 비-천연 표적에 대해 본원에서 사용되는 용어 "유기 분자" 또는 "소형 유기 분자"는 적어도 2개 이상의 탄소 원자, 바람직하게는 7 또는 12개 이하의 회전 가능한 탄소 결합을 포함하는 유기 분자를 나타내며, 100 내지 2,000 달톤 범위, 바람직하게는 100 내지 1,000 달톤 범위, 및 선택적으로 1 또는 2개의 금속 원자를 포함할 수 있다.
- [0029] 본원에서 사용되는 용어 "검출하다", "검출", "검출 가능한" 또는 "검출하는"은 정량적 수준과 정성적 수준 둘 다뿐만 아니라 이들의 조합으로도 이해된다. 따라서 관심 대상 분자의 정량적, 반정량적 및 정성적 측정을 포함한다.
- [0030] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유류, 더 바람직하게는 인간이다. 용어 "포유류"는 본 명세서에서 제한 없이, 단지 몇 개의 예를 들면, 인간, 가축 및 농장 동물 및 동물원 동물, 스포츠 동물, 또는 반려 동물, 예컨대 양, 개, 말, 고양이, 소, 랫트, 돼지, 유인원, 예컨대 게먹이원숭이 등을 포함하는 포유류로서 분류되는 임의의 동물을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 바람직하게는, 본 명세서의 포유류는 인간이다.
- [0031] "유효량"은 유리한 또는 목적으로 하는 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투약으로 투여될 수 있다.
- [0032] "샘플"은 임의의 대상체로부터 취한 생물학적 샘플로서 정의된다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 소변, 대변, 정액 또는 조직을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 리포칼린 뮤테인이 PHA(Phytohemagglutinin) 자극 말초혈액단핵세포(PBMC)에 결합한다는 것을 보여준다. 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 사용하여 PHA 자극 PBMC(흑색 선) 및 비자극 PBMC(회색 선)에 대한 리포칼린 뮤테인(서열번호 11-17, 21 및 22) 및 레퍼런스 분자(벤치마크 항-LAG-3 항체, BMS 986016, 서열번호 5 및 6)의 결합을 분석하였다. PHA 자극 CD3 양성 PBMC에 대한 모든 리포칼린 뮤테인의 명확한 결합이 검출되었다; 자극받지 않은 세포에 대한 결합은 관찰되지 않았다.
- 도 2는 LAG-3에 결합하기 위해 리포칼린 뮤테인이 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 II 분자 (LAG-3의 천연 리간드)와 경쟁함을 보여준다. LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인(서열번호 7-10)(도 2A) 및 최적화된 LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인(서열번호 11, 12, 14, 17 및 21)(도 2B)에 의해, 인간 흑색종 세포주 A375 상에 발현된 MHC 클래스 II 분자에 대한 huLAG-3-Fc(인간 IgG1 Fc 단편에 융합된 인간 LAG-3 세포 외 도메인) 결합의 용량 의존적 저해를 나타내었다. 최적화된 리포칼린 뮤테인 및 레퍼런스 분자(서열번호 5 및 6)는 동일한 농도로 결합하는 LAG-3/MHC 클래스 II 분자에 대한 억제 효과를 나타냈다. 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열번호 3)은 MHC 클래스 II 분자를 발현하는 A375 세포에 대한 huLAG-3-Fc 결합의 측정 가능한 억제로 유도되지 않았다.
- 도 3은 야생형 hT1c의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여 특정 LAG-3 특이적 인간 눈물 리포칼린(hT1c) 뮤테인의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여, 처음 4개의 N-말단 아미노산 잔기(His, His, Leu, Leu, 서열번호 55) 및 마지막 2개의 C-말단 아미노산 잔기(Ser, Asp)는 이들 hT1c-유래의 LAG-3 결합 뮤테인(hT1c 뮤테인 서열번호 7-22로 기재됨) 및 음성대조군 단백질(서열번호 3 및 4)에서 결실된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 명세서에서 사용된 "리포칼린"은 결합 포켓으로 정의되는 한쪽 말단에서 복수의 (바람직하게는 4개의) 루프(loop)에 의해 연결된 쌍을 이루는 복수의 (바람직하게는 8개의) β -가닥을 포함하는 원통형 β -주름 시트(β pleated sheet) 슈퍼 2차 구조 영역을 갖는 약 18-20kDa 중량의 단량체 단백질로서 정의된다. 다른 크기, 형태 및 화학적 특성의 표적을 수용할 수 있는, 리포칼린 부류 구성원들 사이에서 다양한 결합 형태를 야기하는 것은 다르게 경직된 리포칼린 지지체 내 루프의 다양성이다 (예, (reviewed, e.g. in Skerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996). 실제로 리포칼린 단백질 부류는 낮은 수준의 전체 서열 보존성 (흔히 20% 이하의 서열 동일성)을 공유하나 고도로 보존된 전체 폴딩 패턴을 유지하면서 넓은 범위의 리간드에 결합하여 자연적으로 진화해왔다. 다양한 리포칼린 내 위치 간의 일치하는 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제 7,250,297 호를 참고하시오).

- [0035] 상기 언급한 바와 같이, 리포칼린은 이의 슈퍼 2차 구조, 즉 결합 포켓으로 정의되는 한쪽 말단에 4개의 루프에 의해 쌍으로 연결된 8개의 β -가닥을 포함하는 원통형 β -주름 시트 슈퍼 2차 구조 영역에 의해 정의되는 폴리펩타이드이다. 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 개시된 리포칼린 뮤테인에 제한되지 않는다. 이와 관련하여, 본 발명은 결합 포켓으로 정의되는 한쪽 말단에 4개의 루프에 의해 연결된 8개의 β -가닥을 포함하는 원통형 β -주름 시트 슈퍼 2차 구조 영역을 갖는 리포칼린 뮤테인에 관한 것이고, 여기서 레퍼런스 서여로가 비교하여 적어도 하나의 아미노산 상기 4개의 루프 중 3개 이상의 각각의 하나 이상의 아미노산이 돌연변이되어 있고, 상기 리포칼린은 검출 가능한 친화성을 갖는 LAG-3에 결합하는데 효과적이다.
- [0036] 하나의 특정 구현예에서, 본원에 개시된 리포칼린 뮤테인은 인간 눈물 리포칼린(hTlc 또는 hTLPC)의 뮤테인이며, 리포칼린-1, 인간 눈물 프리알부민 또는 폰 에브너 글랜드 단백질(von Ebner gland protein)로도 불린다. 본 명세서에서 사용된 용어 "인간 눈물 리포칼린" 또는 "hTlc" 또는 "리포칼린-1"은 SWISS-PROT/UniProt Data Bank Accession Number P31025(이소형(isoform) 1)를 갖는 성숙한 인간 눈물 리포칼린을 나타낸다. SWISS-PROT/UniProt Data Bank Accession Number P31025에 나타난 아미노산 서열을 바람직한 "레퍼런스 서열"로 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 레퍼런스 서열로 사용한다.
- [0037] 일부 구현예에서, 검출 가능한 친화도를 갖는 LAG-3에 결합하는 리포칼린 뮤테인은 레퍼런스 서열의 천연 시스템인 잔기의 또 다른 아미노산, 예를 들어 세린 잔기에 의한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 검출 가능한 친화도를 갖는 LAG-3에 결합하는 리포칼린 뮤테인은 야생형 리포칼린의 하나 이상의 아미노산을 치환하는 하나 이상의 비천연 시스템인 잔기를 포함할 수 있다. 추가의 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인은 하나 이상의 시스템인 브릿지를 형성하기 위해 시스템인 잔기에 의한 천연 아미노산의 적어도 2 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시스템인 브릿지는 적어도 2개의 루프 영역을 연결할 수 있다. 이들 영역의 정의는 본 명세서에서 Flower(Biochem J, 1996) (Biochim Biophys Acta, 2000) 및 Breustedt *et al.* (J Biol Chem, 2005)에 따라 사용된다. 관련된 구현예에서, 본원은 LAG-3에 결합함으로써 LAG-3의 하향(downstream) 신호 전달 경로를 활성화시킬 수 있는 하나 이상의 리포칼린 뮤테인을 개시한다.
- [0038] LAG-3에 대해 대항하거나 특이적인 본 발명의 단백질은 정의된 단백질 스캐폴드, 바람직하게는 리포칼린 스캐폴드를 기본으로 하는 임의의 수의 특이적 결합 단백질 뮤테인을 포함한다. 또한 바람직하게는, 교환, 결실 또는 삽입되는 각각의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 25, 30, 35, 40, 45 또는 50과 같은 그 이상이고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11이 바람직하고 9, 10 또는 11이 더욱 바람직하다. 그러나, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 LAG-3에 여전히 결합할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0039] 한 측면에서, 본 발명은 적어도 검출 가능한 친화도를 갖는 LAG-3에 결합하는 다양한 리포칼린 뮤테인을 포함한다. 이러한 의미에서, LAG-3은 야생형 리포칼린의 비 천연 리간드로 간주될 수 있는데, 여기서 "비 천연 리간드"는 생리학적 조건하에서 야생형 리포칼린에 결합하지 않는 화합물을 의미한다. 특정 서열 위치에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 야생형 리포칼린을 조작함으로써, 본 발명자는 비천연 리간드, LAG-3에 대한 높은 친화력 및 높은 특이성이 가능함을 입증하였다. 일부 구현예에서, 야생형 리포칼린 상의 특정 서열 위치를 코딩하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 심지어 더 많은 뉴클레오타이드 트리플렛(nucleotide triplet(s))에서, 무작위 돌연변이유발이 이들 위치에서 뉴클레오타이드 트리플렛의 서브세트에 의한 치환을 통해 수행될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 레퍼런스 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 특정 서열 위치에 상응하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 서열 위치를 포함하는, 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.
- [0041] 본 발명의 단백질은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 "모 (parental)" 단백질 스캐폴드(리포칼린 스캐폴드와 같은)의 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인은 또한 그러한 돌연변이가 적어도 필수적으로 뮤테인의 결합 활성 및 접힘을 방해하거나 간섭하지 않는 한 서열 위치/위치들에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 지닐 수 있다. 이러한 돌연변이는 확립된 표준 방법(Sambrook and Russell, 2001, Molecular cloning: a laboratory manual)을 사용하여 DNA 수준에서 매우 쉽게 수행할 수 있다. 아미노산 서열의 변경에는 아미노산 치환뿐만 아니라 삽입 또는 결실이다. 그러한 치환은 보존적일 수 있으며, 즉 아미노산 잔기는 특히 극성 및 크기와 관련하여 화학적으로 유사한 성질의 아미노산 잔기로

대체된다. 보존적 치환의 예는 다음 그룹의 멤버들 사이의 치환이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 리신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 다른 한편, 아미노산 서열에 비-보존적 변경을 도입하는 것도 가능하다. 또한, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 대신에, 레퍼런스 리포칼린의 1차 구조의 하나 이상의 연속하는 아미노산, 바람직하게는 hTlc를 삽입하거나 결실시키는 것이 가능하며, 이러한 결실 또는 삽입은 안정한 접힌/기능적 뮤테인을 초래한다. 이러한 뮤테인에서, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 N- 또는 C- 말단에 첨가되거나 결실된다 (예를 들어, N-말단 및 C-말단이 절단된 hTlc 뮤테인). 일반적으로, 이러한 뮤테인은 hTlc(서열번호 1)의 아미노산 서열과 약 70% 이상, 약 80% 이상, 예컨대 약 85% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 예시로서, 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 hTlc 뮤테인을 포함하며, 성숙한 인간 눈물 리포칼린 (His-His-Leu-Leu; 서열번호 55; 1-4번 위치)의 서열의 처음 네 개의 N-말단 아미노산 잔기 및/또는 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 마지막 2개의 C-말단 아미노산 잔기(Ser-Asp; 157-158번 위치)가 결실되어 있다 (서열번호 7-22).

[0042] 본 명세서에 개시된 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열은 다른 리포칼린과의 서열 동일성을 비교할 때 레퍼런스 리포칼린, 바람직하게는 hTlc에 대해 높은 서열 동일성을 갖는다. 이러한 일반적인 맥락에서, 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열은 레퍼런스 리포칼린의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 유사하지만, 정렬에서 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 갭(아래 정의된 바와 같은)이 있을 가능성을 가진다. 레퍼런스 리포칼린의 서열과 실질적으로 유사한, 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 각 서열은, 일부 구현예에서, 레퍼런스 리포칼린의 서열과 70% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 75% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 80% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 85% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 87% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 또는 90% 이상의 동일성 또는 서열 상동성, 95% 이상의 동일성 또는 서열 상동성을 가진다, 단, 변경된 위치 또는 서열은 유지되고 하나 이상의 갭이 가능하다.

[0043] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 결합 특이성은 절대적인 것이 아니라 상대적인 속성이므로 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 그 표적과 하나 이상의 레퍼런스 표적 사이를 구별할 수 있다면 표적(예를 들어, LAG-3)과 "특이적으로" 결합한다. 예를 들어, "특이적으로 결합"은 웨스턴 블랏, ELISA, FACS, RIA (방사면역측정법), ECL (전기화학 발광), IRMA 어세이 (면역방사능동정), IHC (면역조직화학) 및 펩타이드 스캔에 따라 결정될 수 있다.

[0044] 하나의 구현예에서, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 이의 C-말단에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 단백질 도메인인 융합 파트너에 융합된다. 추가 특정 구현예에서 상기 단백질 도메인은 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 C_H3 도메인, 면역글로불린의 C_H4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 및 알부민 결합 단백질을 포함한다.

[0045] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 상기 리포칼린 뮤테인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물에 컨쥬게이트된다. 보다 바람직하게는, 상기 뮤테인은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역 글로불린의 Fc 부분, 면역 글로불린의 C_H3 도메인, 면역 글로불린의 C_H4 도메인, 알부민 결합 펩타이드 및 알부민 결합 단백질을 포함한다.

[0046] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 개시된 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 상기 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포를 포함한다.

[0047] A. LAG-3에 특이적인 리포칼린 뮤테인

[0048] 한 측면에서, 본 발명은 인간 LAG-3에 결합하는 인간 리포칼린 뮤테인 및 이러한 뮤테인의 유용한 응용을 제공한다. 본원은 또한 본원에 기술된 LAG-3 결합 단백질을 제조하는 방법 및 상기 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 본원의 LAG-3 결합 단백질 및 이의 조성물은 샘플에서 LAG-3 단백질을 검출하는 방법 또는 면역 반응을 자극하거나 억제하기 위해 대상체에서 LAG-3을 결합시키는 방법에 사용될 수 있다. 마지막으로, 본원은 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 II 분자에 LAG-3의 결합을 저해하기 위해 LAG-3에 대한 리포칼린의 뮤테인을 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해 제공된 용도에 부수하는 이들 특징을 갖는 그러한 인간 리포칼린 뮤테인은 이전에 알려져 있지 않다.

[0049] 1. LAG-3에 특이적인 예시적인 리포칼린 뮤테인.

[0050] 본 발명의 일 구현예는 LAG-3, 특히 인간 LAG-3 (huLAG-3)을 약 500 nM, 300 nM, 100 nM, 15nM, 10nM, 1nM 또는 심지어 0.36nM 이하의 K_d로 측정된 친화도로 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인에 관한 것이다. 이러한 친화도

는 예를 들어 **실시예 5** 또는 **실시예 6**에 필수적으로 기술된 표면플라스몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 분석에 의해 측정될 수 있다.

- [0051] 또 다른 구현예에서, LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인은 사이노몰거스 LAG-3 (cyLAG-3, 서열번호 2)일 수 있으며, 일부 추가 구현예에서 약 160 nM, 120 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM 또는 심지어 9.3 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 cyLAG-3 (서열번호 2)에 결합할 수 있다. 이러한 친화도는 예를 들어 **실시예 6**에 필수적으로 기술된 SPR 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0052] 또 다른 구현예에서, 상기 리포칼린 뮤테인은 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 2 nM 이하의 EC_{50} 값을 갖는 huLAG-3로 형질감염된 CHO 세포 상에 LAG-3를 결합시킬 수 있다. 예를 들어, EC_{50} 값은 **실시예 8** 또는 **실시예 9**에 필수적으로 기술된 형광표지 세포분류기(FACS)에 의해 측정될 수 있다.
- [0053] 본원의 다른 구현예는 파이토헤마글루티닌(PHA) 자극 말초혈액 단핵구(PBMC)에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인을 제공한다. 상기 결합은 예를 들어 **실시예 10**에 필수적으로 기술된 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0054] 일부 구현예에서, 상기 리포칼린 뮤테인은 항원-제시 세포(antigen-presenting cells, APCs) 또는 종양 세포에서 발현되는 것과 같은 LAG-3과 MHC 클래스 II의 결합을 억제할 수 있다. 상기 억제 작용 방식은 예를 들어 **실시예 11**에 필수적으로 기술된 FACS 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0055] 한 측면에서, 본 발명은 LAG-3 결합 hT1c 뮤테인을 제공한다.
- [0056] 이와 관련하여, 본원은 약 300 nM 이하 또는 심지어 약 100 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 LAG-3에 결합할 수 있는 하나 이상의 hT1c 뮤테인을 제공한다.
- [0057] 일부 구현예에서, 이러한 hT1c 뮤테인은 hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열의 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 67, 79, 85, 86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기(들)를 포함한다.
- [0058] 일부 특정 구현예에서, 이러한 hT1c 뮤테인은 hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열의 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 및 108 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기(들)를 포함할 수 있다.
- [0059] 추가 특정 구현예에서, 이러한 hT1c 뮤테인은 hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열의 101, 111, 114 및 153 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기(들)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0060] 일부 추가 구현예에서, 상기 hT1c 뮤테인은 hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열의 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 심지어 그 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기(들)를 포함할 수 있으며, 상기 폴리펩타이드는 LAG-3, 특히 huLAG-3에 결합한다.
- [0061] 일부 또 다른 구현예에서, 본 발명은 폴리펩타이드에 관한 것으로, 상기 폴리펩타이드는 hT1c 뮤테인이며, hT1c(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여, 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 서열 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 그 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기(들)를 포함하며, 상기 폴리펩타이드는 LAG-3, 특히 hLAG-3에 결합한다.
- [0062] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인은 예를 들어, 세린 잔기에 의해 천연 시스테인 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 hT1c 뮤테인은 세린 잔기와 같은 또 다른 아미노산에 의한 61 및/또는 153 서열 위치에서 천연 시스테인 잔기의 아미노산 치환된 것을 포함한다. 이러한 맥락에서, 시스테인 잔기 61 및 153에 의해 형성된 야생형 눈물 리포칼린(cf, Breustedt 등, J Biol Chem, 2005)의 구조적 이황화 결합(각각의 천연 핵산 라이브러리 수준에서)의 제거가 안정하게 접힐뿐만 아니라 높은 친화도를 갖는 주어진 비-천연 리간드에도 결합할 수 있는 hT1c 뮤테인을 제공할 수 있음을 주목한다. 일부 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 hT1c 뮤테인은 Cys61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro 또는 Trp, 및/또는 Cys153 → Ser 또는 Ala 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 치환은 Cys 61과 Cys 153을 연결하는 자연 발생적인 이황화 브릿지의 형성을 방지하고 따라서 상기 뮤테인의 취급을 용이하게 하는데 유용하다는 것이 입증되었다. 그러나, LAG-3에 결합하는 hT1c 뮤테인 및 Cys 61과 Cys

153 간에 형성된 이황화 브릿지를 갖는 hTlc 뮤테인도 본 발명의 일부이다.

- [0063] 일부 구현예에서, 구조적 이황화 결합의 제거는 본 발명의 뮤테인으로 비 천연적인 인공 이황화 결합의 (자발적 인) 생성 또는 계획적인 도입을 가능하게 하여 뮤테인의 안정성을 증가시키는 추가 이점을 제공하는 것으로도 보인다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 61, 101 및 153 위치의 시스테인 코돈 중 2개 또는 3개가 또 다른 아미노산의 코돈으로 대체된다. 또한, 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 hTlc 뮤테인은 세린 잔기 또는 히스티딘 잔기에 의해 101번 위치에서 천연 시스테인 잔기의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 뮤테인은 hTlc (서열번호 1)의 아미노산 서열에 대하여 28 또는 105 위치의 시스테인 잔기에 의한 천연 아미노산의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0065] 또한, 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 뮤테인은 hTlc (서열번호 1)의 아미노산 서열에 대하여 프롤린 잔기에 의해 위치 111에서 천연 아르기닌 잔기의 아미노산 치환을 포함한다. 또한, 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 뮤테인은 hTlc (서열번호 1)의 아미노산 서열에 대하여 트립토판 잔기 또는 글루탐산에 의한 위치 114에서의 천연 라이신 잔기의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 LAG-3-결합 hTlc 뮤테인은 hTlc의 선형 폴리펩타이드 서열(서열번호 1)의 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 서열 위치에 상응하는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다: Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ser, Phe, Gly, Ala, Asp 또는 Glu; Glu 27 → Asp, Val 또는 Thr; Phe 28 → Cys or Asp; Pro 29 → Phe, Leu 또는 Trp; Glu 30 → Trp, Asn 또는 Tyr; Met 31 → Ile, Val, Asp, Leu 또는 Tyr; Asn 32 → Asp, Glu, Tyr, Trp, Val, Thr 또는 Met; Leu 33 → Asp, Glu 또는 Pro; Glu 34 → Val, Trp 또는 His; Val 36 → Ala; Asn 48 → Asp; Lys 52 → Glu, Ser, Arg 또는 Asn; Val 53 → Ala; Met 55 → Ala 또는 Val; Leu 56 → Asp, Gln 또는 Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Phe, Trp 또는 Asp; Arg 60 → Phe 또는 Glu; Cys 61 → Trp, Pro, Leu 또는 Trp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Val 85 → Ala; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Ser 또는 Phe; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys 또는 Gly; His 106 → Ala, Glu, Thr, Tyr, Gln 또는 Val; Lys 108 → Tyr, Phe, Thr 또는 Trp; Val 110 → Gly 또는 Ala; Arg 111 → Pro; Gly 112 → Met 또는 Thr; Lys 114 → Trp 또는 Ala; Lys 121 → Thr; Ser 140 → Gly 및 Cys 153 → Ser. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 hTlc 뮤테인은 hTlc(서열번호 1)의 이러한 서열 위치에서 2 이상, 예를 들면 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 심지어 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 이상 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0067] 일부 추가의 구현예에서, LAG-3 결합 hTlc 뮤테인은 hTlc(서열번호 1)의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여 다음의 아미노산 치환 세트 중 하나를 포함한다 :
- [0068] (a) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0069] (b) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Asn; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- [0070] (c) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Tyr; Met 31 → Asp; Asn 32 → Val; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Leu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Val; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0071] (d) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Thr; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Trp; Glu 30 → Trp; Met 31 → Tyr; Asn 32 → Val; Leu 33 → Asp; Glu 34 → His; Leu 56 → Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Gln; Lys 108 → Trp; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0072] (e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 →

Ser;

- [0073] (f) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0074] (g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Asn 48 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 140 → Gly; Cys 153 → Ser;
- [0075] (h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Glu; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0076] (i) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Lys 52 → Glu; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0077] (j) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Val; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0078] (k) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Trp; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Tyr; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- [0079] (l) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Val; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- [0080] (m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- [0081] (n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- [0082] (o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; 또는
- [0083] (p) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Asn; Met 31 → Asp; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Pro; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Thr; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser.
- [0084] 나머지 영역에서, 즉, 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 서열 위치와 다른 영역에서, 본 발명의 hTlc 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 야생형 (천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0085] 추가 구현예에서, 본 발명에 따른 hTlc 뮤테인은 hTlc의 서열(서열 번호 1)과 70% 이상의 서열 동일성 또는 70%

이상의 서열 상동성을 갖는다. 예시적인 예로서, 서열번호 14의 뮤테인은 hT1c(서열번호 1)의 아미노산 서열과 약 86%의 아미노산 서열 동일성 또는 서열 상동성을 갖는다.

- [0086] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 hT1c 뮤테인은 서열번호 7-22 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0087] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 hT1c 뮤테인은 서열번호 7-22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상의 서열 동일성을 가진다.
- [0088] 본 발명은 서열번호 7-22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 hT1c 뮤테인의 구조적 상동체를 또한 포함하며, 상기 구조적 상동체는 상기 hT1c 뮤테인과 비교하여 약 60% 이상, 바람직하게는 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 약 92% 이상 및 가장 바람직하게는 95% 이상의 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다.
- [0089] 본 발명에 따른 hT1c 뮤테인은 자연 발생 형태인 hT1c(서열번호 1)의 돌연변이 유발에 의해 수득될 수 있다. 돌연변이 유발의 일부 구현예에서, 치환 (또는 대체)은 보존적 치환이다. 그럼에도 불구하고, 리포칼린 뮤테인이 LAG-3에 결합하는 능력을 보유하고/하거나 hT1c의 아미노산 서열(서열번호 1)과 적어도 60% 이상, 예를 들어 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 서열 동일성을 갖는다는 점에서 그 다음 치환된 서열과의 동일성을 갖는 한, -비-보존적 치환 또는 하기에 예시된 치환들 중의 하나 이상을 포함하는- 임의의 치환이 예상된다.
- [0090] 일부 특정 구현예에서, 본 발명은 약 15 nM 이하의 K_d 로 측정된 친화도로 인간 LAG-3에 결합하는 리포칼린 뮤테인을 제공하며, 상기 리포칼린 뮤테인은 서열번호 11-13 및 21 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 90% 이상, 예컨대 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다.
- [0091] **2. LAG-3에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 응용.**
- [0092] 본 발명의 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인에 대한 많은 가능한 응용이 의학분야에 존재한다.
- [0093] 추가적 측면으로, 본 발명은 샘플에서 LAG-3을 검출하기 위한 본원에 개시된 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인의 용도 및 각각의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0094] 본 발명은 또한 LAG-3와의 복합체 형성에 대해 기술된 하나 이상의 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인의 용도를 포함한다.
- [0095] 따라서, 본 발명의 다른 측면에서, 본원의 리포칼린 뮤테인은 LAG-3의 검출에 사용된다. 이러한 용도는 적절한 조건 하에서 하나 이상의 상기 뮤테인을 LAG-3을 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 접촉시켜 상기 뮤테인 및 LAG-3 간에 복합체를 형성시키는 단계, 및 적절한 신호에 의해 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 검출 가능한 신호는 상술한 바와 같이, 표지에 의해 또는 결합, 즉 복합체 형성 그 자체에 기인한 물리적 특성의 변화에 의해 야기될 수 있다. 일 예로는 금막과 같은 표면에 고정된 하나로부터 결합 파트너의 결합 중에 변화되는 값인, 표면 플라스몬 공명이다.
- [0096] 본 명세서에 개시된 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인은 또한 LAG-3의 분리에 사용될 수 있다. 그러한 용도는 하나 이상의 상기 뮤테인을 적합한 조건하에서 LAG-3을 함유할 것으로 의심되는 샘플과 접촉시켜 뮤테인과 LAG-3 간에 복합체를 형성시키는 단계, 및 상기 샘플로부터 상기 복합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0097] LAG-3의 검출뿐만 아니라 LAG-3의 분리를 위한 개시된 뮤테인의 용도에서, 뮤테인 및/또는 LAG-3 또는 그의 도메인 또는 단편은 적합한 고체상에 고정화될 수 있다.
- [0098] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 LAG-3 결합 리포칼린 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트를 특징으로 한다.
- [0099] 진단에서의 이들의 용도에 더하여, 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원의 뮤테인 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다.
- [0100] 또한, 본 발명은 항암제 및/또는 면역 조절제로서 사용하기 위해 LAG-3에 결합하는 인간 리포칼린 뮤테인을 제공한다. 이와 같이, LAG-3에 결합하는 본원의 리포칼린 뮤테인은 암, 감염성 질환 및 자가 면역 질환과 같은 인간 질병의 치료 또는 예방 방법에 사용되는 것으로 생각된다. 따라서, 본 발명의 LAG-3에 결합하는 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에 암,

감염성 질환 및 자가 면역 질환과 같은 인간 질병의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0101] **B. 본원의 리포칼린 뮤테인**

[0102] 리포칼린은 리간드에 결합하도록 자연적으로 진화된 단백질성 결합 분자이다. 리포칼린은 척추동물, 곤충, 식물 및 박테리아를 비롯한 많은 생물체에서 나타난다. 리포칼린 단백질 부류((Pervaiz and Brew, FASEB J, 1987)의 멤버는 전형적으로 작은 분비 단백질이며 단일 폴리펩타이드 사슬을 갖는다. 이들은 다양한 분자 인식 특성의 범위에 의해 특징지어진다: 다양한 주요한 소수성 작은 분자(레티노이드, 지방산, 콜레스테롤, 프로스타글란딘, 빌리버딘, 페로몬, 맛이 나는 물질 및 냄새 나는 물질과 같은); 및 특히 세포-표면 수용체와의 결합, 및 이들의 거대 분자 복합체 형성. 과거에는 이들이 주로 수송 단백질로 분류되었지만, 현재 리포칼린이 다양한 생리 기능을 수행하고 있음이 분명하다. 여기에는 레티놀 수송, 후각, 페로몬 신호 전달 및 프로스타글란딘 합성이 포함된다. 리포칼린은 또한 면역 반응의 조절 및 세포 항상성(cell homeostasis)의 매개와 관련되어 있다(예를 들어, Flower *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996 참고).

[0103] 리포칼린은 흔히 20% 미만의 서열 동일성을 갖는 비정상적으로 낮은 수준의 전체 서열 보존을 공유한다. 매우 대조적으로, 그들의 전반적인 접합 패턴은 고도로 보존되어있다. 리포칼린 구조의 중심부는 연속적으로 수소 결합된 β -배럴을 형성하기 위해 그 자체로 폐쇄된 단일 8-가닥 역평행 β -시트로 구성된다. 이 β -배럴은 중앙 공간(cavity)을 형성한다. 상기 배럴의 한쪽 끝은 β -가닥을 연결하는 3개의 펩타이드 루프뿐만 아니라 이의 바닥을 가로지르는 N-말단 펩타이드 절편에 의해 입체적으로 차단된다. 상기 β -배럴의 다른 말단은 용매에 개방되어 있으며 4개의 유연한 펩타이드 루프에 의해 형성된 표적 결합 부위를 포함한다. 다른 크기, 형태 및 화학적 특성을 가진 표적을 수용할 수 있는 다양한 결합 모드를 제공하는 것은 다르게 경질된 리포칼린 스캐폴드에 있는 상기 루프의 다양성이다(예를 들면, Skerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower *et al.*, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996 참조).

[0104] LAG-3에 결합하는 본 발명의 리포칼린 뮤테인과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "~에 특이적인"은 리포칼린 뮤테인이 LAG-3에 대해 지시되거나 그에 결합하거나 반응하는 것을 포함한다. 따라서, 지시되거나 결합하거나 반응하는 것은 리포칼린 뮤테인이 LAG-3에 특이적으로 결합한다는 것을 포함한다. 이 문맥에서의 용어 "특이적으로"는 리포칼린 뮤테인이 본 명세서에 기술된 바와 같이 LAG-3 단백질과 반응하지만, 본질적으로 또 다른 단백질과는 반응하지 않는다는 것을 의미한다. "또 다른 단백질"이란 용어는 본 명세서에 개시된 리포칼린이 지시하는 LAG-3에 밀접하게 관련되거나 상동성이 있는 단백질을 포함하여, 비 LAG-3 단백질을 포함한다. 그러나 인간 이외의 종으로부터의 LAG-3 단백질, 단편 및/또는 변이체는 "대상체"라는 정의의 문맥에서 기술된 것과 같이, "또 다른 단백질"이라는 용어에 의해 배제되지 않는다. "본질적으로 결합하지 않는다"는 용어는 본 발명의 리포칼린 뮤테인이 다른 단백질에 결합하지 않는 것을 의미하며, 즉 30% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 보다 바람직하게는 10% 이하, 특히 바람직하게는 9, 8, 7, 6 또는 5% 이하의 교차-반응성을 나타낸다. 본 명세서에서 정의된 바와 같이 리포칼린이 특이적으로 반응하는지의 여부는 특히 본 발명의 리포칼린 뮤테인과 LAG-3의 반응 및 상기 리포칼린과 다른 단백질(들)의 반응을 비교함으로써 쉽게 테스트할 수 있다. "특이적 결합"은 또한 예를 들어 웨스턴 블랏, ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC 및 펩타이드 스캔에 따라 결정될 수 있다.

[0105] 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열은 또 다른 리포칼린과 그러한 뮤테인의 서열 동일성과 비교하여, 레퍼런스 리포칼린, 예를 들면 hTlc에 대해 높은 서열 동일성을 갖는다. 이러한 일반적인 맥락에서, 본 발명에 따른 조합물의 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열은 상응하는 야생형 또는 레퍼런스 리포칼린의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 유사하다. 상기 상응하는 레퍼런스 리포칼린의 서열과 실질적으로 유사한, 본 발명에 따른 상기 조합물의 리포칼린 뮤테인의 각각의 서열은 상기 상응하는 리포칼린의 서열에 적어도 65% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 82% 이상, 85% 이상, 87% 이상, 90% 이상, 적어도 95% 이상을 포함하는 동일성을 갖는다. 이와 관련하여, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 물론 리포칼린 뮤테인이 LAG-3에 결합할 수 있게 하는 본 명세서에 기재된 비교 치환을 포함할 수 있다. 전형적으로 리포칼린(cf, 상기)의 뮤테인은 리포칼린의 리간드 결합 부위의 개방 말단에 있는 4개의 루프에서 아미노산의 하나 이상의 돌연변이(레퍼런스 리포칼린의 서열에 비해)를 포함한다. 상술한 바와 같이, 이들 영역은 원하는 표적에 대한 리포칼린 뮤테인의 결합 특이성을 결정하는데 필수적이다.

[0106] 본 발명의 뮤테인은 또한 리포칼린의 표적 결합 부위를 형성하는 4개의 가요성 펩타이드 루프 외부의 영역에서 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 뮤테인은 리포칼린의 폐쇄 말단에서 β -가닥을 연결하는 3개의 펩타이드 루프 (BC, DE 및 FG로 표시) 중 하나 이상에서 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예시적인 예로서, 눈물 리포칼린 또는 이의 상동체의 폴리펩타이드로부터 유래된 뮤테인은 N-말단 영역 및/또는 천연

리포칼린 결합 포켓의 반대편에 위치한 β -배럴 구조의 말단에 배열된 세 개의 펩타이드 루프 BC, DE 및 FG의 임의의 서열 위치에서 1, 2, 3, 4개 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 추가의 예시적인 예로서, 눈물 리포칼린 또는 그 상동체의 폴리펩타이드로부터 유래된 뮤테인은 눈물 리포칼린의 야생형 서열과 비교하여 β -배럴 구조의 말단에 배열된 펩타이드 루프 DE에 돌연변이된 아미노산 잔기를 가지지 않을 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인은 상응하는 천연 리포칼린과 비교하여 하나 이상, 즉 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 심지어 20개의 치환을 포함할 수 있지만, 이러한 리포칼린 뮤테인은 LAG-3에 결합할 수 있어야 한다. 예를 들어, 리포칼린 뮤테인은 예를 들어 hTlc의 야생형 서열을 갖는 야생형 리포칼린의 별개의 위치에 상응하는 위치(즉, 상응하는 위치)에서 치환을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 조합물의 리포칼린 뮤테인은 아르기닌 잔기에 의한 천연 아미노산의 2, 3, 4 또는 5개, 때때로 더 많은 아미노산 치환을 포함하는 2개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 "레퍼런스 단백질" 스캐폴드의 핵산은 LAG-3에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인을 생성하기 위한 목적으로 돌연변이유발된다.

[0108] 또한, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 생물학적 활성(예: LAG-3과 같은 표적과의 결합)에 영향을 미치지 않는 그의 N- 또는 C-말단, 바람직하게는 서열번호 23 내와 같은 C-말단에 Strep=태그 II 서열과 같은 이중 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0109] 유사하게, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 각각의 야생형 리포칼린; 예를 들어, 서열번호 7-22과 비교하여 그의 N-말단에서 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 아미노산 및/또는 그의 C-말단에서 1, 2 또는 그 이상의 아미노산이 결핍할 수 있다.

[0110] 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)은 보존적인 치환이다. 그럼에도 불구하고, 리포칼린 뮤테인이 LAG-3에 결합하는 능력을 보유하고 있고/있거나 "레퍼런스 서열"과 60% 이상, 예를 들어 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 동일하다는 점에서 그 다음 치환된 서열과의 동일성을 갖는 한, -비 보존적 치환 또는 하기에 예시된 치환으로부터의 하나 이상의 치환을 포함하는- 임의의 치환이 예상된다.

[0111] 보존적 치환은 일반적으로 돌연변이될 아미노산에 따라 열거되고, 각각 보존적으로 일어날 수 있는 하나 이상의 대체(들)가 따르는 다음의 치환이다 : Ala \rightarrow Gly, Ser, Val; Arg \rightarrow Lys; Asn \rightarrow Gln, His; Asp \rightarrow Glu; Cys \rightarrow Ser; Gln \rightarrow Asn; Glu \rightarrow Asp; Gly \rightarrow Ala; His \rightarrow Arg, Asn, Gln; Ile \rightarrow Leu, Val; Leu \rightarrow Ile, Val; Lys \rightarrow Arg, Gln, Glu; Met \rightarrow Leu, Tyr, Ile; Phe \rightarrow Met, Leu, Tyr; Ser \rightarrow Thr; Thr \rightarrow Ser; Trp \rightarrow Tyr; Tyr \rightarrow Trp, Phe; Val \rightarrow Ile, Leu. 다른 치환도 허용되며, 경험적으로 또는 다른 알려진 보존적 또는 비-보존적 치환에 따라 결정될 수 있다. 추가 배향으로서, 다음의 8개 그룹은 각각 보존적 치환을 정의하기 위해 통상적으로 서로 일어날 수 있는 아미노산을 함유한다 :

- [0112] a. 알라닌 (Ala), 글리신 (Gly);
- [0113] b. 아스파르트산 (Asp), 글루탐산 (Glu);
- [0114] c. 아스파라긴 (Asn), 글루타민 (Gln);
- [0115] d. 아르기닌 (Arg), 라이신 (Lys);
- [0116] e. 이소류신 (Ile), 류신 (Leu), 메티오닌 (Met), 발린 (Val);
- [0117] f. 페닐알라닌 (Phe), 티로신 (Tyr), 트립토판 (Trp);
- [0118] g. 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr); 및
- [0119] h. 시스테인 (Cys), 메티오닌 (Met)

[0120] 그러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 초래하는 경우, 다음과 같은, 또는 아미노산 부류와 관련하여 하기에서 기술되는 바와 같은 보다 실질적인 변화가 도입될 수 있고 생성물은 원하는 특성에 대해 스크리닝될 수 있다. 그러한 보다 실질적인 변화의 예는 Ala \rightarrow Leu, Ile; Arg \rightarrow Gln; Asn \rightarrow Asp, Lys, Arg, His; Asp \rightarrow Asn; Cys \rightarrow Ala; Gln \rightarrow Glu; Glu \rightarrow Gln; His \rightarrow Lys; Ile \rightarrow Met, Ala, Phe; Leu \rightarrow Ala, Met, Norleucine; Lys \rightarrow Asn; Met \rightarrow Phe; Phe \rightarrow Val, Ile, Ala; Trp \rightarrow Phe; Tyr \rightarrow Thr, Ser; Val \rightarrow Met, Phe, Ala 이다.

[0121] 리포칼린의 생물학적 특성의 실질적인 변경은 (a) 치환 영역에서 폴리펩타이드 골격의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선형 형태, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 효과에 있어서

크게 다른 치환체를 선택함으로써 달성된다. 자연적으로 발생하는 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기초하여 그룹들로 나뉘어진다: (1) 소수성: 노르류신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신; (2) 중성 친수성: 시스테인, 세린, 트레오닌; (3) 산성: 아스파르트산, 글루탐산; (4) 염기성: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌; (5) 사슬 방향에 영향을 미치는 잔기: 글리신, 프롤린; 및 (6) 방향족: 트립토판, 티로신, 페닐알라닌.

[0122] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다. 각각의 리포칼린의 적절한 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적인 가교 결합을 방지하기 위해, 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로 시스테인 결합(들)은 안정성을 향상시키기 위해 리포칼린에 첨가될 수 있다.

[0123] 상술한 바와 같이, 삽입을 포함하는 임의의 돌연변이는 핵산 상에서 예를 들어, DNA 수준에서 확립된 표준 방법을 사용하여 매우 용이하게 수행될 수 있다. 아미노산 서열의 변경 예는 아미노산 치환뿐만 아니라 삽입 또는 결실이다. 그러한 치환은 보존적일 수 있으며, 즉 아미노산 잔기는 특히 극성 및 크기와 관련하여 화학적으로 유사한 성질의 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환의 예는 다음 그룹의 멤버들 사이의 치환이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 다른 한편, 아미노산 서열에 비-보존적 변이를 도입하는 것도 가능하다. 또한, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 대신에, 이러한 결실 또는 삽입이 안정한 접합/기능적 뮤테인을 초래하는 한, 눈물 리포칼린의 일차 구조의 하나 이상의 연속적인 아미노산을 삽입하거나 결실시키는 것이 가능할 수 있다.

[0124] 아미노산 서열의 변경은 돌연변이된 리포칼린 유전자 또는 그의 부분의 서브 클로닝을 단순화하기 위해 특정 제한효소에 대한 절단 부위를 혼입함으로써 단일 아미노산 위치의 직접 돌연변이유발을 포함한다. 또한, 이러한 돌연변이는 주어진 LAG-3와 같은 표적에 대한 리포칼린 뮤테인의 친화성을 더욱 향상시키기 위해 도입될 수 있다. 또한, 돌연변이는 접합 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 수용성을 개선하거나, 필요하다면 응집성을 감소시키는 것과 같은 상기 뮤테인의 특정 특성을 조절하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, 자연 발생 시스테인 잔기는 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다. 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸스타치(HES), 비오틴, 펩타이드 또는 단백질과 같은 다른 화합물에 컨쥬게이트시키는 것과 또는 자연적으로 발생하지 않는 이황화 결합의 형성하는 것과 같은 새로운 반응 그룹을 도입하기 위해 의도적으로 다른 아미노산 서열 위치를 시스테인으로 돌연변이시키는 것도 가능하다. 생성된 티올(thiol) 모이어티는 예를 들어 각각의 리포칼린 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 뮤테인을 PEG화 또는 HES화하는데 사용될 수 있다. hTlc 뮤테인의 아미노산 서열에 시스테인 잔기를 도입시키는 그러한 돌연변이의 예시적인 가능성은 Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys 및 Glu 131 → Cys를 포함한다. 임의의 아미노산 위치 40, 73, 90, 95 및/또는 131 측면에서 생성된 티올(thiol) 모이어티는 예를 들어 각각의 hTlc 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 뮤테인을 PEG화 또는 HES화하는데 사용될 수 있다.

[0125] 일부 구현예에서, 상기 모이어티 중 하나가 본 발명의 리포칼린 뮤테인에 컨쥬게이트되는 경우, 아미노산 측쇄로의 컨쥬게이트가 유리할 수 있다. 적합한 아미노산 측쇄는 인간 리포칼린의 아미노산 서열에서 자연적으로 존재할 수 있거나 또는 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 적합한 결합 부위가 돌연변이유발을 통해 도입되는 경우, 하나의 가능성은 시스테인 잔기에 의해 적절한 위치에서의 아미노산을 대체하는 것이다. 예를 들어, 이러한 돌연변이는 인간 눈물 리포칼린의 야생형 서열에서 Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys 또는 Glu 131 → Cys 치환 중 적어도 하나를 포함한다. 이들 중 임의의 위치에서 새로이 생성된 시스테인 잔기는 이후에 상기 뮤테인, 예를 들어 PEG 또는 그의 활성화된 유도체의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티에 상기 뮤테인을 컨쥬게이트시키는데 이용될 수 있다.

[0126] 또 다른 구현예에서, 상기 화합물들 중 하나를 본 발명에 따른 리포칼린 뮤테인에 컨쥬게이트시키는데 적합한 아미노산 측쇄를 제공하기 위해, 인공 아미노산을 돌연변이유발에 의해 도입할 수 있다. 일반적으로, 이러한 인공 아미노산은 보다 반응성이 있고 따라서 목적하는 화합물과의 컨쥬게이트를 용이하게 하도록 설계된다. 인공 tRNA를 통해 도입될 수 있는 그러한 인공 아미노산의 한 예는 파라-아세틸-페닐알라닌(para-acetyl-phenylalanine)이다.

[0127] 본 명세서에 개시된 상기 뮤테인의 여러 가지 응용에 있어서, 융합 단백질의 형태로 이들을 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 리포칼린 뮤테인은 이의 N-말단 또는 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 펩타이드에 융합되고 예를 들어, 신호 서열 및/또는 친화성 태그를 포함할 수 있다.

- [0128] 재조합 단백질의 용이한 검출 및/또는 정제를 가능하게 하는 Strep-태그 또는 Strep-태그 II(Schmidt *et al.*, J Mol Biol, 1996), c-myc-태그, FLAG-태그, His6-태그 또는 HA-태그 또는 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (glutathione-S-transferase)와 같은 단백질과 같은 친화성 태그는 또한 적절한 융합 파트너의 예이다. 마지막으로, 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 황색 형광 단백질(YFP)과 같은 발색 또는 형광 특성을 갖는 단백질은 또한 본 발명의 리포칼린 뮤테인에 적합한 융합 파트너이다.
- [0129] 일반적으로, 본 발명의 리포칼린 뮤테인을 화학적, 물리적, 광학적 또는 효소 반응으로 검출가능한 화합물 또는 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 생성시키는 임의의 적절한 화학 물질 또는 효소로 표지하는 것이 가능하다. 물리적 반응과 동시에 광학 반응/마커의 예는 방사능 표지를 사용할 때 방사선 또는 X선 방출 시 형광 방출이다. 알칼라인 포스파타제(Alkaline phosphatase), 서양 고추냉이 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase) 및 β -갈락토시다아제(β -galactosidase)는 발색 반응 생성물의 형성을 촉매하는 효소 표지(및 동시에 광학 표지)의 예이다. 일반적으로, 항체(면역 글로불린의 Fc 부분에서 당 모이어티로 독점적으로 사용되는 것을 제외함)에 일반적으로 사용되는 모든 표지들도 본 발명의 리포칼린 뮤테인과의 컨주게이트에 사용될 수 있다. 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 예를 들어 주어진 세포, 조직 또는 기관에의 그러한 약물의 표적화된 전달 또는 세포(예를 들어 종양 세포)에 대한 선택적인 표적화를 위해 주변의 정상 세포에는 영향을 미치지 않고 또한 임의의 적합한 치료적 활성제와 컨주게이트될 수 있다. 그러한 치료적 활성제의 예는 방사성 핵종, 독소, 작은 유기 분자 및 치료 펩타이드 (예를 들어, 세포 표적 수용체의 작용제/길항제로서 작용하는 펩타이드 또는 주어진 세포 표적에서 단백질 결합 부위와 경쟁하는 펩타이드)를 포함한다. 그러나, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 치료적 활성 핵산, 예컨대 안티센스 핵산 분자, 작은 간섭 RNA, 마이크로 RNA 또는 리보자임(ribozymes)과 컨주게이트될 수 있다. 이러한 컨주게이트는 당업계에서 널리 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0130] 상기와 같이, 본원의 리포칼린 뮤테인은 일부 구현예에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티에 컨주게이트될 수 있다(이와 관련하여 PCT 공개 번호 W02006/56464 참조)에서 상기 컨주게이트 방법은 CTLA-4에 대한 결합 친화도를 갖는 인간 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린(hNGAL)의 뮤테인에 기재되어 있다). 혈청 반감기를 연장시키는 부분은 몇 개만 언급하자면, 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드록시에틸 스타치, 팔미트산(Vajo and Duckworth, Pharmacol Rev, 2000)과 같은 지방산 분자, 면역 글로불린의 Fc 부분, 면역 글로불린의 C_H3 도메인, 면역 글로불린의 C_H4 도메인, 알부민 결합 도메인, 알부민 결합 펩타이드 또는 알부민 결합 단백질, 트랜스페린 일 수 있다. 알부민 결합 단백질은 세균성 알부민 결합 단백질, 항체, 도메인 항체를 포함하는 항체 단편(예, 미국 특허 제6,696,245호) 또는 알부민에 대한 결합 활성을 갖는 리포칼린 뮤테인일 수 있다. 따라서, 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 반감기 연장에 적합한 컨주게이트 파트너는 예를 들어 연쇄상 구균 단백질 G(Konig and Skerra, J Immunol Methods, 1998)) 중 하나와 같은 세균성 알부민 결합 도메인, 예를 들어 를 포함할 수 있다. 또한, 컨주게이트 파트너로서 사용될 수 있는 알부민 결합 펩타이드의 예로는 예컨대, 미국 특허 공개 제 2003/0069395호 또는 데니스(Dennis) 등(J Biol Chem, 2002)에 기술된 바와 같이, Xaa₁이 Asp, Asn, Ser, Thr 또는 Trp이며; Xaa₂는 Asn, Gln, His, Ile, Leu 또는 Lys이고; Xaa₃은 Ala, Asp, Phe, Trp 또는 Tyr이고; Xaa₄는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser 또는 Thr인 Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys 컨센서스 서열을 갖는 것이다.
- [0131] 다른 구현예에서, 알부민 그 자체(Osborn *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 2002) 또는 알부민의 생물학적 활성 단편은 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 컨주게이트 파트너로서 사용될 수 있다. 용어 "알부민"은 인간 혈청 알부민 또는 소 혈청 알부민 또는 랫트 알부민과 같은 모든 포유류 알부민을 포함한다. 알부민 또는 그 단편은 미국 특허 제5,728,553호 또는 유럽 특허 공개 번호 EP0330451 및 EP0361991에 기술된 바와 같이 재조합적으로 생산될 수 있다. 재조합 인간 알부민(예를 들어, Novozymes Delta Ltd., Nottingham, UK로부터의 Recombum[®])은 뮤테인의 반감기를 연장하기 위해 본원의 리포칼린 뮤테인에 접합되거나 융합될 수 있다.
- [0132] 알부민-결합 단백질이 항체 단편인 경우, 이는 도메인 항체일 수 있다. 도메인 항체(dAb)는 생물 물리학적 특성 및 생체 내 반감기를 정밀하게 제어하여 최적의 안전성 및 효율적인 제품 프로파일을 생성할 수 있도록 설계된다. 도메인 항체는 예를 들어 Domantis Ltd.(Cambridge, UK and MA, USA)로부터 상업적으로 입수 가능하다.
- [0133] 트랜스페린이 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티로서 사용되는 경우, 상기 뮤테인은 비-글리코실화 트랜스페린의 N- 또는 C-말단 또는 둘 모두에 유전적으로 융합될 수 있다. 비-글리코실화 트랜스페린은 14-17일의 반감기를 가지며, 트랜스페린 컨주게이트 뮤테인은 유사하게 연장된 반감기를 갖는다. 트랜스페린 담체는 또한 높은 생체 이용률, 생체 분포 및 순환 안정성을 제공한다. 이 기술은 BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)에서 시판 중이다. 단백질 안정화제/반감기 연장 파트너로서

사용하기 위한 재조합 인간 트랜스페린(DeltaFerrinTM)은 또한 Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

- [0134] 면역 글로불린의 Fc 부분이 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 목적으로 사용되는 경우, Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA)로부터 상업적으로 입수 가능한 SynFusionTM 기술을 사용할 수 있다. 이 Fc-융합 기술을 사용하면 오래 지속되는 생물 의약품을 만들 수 있으며, 예를 들어 약물 동력학, 용해도 및 생산 효율을 향상시키기 위해 항체의 Fc 영역에 연결된 뮤테인의 2개 복제품으로 구성될 수 있다.
- [0135] 본 발명의 리포칼린 뮤테인의 반감기를 연장시키는 또 다른 대안은 긴, 구조화되지 않은, 유연한 글리신-풍부 서열(예를 들어, 약 20 내지 80개의 연속 글리신 잔기를 갖는 폴리-글리신)을 가지는 뮤테인의 N- 또는 C-말단에 융합시키는 것이다. 예를 들어, 국제 공개 번호 WO2007/038619에 개시된 이러한 접근법은 또한 "rPEG"(재조합 PEG)라는 용어이다.
- [0136] 폴리알킬렌 글리콜이 컨쥬게이트 파트너로서 사용되는 경우, 폴리알킬렌 글리콜은 치환되거나, 비치환되거나, 선형 또는 분지형일 수 있다. 이는 또한 활성화된 폴리알킬렌 유도체일 수 있다. 적합한 화합물의 예는 인터페론과 관련하여 국제 공개 WO 99/64016, 미국 특허 제6,177,074호 또는 미국 특허 제6,403,564호에 기술된 바와 같은, 또는 PEG-변형된 아스파라긴 분해 효소(PEG-modified asparaginase), PEG-아데노신 데아미나제(PEG-adenosine deaminase, PEG-ADA) 또는 PEG-수퍼옥사이드 디스뮤타아제(PEG-superoxide dismutase)와 같은 다른 단백질에 대해 기술된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다(Fuertges and Abuchowski, Journal of Controlled Release, 1990). 이러한 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 300 내지 약 70,000 달톤의 범위, 예를 들어 분자량이 약 10,000, 약 20,000, 약 30,000 또는 약 40,000 달톤일 수 있다. 또한, 미국 특허 제6,500,930호 또는 제6,620,413호에 기술된 바와 같이, 하이드록시에틸 스타치(hydroxyethyl starch, HES)과 같은 탄수화물 올리고머 및 중합체는 혈청 반감기 연장 목적으로 본 발명의 뮤테인에 컨쥬게이트될 수 있다.
- [0137] 또한, 본 명세서에 개시된 리포칼린 뮤테인은 효소 활성 또는 다른 표적에 대한 결합 친화성과 같은 본 발명의 리포칼린 뮤테인에 새로운 특징을 부여할 수 있는 모이어티에 컨쥬게이트될 수 있다. 적합한 모이어티의 예는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 서양 고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 글루타치온-S-트랜스퍼라제(glutathion-S-transferase), 단백질 G의 알부민-결합 도메인(albumin-binding domain of protein G), 단백질 A(protein A), 항체 단편, 올리고머화 도메인(oligomerization domains) 또는 독소를 포함한다.
- [0138] 특히, 본 명세서에 개시된 리포칼린 뮤테인을 얻어진 융합 단백질의 "성분"들 모두가 함께 주어진 치료 표적에 작용할 수 있는 별도의 효소 활성 부위와 융합시키는 것이 가능할 수 있다. 리포칼린 뮤테인의 결합 도메인은 효소 도메인이 상기 표적의 생물학적 기능을 제거하기 위해 질환-유발 표적에 부착된다.
- [0139] 본 발명은 또한 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자(DNA 및 RNA)에 관한 것이다. 유전 암호의 축퇴성(degeneracy)은 동일한 아미노산을 특징하는 다른 코돈에 의한 특정 코돈의 치환을 허용하기 때문에, 본 발명은 본 명세서에 기재된 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 특정 핵산 분자에 국한되지 않고, 기능적 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 모든 핵산 분자를 포함한다. 이와 관련하여, 본 발명은 서열번호 23 내지 38, 39 내지 54에 나타낸 바와 같은 일부 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0140] 본 발명에 따른 방법의 또 다른 구현예에서, hTlc를 코딩하는 핵산 분자는 첫 번째 hTlc의 선형 폴리펩타이드 서열(서열번호 1)의 아미노산 서열 위치 14, 25-34, 36, 48, 52-53, 55-58, 60-61, 66, 79, 85-86, 101, 104-106, 108, 110-112, 114, 121, 140 및 153 중 하나 이상에서 돌연변이유발된다. 두 번째, 인간 눈물 리포칼린을 코딩하는 핵산 분자는 또한 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 아미노산 서열 위치 101, 111, 114 및 153 중 하나 이상에서 돌연변이유발된다.
- [0141] 본 발명은 또한 실험적 돌연변이유발의 지정된 서열 위치 외부에 추가적인 돌연변이를 포함하는 본 발명의 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 이러한 돌연변이는 종종 허용되거나, 예를 들어 그들이 향상된 돌연변이 효율, 혈청 안정성, 열 안정성, 제형 안정성 또는 뮤테인 및 융합 단백질의 리간드 결합 친화력에 기여하는 경우에 심지어 유리한 것으로 입증될 수 있다.
- [0142] 본 발명에 개시된 핵산 분자는 하나 이상의 조절 서열(들)에 "작동 가능하게 연결되어" 핵산 분자의 발현을 가

능하게 할 수 있다.

- [0143] 전사 및/또는 전사 조절에 관한 정보를 포함하는 서열 요소를 포함하고 이러한 서열들이 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 "작동 가능하게 연결되어" 있다면, DNA와 같은 핵산 분자는 "핵산 분자를 발현할 수 있다" 또는 "뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 할 수 있다"고 지칭된다. 작동 가능한 결합은 조절 서열 요소 및 발현되는 서열이 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되어 있는 결합(linkage)이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 종마다 다를 수 있지만, 일반적으로 이러한 영역은 원핵세포에서 프로모터 그 자체, 즉 전사의 개시를 지시하는 DNA 요소와 번역 개시 신호인 RNA로 전사될 때 DNA 요소를 모두 포함하는 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터 영역은 예를 들어 원핵세포에서의 -35/-10 박스 및 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 요소, 또는 진핵세포에서의 TATA 박스, CAAT 서열 및 5'-캡핑 요소와 같은 일반적으로 전사 및 번역의 개시에 관여하는 5' 비 암호화 서열을 포함한다. 이러한 영역은 또한 천연 폴리펩타이드를 숙주 세포의 특정 구획으로 표적화하기 위한 인핸서 또는 리프레서 요소뿐만 아니라 번역된 신호 및 리더 서열을 포함할 수 있다.
- [0144] 또한, 3' 비 암호화 서열은 전사 종결, 폴리아데닐화 등에 관여하는 조절 요소를 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 종결 서열이 특정 숙주 세포에서 만족스럽지 않으면, 그 세포에서 기능적 신호로 대체될 수 있다.
- [0145] 따라서, 본 발명의 핵산 분자는 조절 서열, 예컨대 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 프로모터 서열 및 전사 종결 서열을 포함한다. 적합한 원핵세포 프로모터는 예를 들어 tet 프로모터, lacUV5 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 진핵세포에서 발현하는데 유용한 프로모터의 예는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.
- [0146] 본 발명의 핵산 분자는 또한 플라스미드, 파지미드, 파지, 바쿨로바이러스, 코스미드 또는 인공 염색체와 같은 벡터 또는 임의의 다른 종류의 클로닝 운반체의 일부일 수 있다.
- [0147] 하나의 구현예에서, 상기 핵산 분자는 파지미드에 포함된다. 파지미드 벡터는 M13 또는 f1과 같은 템퍼런트 파지(temperent phage)의 유전자간(intergenic) 영역 또는 관심있는 cDNA에 융합된 그의 기능적 부분을 코딩하는 벡터를 나타낸다. 이러한 파지미드 벡터 및 적절한 헬퍼 파지(예 : M13K07, VCS-M13 또는 R408)로 박테리아 숙주세포를 중복감염(superinfection)시킨 후, 손상되지 않은 파지 입자가 생산되고, 이에 따라 파지 표면에 디스플레이되는 그의 상응하는 폴리펩타이드에 암호화된 이종 cDNA의 물리적 커플링을 가능하게 한다(Lowman, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997, Rodi and Makowski, Curr Opin Biotechnol, 1999).
- [0148] 이러한 클로닝 운반체들은 상술한 조절 서열 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 핵산 서열 외에, 발현에 사용되는 숙주 세포와 호환가능한 종에서 유래된 복제 및 제어 서열뿐만 아니라 형질전환 또는 형질감염 세포에서 선택 가능한 표현형을 부여하는 선택 마커를 포함할 수 있다. 많은 수의 적절한 클로닝 벡터가 당업계에 공지되어 있으며 상업적으로 이용 가능하다.
- [0149] 본 명세서에 기술된 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 DNA 분자, 특히 이러한 뮤테인의 코딩 서열을 함유하는 클로닝 벡터는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포로 형질전환될 수 있다. 표준 기술을 사용하여 형질전환을 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0150] 형질전환된 숙주 세포를 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 조건 하에서 배양한다. 적절한 숙주 세포는 Escherichia coli(대장균) 또는 Bacillus subtilis와 같은 원핵세포 또는 Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, SF9 또는 High5 곤충 세포, 불멸화된 포유동물 세포주(예, HeLa 세포 또는 CHO 세포)와 같은 진핵세포, 또는 1차 포유동물 세포일 수 있다.
- [0151] 본원은 또한 본원에 기재된 리포칼린 뮤테인의 생산 방법에 관한 것으로, 상기 뮤테인, 뮤테인의 단편 또는 뮤테인과 또 다른 폴리펩타이드(예를 들어, 또 다른 리포칼린 뮤테인 또는 항체 또는 항체 단편)의 융합 단백질은 유전자 조작 방법에 의해 상기 뮤테인을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산된다. 상기 방법은 생체 내에서 수행될 수 있고, 리포칼린 뮤테인은 예를 들어 박테리아 또는 진핵숙주 유기체에서 생성된 다음 이 숙주 유기체 또는 그 배양물로부터 분리될 수 있다. 예를 들어 in vitro 번역 시스템을 사용하여 시험관 내에서 단백질을 생산하는 것도 가능하다.
- [0152] 리포칼린 뮤테인을 생체 내에서 생산할 때, 그러한 뮤테인을 코딩하는 핵산은 재조합 DNA 기술(상술한 바와 같이)에 의해 적합한 박테리아 또는 진핵 숙주 유기체에 도입된다. 이러한 목적으로, 상기 숙주 세포는 먼저 확립된 표준 방법을 사용하여 본 명세서에 기재된 바와 같이 리포칼린 뮤테인을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 벡터로 형질 전환된다. 그 다음 상기 숙주 세포를 이종 DNA의 발현 및 이에 상응하는 폴리펩타이드의 합성

을 가능하게 하는 조건하에 배양한다. 이어서, 상기 폴리펩타이드는 세포 또는 배양 배지로부터 회수된다.

[0153] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 DNA와 같은 핵산 분자는 본원의 융합 단백질의 발현이 가능하도록 본원의 또 다른 핵산 분자에 "작동 가능하게 결합"될 수 있다. 이와 관련하여, 작동 가능한 결합은 제 1 핵산 분자의 서열 요소 및 제 2 핵산 분자의 서열 요소가 단일 폴리펩타이드로서 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 결합이다.

[0154] 또한, 본 발명의 hTlc 뮤테인에 대한 일부 구현예에서, Cys 61과 Cys 153 사이의 자연적으로 발생하는 이황화 결합도 제거될 수 있다. 따라서, 그러한 뮤테인은 예를 들어 그람-음성 박테리아의 세포질에서, 환원성 산화 환원 환경(reducing redox milieu)을 갖는 세포 구획에서 생산될 수 있다.

[0155] 본 발명의 리포칼린 뮤테인이 분자 내 이황화 결합을 포함하는 경우, 적절한 신호 서열을 사용하여 산화성 산화 환원 환경을 갖는 세포 구획에 초기 폴리펩타이드를 유도하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 산화 환경은 그람 양성 박테리아의 세포 외 환경 또는 진핵 세포의 소포체 내강에서 대장균과 같은 그람 음성 박테리아의 주변 세포질(periplasm)에 의해 제공될 수 있으며, 일반적으로 구조적 이황화 결합의 형성을 선호한다.

[0156] 그러나, 숙주 세포, 바람직하게는 대장균의 세포질에서 본 발명의 뮤테인을 생산하는 것도 가능하다. 이 경우, 상기 폴리펩타이드는 가용성 및 접힌 상태에서 직접 수득되거나 또는 봉입체의 형태로 회수되어 생체 외에서 재 생성될 수 있다. 추가적인 선택은 산화성 세포 내 환경을 갖는 특정 숙주 균주의 사용으로, 이는 세포질에서 이황화 결합의 형성을 가능하게 할 수 있다(Venturi et al. J. Mol. Biol. 2002).

[0157] 그러나, 본 명세서에 기재된 리포칼린 뮤테인은 유전 공학의 사용에 의해서만 생성되거나 제조될 필요는 없다. 오히려, 이러한 뮤테인은 메리필드(Merrifield) 고체상 폴리펩타이드 합성과 같은 화학 합성 또는 시험관 내 전사 및 번역에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어 원하는 돌연변이가 분자 모델링을 사용하여 확인되고, 시험관 내에서 그러한 돌연변이를 계속하는 폴리펩타이드를 합성하고 LAG-3의 결합 활성 및 다른 바람직한 성질(안정성과 같은)을 조사하는 것이 가능하다. 폴리펩타이드/단백질의 고체상 및/또는 용액상의 합성 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예, Bruckdorfer et al., Curr Pharm Biotechnol, 2004 참조).

[0158] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 당업계의 통상의 기술자에게 알려진 잘-확립된 방법을 사용하여 시험관 내 전사/번역에 의해 제조될 수 있다.

[0159] 통상의 기술자는 본 명세서에 개시된 리포칼린 뮤테인을 제조하는데 유용한 방법을 알 수 있을 것이나, 그의 단백질 또는 핵산 서열은 본 명세서에서 명시적으로 개시되어 있지 않다. 개요로서, 아미노산 서열의 이러한 변형은 돌연변이된 리포칼린 유전자 또는 그의 부분의 서브 클로닝을 단순화하기 위해 특정 제한효소에 대한 절단 부위를 혼입시킴으로써 단일 아미노산 위치의 지정된 돌연변이유발을 포함한다. 또한, 이들 돌연변이는 리포칼린 뮤테인 또는 그의 표적(예, LAG-3)에 대한 친화성을 더욱 향상시키기 위해 혼입될 수 있다. 또한, 돌연변이는 접힘 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 수용성을 향상시키거나 또는 필요하다면 응집성을 감소시키는 것과 같은 뮤테인의 특정 특성을 조절하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 발생하는 시스테인 잔기는 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다.

[0160] 본 명세서에 개시된 리포칼린 뮤테인 및 그의 유도체는 항체 또는 그의 단편과 유사한 많은 분야에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 리포칼린 뮤테인은 효소, 항체, 방사성 물질 또는 생화학적 활성 또는 정의된 결합 특성을 갖는 임의의 다른 그룹으로 표지하기 위해 사용될 수 있다. 그렇게 함으로써, 그들의 각각의 표적 또는 접합체 또는 그의 융합 단백질이 검출되거나 그들과 접촉될 수 있다. 또한, 본 발명의 리포칼린 뮤테인은 확립된 분석 방법(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯)에 의해 또는 현미경 또는 면역 감지에 의해 화학 구조를 검출하는 역할을 할 수 있다. 이와 관련하여, 검출 신호는 적절한 뮤테인 접합체 또는 융합 단백질의 사용에 의해 직접 생성될 수 있거나; 또는 항체를 통해 결합된 뮤테인의 면역 화학적 검출에 의해 간접적으로 생성될 수 있다.

[0161] 본 발명의 추가적인 목적, 이점 및 특징은 하기 실시예 및 첨부된 도면을 검토함으로써 통상의 기술자에게 명백해질 것이며, 이는 제한하려는 것이 아니다. 따라서, 본 발명은 예시적인 실시예들 및 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본 명세서에 개시된 발명들의 수정 및 변형이 통상의 기술자에 의해 수행될 수 있고, 그러한 수정들 및 변형들은 본 발명의 범위 내에서 고려된다는 것이 이해되어야 한다.

[0162] V. 실시예

[0163] 실시예 1: 게믹이원송이(Cynxoligus) 유래 재조합 LAG-3의 제작 및 특성 규명

[0164] 게믹이원송이 LAG-3 (cyLAG-3)의 세포 외 도메인은 인자 Xa 절단 부위(Ile-Glu-Gly-Arg, 서열번호: 56)를 통해

C-말단에서 융합되고, 이어서 인간 IgG1 Fc 단편 (cyLAG-3-Fc, 서열번호 2)에 대한 (G₄S)₃-링커를 발현 및 정제 하였다.

[0165] 실시예 2: LAG-3에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선별

[0166] LAG-3 단백질에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선별을 위해 인간 눈물 리포칼린(hTlc)-기반의 나이트 파지미드 라이브러리를 사용하였다. 인간 LAG-3 (huLAG-3) 융합 단백질(huLAG-3-Fc 융합, R&D Systems)을 파지 디스플레이 선별 동안 사용하였다.

[0167] huLAG-3 융합 단백질을 단백질 G 또는 단백질 A 중 하나로 코팅된 상자성 비드 상에 포획하였다. 이어서, 나이트 파지 라이브러리로부터 2×10^{12} 개의 파지미드를 표적-장식된 비드와 함께 인큐베이션하였다. 이후 상기 비드는 자석으로 분리되었다. 결합되지 않은 파지미드는 0.1% Tween (PBS/T)로 보충된 1x PBS로 비드를 세척하여 제거하였다. 결합된 파지미드를 먼저 70 mM 트리에틸아민으로 10분 동안 용출시킨 후 1M 트리스-Cl pH 6.0으로 상등액을 즉시 중화시켰다. 중간 세척 사이클 후 잔류하는 파지미드를 100 mM 글리신 pH 2.2로 10분 동안 용출시킨 다음 0.5 M 트리스-염기로 즉시 중화시켰다. 두 용출 분획을 모으고 재증폭을 위해 대장균 XL1-blue 배양물을 감염시키는데 사용하였다. 30분 동안 인큐베이션한 후, 원심분리에 의해 박테리아를 수집하고, 배지에 재현탁하고, 3개의 큰 LB/Am-ampiclinp 아가 플레이트에 도말하였다. 플레이트를 32 °C에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 감염된 세포를 10 g/L MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), 32 g/L 박토티립톤, 20 g/L 효모 추출물을 포함하는, pH 7.0 100 µg/mL 암피실린로 보충된 50 mL Super Broth (SB/Amp) 배지를 사용하여 아가 플레이트에서 긁어 냈다. 50 mL SB/Amp 배지에 적당한 부피의 박테리아 현탁액을 접종하여 0.08의 OD₅₅₀에 도달시켰다. 상기 배양액을 37 °C에서 진탕기(160 rpm)로 OD₅₅₀이 0.5에 도달할 때까지 인큐베이션하고, 그런 다음 37 °C에서 진탕기에 15분 동안 그리고 45분 동안 인큐베이션함으로써 헬퍼 파지(VCSM13, Amersham Bioscience, 1.5×10^{11} pfu)로 감염시켰다. 이어서, 카나마이신을 최종 농도 70 µg/mL가 되도록 첨가하여 헬퍼 파지에 감염된 박테리아를 선별하였다. 최종적으로, pIII-Tlc 뮤테인의 발현은 25 ng/mL 안하이드로테트라사이클린(Acros Organics)의 첨가에 의해 유도되었다.

[0168] 24 °C에서 15시간 인큐베이션 후, 배양물의 상등액을 원심분리(5000 xg, 20분)로 제거하였다. 이어서, 상등액을 0.22µm의 공극 크기를 갖는 폴리에테르설폰 막을 통과시켰다. 여액에 물 내 20% (w/v) PEG-8000 및 15% (w/v) NaCl을 함유하는 용액을 첨가하고 부드럽게 혼합하였다. 상기 용액을 4 °C, 5000 xg에서 20분 동안 원심분리하였다. 상기 파지미드를 함유하는 펠렛을 200 mM 붕산, 160 mM NaCl 및 1 mM EDTA를 함유하는 버퍼에 용해시켰다. 불용성 입자를 원심분리(5000 xg, 5분)로 제거하였다. 상기 상등액을 새로운 튜브로 옮기고 물 내 20% (w/v) PEG-8000 및 15% (w/v) NaCl을 함유하는 용액과 혼합하였다. 상기 용액을 30분 동안 인큐베이션하고 침전된 파지미드를 원심분리(5분 동안 5000 xg)로 모았다. 파지미드를 50 mM 벤즈아미딘으로 보충된 PBS에 재현탁하고 다음 라운드의 파지미드 선별에 사용하였다. 4회의 연속 선별을 수행하여 4개의 모(parental) 리포칼린 뮤테인(서열번호: 7, 8, 9, 10)을 얻었다.

[0169] 최적화된 LAG-3 특이 뮤테인의 선별을 위하여, 선별된 위치의 편향된 랜덤화 또는 오류 경향이 있는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기반 방법 중 하나를 사용함으로써 모 리포칼린 뮤테인(parental lipocalin mutant)인 서열번호 7, 8 및 9에 기초로 하여 추가 라이브러리를 생성하였다. 개선된 열 안정성 및 결합 친화도를 갖는 최적화된 뮤테인의 선별을 위해, 상기 파지미드 선별을 초기 뮤테인 서열과 비교하여 증가된 염격성으로 상기 기술된 바와 같이 수행하였고, 상승된 온도 및 제한된 농도에서의 예비 인큐베이션 단계를 수반하였다.

[0170] 실시예 3: 고 처리량 ELISA 스크리닝을 사용하여 LAG-3에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 동정

[0171] 개별 콜로니를 2x 효모추출물 트립톤(YT)/Amp 배지에 접종하고 밤새 (14-18 시간) 고정상으로 성장시켰다. 이어서 50 µL 2xYT / Amp를 고정상 배양물에 접종하고 37 °C에서 3시간 동안 인큐베이션한 다음 0.6-0.8의 OD₅₉₅에 도달할 때까지 22 °C로 이동시켰다. 뮤테인의 생산은 1.2 µg/mL 안하이드로테트라사이클린으로 보충된 10 µL 2xYT/Amp의 첨가에 의해 유도되었다. 배양물을 다음날까지 22 °C에서 인큐베이션시켰다. PBS/T에서 5%(w/v) BSA의 40 µL 첨가 및 25 °C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 배양물을 스크리닝 분석에 사용할 준비를 하였다.

[0172] LAG-3에 대한 상기 분리된 뮤테인의 결합을 마이크로타이터 플레이트 상에 4 °C에서 밤새 표적(PBS 중 1µg/mL)을 직접 코팅함으로써 시험하였다. 2% BSA를 함유한 PBST로 플레이트를 차단시킨 후, 20µL의 BSA-차단된 배양물(이전 열 인큐베이션 여부)을 마이크로타이터 플레이트에 첨가하고 25 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 뮤테인을 1시간 인큐베이션 후에 호스레디쉬 퍼옥시다아제(IBA)로 접합된 항 Strep-Tag 항체로

검출하였다. 정량화를 위해, 20 μ L의 QuantaBlu 형광 생성 펠록시다아제 기질을 첨가하고, 상기 형광을 330 nm의 여기 파장 및 420 nm의 방출 파장에서 측정하였다

[0173] 또한, 역 스크리닝 포맷을 적용하여 상기 뮤테인을 항-Strep-태그 항체로 코팅된 마이크로타이터 플레이트 상의 Strep-태그를 통해 포획하고 비오틴화된 표적을 첨가하고 엑스트라비딘-호스래디쉬 펠록시다아제(HRP)(Sigma)를 통해 검출하였다. 대안적으로, LAG-3-Fc 융합 단백질 표적을 첨가하고 항-인간 Fc IgG-HRP(Dianova)를 통해 검출하였다.

[0174] 증가된 친화성 및 안정성을 갖는 뮤테인을 선별하기 위해, 상기 스트리닝은 i) 감소된 항원 농도 및/또는 ii) MHC 클래스 II와의 경쟁 및/또는 iii) 표적 플레이트에 첨가하기 전에 60 °C에서 상기 스크리닝 상등액의 인큐베이션 및/또는 iv) 상기 뮤테인을 항-Strep-태그 항체로 코팅된 마이크로타이터 플레이트 상의 Strep-태그를 통해 포획하고, 상이한 농도의 표적을 첨가하여 엑스트라비딘-HRP(Sigma)(시그마 알드리치, St.Louis, MO) 또는 항-인간 Fc IgG-HRP (Dianova)를 통해 검출하는 역 스트리닝 포맷을 사용하여 수행하였다.

[0175] 상기 스크리닝 결과에 기초하여 클론을 시퀀싱한 다음, 추가 특성 규명을 위해 뮤테인을 선별하였다.

[0176] 실시예 4: 뮤테인의 발현

[0177] C-말단 서열 SAWHPQFEK (서열번호 57) 및 Strep- 태그 II 펩타이드 (WSHPQFEK, 서열번호 58)를 갖는 선별된 뮤테인을 적용 가능한 Strep-Tactin 친화성 크로마토그래피 및 예비 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 발현 후 상기 뮤테인을 정제하기 위해 2YT/Amp 배지에서 대장균 내 발현되었다.

[0178] 실시예 5: 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된 인간 LAG-3 단백질에 결합하는 뮤테인의 친화도

[0179] 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 본원에 개시된 대표적인 리포칼린 뮤테인의 결합 동력학 및 친화도를 측정하였다.

[0180] Biacore T200 기기(GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 huLAG-3-Fc(R&D Systems)에 리포칼린 뮤테인 서열번호 7, 8, 9 및 10의 결합을 측정하였다. 항-인간 IgG Fc 항체 (GE Healthcare)를 표준 아민 화학을 사용하여 CM5 센서 칩 상에 고정시켰다: 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이미드(EDC) 및 N-히드록시수신이미드(NHS)를 사용하여 칩 상의 카르복실기를 활성화시켰다. 이어서, 10 mM 소듐 아세테이트(pH 5) 중의 25 μ g/mL 농도에서 항-인간 IgG Fc 항체 용액(GE 헬스케어)을 9000 - 14000 공명 단위(RU)의 고정 수준까지 5 μ L/분의 유속으로 적용하였다. 잔류 미반응 NHS-에스테르를 1M 에탄올 아민 용액을 표면에 통과시킴으로써 차단하였다. 레퍼런스 채널은 유사한 방식으로 처리되었다. 그 후, HBS-EP + 버퍼 중 0.5 μ g/mL에서 LAG-3-Fc를 항-인간 IgG-Fc 항체로 포획하였다.

[0181] 친화도 측정을 위해, 각 뮤테인의 4가지 희석물을 HBS-EP + 버퍼에서 제조하고 5000, 2500, 1250 및 625 nM의 농도를 사용하여 제조된 칩 표면에 적용하였다. 결합 분석은 180초의 접촉 시간, 300초의 해리 시간 및 30 μ L/min의 유속으로 수행되었다. 모든 측정은 25 °C에서 수행되었다. 칩 표면의 재생을 10 μ L/분의 유속에서 60초 동안 3M MgCl₂ 및 180초 동안 10mM 글리신-HCl(pH 2)를 주입하여 달성하고, 러닝 버퍼(HBS-EP + 버퍼)로 여분의 세척을 거치고 120초의 안정화 기간을 거쳤다. 단백질 측정에 앞서 컨디셔닝 목적으로 3가지 시동 사이클을 수행하였다. 데이터는 Biacore T200 Evaluation 소프트웨어 (V 2.0)로 평가되었다. 더블 레퍼런싱을 사용하고, 로우데이타를 조정하기 위해 1 : 1 결합 모델을 사용하였다.

[0182] 그 결과를 표 1에 요약하였다. 상기 데이터로부터 서열번호 7, 8, 9 및 10의 리포칼린 뮤테인은 287 내지 500 nM의 K_d로 인간 LAG-3에 결합한다는 결론을 얻을 수 있다.

표 1

재조합 인간 LAG-3-Fc에 대한 서열번호 7, 8, 9 및 10의 LAG-3 특이 뮤테인의 운동 상수

	huLAG-3-Fc		
	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
서열번호 7	1.00E+05	4.00E-02	287
서열번호 8	3.00E+04	1.00E-02	354
서열번호 9	2.00E+03	9.00E-04	500
서열번호 10	7.00E+04	3.00E-02	391

[0183]

[0184] 실시예 6: Biacore에서 SPR에 의해 측정된 인간 및 게막이원숭이 LAG-3 단백질에 결합하는 최적화된 뮤테인의 친화도

[0185] huLAG-3-Fc (R&D) 및 cyLAG-3-Fc (서열번호 2)에 대한 최적화된 리포칼린 뮤테인의 결합을 실시예 5에 기술된 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

[0186] 그 결과는 표 2에 요약하였다. huLAG-3에 대한 친화도는 subnM 내지 103 nM 범위였다. cyLAG-3에 대한 친화도는 9.3 nM 내지 160 nM 범위였다.

표 2

SPR에 의해 결정된 재조합 인간 및 게막이원숭이 LAG-3에 대한 LAG-3 특이 뮤테인의 친화성

	huLAG-3-Fc			cyLAG-3-Fc		
	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
서열번호 11	3.52E+06	1.99E-03	0.56	4.16E+06	1.08E-01	26.08
서열번호 12	3.54E+06	1.92E-03	0.54	4.36E+06	9.53E-02	21.89
서열번호 13	1.73E+06	8.45E-04	0.49	8.31E+05	1.03E-01	123.97
서열번호 14	2.84E+06	1.02E-03	0.36	5.68E+06	9.28E-02	16.33
서열번호 15	2.48E+06	1.23E-03	0.5	6.37E+06	1.29E-01	20.33
서열번호 16	2.45E+06	2.38E-03	0.97	1.79E+06	5.02E-02	28.06
서열번호 17	4.10E+04	6.12E-04	14.91	3.73E+04	8.66E-04	23.22
서열번호 18	2.06E+04	2.12E-03	102.95	1.98E+04	3.16E-03	159.41
서열번호 19	6.42E+04	7.24E-04	11.29	5.38E+04	7.55E-04	14.03
서열번호 20	6.34E+04	9.32E-04	14.7	4.95E+04	9.14E-04	18.46
서열번호 21	1.02E+05	7.25E-04	7.09	9.49E+04	1.04E-03	10.97
서열번호 22	2.99E+04	2.63E-04	8.78	2.83E+04	2.63E-04	9.3

[0187]

[0188] 실시예 7: 뮤테인의 안정성 평가

[0189] 전반적인 안정성에 대한 일반적인 지시제인 리포칼린 뮤테인의 용융 온도(T_m)를 결정하기 위해, PBS (Gibco) 중 1 mg/mL의 단백질 농도에서 상기 LAG-3 특이 뮤테인을 모세관 nanoDSC 장치 (CSC 6300, TA Instruments)를 사용하여 1 °C/분으로 스캔(25-100 °C)하였다. T_m 는 통합된 Nano Analyze 소프트웨어를 사용하여 표시된 열 화상으로부터 계산되었다.

[0190] 상기 결과적인 최대 용융 온도뿐만 아니라 예시적인 리포칼린 뮤테인(서열번호 11~14 및 16)에 대한 용융의 개

시(onset of melting)가 하기 표 3에 열거되어 있다. 거의 모든 리포칼린 뮤테인은 70 ~ 84 °C 범위의 T_m 을 가지며, 이들 각각의 뮤테인과 관련하여 전반적인 안정성이 양호함을 나타낸다.

표 3

LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인의 나노 DSC에 의해 측정된 T_m 및 개시 용점 온도

	T_m [°C]	Onset melting [°C]
서열번호 11	81.0	58
서열번호 12	82.2	58
서열번호 13	72.1	50
서열번호 14	83.9	70
서열번호 16	83.0	62

[0191]

[0192]

저장 안정성을 평가하기 위해, 상기 LAG-3- 특이 뮤테인을 PBS 중 1 mg/mL의 농도 또는 50% 인간 또는 50% 마우스 혈장 내 0.5 mg/mL의 농도로 37 °C에서 1주간 인큐베이션하였다. 이어서, 정량적 ELISA를 사용하여 활성 뮤테인을 측정하였다. 단량체 단백질 함량을 추가적으로 PBS에 저장된 샘플에 대한 분석 크기 배제 크로마토그래피로 측정하였다. 서열번호 11, 12, 14, 16, 17 및 21에 대한 예시적인 데이터를 표 4에 나타내었다.

[0193]

저장된 리포칼린 뮤테인의 활성은 384-웰 플레이트(Greiner FLUOTRAC™ 600, 검은 평평한 바닥, 고-결합)에서 정량적 ELISA (qELISA)에 의해 평가되었다. 플레이트의 각 웰은 4 °C에서 밤새 PBS 내 1 µg/mL의 농도에서 huLAG-3-Fc(R&D Systems) 20 µL로 코팅되었다. 세척 후, huLAG-3-Fc-코팅된 웰을 100 µL 블로킹 버퍼(2% w/v BSA 및 0.1% v/v Tween-20을 가진 1X PBS)으로 1시간 동안 차단시켰다. 상기 플레이트를 세척한 후 적절히 희석한 단백질 표준품, 스트레스를 받지 않은 레퍼런스 샘플 및 스트레스를 가한 샘플 각각 20 µL를 ELISA 플레이트에 별도로 옮겼다. 플레이트-결합 단백질을 정량하기 위해 ELISA 플레이트를 세척하고, 남아있는 상등액을 버리고, 블로킹 버퍼에 HRP-표지된 항-hTlc 항체 20 µL를 소정의 최적 농도로 첨가하여 인큐베이션하였다. 세척 후, 20 µL의 형광성 HRP 기질(QuantaBlu, Pierce)을 각 웰에 첨가하고, 반응을 20-30분 동안 진행시켰다. 플레이트 상의 각 웰의 형광 세기를 Ex/Em 330/420 nm에서 형광 마이크로플레이트 판독기(Tecan)를 사용하여 판독하였다.

[0194]

별도의 언급이 없는 한, 모든 인큐베이션 단계를 실온에서 1시간 동안 수행하고, 각 인큐베이션 단계 후, 플레이트를 100 µL PBS-T 버퍼(PBS, 0.05% Tween 20)로 5 회 동안 Biotek ELx405 셀렉트 CW 위서를 사용하여 세척하였다.

[0195]

상술된 바와 같이 ELISA에 대해, 전형적으로 0.017-1000 ng/mL 범위의 11 표준 단백질 희석을 포함하는 검정 곡선을 제조하였다. 검량선의 선형 범위 내에서 세 가지 다른 독립 희석액을 각 샘플에 대해 준비하였다. 임의로 1% 인간 또는 마우스 혈장이 보충된 블로킹 버퍼를 희석에 사용하였다.

[0196]

상기 검정 곡선은 4 파라미터 로지스틱 (4 Parameter Logistic, 4PL) 비선형 회귀 모델을 사용하여 적합하게 하고, 시험된 샘플들에 대한 활성 단백질 농도를 계산하는데 사용하였다. 각각의 샘플에 대한 활성 회복율이 동일한 농도 및 동일한 매트릭스에서 저장된 스트레스가 없는 샘플을 참조하여 결정되었다.

[0197]

분석 크기 배제 크로마토그래피는 2개의 Superdex 75 5/150 GL 컬럼(GE Healthcare)을 직렬로 사용하는 Agilent HPLC 시스템 상에서 수행되었으며, 1X PBS (Gibco)는 0.3 mL/분의 유속으로 러닝 버퍼로 사용되었다. 단량체의 회수율은 스트레스를 받지 않은(non-stressed) 레퍼런스 샘플을 기준으로 한 각 샘플의 단량체 피크 면적에 의해 결정되었다.

[0198]

예시적인 리포칼린 뮤테인(서열번호 11, 12, 14, 16, 17)은 모든 시험된 조건 하에서 안정한 것으로 나타났다.

그 결과는 표 4에 요약되어 있다.

표 4

LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인의 저장 안정성: qELISA에서 활성 회복 및 분석
SEC에서의 단량체 함량에 의해 평가된, 37 °C에서 PBS로 1주간 저장 및 37 °C에서 인간(hu) 및 마우스(mu) 혈장에서 1주간 저장 후 안정성: qELISA = 100 +/- 15 %에서 안정; aSEC = 100 +/- 5 %에서 안정.

	1 주 PBS, 37°C		1 주 hu 혈장, 37°C	1 주 mu 혈장, 37°C
	qELISA에서 활성 회복 %	분석 SEC에서의 단량체 %	qELISA에서 활성 회복 %	
서열번호 11	104	98	106	104
서열번호 12	97	104	106	101
서열번호 14	98	98	103	103
서열번호 16	107	99	100	100
서열번호 17	100	101	99	99
서열번호 21	100	103	110	110

[0199]

[0200]

실시예 8: 인간 LAG-3을 발현하는 세포에 결합하는 리포칼린 뮤테인의 FACS 분석

[0201]

본 발명자들은 huLAG-3 (CHO-huLAG-3)로 안정적으로 형질감염된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 대한 리포칼린 뮤테인 서열번호 7, 8 및 9의 특이적 결합을 평가하기 위해 FACS 연구를 이용하였다. 서열번호 3은 음성 대조군으로서 병행하여 시험하였다. 제조회사의 지시에 따라 Flp-In 시스템(Invitrogen)을 사용하여 세포주를 생성하였다. 모의-형질감염된 Flp-In CHO 세포는 음성 대조군으로 사용되었다.

[0202]

형질감염된 CHO 세포를 10% 소태아 혈청(FCS, Biochrom) 및 500 µg/mL 하이그로마이신 B (Roth)가 보충된 햄스 F12 배지(Ham's F12 medium, Invitrogen)에서 유지시켰다. 세포를 제조사의 지시(37 °C, 5% CO₂ 대기)에 따라 표준 조건 하에서 세포 배양 플라스크에서 배양하였다. 계대 배양(subculture)용 또는 FACS 실험용 부착 세포를 해리하기 위해, 제조사의 지시에 따라 Accutase (PAA)를 사용하였다.

[0203]

실험을 수행하기 위해, LAG-3 양성 및 음성 Flp-In CHO 세포를 리포칼린 뮤테인과 함께 인큐베이션하고, 결합된 뮤테인을 항-hTlc 일차 항체 및 형광성 이차 항체를 사용하여 표지한 다음, 신호를 다음에 기술된 바와 같이 FACS 분석을 사용하여 검출하였다.

[0204]

웰당 1 x 10⁵ 세포를 5% 소 태아 혈청(PBS-FCS)을 함유하는 빙냉(ice-cold) PBS 중에서 1 시간 동안 예비 배양(인큐베이션)하였다. 이어서, 일반적으로 5 µM 내지 1nM 범위의 리포칼린 뮤테인(서열번호 7, 8 및 9) 및 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열번호 3)의 희석 시리즈를 세포에 첨가하고, 얼음에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 300xg에서 원심분리를 사용하여 빙냉 PBS에서 두 번 세척한 다음 얼음에서 30분간 토끼 항-리포칼린 일차 항체(polyclonal rabbit anti-hTlc, Pieris)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 다시 빙냉 PBS 중에서 2회 세척하고, PBS-FCS에 재현탁하고, 피코에리트린(Jackson Immunologics)으로 표지된 2차 항-토끼 항체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Guava easyCyte HT Flow cytometer (EMD Millipore)를 사용하여 분석하였다. 전형적으로, 게이트는 생존력이 없는 세포를 제외하도록 설정되었고 5000개의 이벤트가 기록되었다.

[0205]

CHO-huLAG-3 세포에 대한 리포칼린의 결합에 의해 생성된 FACS 데이터를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하고 생성된 기하학적 형광 평균을 그래프패드(Graphpad) 소프트웨어를 사용하여 플롯하고 조정하였다. 생성된 EC₅₀은 표 5에 요약하였다.

표 5

huLAG-3로 형질감염된 CHO 세포에 LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인의 결합

	CHO::huLAG-3 EC ₅₀ [nM]
서열번호 7	29
서열번호 8	47
서열번호 9	109

[0206]

[0207]

뮤테인, 서열번호 7, 8 및 9는 두자릿수 내지 적은 세자릿수(low triple digit) nM EC₅₀ 범위 내의 EC₅₀ 값을 갖는 huLAG-3을 발현하는 CHO 세포에 명확한 결합을 나타낸다. LAG-3에 결합하지 않는 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열번호 3)은 어떠한 결합도 나타내지 않았다(미도시). 모의-형질감염된 Flp-In CHO 세포에서 리포칼린 뮤테인의 결합은 검출되지 않았다 (미도시).

[0208]

실시예 9: 인간 또는 사이노몰거스 LAG-3을 발현하는 세포에 결합하는 최적의 리포칼린 뮤테인의 FACS 분석

[0209]

웰당 5×10^4 세포를 5% 소 태아 혈청(PBS-FCS)을 함유하는 빙냉 PBS에서 1시간 동안 예비-배양(인큐베이션)하였다. 이어서, 일반적으로 5 μ M 내지 0.01 nM 범위의 리포칼린 뮤테인(서열번호 11-17 및 19-21) 및 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열 번호 3)의 희석 시리즈를 세포에 첨가하고, 얼음에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 300xg에서 원심분리를 사용하여 빙냉 PBS에서 두 번 세척한 다음 얼음에서 30분간 토끼 항-리포칼린 일차 항체(polyclonal rabbit anti-hTlc, Pieris)와 함께 배양하였다. 이어서, 세포를 다시 빙냉 PBS에서 2회 세척하고, PBS-FCS에 재현탁시키고, Alexafluor647 (Jackson Immunologics)로 표지된 항체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 intellicyt IQue Flow cytometer (Intellicyt)를 사용하여 분석하였다. LAG-3 발현 세포에 결합하는 리포칼린 뮤테인(lipocalin mutein binding)에 의해 생성된 형광 데이터를 Forecyt 소프트웨어를 사용하여 분석하고, 생성된 기하학적 형광 평균을 그래프패드(Graphpad) 소프트웨어를 사용하여 플롯하고 조정하였다. 생성된 예시적인 EC₅₀ 값을 표 6에 요약하였다.

표 6

huLAG-3 또는 cynomolgus LAG-3로 형질감염된 CHO 세포에 LAG-3 특이 리포칼린 뮤테 및 레퍼런스 분자(벤치마크 항-LAG-3 항체, BMS 986016, 서열번호 5 및 6)의 결합

	CHO::huLAG-3 EC ₅₀ : nM	CHO::cyLAG-3 EC ₅₀ : nM
서열번호 11	0.37	19.88
서열번호 12	0.78	29.28
서열번호 13	0.26	26.09
서열번호 14	0.25	19.14
서열번호 15	0.54	10.39
서열번호 16	0.36	32.83
서열번호 5 및 6	0.26	21

[0210]

[0211]

실시예 10: PHA Blast에 결합하는 리포칼린 뮤테인의 FACS 분석

[0212]

리포칼린 뮤테인과 파이토헤마글루티닌(phytohemagglutinin, PHA)으로 자극된 PBMC에 대한 음성 대조군의 결합을 평가하기 위해 FACS 연구가 사용되었다.

[0213]

Biochrom의 프로토콜에 따라, 건강한 지원자 기증자로부터의 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 폴리수크로스 밀도 구배(Biocoll 1.077 g/mL, Biochrom)를 통한 원심분리로 버피 코트(buffycoats)로부터 분리하였다. 정제

된 PBMC를 90% FCS 및 10% DMSO로 이루어진 버퍼에 재현탁하고, 즉시 액체 질소를 사용하여 냉동시키고, 이후의 사용시까지 액체 질소 중에 저장하였다.

[0214] 분석을 위해, PBMC를 해동하고 10% FCS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 배양 배지 (RPMI 1640, Life Technologies)에서 16시간 동안 배양하였다. PBMC를 mL당 2×10^6 세포의 밀도로 설정하고 37 °C에서 3일 동안 5 µg/mL PHA-P (Sigma)로 자극하였다. 자극받지 않은 PBMC를 동일한 세포 밀도로 설정하고 동시에 배양하였다.

[0215] 웰당 1×10^5 PBMC를 5% 소 태아 혈청(PBS-FCS)을 함유하는 빙냉 PBS 중에서 1시간 동안 예비-배양(인큐베이션)하였다. 이어서, 10 µM 또는 200 nM의 리포칼린 뮤 테인 및 음성 대조군을 일반적으로 세포에 첨가하고, 인큐베이션을 얼음 위에서 1시간 동안 계속하였다. 세포를 300xg에서 원심분리를 사용하여 빙 냉 PBS로 2회 세척한 후, 토끼 항-리포칼린 1차 항체 (폴리클로날 토끼 항-hTlc, Pieris)와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 빙냉 PBS로 2회 다시 세척하고, PBS-FCS에 재현탁하고, 형광 표지된 2차 항체 및 피코에리트린 항 CD3 항체와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Guava easyCyte HT Flow cytometer를 사용하여 분석하였다. 리포칼린의 PBMCs에 대한 결합에 의해 생성된 형광 데이터를 Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0216] 선별된 FACS 도트 플롯 및 히스토그램은 도 1에 나타내었다. 각각의 플롯에, 서열번호 11-17, 21 및 22 각각의 리포칼린 뮤테인뿐만 아니라 레퍼런스 분자(서열번호 5 및 6)가 도시되어 있다. PHA 자극된 CD3 양성 PBMC에 대한 모든 시험된 리포칼린 뮤테인 및 레퍼런스 분자의 명확한 결합이 검출되었고, 자극되지 않은 세포에 대한 어떠한 결합도 관찰되지 않았다. 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열번호 3)은 PHA 자극된 CD3 양성 PBMC에 결합을 나타내지 않았다 (미도시).

[0217] **실시예 11: MHC 클래스 II 발현 세포에 대한 인간 LAG-3 및 리포칼린 뮤테인의 경쟁적 결합에 대한 FACS 분석**

[0218] 주어진 리포칼린 뮤테인이 MHC 클래스 II-양성 세포 상의 MHC 클래스 II에 대한 LAG-3의 결합을 방해하는지를 평가하기 위해, 경쟁 FACS 실험이 이용되었다. 이 실험에서, 일정한 농도의 인간 LAG-3-Fc 융합체(huLAG-3-Fc, R&D system) 및 각 리포칼린 뮤 테인의 희석 시리즈를 MHC 클래스 II 양성 인간 세포주 A375와 함께 인큐베이션 하고, 형광 표지된 항-IgG Fc 항체를 사용하여 세포-결합된 hu LAG-3-Fc를 검출하였다. 이 분석에서 huLAG-3과 이의 리간드 MHC 클래스 II의 결합을 간섭하는 경쟁적 리포칼린 뮤테인은 MHC 클래스 II 양성 세포주 A375에 대한 huLAG-3-Fc 결합 감소를 초래한다.

[0219] 흑색종 세포주 A375를 10% 소 태아 혈청(FCS, Biochrom)이 보충된 DMEM 배지 (Invitrogen)에서 유지하였다. 세포를 제조사의 지시(37 °C, 5% CO₂ 대기)에 따라 표준 조건 하에서 세포 배양 플라스크에서 배양하였다. 계대 배양 또는 FACS 실험용 집착 세포를 해리하기 위해, Accutase (PAA Laboratories GmbH)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

[0220] FACS 분석을 위해, 웰당 1×10^5 또는 2.5×10^4 A375 세포를 PBS-FCS에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 3 nM 의 huLAG-3-Fc 및 5 µM 내지 0.1 nM 또는 1 µM 내지 0.01 nM 범위의 다양한 농도의 LAG-3 특이적 리포칼린 뮤테인을 첨가하였다. 세포를 빙냉 PBS에서 2회 세척하고, PBS-FCS에 재현탁하고, 피코에리트린으로 표지된 항-인간 IgG Fc 항체(Jackson Immunologics)와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고, Guava easyCyte HT Flow cytometer (EMD Millipore) 또는 Intellicyt IQue Flow cytometer (Intellicyt)를 사용하여 분석하였다. A375 세포에 결합하는 huLAG-3-Fc에 의해 생성된 형광 데이터를 각각 FlowJo 소프트웨어 또는 Forecyt 소프트웨어를 사용하여 분석하고, 얻어진 기하학적 형광 평균을 huLAG-3-Fc 최대 결합에 대해 표준화하였다. huLAG-3-Fc 결합 퍼센트를 플롯팅하고 Graphpad 소프트웨어를 사용하여 조정하였다. 서열번호 11-17 및 19-21의 IC₅₀ 값을 표 7에 요약하고, 선별된 경쟁 결합 곡선을 도 2에 제공한다. 상기 데이터는 시험된 리포칼린 뮤테인이 인간 MHC 클래스 II 발현 세포 상의 huLAG-3의 리간드 MHC 클래스 II에 대한 huLAG-3의 결합과 경쟁한다는 것을 보여준다. LAG-3에 결합하지 않는 음성 대조군 리포칼린 뮤테인(서열번호 3)은 어떠한 경쟁도 보이지 않았다 (도 2 참조).

표 7

리 포칼린 류티인은 MHC 클래스 II 발현 세포 상에서 이의 리간드 MHC 클래스 II에 대한 huLAG-3의 결합과 경쟁한다.

	IC50 : nM
서열번호 5 및 6	1.6
서열번호 11	1.1
서열번호 12	2.1
서열번호 13	1.6
서열번호 14	3
서열번호 15	2.1
서열번호 16	4.1
서열번호 17	2.8
서열번호 19	3.4
서열번호 20	3.2
서열번호 21	1.5

[0221]

[0222]

본원에 예시적으로 기술된 구현예들은 여기에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들이 없이 적당히 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는", "함유하는", "내포하는" 등은 광범위하고 제한없이 임의여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어들 및 표현들은 설명의 용어들로서 사용되었을 뿐 제한은 아니며, 도시되고 기술된 특징들 또는 이의 일부의 임의의 등가물을 배제하는 그러한 용어들 및 표현들의 사용에 대한 의도는 없으나, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형들이 가능한 것으로 간주된다. 따라서, 본 구현예들이 바람직한 구현예들과 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었다고는 하나, 이의 변형 및 변이들이 당업자에 의해 이루어질 수 있고, 그러한 변형 및 변이들은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다는 것으로 이해되어야 한다. 여기에 기재된 모든 특허, 특허출원, 교과서 및 동료 검토 논문들은 그들의 전체가 참조로 여기에 포함된다. 또한, 여기에 참조로 포함된 참고문헌에서 정의 또는 용어의 사용이 여기에 제공된 용어의 정의와 모순되거나 반대되는 경우, 여기에 제공된 해당 용어의 정의와 참조에서 해당 용어의 정의가 적용되지 않는다. 일반 개시물에 속하는 더 좋은 종 및 아속(sub-generic) 그룹화 각각 역시 본 발명의 일부를 형성한다. 삭제된 물질이 구체적으로 여기에 인용되는 지의 여부와 무관하게 속(genus)으로부터 임의의 대상을 제거하는 단서 또는 부정적 제한을 가진 발명의 일반적인 설명이 포함된다. 또한, 특징이 마쿠쉬 그룹으로 기재되는 경우, 당업자는 개시물이 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원들의 서브그룹의 관점에서 기재됨을 인식할 것이다. 추가의 구현예들은 다음의 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0223]

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

[0224]

[비특허문헌]

[0225]

1. TRIEBEL, F., JITSUKAWA, S., BAIXERAS, E., ROMAN-ROMAN, S., GENEVEE, C., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & HERCEND, T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171, 1393-405.

[0226]

2. KISIELOW, M., KISIELOW, J., CAPOFERRI-SOLLAMI, G. & KARJALAINEN, K. 2005. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*, 35, 2081-8.

[0227]

3. WORKMAN, C. J., WANG, Y., EL KASMI, K. C., PARDOLL, D. M., MURRAY, P. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI,

D. A. 2009. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*, 182, 1885-91.

- [0228] 4. HUARD, B., MASTRANGELI, R., PRIGENT, P., BRUNIQUEL, D., DONINI, S., EL-TAYAR, N., MAIGRET, B., DREANO, M. & TRIEBEL, F. 1997. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5744-9.
- [0229] 5. BUISSON, S. & TRIEBEL, F. 2003. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) leads to a distinct pattern of chemokine and chemokine receptor expression by human dendritic cells. *Vaccine*, 21, 862-8.
- [0230] 6. ANDREAE, S., PIRAS, F., BURDIN, N. & TRIEBEL, F. 2002. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 168, 3874-80.
- [0231] 7. MACON-LEMAITRE, L. & TRIEBEL, F. 2005. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology*, 115, 170-8.
- [0232] 8. WOO, S. R., TURNIS, M. E., GOLDBERG, M. V., BANKOTI, J., SELBY, M., NIRSCHL, C. J., BETTINI, M. L., GRAVANO, D. M., VOGEL, P., LIU, C. L., TANGSOMBATVISIT, S., GROSSO, J. F., NETTO, G., SMELTZER, M. P., CHAUX, A., UTZ, P. J., WORKMAN, C. J., PARDOLL, D. M., KORMAN, A. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2012. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*, 72, 917-27.
- [0233] 9. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- [0234] 10. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50.
- [0235] 11. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24.
- [0236] 12. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.
- [0237] 13. FLOWER, D. R. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36.
- [0238] 14. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, 280, 484-93.
- [0239] 15. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0240] 16. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*, 1, 209-14.
- [0241] 17. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753-66.
- [0242] 18. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. *Pharmacol Rev*, 52, 1-9.
- [0243] 19. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods*, 218, 73-83.
- [0244] 20. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35035-43.
- [0245] 21. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G.,

ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540-8.

[0246] 22. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139-148.

[0247] 23. LOWMAN, H. B. 1997. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401-24.

[0248] 24. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 87-93.

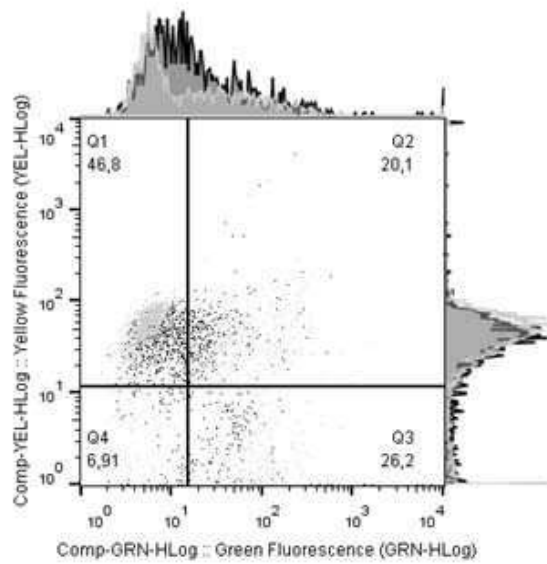
[0249] 25. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*, 315, 1-8.

[0250] 26. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29-43.

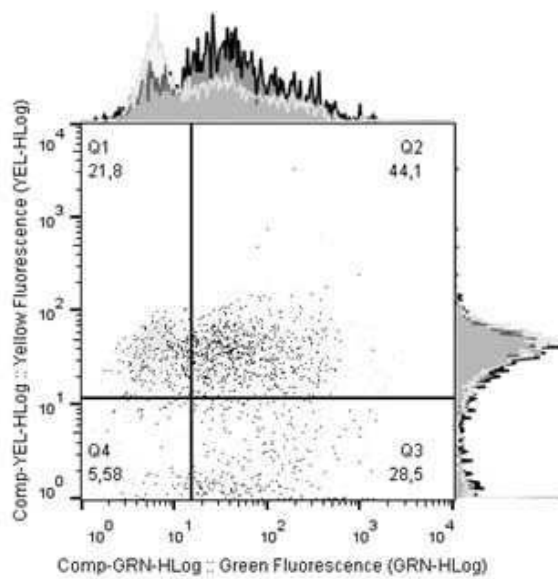
도면

도면1a

서열번호 5, 6

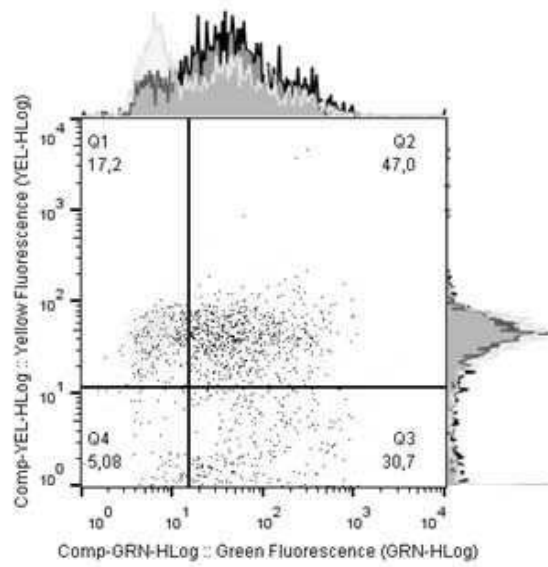


서열번호 11

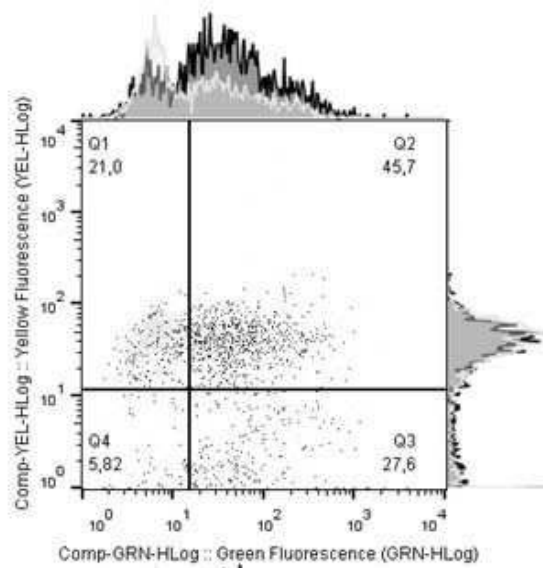


도면1b

서열번호 12

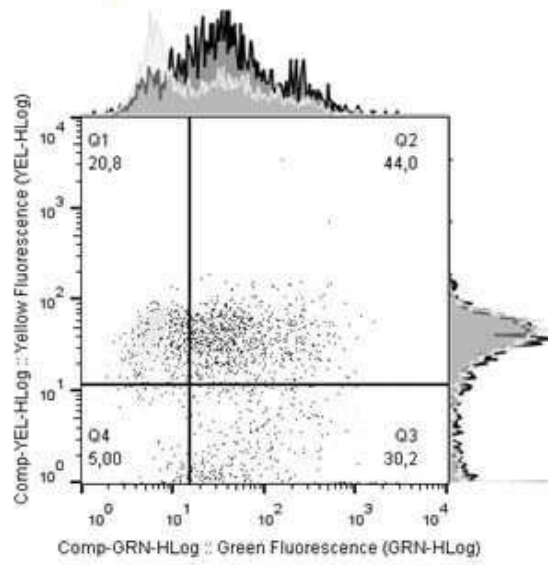


서열번호 13

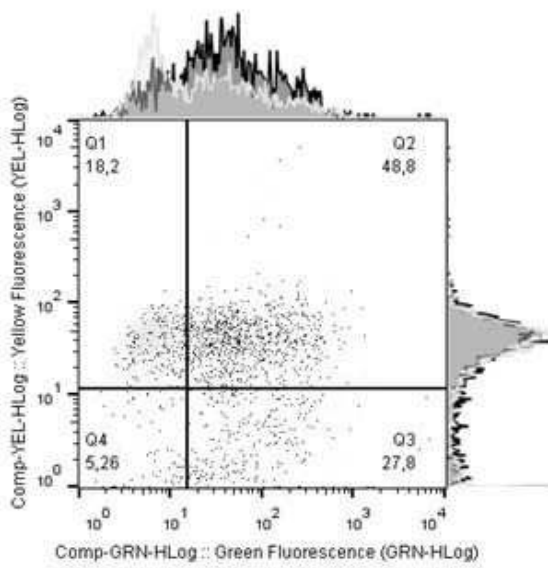


도면1c

서열번호 14

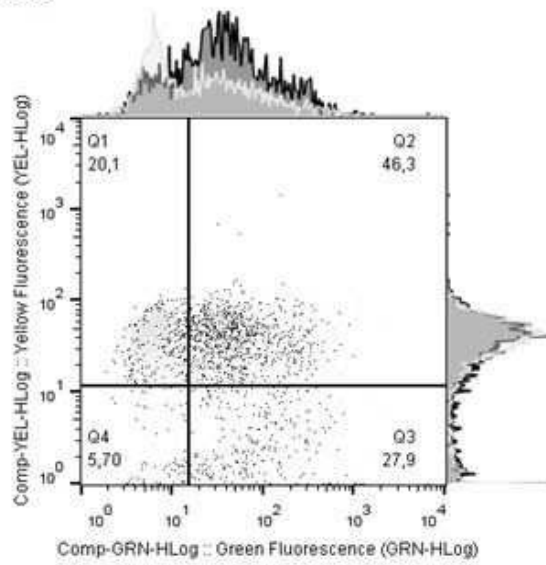


서열번호 15

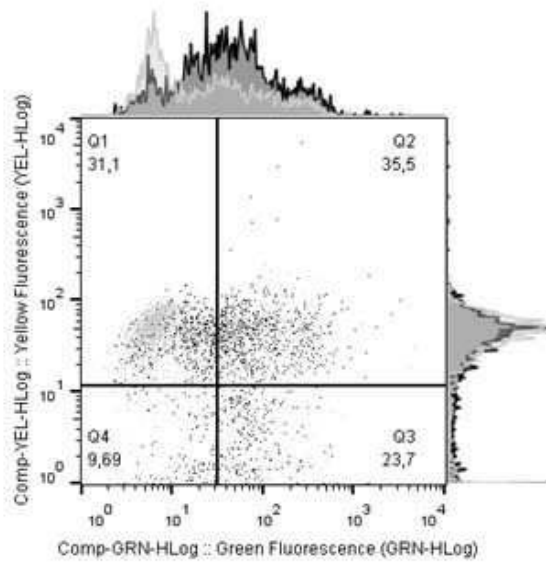


도면1d

서열번호 16

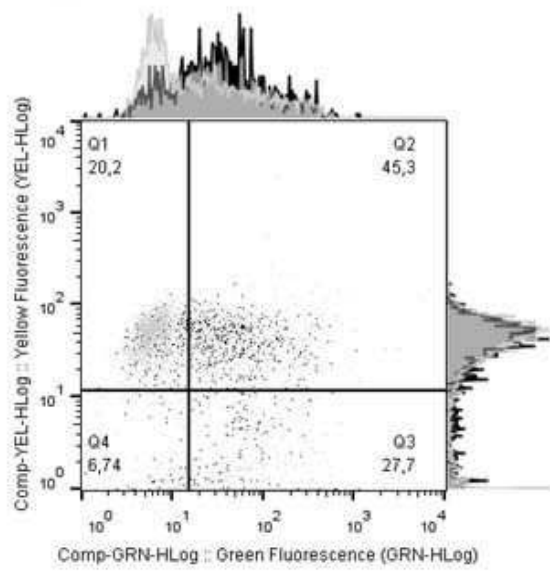


서열번호 17

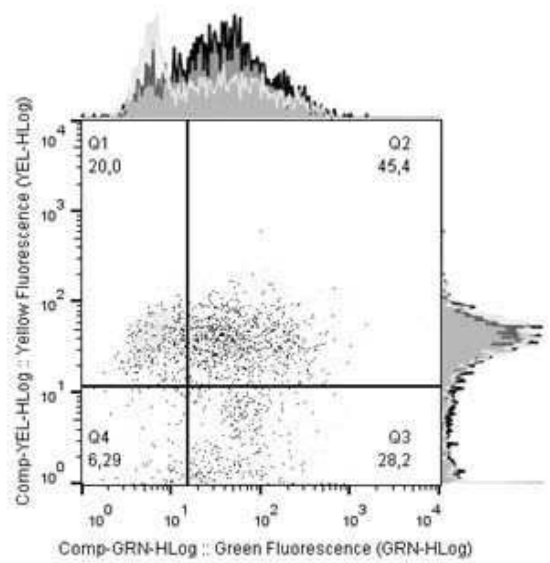


도면1e

서열번호 21

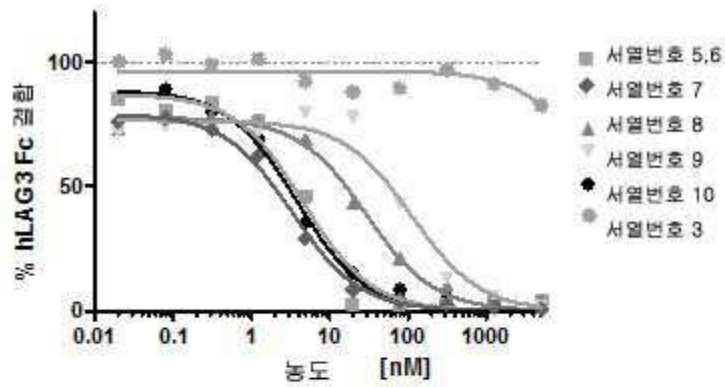


서열번호 22

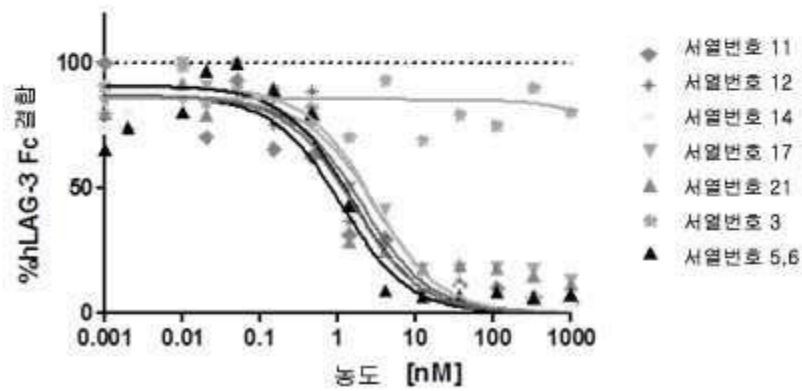


도면2

A.



B.



도면3a

SEQ ID NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SEQ ID NO: 1 (human tear lipocalin wt)	H	H	L	L	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 3 (negative control lipocalin mutein)					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 4 (negative control lipocalin mutein)					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 7					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 8					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 9					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 10					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 11					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 12					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 13					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 14					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 15					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 16					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 17					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 18					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 19					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 20					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 21					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K
SEQ ID NO: 22					A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K

SEQ ID NO	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
SEQ ID NO: 1	A	M	T	V	D	R	E	F	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 3	A	M	T	V	D	R	E	C	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 4	A	M	T	V	D	R	E	F	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 7	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	E	W	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 8	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	T	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 9	A	M	T	V	D	F	V	C	L	Y	D	V	P	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 10	A	M	T	V	D	E	T	C	W	W	Y	V	D	H	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 11	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	D	D	V	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 12	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 13	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	E	W	S	A	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 14	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 15	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	E	W	S	A	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 16	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	V	D	E	V	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 17	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	L	W	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 18	A	M	T	V	S	A	E	D	P	E	L	V	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 19	A	M	T	V	S	D	E	D	P	E	M	T	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 20	A	M	T	V	S	E	E	D	P	E	M	T	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 21	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	M	L	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E
SEQ ID NO: 22	A	M	T	V	D	F	V	C	L	N	D	Y	P	E	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E

도면3b

SEQ ID NO	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
SEQ ID NO: 1	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	C	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 3	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	C	S	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D
SEQ ID NO: 4	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	C	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 7	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 8	A	N	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 9	A	K	V	T	M	Q	I	W	G	E	L	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 10	A	K	V	T	M	N	L	W	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 11	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 12	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 13	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 14	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 15	A	E	A	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 16	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	
SEQ ID NO: 17	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 18	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 19	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 20	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 21	A	R	V	T	V	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	E	D	
SEQ ID NO: 22	A	K	V	T	M	Q	I	W	G	E	P	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A	D	

SEQ ID NO	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
SEQ ID NO: 1	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	C	E	G	E	L	H	G	K	P	V
SEQ ID NO: 3	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	H	G	K	P	V
SEQ ID NO: 4	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	L	H	G	K	P	V
SEQ ID NO: 7	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P	V
SEQ ID NO: 8	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	G	T	P	A
SEQ ID NO: 9	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	Y	C	V	G	Y	P	V
SEQ ID NO: 10	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	Q	G	W	P	V
SEQ ID NO: 11	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	Y	P	V
SEQ ID NO: 12	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	Y	P	V
SEQ ID NO: 13	G	G	K	H	A	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P	V
SEQ ID NO: 14	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	E	G	F	P	V
SEQ ID NO: 15	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P	V
SEQ ID NO: 16	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P	V
SEQ ID NO: 17	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	Y	G	T	P	G
SEQ ID NO: 18	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	G	T	P	A
SEQ ID NO: 19	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	Q	G	T	P	G
SEQ ID NO: 20	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	G	T	P	G
SEQ ID NO: 21	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	Q	G	T	P	G
SEQ ID NO: 22	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	Y	C	T	G	Y	P	V

도면3c

SEQ ID NO	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
SEQ ID NO: 1	R	G	V	K	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 3	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 4	R	G	V	K	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 7	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 8	R	T	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 9	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 10	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 11	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 12	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 13	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 14	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 15	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 16	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 17	R	M	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 18	R	T	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 19	R	M	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 20	R	M	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 21	R	M	V	A	L	V	G	R	D	P	T	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S
SEQ ID NO: 22	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L	S

SEQ ID NO	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
SEQ ID NO: 1	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G	S	D
SEQ ID NO: 3	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 4	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 7	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 8	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 9	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 10	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 11	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 12	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 13	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 14	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 15	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 16	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		
SEQ ID NO: 17	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 18	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 19	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 20	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 21	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	C	S	P	G		
SEQ ID NO: 22	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S	P	G		

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pieris AG

<120> Novel proteins specific for LAG-3

<130> PIE15433PCT

<150> EP 15 176 740.7

<151> 2015-07-15

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Human tear lipocalin

<400> 1

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

1 5 10 15

Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn

20 25 30

Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn

35 40 45

Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Ile Phe Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Ser Asp

145 150 155

<210> 2

<211> 676

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein of Cynomolgus LAG-3 extracellular domain and IgG1

Fc

<400> 2

Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala

1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly His Pro Pro Val Pro Gly His Arg Pro

50 55 60

Ala Ala Pro Tyr Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu

65 70 75 80

Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro

85 90 95

Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu

100 105 110

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

115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Val

130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Thr Ser

145 150 155 160

Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala

165 170 175

Ser Val His Trp Phe Arg Ser Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Gln

180 185 190

Gly Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro His

195 200 205

Val Gly Pro Met Asp Ser Gly Leu Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg

210 215 220

Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu

225 230 235 240

Glu Pro Ala Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gln Ala Gly Thr Tyr Ile Cys His Ile Arg Leu Gln Gly Gln Gln Leu

305 310 315 320

Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe

325 330 335

Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala

340 345 350

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

355 360 365

Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu

370 375 380

Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly His Leu Ile Glu Gly Arg

420 425 430

Met Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

435 440 445

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

465 470 475 480
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

 485 490 495
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

 500 505 510
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

 515 520 525
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

 530 535 540
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

545 550 555 560
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

 565 570 575
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

 580 585 590
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

 595 600 605
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

 610 615 620
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

625 630 635 640
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

 645 650 655
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

 660 665 670
Ser Pro Gly Lys

 675
<210> 3

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> negative control 4008wt

<400> 3

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Cys Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Ser Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Gly Glu Cys His Gly Lys Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 4

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> negative control 4009wt

<400> 4

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val

20 25 30

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

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

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

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

Ser Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly Val Lys Leu Val
100 105 110

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

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

Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly
145 150

<210> 5
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> benchmark antibody heavy chain
<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 6

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> benchmark antibody light chain

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 7

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 7

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Ile Glu Glu Trp Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Phe Gly Phe Trp Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

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

115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 8

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 8

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Ser Gly Glu Asp Pro Glu Met Thr Leu Glu Ser Val

20 25 30
 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Asn

35 40 45
 Val Thr Ala Leu Ile Asp Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Asn Val Leu

50 55 60
 Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

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

85 90 95
 Phe Glu Gly Glu Gly His Gly Thr Pro Ala Arg Thr Val Ala Leu Val

100 105 110
 Gly Arg Asp Pro Thr Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly
 145 150

<210> 9

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 9

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Met Thr Val Asp Phe Val Cys Leu Tyr Asp Val Pro Glu Ser Val
 20 25 30
 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
 35 40 45
 Val Thr Met Gln Ile Trp Gly Glu Leu Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

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

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145	150															
<210>	10															
<211>	152															
<212>	PRT															
<213>	Artificial Sequence															
<220><223>	lipocalin mutein															
<400>	10															
Ala	Ser	Asp	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Val	Ser	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Lys	
1				5					10					15		
Ala	Met	Thr	Val	Asp	Glu	Thr	Cys	Trp	Trp	Tyr	Val	Asp	His	Ser	Val	
				20				25					30			
Thr	Pro	Met	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys	
			35				40					45				
Val	Thr	Met	Asn	Leu	Trp	Gly	Phe	Trp	Gln	Glu	Val	Lys	Ala	Val	Leu	
	50					55					60					
Glu	Lys	Thr	Asp	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Ala	Asp	Gly	Gly	Lys	His	
65				70						75				80		
Val	Ala	Tyr	Ile	Ile	Arg	Ser	His	Val	Lys	Asp	His	Tyr	Ile	Phe	Tyr	
				85					90					95		
Ser	Glu	Gly	Glu	Cys	Gln	Gly	Trp	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Trp	Leu	Val	
			100					105					110			
Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Asn	Asn	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys	
			115				120					125				
Ala	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ser	Ile	Leu	Ile	Pro	Arg	
	130					135					140					
Gln	Ser	Glu	Thr	Ser	Ser	Pro	Gly									
145	150															

<210>	11
<211>	152
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	lipocalin mutein

<400> 11

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Ile Asp Asp Val Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Phe Gly Phe Trp Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Gly Glu Cys Ala Gly Tyr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 12

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 12

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Ile Asp Glu Val Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

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

 85 90 95
 Ser Glu Gly Glu Cys Ala Gly Tyr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
 100 105 110
 Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 13

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 13

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Ile Glu Glu Trp Ser Ala
 20 25 30
 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asp Leu Glu Ala Lys
 35 40 45
 Val Thr Met Asp Ile Phe Gly Phe Trp Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

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

85 90 95
Ser Glu Gly Glu Cys Ala Gly Phe Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Gly Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150
<210> 14
<211> 152
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> lipocalin mutein
<400> 14

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

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

85 90 95
Ser Glu Gly Glu Cys Glu Gly Phe Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110
Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 15
<211> 152
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> lipocalin mutein
<400> 15

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15
Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Ile Glu Glu Trp Ser Ala
20 25 30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Glu
35 40 45
Ala Thr Met Asp Ile Phe Gly Phe Trp Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

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

115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140
Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 16
<211> 152
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 16

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Ser Asp Cys Phe Trp Val Asp Glu Val Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met Asp Ile Phe Gly Phe Trp Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Gly Glu Cys Ala Gly Phe Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 17

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 17

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Ser Gly Glu Asp Pro Glu Leu Trp Leu Glu Ser Val

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

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

115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly
 145 150

<210> 18

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 18

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

20 25 30
 Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Ser
 35 40 45
 Val Thr Ala Leu Ile Asp Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Asn Val Leu
 50 55 60
 Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80
Val Asp Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

85 90 95
Phe Glu Gly Glu Gly His Gly Thr Pro Ala Arg Thr Val Ala Leu Val

100 105 110
Gly Arg Asp Pro Thr Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140
Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly

145 150

<210> 19

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 19

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Ser Asp Glu Asp Pro Glu Met Thr Leu Glu Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Ser

35 40 45

Val Thr Ala Leu Ile Asp Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Asn Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Glu Gly Glu Gly Gln Gly Thr Pro Gly Arg Met Val Ala Leu Val

100 105 110

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

115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140
Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly

145 150

<210> 20

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 20

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Ser Glu Glu Asp Pro Glu Met Thr Leu Glu Ser Val

20 25 30
Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Ser

35 40 45
Val Thr Ala Leu Ile Asp Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Asn Val Leu

50 55 60
Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

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

85 90 95
Phe Glu Gly Glu Gly His Gly Thr Pro Gly Arg Met Val Ala Leu Val

100 105 110
Gly Arg Asp Pro Thr Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125
Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg

130 135 140
Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly

145

150

<210> 21

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 21

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Ser Gly Glu Asp Pro Glu Met Met Leu Glu Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Arg

35 40 45

Val Thr Val Leu Ile Asp Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Asn Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Glu Gly Glu Gly Gln Gly Thr Pro Gly Arg Met Val Ala Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly

145 150

<210> 22

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 22

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

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Phe Val Cys Leu Asn Asp Tyr Pro Glu Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

Val Thr Met Gln Ile Trp Gly Glu Pro Gln Glu Val Lys Ala Val Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Glu Gly Tyr Cys Thr Gly Tyr Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 23

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 23

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatatat ttgggttctg gcaggaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgaggcgag 300

tgcgcagggt ttccggttcc aggggtgtgg ctctgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
 ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggagcgc cttggtctca cccgcagttc 480
 gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540
 tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637
 <210> 24
 <211> 637
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lipocalin mutein
 <400> 24
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgcc a gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

 tctggggaag atctgagat gactctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120
 gaaggcggca atctggagcg taacgtcacc gcactgatcg atgggcgctg tcaagaagtg 180
 aagaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggacgg cggtaaacat 240
 gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgagggcgag 300
 gggcatggca ctccggcacg tactgtggca ctggtgggca gagacccac caataatctg 360
 gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
 ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggagcgc cttggtctca cccgcagttc 480

 gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540
 tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637
 <210> 25
 <211> 637
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> lipocalin mutein
 <400> 25
 gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60
 gattttgtgt gtctgtatga tgtgcctgag tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgcaaataat ggggggagct gcaagaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggtat 300

tgtgtgggt atcctgttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagacccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcg acattgtgcg acatttttt 540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcgccggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 26

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 26

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60

gatgagactt gttggtgta tgtggatcat tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgaatctct gggggttctg gcaggaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagag 300

tgccaagggt ggccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagacccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 27

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 27

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60

gattctgatt gcttttggat tgatgatgtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa 300

tgcgctggct atccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 28

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 28

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg 60

gattcggatt gcttttggat tgatgaggtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa 300

tgcgctggct atccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 29

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 29

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc gatgacggtg	60
gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagctacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggctggcg atctggaggc taaggtcacc atggatata tctgggttctg gcaggaggtg	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacat	240
gtgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgaggcgag	300
tgcgcagggt ttccggtccc gggggtgtgg ctctgtggca gagacccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcggcac ggagagcatc	420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggccaa gcgcttggtc tcaccgcag	480
ttcgaaaaat aataagcttg acctgtgaag tgaaaaatgg cgcacattgt gcgacatttt	540
ttttgtctgc cgtttaccgc tactgcgtca cggatctcca cgcgcctgt agcggcgcat	600
taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgac	637

<210> 30

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 30

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaagc catgacggtg	60
gattcggatt gcttttggat tgatgaggtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaaagt	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggcaaacat	240
gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgaggcgaa	300
tgcgagggt ttccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagacccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggagcg cttggtctca cccgcagttc	480
gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt	540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa	600
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc	637

<210> 31

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 31

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg	60
gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagctacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggagggc tgagggccacc atggatatat ttgggttctg gcaggaggtg	180
aaagcagtgt tggagaagac agacgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggtaaacat	240
gttgctata tcattcgagc ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgag	300
tgcgcagggt ttccgggtccc ggggtgtgtg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggccaa gcgcttggtc tcaccgcgag	480
ttcgaaaaat aataagcttg acctgtgaag tgaaaaatgg cgcacattgt gcgacatttt	540
ttttgtctgc cgtttaccgc tactgcgtca cggatctcca cgcgccctgt agcggcgcat	600
taagcggggc ggggtgtgtg gttacgcgca gcgtgac	637

<210> 32

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 32

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg	60
gattcggatt gcttttgggt ggatgagggt tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggagggc taaggtcacc atggatatat ttggcttttg gcaggaagtg	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaatata cggccgatgg cggcaaacat	240
gttgctata tcattcgagc ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa	300
tgcgtgggtt ttccgggtcc aggggtgtgtg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggagcg cttggtctca cccgcagttc	480
gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt	540
tgtctgccgt ttaccgtacg tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa	600
gcgcggcggg tgttgtgtgtt acgcgcagcg tgaccgc	637

<210> 33

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 33

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tcgggggaag atcctgagtt gtggctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc tagtgtgacc gctctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

ggttatggca cggcgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggagcgc cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 34

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 34

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tcggcggaag atcctgagtt ggtgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc ttctgtgacc gcgctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

ggtcatggca ctccggctcg cacggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggagcgc cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 35

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 35

gcctcagacg aggagattca ggatgtgcca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tctgatgaag atcctgagat gacgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg tagtgtgacc gcgctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

ggtcagggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggagcgc cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 36

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 36

gcctcagacg aggagattca ggatgtgcca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tctgaggaag atcctgagat gacgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg tagtgtgacc gctctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

ggtcattgca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccagggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 37

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 37

gcctcagacg aggagattca ggatgtgcca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tcgggggaag atcctgagat gatgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg tcgtgtgacc gttctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

gggcagggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccagggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgctac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 38

<211> 637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 38

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattttgtgt gcctgaatga ttatctgag tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg taaggtcacc atgcagattt ggggcgagcc gcaggaagtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggtat 300

tgcacgggct atccggttcc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggggagcg cttggtctca cccgcagttc 480

gaaaaataat aagcttgacc tgtgaagtga aaaatggcgc acattgtgcg acattttttt 540

tgtctgccgt ttaccgtac tgcgtcacgg atctccacgc gccctgtagc ggcgcattaa 600

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgc 637

<210> 39

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 39

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg taaggtcacc atggatataat ttgggttctg gcaggaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgag 300

tgcgcagggt ttccggttcc aggggtgtgg ctctgtggga gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 40

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 40

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tctggggaag atctgagat gactctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggagcg taacgtcacc gcactgatcg atgggcgctg tcaagaagtg 180

aagaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggacgg cggtaaacat	240
giggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgagggcgag	300
gggcatggca ctccggcacg tactgtggca ctggtgggca gagacccac caataatctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg	456
<210> 41	
<211> 456	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> lipocalin mutein	
<400> 41	
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg	60
gattttgtgt gtctgtatga tgtgcctgag tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgcaaatat ggggggagct gcaagaggtg	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggccgatgg cggtaaacat	240
gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggtat	300
tgtgtggggt atcctgttcc aggggtgtgg ctggtgggca gagacccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456
<210> 42	
<211> 456	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> lipocalin mutein	
<400> 42	
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg	60
gatgagactt gttggtggtg tgtggatcat tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgaatctct gggggttctg gcaggaggtg	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggccgatgg cggtaaacat	240
gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggagag	300
tgccaagggt ggccggttcc aggggtgtgg ctggtgggca gagacccaa gaacaacctg	360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 43

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 43

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattctgatt gcttttggat tgatgatgtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240

gttgctata tcattcgagc ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa 300

tgcgctggct atccggttcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 44

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 44

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gattcggatt gcttttggat tgatgaggtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240

gttgctata tcattcgagc ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa 300

tgcgctggct atccggttcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 45

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 45

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg      60
gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagctacgc caatgactct gactaccctt      120
gaaggtggcg atctggaggc taaggtcacc atggatatat tcgggttctg gcaggaggtg      180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat      240
gtgcctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgag      300
tgcgcagggt ttccggtccc gggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcggcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456
```

<210> 46

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 46

```
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gattcggatt gcttttggat tgatgagggt tcagttacgc caatgactct gactaccctt      120
gaagcgcgca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg      180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat      240
gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa      300
tgcgagggct ttccggttcc aggggtgtgg ctctgtggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456
```

<210> 47

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 47

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg 60
gattctgatt gtttttggat agaggagtgg tcagctacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc tgaggccacc atggatata tttgggttctg gcaggaggtg 180
aaagcagtgt tggagaagac agacgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgag 300
tgcgcagggt ttccgggtccc gggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 48

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 48

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60
gattcggatt gcttttgggt ggatgaggtg tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggatattt ttggcttttg gcaggaagtg 180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat 240
gttgctata tcattcgag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcgaa 300
tgcgtgggt ttccgggtccc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 49

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> lipocalin mutein

<400> 49

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60
tcgggggaag atctgagtt gtggctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc tagtgtgacc gctctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180
aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa	300
ggttatggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg	456
<210> 50	
<211> 456	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> lipocalin mutein	
<400> 50	
gcctcagacg aggagattca ggatgtgcca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt	60
tcggcggaag atcctgagtt ggtgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc ttctgtgacc gcgctgattg atggccgctg ccaggaagtg	180
aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat	240
gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa	300
ggtcatggca ctccggctcg cacggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg	456
<210> 51	
<211> 456	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> lipocalin mutein	
<400> 51	
gcctcagacg aggagattca ggatgtgcca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt	60
tctgatgaag atcctgagat gacgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc tagtgtgacc gcgctgattg atggccgctg ccaggaagtg	180
aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat	240
gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa	300
ggtcagggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg	456

<210> 52

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 52

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tctgaggaag atcctgagat gacgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc tagtgtgacc gctctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

ggtcatggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg 456

<210> 53

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 53

gcctcagacg aggagattca ggatgtgccca gggacgtggt atctgaaagc gatgacggtt 60

tcgggggaag atcctgagat gatgctggaa tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc tcgtgtgacc gttctgattg atggccgctg ccaggaagtg 180

aaaaatgtgc tcgagaagac agatgaaccg ggtaaataca cggaggatgg cggcaaacat 240

gtggattata tcattagatc tcatgtgaaa gatcattaca tcttctactt tgaaggcgaa 300

gggcagggca cgccgggtcg catggtggct ctggtgggca gagacccac caataatctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aacctgctct ccaggg 456

<210> 54

<211> 456

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> lipocalin mutein

<400> 54

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg	60
gatttttgtt gcctgaatga ttatcctgag tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atgcagattt ggggcgagcc gcaggaagtg	180
aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggcaaacat	240

gttgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggtat	300
tgcacgggct atccggttcc aggggtgtgg ctggtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg	456

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> N-terminal sequence of human tear lipocalin

<400> 55

His His Leu Leu

1

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Factor Xa cleavage site

<400> 56

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SA linker and strep-tag II fusion peptide

<400> 57

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Strep-tag II peptide

<400> 58

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5