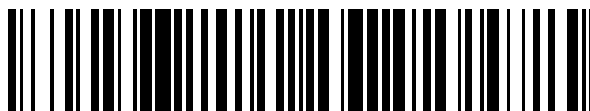


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 425**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2016 PCT/EP2016/059959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016 E 16721149 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3292137**

54 Título: **Proteínas específicas para CD137**

30 Prioridad:

04.05.2015 EP 15166184

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.01.2023

73 Titular/es:

**PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)
Lise-Meitner-Strasse 30
85354 Freising-Weihenstephan, DE**

72 Inventor/es:

**HINNER, MARLON;
ROTHER, CHRISTINE;
OLWILL, SHANE;
ALLERSDORFER, ANDREA y
BEL AIBA, RACHIDA SIHAM**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 932 425 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas específicas para CD137

I. Antecedentes

CD137 es una molécula de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y cuya actividad puede estar implicada en muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias inmunomediadas. También es una diana para la inmunoterapia del cáncer.

Se ha demostrado que la señalización de CD137 es primordial para el mantenimiento y la expansión de la respuesta inmunitaria a antígenos, así como, para la generación de células T de memoria. Numerosos estudios de células T murinas y humanas indican que CD137 promueve una proliferación celular, supervivencia, y producción de citocinas potenciadas (Croft, 2009, Nat Rev Immunol 9:271-285). Los estudios han indicado que algunos AcM agonistas de CD137 aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y mejoran notablemente las respuestas de linfocitos T citolíticos, dando como resultado eficacia antitumoral en diversos modelos. Los AcM agonistas de CD137 han demostrado eficacia en entornos profilácticos y terapéuticos. Además, los modelos tumorales de monoterapia y terapia de combinación con CD137 han establecido respuestas duraderas de memoria de células T protectoras antitumorales (Lynch, 2008, Immunol Rev. 22: 277-286). También se ha demostrado que los agonistas de CD137 inhiben las reacciones autoinmunes en una variedad de modelos de autoinmunidad reconocidos en la técnica (Vinay, 2006, J Mol Med 84:726-736). Esta actividad dual de CD137 ofrece el potencial de proporcionar actividad antitumoral mientras amortigua los efectos secundarios autoinmunitarios que pueden asociarse con enfoques de inmunoterapia que rompen la tolerancia inmunitaria. Lynch D H, Immunological Reviews, vol. 222, 1 de abril de 2008, páginas 277-286, comenta la inmunomodulación mediada por 4-1BB (CD137) y la inmunoterapia del cáncer.

Por consiguiente, basándose en las funciones de CD137 en la modulación de la respuesta inmunitaria, existe una necesidad insatisfecha durante mucho tiempo de compuestos que se unan a CD137 humana, aumenten una respuesta mediada por CD137, y, por lo tanto, proporcionen un posible agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades y afecciones, como cáncer, enfermedades infecciosas, y enfermedades autoinmunitarias.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar tales compuestos, que son muteínas derivadas de lipocalinas. Las muteínas de diversas lipocalinas son una clase de agentes terapéuticos que se expande rápidamente y pueden construirse mediante ingeniería artificial altamente sofisticada para exhibir una alta afinidad y especificidad contra una diana que es diferente de un ligando natural de las lipocalinas de tipo silvestre (véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029463, WO 03/029471 y WO 05/19256).

II. Definiciones

La siguiente lista define términos, expresiones y abreviaturas usadas a lo largo de la presente memoria descriptiva. Todos los términos enumerados y definidos en el presente documento pretenden abarcar todas las formas gramaticales.

Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique de otro modo, "CD137" significa CD137 humana. CD137 también se conoce como "4-1BB" o "miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF9)" o "inducido por activación de linfocitos (ILA)". CD137 humana significa una proteína de longitud completa definida por UniProt Q07011, un fragmento de la misma, o una variante de la misma.

Como se usa en el presente documento, "afinidad detectable" significa la capacidad de unirse a una diana seleccionada con una constante de afinidad de generalmente al menos aproximadamente 10^{-5} M o inferior. Las afinidades más bajas generalmente ya no son medibles con métodos comunes tales como ELISA y, por lo tanto, son de importancia secundaria.

Como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" de una proteína de la divulgación (por ejemplo, una muteína de una lipocalina) o un polipéptido de fusión de la misma a una diana seleccionada (en el presente caso, CD137), puede medirse (y, mediante lo cual, pueden determinarse valores de K_D de un complejo muteína-ligando) mediante una multitud de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, titulación de fluorescencia, ELISA de competición, métodos calorimétricos, tal como calorimetría de titulación isotérmica (ITC), y resonancia de plasmón superficial (BIAcore). Tales métodos están bien establecidos en la técnica y ejemplos de los mismos también se detallan a continuación.

También se observa que la formación de complejo entre el aglutinante respectivo y su ligando está influenciada por muchos factores diferentes, tales como las concentraciones de los respectivos compañeros de unión, la presencia de competidores, pH y la fuerza iónica del sistema de tampón utilizado, y el método experimental usado para la determinación de la constante de disociación K_D (por ejemplo, titulación de fluorescencia, ELISA de competición o resonancia de plasmón superficial, solo por nombrar algunos) o incluso el algoritmo matemático que se usa para la evaluación de los datos experimentales.

Por lo tanto, también está claro para el experto que los valores de K_D (constante de disociación del complejo formado entre el respectivo aglutinante y su diana/ligando) pueden variar dentro de un cierto intervalo experimental, dependiendo del método y la configuración experimental que se usa para determinar la afinidad de una muteína de lipocalina particular para un ligando dado. Esto significa que puede haber una ligera desviación en los valores de K_D medidos o un intervalo de tolerancia dependiendo, por ejemplo, sobre si el valor de K_D se determinó por resonancia de plasmón superficial (Biacore), mediante ELISA de competición, o por “ELISA directo”.

Como se usa en el presente documento, una “muteína”, una entidad “mutada” (ya sea proteína o ácido nucleico), o “mutante” se refiere al intercambio, delección, o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, en comparación con el núcleo estructural de “referencia” de ácido nucleico o proteína de origen natural (de tipo silvestre). Dicho término también incluye fragmentos de una muteína y variantes como se describe en el presente documento. Muteínas de lipocalina de la presente divulgación, fragmentos o variantes de las mismas conservan preferentemente la función de unirse a CD137 como se describe en el presente documento.

El término “fragmento” como se usa en el presente documento en relación con las muteínas de la divulgación se refiere a proteínas o péptidos derivados de lipocalina lacrimal humana madura de longitud completa que se acortan en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C, es decir, que carece de al menos uno de los aminoácidos de extremo terminal N y/o extremo terminal C. Tales fragmentos pueden incluir al menos 10, más tales como 20 o 30 o más aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la lipocalina madura y generalmente son detectables en un inmunoensayo de la lipocalina madura. En general, el término “fragmento”, como se usa en el presente documento con respecto al correspondiente ligando proteico de CD137 de una muteína de lipocalina de la divulgación o de la combinación según la divulgación o de una proteína de fusión descrita en el presente documento, se refiere a ligandos proteicos o peptídicos acortados en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C, que retienen la capacidad del ligando de longitud completa para reconocerse y/o unirse por una muteína según la divulgación.

El término “mutagénesis”, como se usa en el presente documento, significa que las condiciones experimentales se eligen de modo que el aminoácido que se produce de manera natural en una posición de secuencia dada de la lipocalina madura pueda sustituirse por al menos un aminoácido que no está presente en esta posición específica en la secuencia polipeptídica natural respectiva. El término “mutagénesis” también incluye la modificación (adicional) de la longitud de segmentos de secuencia por delección o inserción de uno o más aminoácidos. Por lo tanto, está dentro del alcance de la divulgación que, por ejemplo, un aminoácido en una posición de secuencia elegida se reemplaza por un tramo de tres mutaciones aleatorias, lo que conduce a una inserción de dos residuos de aminoácidos en comparación con la longitud del segmento respectivo de la proteína de tipo silvestre. Una inserción o delección de este tipo puede introducirse independientemente entre sí en cualquiera de los segmentos peptídicos que pueden someterse a mutagénesis en la divulgación. En un ejemplo de la divulgación, puede introducirse una inserción de varias mutaciones en el bucle AB del núcleo estructural de lipocalina elegido (véase la solicitud de patente Internacional WO 2005/019256).

El término “mutagénesis aleatoria” significa que ningún aminoácido único predeterminado (mutación) está presente en una determinada posición de secuencia, pero que al menos dos aminoácidos pueden incorporarse con una cierta probabilidad en una posición de secuencia predefinida durante la mutagénesis.

“Identidad” es una propiedad de secuencias que mide su similitud o relación. El término “identidad de secuencia” o “identidad” como se usa en la presente descripción significa el porcentaje de restos idénticos por pares, después de la alineación (homóloga) de una secuencia de un polipéptido de la divulgación con una secuencia en cuestión, con respecto al número de restos en la más larga de estas dos secuencias. La identidad de secuencia se mide dividiendo el número de residuos de aminoácidos idénticos por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100.

El término “homología” se usa en el presente documento en su significado habitual e incluye aminoácidos idénticos, así como aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas (por ejemplo, intercambio de un residuo de glutamato por un residuo de aspartato) en posiciones equivalentes en la secuencia de aminoácidos lineal de un polipéptido de la divulgación (por ejemplo, cualquier muteína de lipocalina de la divulgación).

El porcentaje de homología de secuencia o identidad de secuencia puede, por ejemplo, determinarse en el presente documento usando el programa BLASTP, versión blastp2.2.5 (16 de noviembre de 2002; véase Altschul, S. F. *et al.* (1997) *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402). En este ejemplo, el porcentaje de homología se basa en la alineación de las secuencias polipeptídicas completas (matriz: BLOSUM 62; costes de hueco: 11.1; valor de corte establecido en 10^{-3}) que incluye las secuencias de propéptidos, preferiblemente usando el núcleo estructural de proteínas de tipo silvestre como referencia en una comparación por pares. Se calcula como el porcentaje de números de “positivos” (aminoácidos homólogos) indicado como resultado de la salida del programa BLASTP dividido por el número total de aminoácidos seleccionados por el programa para la alineación.

Específicamente, para determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una lipocalina (muteína) diferente de una lipocalina de tipo silvestre corresponde a una determinada posición en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina de tipo silvestre, un experto en la técnica puede usar medios y métodos bien conocidos

en la técnica, por ejemplo, alineaciones, o bien manualmente o bien mediante el uso de programas informáticos tales como BLAST2.0, que significa Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que sea adecuado para generar alineaciones de secuencias. Por consiguiente, una lipocalina de tipo silvestre puede servir como “secuencia sujeto” o “secuencia de referencia”, mientras que la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de la lipocalina de tipo silvestre descrita en el presente documento sirve como “secuencia de consulta”. Los términos “secuencia de referencia” y “secuencia de tipo silvestre” se usan de manera intercambiable en el presente documento. Una lipocalina de tipo silvestre preferida se muestra en SEQ ID NO: 1 (Tlc) o SEQ ID NO: 2 (NGAL), respectivamente. Dependiendo de si una muteína de lipocalina de la presente invención se basa en Tlc o NGAL, respectivamente, la lipocalina de tipo silvestre correspondiente puede usarse como secuencia de referencia o secuencia de tipo silvestre.

Los “huecos” son espacios en una alineación que son el resultado de adiciones o deleciones de aminoácidos. Por lo tanto, dos copias exactamente de la misma secuencia tienen una identidad del 100 %, pero secuencias que están menos altamente conservadas, y tienen deleciones, adiciones o reemplazos, pueden tener un menor grado de identidad de secuencia. Los expertos en la técnica reconocerán que varios programas informáticos están disponibles para determinar la identidad de secuencia usando parámetros estándar, por ejemplo Blast (Altschul, *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410), y Smith-Waterman (Smith, *et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197).

El término “variante”, como se usa en la presente descripción, se refiere a derivados de una proteína o péptido que incluyen modificaciones de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por sustitución, delección, inserción o modificación química. Tales modificaciones hechas en algunos ejemplos no reducen la funcionalidad de la proteína o péptido. Tales variantes incluyen proteínas, en donde uno o más aminoácidos se han reemplazado por sus respectivos estereoisómeros D o por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos de origen natural, tales como, por ejemplo, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserina, hidroxilisina, norvalina. Sin embargo, tales sustituciones también pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido químicamente similar. Ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptófano. El término “variante”, como se usa en el presente documento con respecto al correspondiente ligando proteico de CD137 de una muteína de lipocalina de la divulgación o de la combinación según la divulgación o de una proteína de fusión descrita en el presente documento, se refiere a CD137 o fragmento de la misma, respectivamente, que tiene uno o más de tales como 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 o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína CD137 de tipo silvestre, respectivamente, tal como una proteína de referencia CD137 depositada en SwissProt como se describe en el presente documento. Una variante de CD137, respectivamente, tiene preferiblemente una identidad de aminoácidos de al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % con una CD137 humana de tipo silvestre, tal como una proteína de referencia CD137 depositada en SwissProt como se describe en el presente documento.

Por “secuencia nativa” se entiende una lipocalina que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza. Por lo tanto, una lipocalina de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de la respectiva lipocalina de origen natural de cualquier organismo, en particular un mamífero. Tal polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de “secuencia nativa” abarca específicamente formas truncadas o secretadas de manera natural de la lipocalina, formas variantes de origen natural tales como formas empalmadas y variantes alélicas de origen natural alternativamente de la lipocalina. Una “variante” polipeptídica significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden o eliminan en el extremo terminal N o C del polipéptido. Generalmente, una variante tiene al menos aproximadamente un 70 %, incluyendo al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, incluyendo al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Como ejemplo ilustrativo, los primeros 4 residuos de aminoácidos de extremo terminal N (His-His-Leu-Leu) y los últimos 2 residuos de aminoácidos de extremo terminal C (Ser-Asp) pueden eliminarse en una muteína de lipocalina lacrimal (Tlc) de la divulgación sin afectar a la función biológica de la proteína, por ejemplo, SEQ ID NO: 5-11. Además, como otro ejemplo ilustrativo, ciertos residuos de aminoácidos pueden eliminarse en una muteína de lipocalina 2 (NGAL) de la divulgación sin afectar a la función biológica de la proteína, por ejemplo, (Lys-Asp-Pro, posiciones 46-48) en cuanto a SEQ ID NO: 16.

El término “posición” cuando se usa según la divulgación significa la posición de o bien un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento o la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento. Para comprender el término “corresponder” o “correspondiente” como se usa en el presente documento en el contexto de las posiciones de secuencia de aminoácidos de una o más muteínas de lipocalina, una posición correspondiente no solo está determinada por el número de los nucleótidos/aminoácidos anteriores. Por consiguiente, la posición de un aminoácido dado según la

divulgación que puede sustituirse puede variar debido a la delección o adición de aminoácidos en otra parte en una lipocalina (mutante o de tipo silvestre). De manera similar, la posición de un nucleótido dado según la presente divulgación que puede sustituirse puede variar debido a delecciones o nucleótidos adicionales en otra parte en una región 5' no traducida (UTR) de lipocalina de tipo silvestre o muteína que incluye el promotor y/o cualquier otra secuencia reguladora o gen (incluyendo exones e intrones).

Por lo tanto, para una posición correspondiente según la divulgación, debe entenderse preferiblemente que las posiciones de los nucleótidos/aminoácidos pueden diferir en el número indicado de los nucleótidos/aminoácidos vecinos similares, pero dichos nucleótidos/aminoácidos vecinos, que pueden intercambiarse, eliminarse, o añadirse, también están comprendidos por la una o más posiciones correspondientes.

Además, para una posición correspondiente en una muteína de lipocalina basada en un núcleo estructural de referencia según la divulgación, debe entenderse preferiblemente que las posiciones de nucleótidos/aminoácidos son estructuralmente correspondientes a las posiciones en otras partes de una lipocalina (mutante o de tipo silvestre), aunque pueden diferir en el número indicado, como apreciará el experto en la materia a la luz del patrón de plegado global altamente conservado entre lipocalinas.

El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamífero tales como albúmina de suero humano o albúmina de suero bovino o albúmina de suero de rata.

El término "molécula orgánica" o "molécula orgánica pequeña" como se usa en el presente documento para la diana no natural indica una molécula orgánica que comprende al menos dos átomos de carbono, pero preferiblemente no más de 7 o 12 enlaces de carbono que pueden rotar, que tiene un peso molecular en el intervalo entre 100 y 2000 Dalton, preferiblemente entre 100 y 1000 Dalton, y opcionalmente incluyendo uno o dos átomos metálicos.

La palabra "detectar", "detección", "detectable" o "que detecta", como se usa en el presente documento, se entiende tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, así como una combinación de los mismos. Por lo tanto, incluye mediciones cuantitativas, semicuantitativas y cualitativas de una molécula de interés.

Un "sujeto" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. El término "mamífero" se usa en el presente documento para referirse a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de compañía, de deportes o de zoológico, tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, ratas, cerdos, simios tales como monos *cynomolgus* y etc., por nombrar solo unos pocos ejemplos ilustrativos. Preferiblemente, el mamífero en el presente documento es ser humano.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones.

Una "muestra" se define como una muestra biológica tomada de cualquier sujeto. Muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, heces, semen o tejido.

III. Descripciones de figuras

Figura 1: proporciona mediciones típicas de la velocidad de asociación y la velocidad de disociación por resonancia de plasmón superficial (SPR) para la interacción de diversas muteínas de lipocalina representativas (SEQ ID NO indicadas en el gráfico) con CD137 humana (Fc-fusión) como diana. Las dianas se inmovilizaron a través de un anticuerpo anti-IgG-Fc humano, que a su vez se inmovilizó en un chip sensor usando química de acoplamiento de amina estándar. Las muteínas de lipocalina se emplearon como el analito soluble que se hizo fluir a diferentes concentraciones a través de la superficie del chip. Hay señales de unión de SPR claras hacia la diana humana, proteína de fusión CD137-Fc humana (huCD137-Fc), para todas las muteínas sometidas a prueba, mientras que los controles negativos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 no muestran unión. Las constantes de disociación resultantes de un ajuste (modelo de unión 1:1) de los datos representados para todas las SEQ ID NO se proporcionan en tabla 1.

Figura 2: proporciona ejemplos representativos de un experimento basado en SPR diseñado para investigar si las muteínas de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 interfieren con la unión del ligando de CD137 (CD137L) a CD137. Esto se investiga generando un complejo de CD137 y CD137L en el chip sensor de SPR, y comprobando si las muteínas de lipocalina sometidas a prueba pueden unirse a este complejo o no. Como referencia, CD137 en ausencia de CD137L se incubó con las muteínas de lipocalina. En las figuras, solo se proporcionan los segmentos relevantes de los diagramas de detección (sensogramas). El trazado de SPR para la unión de la muteína de lipocalina respectiva a huCD137-Fc solo se marca con una flecha con un cuerpo continuo. El trazado de SPR para la unión de la muteína de lipocalina respectiva a huCD137-Fc que se ha saturado con CD137L se marca con una flecha con un cuerpo discontinuo. La figura 2(A) muestra que SEQ ID NO: 5 no puede unirse a huCD137-Fc en presencia de CD137L. La figura 2(B) y la figura 2(C) muestran que SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 se unen a huCD137-Fc con una respuesta muy similar tanto en ausencia como en presencia de CD137L, mostrando que no hay competencia en la unión entre las dos muteínas de lipocalina y CD137L.

Figura 3: muestra ejemplos representativos de estudios de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) realizados para evaluar la unión específica de muteínas de lipocalina representativas (SEQ ID NO indicadas en el gráfico) a CD137 humana expresada en células de mamífero. Las células transfectadas simuladas sirvieron como control negativo.

Figura 4: representa los resultados de un ensayo de activación de células T que se llevó a cabo para evaluar la capacidad de un conjunto de muteínas de lipocalina de unión a CD137 representativas (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15) para estimular de manera conjunta respuestas de células T cuando se recubren en una placa de plástico, induciendo la agrupación y señalización en sentido 3' concomitante de señalización de CD137. Además, se sometió a prueba la activación de células T por incubación con muteínas de lipocalina solubles para investigar si los respectivos aglutinantes muestran actividad agonista en ausencia de agrupación. En la figura 4(A), las muteínas de lipocalina se recubrieron sobre una placa de plástico junto con un anticuerpo anti-CD3 humano y las células T purificadas se incubaron posteriormente sobre la superficie recubierta en presencia de anti-CD28 humano soluble. En la figura 4(B) se recubrió un anticuerpo anti-CD3 humano sobre una placa de plástico y las células T purificadas se incubaron posteriormente sobre la superficie recubierta en presencia de anti-CD28 humano soluble y las muteínas de lipocalina en disolución. En ambos casos, los niveles de interleucina 2 (IL-2) sobrenadante sirvieron como lectura. Como control negativo, se empleó SEQ ID NO: 4. En el experimento de la figura 4(A), hay una concentración de IL-2 claramente aumentada en el sobrenadante debido a la activación de células T para las muteínas de lipocalina de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4. Para el experimento que utiliza las muteínas de lipocalina en disolución en la figura 4(B), no hay un aumento significativo en la concentración de IL-2 en el sobrenadante para ninguna de las muteínas de lipocalina sometidas a prueba en comparación con SEQ ID NO: 4 de control negativo. Tomadas en conjunto, la figura 4(A) y 4(B) muestran que las muteínas de lipocalina sometidas a prueba muestran el comportamiento deseado: agrupación de CD137 en la superficie de células T a través de muteínas anti-CD137 recubiertas en plástico conduce a la estimulación conjunta de células T deseada, mientras que la muteína respectiva en disolución, mientras que se une a CD137 como se muestra en el ejemplo 4 y la figura 3, no induce ninguna estimulación conjunta de células T.

Figura 5: proporciona el resultado de un experimento de activación de células T que utiliza la muteína de lipocalina de unión a CD137 de SEQ ID NO: 13 como la molécula de prueba. Se usó SEQ ID NO: 4 como control negativo. El experimento se realizó utilizando estimulación anti-CD3 y anti-CD28 subóptima adicional de células T con lecturas de, en la figura 5(A), proliferación continuada de las células T después de tres días de incubación usando un pulso de BrdU de 4 h, la figura 5 (C), concentración de IL-2 sobrenadante y la figura 5 (E), niveles de IFN- γ sobrenadante. Alternativamente, solo se utilizó una concentración de anti-CD3 subóptima, con lecturas de, en la figura 5(B), proliferación continuada, la figura 5(D), concentración de IL-2 de sobrenadante y la figura 5(F), niveles de IFN- γ sobrenadante. El experimento demuestra aumentos dependientes de la dosis de SEQ ID NO: 13 en niveles de proliferación de IL-2 e IFN-gamma utilizando tanto estimulación de anti-CD3/anti-CD28 como solo estimulación de anti-CD3.

IV. Descripción detallada de la divulgación

Como se usa en el presente documento, una "lipocalina" se define como una proteína monomérica de aproximadamente 18-20 kDa en peso, que tiene una región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende una pluralidad de (preferiblemente ocho) hebras β conectadas por parejas por una pluralidad de (preferiblemente cuatro) bucles en un extremo para definir de ese modo un bolsillo de unión. Es la diversidad de los bucles en el núcleo estructural de lipocalina por lo demás rígido lo que da lugar a una variedad de diferentes modos de unión entre los miembros de la familia de la lipocalina, cada uno capaz de acomodar objetivos de diferente tamaño, forma, y carácter químico (revisado, por ejemplo, en el documento de Flower, D. R. (1996), citado anteriormente; Flower, D. R. *et al.* (2000), citado anteriormente, o Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350). De hecho, la familia de proteínas de lipocalina ha evolucionado naturalmente para unirse a un amplio espectro de ligandos, compartir niveles inusualmente bajos de conservación de secuencia global (a menudo con identidades de secuencia de menos del 20 %) pero conservando un patrón de plegado global altamente conservado. La correspondencia entre las posiciones en diversas lipocalinas es bien conocida por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.250.297.

Como se ha indicado anteriormente, una lipocalina es un polipéptido definido por su estructura supersecundaria, concretamente, la región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende ocho hebras β conectadas por parejas por cuatro bucles en un extremo para definir de ese modo un bolsillo de unión. La presente divulgación no se limita a muteínas de lipocalina dadas a conocer específicamente en el presente documento. A este respecto, la divulgación se refiere a una muteína de lipocalina que tiene una región estructural supersecundaria de hoja plegada en β cilíndrica que comprende ocho hebras β conectadas por parejas por cuatro bucles en un extremo para definir de ese modo un bolsillo de unión, en donde al menos un aminoácido de cada uno de al menos tres de dichos cuatro bucles se ha mutado y en donde dicha lipocalina es eficaz para unirse a CD137 con afinidad detectable.

En una realización particular, una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento es una muteína de lipocalina lacrimal humana (TLPC o Tlc), también denominada lipocalina-1, prealbúmina lacrimal o proteína de la

glándula von Ebner. El término "lipocalina lacrimal humana" o "Tlc" o "lipocalina-1", como se usa en el presente documento, se refiere a la lipocalina lacrimal humana madura con el número de registro del banco de datos de SWISS-PROT/UniProt P31025 (Isoforma 1). La secuencia de aminoácidos mostrada en el número de registro del banco de datos de SWISS-PROT/UniProt P31025 puede usarse como una "secuencia de referencia" preferida, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 se usa como secuencia de referencia.

En otra realización particular, una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento es una muteína de lipocalina 2 humana. El término "lipocalina 2 humana" o "Lcn 2 humana" o "NGAL humana", como se usa en el presente documento, se refiere a la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humana madura (NGAL) con el número de registro del banco de datos de SWISS-PROT/UniProt P80188. Una muteína de lipocalina 2 humana de la divulgación también puede designarse en el presente documento como "una muteína de hNGAL". La secuencia de aminoácidos mostrada en el número de registro del banco de datos de SWISS-PROT/UniProt P80188 puede usarse como una "secuencia de referencia" preferida, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 se usa como secuencia de referencia.

En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina que se une a CD137 con afinidad detectable puede incluir al menos una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo por otro aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina. En algunas otras realizaciones, una muteína de lipocalina que se une a CD137 con afinidad detectable puede incluir uno o más residuos de cisteína no nativos sustituyendo uno o más aminoácidos de una lipocalina de tipo silvestre. En una realización particular adicional, una muteína de lipocalina según la divulgación incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína, mediante lo cual para formar uno o más puentes de cisteína. En algunas realizaciones, dicho puente de cisteína puede conectar al menos dos regiones de bucle. La definición de estas regiones se usa en el presente documento según el documento Flower (Flower, 1996, citado anteriormente, Flower, *et al.*, 2000, citado anteriormente) y Breustedt *et al.* (2005, citado anteriormente). En una realización relacionada, la divulgación enseña una o más muteínas de lipocalina que son capaces de activar rutas de señalización en sentido 3' de CD137 mediante unión a CD137.

Proteínas de la divulgación, que se dirigen contra o son específicas para CD137, incluyen cualquier número de muteínas de proteínas de unión específica que se basan en un núcleo estructural proteico definido. Preferiblemente, el número de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, que se intercambia, se elimina o se inserta es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, tal como 25, 30, 35, 40, 45 o 50, prefiriéndose 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, y prefiriéndose aún más 9, 10 u 11. Sin embargo, se prefiere que una muteína de lipocalina de la divulgación todavía sea capaz de unirse a CD137.

En un aspecto, la presente divulgación incluye diversas muteínas de lipocalina que se unen a CD137 con al menos afinidad detectable. En este sentido, CD137 puede considerarse un ligando no natural de la lipocalina de tipo silvestre de referencia, donde "ligando no natural" se refiere a un compuesto que no se une a las lipocalinas de tipo silvestre en condiciones fisiológicas. Por modificación mediante ingeniería de lipocalinas de tipo silvestre con una o más mutaciones en ciertas posiciones de secuencia, los presentes inventores han demostrado que la alta afinidad y la alta especificidad por el ligando no natural, CD137, es posible. En algunos ejemplos, en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más triplete(s) de nucleótidos que codifican ciertas posiciones de secuencia en lipocalinas de tipo silvestre, puede llevarse a cabo una mutagénesis aleatoria a través de la sustitución en estas posiciones por un subconjunto de tripletes de nucleótidos.

Además, las muteínas de lipocalina de la divulgación pueden tener un residuo de aminoácido mutado en una cualquiera o más, incluyendo al menos una cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, de las posiciones de secuencia correspondientes a determinadas posiciones de secuencia de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina de referencia.

Una proteína de la divulgación puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (natural) del núcleo estructural de proteína "original" (tal como una lipocalina) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina según la divulgación también puede portar una o más mutaciones de aminoácidos en una posición/posiciones de secuencia siempre que una mutación de este tipo, al menos esencialmente no obstaculice o no interfiera con la actividad de unión y el plegamiento de la muteína. Tales mutaciones pueden lograrse muy fácilmente a nivel de ADN usando métodos estándar establecidos (Sambrook, J. *et al.* (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones, así como sustituciones de aminoácidos. Tales sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido de propiedades químicamente similares, en particular con respecto a la polaridad, así como al tamaño. Ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina, y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptófano. Por otro lado, también es posible introducir alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos de aminoácidos individuales, también es posible o bien insertar o bien eliminar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina lacrimal humana siempre que estas deleciones o inserciones den como resultado una muteína plegada/funcional estable (por ejemplo, muteínas de Tlc con extremos terminales N y C

truncados). En tal muteína, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos se añaden o eliminan en el extremo terminal N o C del polipéptido. Generalmente, una muteína de este tipo puede tener aproximadamente al menos un 70 %, incluyendo al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimon humana madura. Como ejemplo ilustrativo, la presente divulgación también abarca muteínas de Tlc como se ha definido anteriormente, en las que los primeros cuatro residuos de aminoácidos de extremo terminal N de la secuencia de lipocalina lacrimon humana madura (His-His-Leu-Leu; posiciones 1-4) y/o los dos últimos residuos de aminoácidos de extremo terminal C (Ser-Asp; posiciones 157-158) de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimon humana madura se han eliminado (SEQ ID NO: 5-11). Además, como otro ejemplo ilustrativo, la presente divulgación también abarca muteínas de NGAL como se ha definido anteriormente, en las que los residuos de aminoácidos (Lys-Asp-Pro, posiciones 46-48) de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina 2 humana madura (hNGAL) se han eliminado (SEQ ID NO: 16).

La secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento tiene una alta identidad de secuencia con respecto a la lipocalina de referencia en comparación con las identidades de secuencia con otras lipocalinas. En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina de la divulgación es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina de referencia, con la condición de que posiblemente haya huecos (como se define a continuación) en una alineación que son el resultado de adiciones o deleciones de aminoácidos. Una secuencia respectiva de una muteína de lipocalina de la divulgación, que es sustancialmente similar a las secuencias de la lipocalina de referencia, tiene, en algunos ejemplos, al menos un 70 % de identidad u homología de secuencia, al menos un 75 % de identidad u homología de secuencia, al menos un 80 % de identidad u homología de secuencia, al menos un 82 % de identidad u homología de secuencia, al menos un 85 % de identidad u homología de secuencia, al menos un 87 % de identidad u homología de secuencia, o al menos un 90 % de identidad u homología de secuencia que incluye al menos un 95 % de identidad u homología de secuencia, con respecto a la secuencia de la lipocalina de referencia, con la condición de que la posición o secuencia alterada se mantenga y que sean posibles uno o más huecos.

Como se usa en el presente documento, una muteína de lipocalina de la divulgación "se une específicamente" a una diana (por ejemplo, CD137) si es capaz de discriminar entre esa diana y una o más dianas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino una propiedad relativa. Puede determinarse la "unión específica", por ejemplo, según ensayos de inmunoelectrotransferencia de tipo Western, ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

En una realización, las muteínas de lipocalina de la divulgación se fusionan en su extremo terminal N y/o su extremo terminal C con un compañero de fusión que es un dominio de proteína que prolonga la semivida en suero de la muteína. En realizaciones particulares adicionales, el dominio de proteína es una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, o una proteína de unión a albúmina.

En otra realización, las muteínas de lipocalina de la divulgación se conjugan con un compuesto que prolonga la semivida en suero de la muteína. Más preferiblemente, la muteína se conjuga con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula de polialquilenglicol, un hidroxietilalmidón, una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, y una proteína de unión a albúmina.

En otra realización más, la presente divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una muteína de lipocalina de la invención dada a conocer en el presente documento. La divulgación abarca una célula huésped que contiene dicha molécula de ácido nucleico.

A. Muteínas de lipocalina específicas para CD137

En un aspecto, la presente divulgación proporciona muteínas de lipocalina humana que se unen a CD137 y aplicaciones útiles para las mismas. La divulgación también proporciona métodos para preparar proteínas de unión a CD137 descritas en el presente documento, así como composiciones que comprenden tales proteínas. Las proteínas de unión a CD137 de la divulgación, así como composiciones de las mismas, pueden usarse en métodos de detección de CD137 en una muestra o en métodos de unión de CD137 en un sujeto. No se han descrito previamente tales muteínas de lipocalina humana que tengan estas características relacionadas con los usos proporcionados por la presente divulgación.

1. Muteínas de lipocalina a modo de ejemplo específicas para CD137.

Una realización de la presente divulgación se refiere a una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a CD137 con una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 300 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM o incluso inferior, tal como 2 nM, por ejemplo, determinada por análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) descrito esencialmente en el ejemplo 4.

En otra realización, la muteína de lipocalina es capaz de unirse a CD137 con un valor de CE_{50} de aproximadamente 250 nM o inferior, aproximadamente 100 nM o inferior, aproximadamente 50 nM o inferior, aproximadamente 18 nM o inferior, por ejemplo, determinado por un análisis de FACS como se describe esencialmente en el ejemplo 6.

- 5 Otra realización de la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina que es capaz de activar rutas de señalización en sentido 3' de CD137 uniéndose a CD137.

10 En algunas realizaciones, en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, una muteína de lipocalina de la divulgación es capaz de inducir una mayor concentración de IL-2, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo de activación de células T funcional descrito esencialmente en el ejemplo 7.

15 En algunas otras realizaciones, en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, una muteína de lipocalina de la divulgación no conduce a una mayor concentración de IL-2, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo de activación de células T funcional descrito esencialmente en el ejemplo 8.

En algunas realizaciones, en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, una muteína de lipocalina de la divulgación es capaz de inducir una mayor proliferación de IL-2 e IFN- γ , por ejemplo, cuando se mide en un ensayo de activación de células T funcional descrito esencialmente en el ejemplo 9.

- 20 En un aspecto, la presente divulgación proporciona muteínas de lipocalina lacrimal humana de unión a CD137.

A este respecto, la divulgación proporciona una o más muteínas de Tlc que son capaces de unirse a CD137 con una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 300 nM o inferior e incluso aproximadamente 100 nM o inferior.

- 25 En algunos ejemplos, tal muteína de Tlc comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

- 30 En algunos ejemplos particulares, tal muteína de Tlc puede contener un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura.

- 35 En realizaciones particulares adicionales, tal muteína de Tlc puede incluir además un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 101, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura.

- 40 En otros ejemplos particulares, la Tlc puede contener un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura.

- 45 En algunos ejemplos adicionales, la muteína de Tlc puede comprender al menos 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 o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en una o más posiciones de secuencia correspondientes a las posiciones de secuencia 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura y en donde dicho polipéptido se une a CD137, en particular CD137 humana.

- 50 En algunos ejemplos adicionales más, la divulgación se refiere a un polipéptido, en donde dicho polipéptido es una muteína de Tlc, en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura, que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 y 108 y en donde dicho polipéptido se une a CD137, en particular CD137 humana.

- 55 En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina según la divulgación puede incluir al menos una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo por, por ejemplo, un residuo de serina. En algunas realizaciones, una muteína de Tlc según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo en las posiciones 61 y/o 153 por otro aminoácido tal como un residuo de serina. En este contexto, se observa que se ha encontrado que la eliminación del enlace disulfuro estructural (en el nivel de una respectiva biblioteca de ácidos nucleicos sin tratamiento) de la lipocalina lacrimal de tipo silvestre que se forma por los residuos de cisteína 61 y 153 (véase Breustedt, *et al.*, 2005, citado anteriormente) pueden proporcionar muteínas de lipocalina lacrimal que no solo están plegadas de manera estable, sino que también pueden unirse a un ligando no natural dado con alta afinidad. En algunas realizaciones particulares, la muteína de Tlc según la divulgación incluye las sustituciones de aminoácidos Cys 61 \rightarrow Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro o Trp y Cys 153 \rightarrow Ser o Ala. Una sustitución de este tipo ha demostrado ser útil para evitar la formación del puente disulfuro natural que une Cys 61 y Cys 153, y facilitar de ese modo la manipulación de la muteína. Sin embargo, las muteínas de lipocalina lacrimal que

se unen a CD137 y que tienen el puente disulfuro formado entre Cys 61 y Cys 153 también son parte de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la eliminación del enlace disulfuro estructural puede proporcionar la ventaja adicional de permitir la generación (espontánea) o la introducción deliberada de enlaces disulfuro artificiales no naturales en muteínas de la divulgación, aumentando de ese modo la estabilidad de las muteínas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, o bien dos o bien los tres codones de cisteína en la posición 61, 101 y 153 se reemplazan por un codón de otro aminoácido. Además, en algunas realizaciones, una muteína de Tlc según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo en la posición 101 por un residuo de serina o un residuo de histidina.

En algunas realizaciones, una muteína según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína en las posiciones 28 o 105 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimal humana madura.

Además, en algunas realizaciones, una muteína según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de arginina nativo en las posiciones 111 por un residuo de prolina. Además, en algunas realizaciones, una muteína según la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de lisina nativo en las posiciones 114 por un residuo de triptófano o un ácido glutámico.

En algunos ejemplos, una muteína de Tlc de unión a CD137 según la divulgación incluye, en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1), uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos mutados: Ala 5 → Val o Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg o Asn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Arg o Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile y Cys 153 → Ser. En algunos ejemplos, una muteína de Tlc según la divulgación incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, incluso más tal como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la lipocalina lacrimal humana madura.

En algunas realizaciones adicionales, la muteína de Tlc que se une a CD137 incluye uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura:

1. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

2. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

3. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser;

4. Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

5. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

6. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro; o

7. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro.

En la región residual, es decir, la región que difiere de las posiciones de secuencia 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153, una muteína de Tlc de la divulgación puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas.

En otras realizaciones adicionales, una muteína de Tlc según la presente divulgación tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia o al menos un 70 % de homología de secuencia con respecto a la secuencia de la lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1). Como ejemplo ilustrativo, la muteína de SEQ ID NO: 7 tiene una identidad de secuencia de aminoácidos o una homología de secuencia de aproximadamente el 81 % con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimal humana madura.

En realizaciones particulares adicionales, una muteína de Tlc de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en una cualquiera de SEQ ID NO: 5-11 o un fragmento o variante de la misma.

En ejemplos particulares adicionales, una muteína de Tlc de la divulgación tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o más de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-11.

La divulgación también incluye homólogos estructurales de una muteína de Tlc que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-11, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente un 60 %, preferiblemente más de un 65 %, más de un 70 %, más de un 75 %, más de un 80 %, más de un 85 %, más de un 90 %, más de un 92 % y lo más preferiblemente más de un 95 % en relación con dicha muteína de Tlc.

Puede obtenerse una muteína de Tlc según la presente divulgación por medio de mutagénesis de una forma de origen natural de lipocalina lacrimal humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se contempla cualquier sustitución, incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones a modo de ejemplo a continuación, siempre que la muteína de lipocalina conserve su capacidad para unirse a CD137, y/o tenga una identidad de secuencia con respecto a la secuencia sustituida entonces en el sentido de que es al menos un 60 %, tal como al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o más de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimal humana madura (número de registro del banco de datos SWISS-PROT P31025).

En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la divulgación es capaz de interferir con la unión de CD137L a CD137, por ejemplo, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) descrito esencialmente en el ejemplo 5.

En algunas realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina que se une a CD137 con una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 200 nM o inferior, en donde la muteína de lipocalina tiene al menos un 90 % o más, tal como un 95 %, de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a muteínas de lipocalina 2 humana de unión específica (Lcn2 humana o hNGAL) novedosas dirigidas contra o específicas para CD137.

A este respecto, la divulgación proporciona una o más muteínas de hNGAL que son capaces de unirse a CD137 con una afinidad medida por una K_D de 200 nM o inferior, aproximadamente 140 nM o inferior, aproximadamente 50 nM o inferior, e incluso aproximadamente 10 nM o inferior. Más preferiblemente, las muteínas de hNGAL pueden tener una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 5 nM o inferior.

En algunos ejemplos, una muteína de hNGAL de la divulgación incluye una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

En ejemplos particulares, una muteína de lipocalina de la divulgación comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, sustitución/sustituciones en una posición de secuencia correspondiente a la posición de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (número de registro del banco de datos SWISS-PROT P80188; SEQ ID NO: 2). Preferiblemente, se prevé que la divulgación se refiera a una muteína de lipocalina que comprende, además de una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 36, 87 y/o 96 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura, una sustitución en una o más posiciones

correspondientes a las posiciones 28, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 94, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura.

En algunos ejemplos adicionales, la divulgación se refiere a un polipéptido, en donde dicho polipéptido es una muteína de hNGAL, en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (número de registro del banco de datos SWISS-PROT P80188; SEQ ID NO: 2), que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134, y en donde dicho polipéptido se une a CD137, en particular CD137 humana.

En algunos ejemplos, una muteína de hNGAL de unión a CD137 de la divulgación incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos mutados: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg o Lys; Gln 49 → Val, Ile, His, Ser o Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, Ala o Gly; Leu 70 → Ala, Lys, Ser o Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, Thr o Asn; Trp 79 → Ala o Asp; Arg 81 → Met, Trp o Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu y Lys 134 → Tyr.

En algunos ejemplos, una muteína de hNGAL de la divulgación incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, incluso más tal como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la divulgación, que se une a CD137 incluye los siguientes reemplazos de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

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

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr; o

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr.

En la región residual, es decir, la región difiere de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134, una muteína de hNGAL de la divulgación puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas.

En otra realización, la muteína de hNGAL tiene al menos un 70 % o incluso mayor identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (número de registro del banco de datos SWISS-PROT P80188). Como ejemplo ilustrativo, la muteína de SEQ ID NO: 17 tiene una identidad de secuencia de aminoácidos o una homología de secuencia de aproximadamente un 86,5 % con la secuencia de aminoácidos de la hNGAL madura.

En realizaciones particulares adicionales, una muteína de lipocalina según la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20 o un fragmento o variante de la misma.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL de unión a CD137 de la divulgación puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 82 %, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 90 % de identidad, que incluye al menos un 95 % de identidad, con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20.

La divulgación también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente un 60 %, preferiblemente más de un 65 %, más de un 70 %, más de un 75 %, más de un 80 %, más de un 85 %, más de un 90 %, más de un 92 % y lo más preferiblemente más de un 95 % en relación con dicha muteína de hNGAL.

Puede obtenerse una muteína de hNGAL según la presente divulgación por medio de mutagénesis de una forma de origen natural de lipocalina 2 humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se contempla cualquier sustitución, incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones a modo de ejemplo a continuación, siempre que la muteína de lipocalina conserve su capacidad para unirse a CD137, y/o tenga una identidad con respecto a la secuencia sustituida entonces en el sentido de que es al menos un 60 %, tal como al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o más de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (número de registro del banco de datos SWISS-PROT P80188).

En algunas realizaciones adicionales, una muteína de Tlc de la divulgación no interfiere con la unión de CD137L a CD137, por ejemplo, medido en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) descrito esencialmente en el ejemplo 5.

En algunas realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina que se une a CD137 con una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 5 nM o inferior, en donde la muteína de lipocalina tiene al menos un 90 % o más, tal como un 95 %, identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

2. Aplicaciones de muteínas de lipocalina específicas para CD137

CD137 es un receptor coestimulador de células T inducido en la activación del receptor de células T (TCR) (Nam *et al.*, Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363 (2005); Watts *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)). Además de su expresión en células T CD4+ y CD8+ activadas, CD137 también se expresa en células T reguladoras CD4+CD25+, células T NK y células T citolíticas naturales (NK), monocitos, neutrófilos, y células dendríticas. Su ligando natural, CD137L, se ha descrito en células presentadoras de antígenos que incluyen células B, monocitos/macrófagos, y células dendríticas (Watts *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)). En interacción con su ligando, CD137 conduce a una mayor proliferación de células T inducida por TCR, producción de citocinas, maduración funcional, y supervivencia prolongada de células T CD8+ (Nam *et al.*, Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363 (2005), Watts *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)).

La interacción CD137/CD137L está implicada en diversos aspectos de una respuesta inmunitaria. Parece ser importante en la inhibición de la muerte celular inducida por activación en células T (Hurtado *et al.*, J. Immunol. 158:2600, 1997), pero anula los efectos antiapoptóticos de otras citocinas en neutrófilos (Heinisch *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:3441, 2001). CD137, por lo tanto, puede desempeñar un papel en la homeostasis de la función inmunitaria (Ebata *et al.*, Eur. J. Immunol. 31:1210, 2001) y puede representar un sistema coestimulador diana que puede

seleccionarse como diana en el tratamiento del cáncer o la respuesta inflamatoria (Blazar *et al.*, J. Immunol. 166:174, 2001; Takahashi *et al.*, Immunol. Lett. 76:183, 2001; Kim y Broxmeyer, J. Hematother. Stem Cell Res. 10:441, 2001; Kim *et al.*, Cancer Res. 61:2031, 2001).

5 Numerosas aplicaciones posibles para las muteínas de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación, por lo tanto, existen en medicina. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al uso de una muteína de lipocalina de unión a CD137 dada a conocer en el presente documento para detectar CD137 en una muestra, así como un método de diagnóstico respectivo.

10 La presente descripción también implica el uso de una o más muteínas de lipocalina de unión a CD137, como se describe para la formación de complejos con CD137.

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, las muteínas de lipocalina dadas a conocer se usan para la detección de CD137. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones
15 adecuadas, con una muestra sospechosa de contener CD137, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas y CD137, y detectar el complejo mediante una señal adecuada.

La señal detectable puede provocarse por un marcador, como se explicó anteriormente, o por un cambio de propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo, en sí misma. Un ejemplo es la resonancia
20 de plasmón superficial, cuyo valor se cambia durante la unión de los compañeros de unión de los que se inmoviliza uno en una superficie tal como una lámina de oro.

Las muteínas de lipocalina de unión a CD137 dadas a conocer en el presente documento también pueden usarse para la separación de CD137. Tal uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en
25 condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene CD137, permitiendo de ese modo la formación de un complejo entre las muteínas y CD137, y que se separe el complejo de la muestra.

En el uso de las muteínas dadas a conocer para la detección de CD137, así como la separación de CD137, las muteínas y/o CD137 o un dominio o fragmento de las mismas pueden inmovilizarse en una fase sólida adecuada.
30

En otro aspecto más, la presente divulgación presenta un kit de diagnóstico o analítico que comprende una muteína de lipocalina de unión a CD137, según la divulgación.

Además de su uso en diagnósticos, en otro aspecto más, la divulgación contempla una composición farmacéutica que comprende una muteína de la divulgación y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
35

Además, la presente divulgación proporciona muteínas de lipocalina humana que se unen a CD137 para su uso como agentes anticancerígenos y/o moduladores inmunitarios. Como tal, se prevén que las muteínas de lipocalina de la presente divulgación que se unen a CD137 se usen en un método de tratamiento o prevención de enfermedades
40 humanas tales como cáncer, enfermedades infecciosas, y enfermedades autoinmunitarias. Por consiguiente, también se proporcionan métodos de tratamiento o prevención de enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedades infecciosas, y enfermedades autoinmunitarias en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una muteína de lipocalina de la presente invención que se une a CD137.

En las células T, la señalización mediada por CD137, conduce al reclutamiento de miembros de la familia TRAF y a la activación de varias quinasas, incluyendo ASK-1, MKK, MAPK3/MAPK4, p38, y JNK/SAPK. A continuación, la activación de quinasas es seguida por la activación y la translocación nuclear de varios factores de transcripción, incluyendo ATF-2, Jun, y NF-kB. Además de aumentar la proliferación inducida por TCR subóptima, la señalización
45 mediada por CD137 protege las células T, y en particular, células T CD8+ de muerte celular inducida por activación (AICD).
50

La presente divulgación abarca el uso de una muteína de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación o una composición que comprende tal muteína de lipocalina para la unión de CD137, estimulación conjunta de células T, y/o activación de rutas de señalización en sentido 3' de CD137 mediante unión a CD137, incluyendo potenciación de la
55 secreción de IL-2 y producción de interferón IFN- γ .

La presente divulgación también presenta un método para unir CD137 o estimular de manera conjunta células T, que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.
60

Además, la presente divulgación implica un método para activar rutas de señalización en sentido 3' de CD137, incluyendo potenciar la secreción de IL-2 y producir interferón IFN- γ , que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.
65

La presente divulgación también contempla un método para inducir la proliferación de linfocitos T, que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.

Además, la ausencia de interacciones CD137/CD137L previene el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunitarias (Seo *et al.*, 2003, 2004). Las interacciones CD137/CD137L están implicadas en la red de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas además de las interacciones células T - células presentadoras de antígeno bien caracterizadas. La señalización a través de CD137L desempeña un papel crítico en la diferenciación de células mieloides y sus actividades celulares, lo que sugiere que las señales de CD137L desencadenan y mantienen la inflamación. [Immune Network 2009;9(3):84-89].

La presente divulgación abarca el uso de una muteína de lipocalina de unión a CD137 de la divulgación que es capaz de unirse a CD137 competitivamente con CD137L o una composición que comprende tal muteína de lipocalina para la interferencia con la unión de CD137L a CD137 y/o la señalización de CD137L natural.

La presente divulgación también presenta un método para interferir con la unión de CD137L a CD137, que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión competitiva a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.

Además, la presente divulgación implica un método para interferir con la señalización natural de CD137L, que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión competitiva a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.

La presente divulgación también contempla un método para reducir la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que comprende aplicar una o más muteínas de lipocalina de unión competitiva a CD137 de la divulgación o de una o más composiciones que comprenden tales muteínas de lipocalina.

B. Muteínas de lipocalina de la divulgación

Las lipocalinas son moléculas de unión proteicas que han evolucionado naturalmente para unirse a ligandos. Las lipocalinas se producen en muchos organismos, incluyendo vertebrados, insectos, plantas y bacterias. Los miembros de la familia de proteínas de lipocalina (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) FASEB J. 1, 209-214) son proteínas secretadas normalmente pequeñas y tienen una sola cadena polipeptídica. Se caracterizan por un intervalo de diferentes propiedades de reconocimiento molecular: su capacidad para unirse a diversas, principalmente moléculas hidrófobas (tales como retinoides, ácidos grasos, colesterol, prostaglandinas, biliverdinas, feromonas, saborizantes, y aromatizantes), su unión a receptores específicos en la superficie celular y su formación de complejos macromoleculares. Aunque en el pasado se han clasificado principalmente como proteínas de transporte, ahora está claro que las lipocalinas cumplen una variedad de funciones fisiológicas. Estas incluyen papeles en el transporte de retinol, olfato, señalización de feromonas y la síntesis de prostaglandinas. Las lipocalinas se han implicado también en la regulación de la respuesta inmunitaria y la mediación de la homeostasis celular (revisado, por ejemplo, en Flower, D.R. (1996) Biochem. J. 318, 1-14 y Flower, D.R. *et al.* (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 9-24).

Las lipocalinas comparten niveles inusualmente bajos de conservación de secuencia global, a menudo con identidades de secuencia de menos de un 20%. En fuerte contraste, su patrón de plegamiento global está altamente conservado. La parte central de la estructura de lipocalina consiste en una única hoja β anti-paralela de ocho hebras, cerrada sobre sí misma para formar un barril β unido por puentes de hidrógeno de manera continua. Este barril β forma una cavidad central. Un extremo del barril está estéricamente bloqueado por el segmento peptídico de extremo terminal N que discurre a través de su parte inferior así como tres bucles peptídicos que conectan las hebras β . El otro extremo del barril β está abierto al disolvente y abarca un sitio de unión a diana, el cual está formado por cuatro bucles peptídicos flexibles. Es esta diversidad de bucles en el núcleo estructural de lipocalina por lo demás rígido lo que da origen a una variedad de diferentes modos de unión cada uno capaz de acomodar dianas de diferentes tamaño, forma y carácter químico (revisado, por ejemplo en Flower, D.R. (1996), citado anteriormente; Flower, D.R. *et al.* (2000), citado anteriormente, o Skerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350).

Una muteína de lipocalina según la presente divulgación puede ser una muteína de cualquier lipocalina elegida. Ejemplos de lipocalinas adecuadas (también designadas a veces como "núcleos estructurales de 'referencia' de proteínas" o simplemente "núcleos estructurales") de las cuales puede usarse una muteína incluyen, pero no se limitan a, lipocalina lacrimal (lipocalina-1, proteína de la glándula von Ebner), proteína de unión a retinol, neutrófilos, prostaglandina D-sintasa de tipo lipocalina, β -lactoglobulina, proteína de unión a bilina (BBP), apolipoproteína D (APO D), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), lipocalina lacrimal (Tlc), proteína relacionada con α 2-microglobulina (A2m), 24p3/uterocalina (24p3), proteína 1 de la glándula de von Ebners (VEGP 1), proteína 2 de la glándula de von Ebners (VEGP 2), y el precursor de alérgeno mayor Can f1 (ALL-1). En ejemplos relacionados, la muteína de lipocalina se selecciona del grupo que consiste en lipocalina humana asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), lipocalina lacrimal humana (Tlc), apolipoproteína D humana (APO D) y la proteína de unión a bilina de *Pteris brassicae*.

Cuando se usa en el presente documento en el contexto de las muteínas de lipocalina de la presente divulgación que se unen a CD137, el término “específica para” incluye que la muteína de lipocalina se dirige contra, se une a, o reacciona con CD137, respectivamente. Por lo tanto, que está dirigida a, que se une a o que reacciona con incluye que la muteína de lipocalina se una específicamente a CD137, respectivamente. El término “específicamente” en este contexto significa que la muteína de lipocalina reacciona con una proteína CD137, como se describe en el presente documento, pero esencialmente no con otra proteína. El término “otra proteína” incluye cualquier proteína que no sea CD137, respectivamente, incluyendo proteínas estrechamente relacionadas con u que son homólogas a CD137 contra las que se dirigen las lipocalinas dadas a conocer en el presente documento. Sin embargo, proteínas CD137, los fragmentos y/o variantes de especies distintas de las humanas, tales como las descritas en el contexto de la definición “sujeto”, no están excluidos por el término “otra proteína”. El término “no se une esencialmente” significa que la muteína de lipocalina de la presente divulgación no se une a otra proteína, es decir, muestra una reactividad cruzada de menos de un 30 %, preferiblemente un 20 %, más preferiblemente un 10 %, de manera particularmente preferible menos de un 9, 8, 7, 6 o 5 %. Puede someterse a prueba fácilmente si la lipocalina reacciona específicamente como se define anteriormente en el presente documento, entre otros, comparando la reacción de una muteína de lipocalina de la presente divulgación con CD137 y la reacción de dicha lipocalina con (una) otra(s) proteína(s). También puede determinarse la “unión específica”, por ejemplo, según ensayos de inmunoelectrotransferencia de tipo Western, ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y exploraciones de péptidos.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina según la divulgación tiene una alta identidad de secuencia con respecto a una lipocalina respectiva en comparación con las identidades de secuencia con otra lipocalina (véase también anteriormente). En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina correspondiente (la lipocalina de tipo silvestre o de referencia). Una secuencia respectiva de una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación, que es sustancialmente similar a las secuencias de la lipocalina correspondiente, tiene en algunos ejemplos al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 82 %, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 90 % de identidad, incluyendo al menos un 95 % de identidad con respecto a la secuencia de la lipocalina correspondiente. A este respecto, una muteína de lipocalina de la divulgación, por supuesto, puede contener, en comparación, sustituciones descritas en el presente documento que hacen que la muteína de lipocalina sea capaz de unirse a CD137, respectivamente. Típicamente, una muteína de una lipocalina incluye una o más mutaciones, en relación con la secuencia nativa de lipocalina, de aminoácidos en los cuatro bucles en el extremo abierto del sitio de unión a ligando de la lipocalina (véase anteriormente). Como se explicó anteriormente, estas regiones son esenciales para determinar la especificidad de unión de una muteína de lipocalina para una diana deseada. Como ejemplo ilustrativo, una muteína derivada de un polipéptido de lipocalina lacrimal, lipocalina de NGAL o un homólogo de la misma, puede tener uno, dos, tres, cuatro o más residuos de aminoácidos mutados en cualquier posición de secuencia en la región de extremo terminal N y/o en los tres bucles peptídicos BC, DE, y FG dispuestos en el extremo de la estructura de barril β que se encuentra opuesto al bolsillo de unión de lipocalina natural. Como un ejemplo ilustrativo adicional, una muteína derivada de un polipéptido de lipocalina lacrimal o un homólogo de la misma, puede no tener residuos de aminoácidos mutados en el bucle peptídico DE dispuesto en el extremo de la estructura de barril β , en comparación con la secuencia de tipo silvestre de lipocalina lacrimal.

Una muteína de lipocalina según la divulgación incluye uno o más, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o incluso veinte sustituciones en comparación con la lipocalina nativa correspondiente, siempre que una muteína de lipocalina de este tipo sea capaz de unirse a CD137, respectivamente. Por ejemplo, una muteína de lipocalina puede tener una sustitución en una posición correspondiente a una posición distinta (es decir, en una posición correspondiente) de la lipocalina de tipo silvestre que tiene la secuencia de tipo silvestre de, por ejemplo, lipocalina lacrimal, lipocalina de NGAL, o cualquier otra lipocalina dada a conocer en el presente documento. En algunos ejemplos, una muteína de lipocalina de la combinación según la divulgación incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos, incluyendo 2, 3, 4, 5, o incluso más, sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de arginina. Por consiguiente, el ácido nucleico de un núcleo estructural ‘de referencia’ de proteína como se describe en el presente documento está sujeto a mutagénesis con el objetivo de generar una muteína de lipocalina que sea capaz de unirse a CD137, respectivamente.

Además, una muteína de lipocalina de la presente divulgación puede comprender una secuencia de aminoácidos heteróloga en su extremo terminal N o C, preferiblemente extremo terminal C, tal como una SEQ ID NO: 23, por ejemplo, la etiqueta Strep II sin afectar a la actividad biológica (unión a su diana por ejemplo, CD137, respectivamente) de la muteína de lipocalina.

Del mismo modo, una muteína de lipocalina de la presente divulgación puede carecer de 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos en su extremo terminal N y/o 1, 2 o más aminoácidos en su extremo terminal C, en comparación con la lipocalina de tipo silvestre respectiva; por ejemplo, SEQ ID N°: 5-11 y 16.

Específicamente, para determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina diferente de una lipocalina de tipo silvestre corresponde a una determinada posición en la secuencia de

aminoácidos de una lipocalina de tipo silvestre, un experto en la técnica puede usar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, alineaciones, o bien manualmente o bien mediante el uso de programas informáticos tales como BLAST2.0, que significa Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que sea adecuado para generar alineaciones de secuencia. Por consiguiente, una lipocalina de tipo silvestre puede servir como “secuencia sujeto” o “secuencia de referencia”, mientras que la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de la lipocalina de tipo silvestre descrita en el presente documento sirve como “secuencia de consulta”. Los términos “secuencia de referencia” y “secuencia de tipo silvestre” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

En algunas realizaciones, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se contempla cualquier sustitución, incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones a modo de ejemplo enumeradas a continuación, siempre que la muteína de lipocalina conserve su capacidad para unirse a CD137, respectivamente, y/o tenga una identidad con respecto a la secuencia entonces sustituida en el sentido de que es al menos un 60 %, tal como al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 % o más idéntica con respecto a la secuencia “original”.

Las sustituciones conservativas son generalmente las siguientes sustituciones, enumeradas según el aminoácido que va a mutarse, cada uno seguido de uno o más reemplazos que pueden considerarse conservativos: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. También se permiten otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o según otras sustituciones conservativas o no conservativas conocidas. Como orientación adicional, los ocho grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que pueden tomarse típicamente para definir sustituciones conservativas entre sí:

- a. Alanina (Ala), Glicina (Gly);
- b. Ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu);
- c. Asparagina (Asn), Glutamina (Gln);
- d. Arginina (Arg), lisina (Lys);
- e. Isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), valina (Val);
- f. Fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp);
- g. Serina (Ser), treonina (Thr); y
- h. Cisteína (Cys), metionina (Met)

Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, luego cambios más sustanciales, tales como los siguientes, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, pueden introducirse y cribarse los productos en cuanto a una característica deseada. Ejemplos de tales cambios más sustanciales son: Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucina; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la lipocalina seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes: (1) hidrófobos: norleucina, metionina, alanina, valina, leucina, iso-leucina; (2) hidrófilos neutros: cisteína, serina, treonina; (3) ácidos: ácido aspártico, ácido glutámico; (4) básicos: asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina; (5) residuos que influyen en la orientación de cadena: glicina, prolina; y (6) aromáticos: triptófano, tirosina, fenilalanina.

Sustituciones no conservativas supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de la lipocalina respectiva también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. Por el contrario, puede(n) añadirse enlace(s) de cisteína a la lipocalina para mejorar su estabilidad.

Cualquier mutación, incluyendo una inserción como se discutió anteriormente, puede lograrse muy fácilmente en el ácido nucleico, por ejemplo, a nivel de ADN usando métodos estándar establecidos. Ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones, así como sustituciones de aminoácidos. Tales sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de

aminoácido de propiedades químicamente similares, en particular con respecto a la polaridad, así como al tamaño. Ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) iso-leucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptófano. Por otro lado, también es posible introducir

alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos de aminoácidos individuales, también es posible insertar o eliminar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina lacrimal siempre que estas delecciones o inserción den como resultado una muteína estable plegada/funcional.

Modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos individuales para simplificar la subclonación del gen de lipocalina mutado o sus partes incorporando sitios de escisión para determinadas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar aún más la afinidad de una muteína de lipocalina por una diana dada tal como CD137. Además, pueden introducirse mutaciones para modular determinadas características de la muteína, tales como mejorar la estabilidad de plegado, estabilidad en suero, resistencia de proteína o solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, residuos de cisteína de origen natural pueden mutarse a otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro. También es posible mutar deliberadamente otra posición de secuencia de aminoácidos a cisteína para introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo, para la conjugación con otros compuestos, tales como polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de enlaces disulfuro de origen no natural. El resto tiol generado puede usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de una muteína de lipocalina respectiva. Posibilidades a modo de ejemplo de una mutación de este tipo para introducir un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de una muteína de Tlc incluyen las sustituciones Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys y Glu 131 → Cys. El resto tiol generado en el lado de cualquiera de las posiciones de aminoácido 40, 73, 90, 95 y/o 131 puede usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de una muteína de Tlc respectiva.

También es posible mutar otras posiciones de secuencia de aminoácidos a cisteína para introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo, para la conjugación con otros compuestos, tales como polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de enlaces disulfuro de origen no natural.

En algunas realizaciones, si uno de los restos anteriores se conjuga con una muteína de lipocalina de la divulgación, la conjugación con una cadena lateral de aminoácidos puede ser ventajosa. Cadenas laterales de aminoácidos adecuadas pueden aparecer naturalmente en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina humana o pueden introducirse mediante mutagénesis. En caso de que se introduzca un sitio de unión adecuado mediante mutagénesis, una posibilidad es el reemplazo de un aminoácido en la posición apropiada por un residuo de cisteína. Por ejemplo, tal mutación incluye al menos una de la sustitución Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys o Glu 131 → Cys en la secuencia de tipo silvestre de la lipocalina lacrimal humana. El residuo de cisteína recién creado en cualquiera de estas posiciones puede utilizarse a continuación para conjugar la muteína con el resto que prolonga la semivida en suero de la muteína, tal como PEG o un derivado activado del mismo.

Con respecto a una muteína de lipocalina 2 humana, posibilidades a modo de ejemplo de tal mutación para introducir un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de una lipocalina que incluye muteína de lipocalina 2 humana para incluir la introducción de un residuo de cisteína (Cys) en al menos una de las posiciones de secuencia que corresponden a las posiciones de secuencia 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 o 158 de la secuencia de tipo silvestre de NGAL humana. En algunas realizaciones en las que una muteína de lipocalina 2 humana de la divulgación tiene una secuencia en la que, en comparación con la secuencia del número de registro del banco de datos SWISS-PROT/UniProt P80188, una cisteína se ha reemplazado por otro residuo de aminoácido, la cisteína correspondiente puede reintroducirse en la secuencia. Como ejemplo ilustrativo, un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 87 puede introducirse en tal caso revirtiendo a una cisteína como estaba originalmente presente en la secuencia del número de registro SWISS-PROT P80188. El resto tiol generado en el lado de cualquiera de las posiciones de aminoácidos 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 y/o 158 pueden usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero de una muteína de lipocalina 2 humana respectiva.

En otra realización, para proporcionar cadenas laterales de aminoácidos adecuadas para conjugar uno de los compuestos anteriores con una muteína de lipocalina según la presente divulgación, los aminoácidos artificiales pueden introducirse por mutagénesis. Generalmente, tales aminoácidos artificiales están diseñados para ser más reactivos y, por lo tanto, para facilitar la conjugación con el compuesto deseado. Un ejemplo de tal aminoácido artificial que puede introducirse a través de un ARNt artificial es para-acetil-fenilalanina.

Para varias aplicaciones de las muteínas dadas a conocer en el presente documento, puede ser ventajoso usarlas en forma de proteínas de fusión. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina de la divulgación se fusiona en su extremo terminal N o su extremo terminal C con una proteína, un dominio de proteína o un péptido, por ejemplo, una secuencia señal y/o una etiqueta de afinidad.

Etiquetas de afinidad tales como Strep-tag® o Strep-tag II (Schmidt, T.G.M. *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 753-766), la etiqueta *myc*, la etiqueta FLAG, la etiqueta His₆ o la etiqueta HA o proteínas tales como la glutatión-S-transferasa

también permiten la fácil detección y/o purificación de proteínas recombinantes son ejemplos adicionales de compañeros de fusión adecuados. Finalmente, proteínas con propiedades cromogénicas o fluorescentes tales como la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína amarilla fluorescente (YFP) también son compañeros de fusión adecuados para las muteínas de lipocalina de la divulgación.

En general, es posible marcar las muteínas de lipocalina de la divulgación con cualquier sustancia química o enzima apropiada, que genera directa o indirectamente un compuesto o señal detectable en una reacción química, física, óptica o enzimática. Un ejemplo para una reacción física y al mismo tiempo una marcador/reacción óptica es la emisión de fluorescencia tras la irradiación o la emisión de rayos X cuando se usa un marcador radiactivo. Fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa son ejemplos de marcadores enzimáticos (y al mismo tiempo marcadores ópticos) que catalizan la formación de productos de reacción cromogénicos. En general, todos los marcadores usados comúnmente para anticuerpos (excepto aquellos usados exclusivamente con el resto de azúcar en la parte Fc de las inmunoglobulinas) también pueden usarse para la conjugación con las muteínas de lipocalina de la divulgación. Las muteínas de lipocalina de la divulgación también pueden conjugarse con cualquier agente terapéuticamente activo adecuado, por ejemplo, para la administración dirigida de tales agentes a una célula, tejido u órgano dados o para el direccionamiento selectivo de células, por ejemplo, de células tumorales, sin afectar a las células normales circundantes. Ejemplos de tales agentes terapéuticamente activos incluyen radionúclidos, toxinas, moléculas orgánicas pequeñas, y péptidos terapéuticos (tales como péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de superficie celular o péptidos que compiten por un sitio de unión a proteínas en una diana celular dada). Las muteínas de lipocalina de la divulgación también pueden, sin embargo, conjugarse con ácidos nucleicos terapéuticamente activos tales como moléculas de ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños, micro ARN o ribozimas. Tales conjugados pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Como se indicó anteriormente, una muteína de lipocalina de la divulgación puede conjugarse en algunas realizaciones con un resto que extiende la semivida en suero de la muteína (a este respecto véase también la publicación PCT WO 2006/56464 donde tales estrategias de conjugación se describen con referencias a muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa neutrófila humana con afinidad de unión por CTLA-4). El resto que extiende la semivida en suero puede ser una molécula de polialquilenglicol, hidroxietilalmidón, moléculas de ácidos grasos, tales como ácido palmítico (Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9), una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, o una proteína de unión a albúmina, transferrina por nombrar solo unos pocos. La proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la patente estadounidense 6.696.245, por ejemplo), o una muteína de lipocalina con actividad de unión para albúmina. Por consiguiente, parejas de conjugación adecuadas para extender la semivida de una muteína de lipocalina de la divulgación incluyen una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, un dominio de unión a albúmina bacteriana, tal como la de la proteína G de estreptococos (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como parejas de conjugación son, por ejemplo, aquellas que tienen una secuencia de consenso Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, en donde Xaa₁ es Asp, Asn, Ser, Thr, o Trp; Xaa₂ es Asn, Gln, His, Ile, Leu, o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp, Phe, Trp, o Tyr; y Xaa₄ es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, o Thr como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2003/0069395 o el documento de Dennis *et al.* (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 35035-35043).

En otras realizaciones, la propia albúmina (Osborn, B. L. *et al.*, 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548), o puede usarse un fragmento biológicamente activo de albúmina como pareja de conjugación de una muteína de lipocalina de la divulgación. El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamífero tales como albúmina de suero humana o albúmina de suero bovina o albúmina de rata. La albúmina o fragmento de la misma puede producirse de forma recombinante como se describe en la patente estadounidense 5.728.553 o las solicitudes de patente europea EP 0 330 451 y EP 0 361 991. Albúmina humana recombinante (Recombunin[®]) de Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Reino Unido) puede conjugarse o fusionarse con una muteína de lipocalina de la divulgación para extender la semivida de la muteína.

Si la proteína de unión a albúmina es un fragmento de anticuerpo, puede ser un anticuerpo de dominio. Anticuerpos de dominio (Acd) están modificados por ingeniería genética para permitir un control preciso sobre las propiedades biofísicas y la semivida *in vivo* para crear el perfil óptimo de seguridad y eficacia del producto. Anticuerpos de dominio están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Domantis Ltd. (Cambridge, Reino Unido y MA, EE. UU.).

Usando transferrina como resto para extender la semivida en suero de las muteínas de lipocalina de la divulgación, las muteínas pueden fusionarse genéticamente con el extremo terminal N o C, o ambos, de transferrina no glicosilada. La transferrina no glicosilada tiene una semivida de 14-17 días, y una proteína de fusión de transferrina tendrá de manera similar una semivida extendida. El portador de transferrina también proporciona una alta biodisponibilidad, biodistribución y estabilidad en circulación. Esta tecnología está disponible comercialmente de BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, EE.UU.). La transferrina humana recombinante (DeltaFerrin[™]) para su uso como pareja de extensión de semivida/estabilizador de proteínas también está disponible comercialmente de Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Reino Unido).

Si se usa una parte Fc de una inmunoglobulina con el fin de prolongar la semivida en suero de las muteínas de lipocalina de la divulgación, puede usarse la tecnología *SynFusion*TM, disponible comercialmente de Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, EE.UU.). El uso de esta tecnología de fusión de Fc permite la creación de productos biofarmacéuticos de acción más prolongada y puede consistir, por ejemplo, en dos copias de la muteína unida a la región Fc de un anticuerpo para mejorar la farmacocinética, solubilidad, y eficiencia de producción.

Otra alternativa más para prolongar la semivida de las muteínas de lipocalina de la divulgación es fusionar al extremo terminal N o C de la muteína secuencias ricas en glicina flexibles, no estructuradas, largas (por ejemplo, poliglicina con aproximadamente 20 a 80 residuos de glicina consecutivos). Este enfoque dado a conocer en el documento WO2007/038619, por ejemplo, también se ha denominado "rPEG" (PEG recombinante).

Si se usa polialquilenglicol como pareja de conjugación, el polialquilenglicol puede estar sustituido, no sustituido, ser lineal o ramificado. También puede ser un derivado de polialquileño activado. Ejemplos de compuestos adecuados son moléculas de polietilenglicol (PEG) como se describe en el documento WO 99/64016, en la patente estadounidense 6.177.074 o en la patente estadounidense 6.403.564 en relación con interferón, o como se describe para otras proteínas tales como asparaginasa modificada con PEG, PEG-adenosina desaminasa (PEG-ADA) o PEG-superóxido dismutasa (véase, por ejemplo, Fuertges *et al.* (1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release* 11, 139-148). El peso molecular de tal polímero, tal como polietilenglicol, puede variar desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 70.000 Dalton, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 10.000, de aproximadamente 20.000, de aproximadamente 30.000 o de aproximadamente 40.000 Dalton. Además, como, por ejemplo, se describe en las patentes estadounidenses 6.500.930 o 6.620.413, oligómeros y polímeros de carbohidratos tales como almidón o hidroxietilalmidón (HES) pueden conjugarse con una muteína de la divulgación con el fin de extender la semivida en suero.

Además, una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento puede fusionarse con un resto que puede conferir nuevas características a las muteínas de lipocalina de la divulgación, tales como actividad enzimática o afinidad de unión por otras moléculas. Ejemplos de compañeros de fusión adecuados son fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glutatión-S-transferasa, el dominio de unión a albúmina de proteína G, proteína A, fragmentos de anticuerpo, dominios de oligomerización o toxinas.

En particular, puede ser posible fusionar una muteína de lipocalina dada a conocer en el presente documento con un sitio activo enzimático separado de modo que ambos "componentes" de la proteína de fusión resultante actúen juntos sobre una diana terapéutica dada. El dominio de unión de la muteína de lipocalina se une a la diana causante de la enfermedad, permitiendo que el dominio enzimático suprima la función biológica de la diana.

La presente divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico (ADN y ARN) que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican las muteínas de lipocalina de la divulgación. Dado que la degeneración del código genético permite sustituciones de ciertos codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido, la divulgación no se limita a una molécula de ácido nucleico específica que codifica una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento, sino que abarca todas las moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una muteína funcional. A este respecto, la presente divulgación proporciona secuencias de nucleótidos que codifican algunas muteínas de lipocalina de la divulgación como se muestra en SEQ ID NO: 24-39.

En un ejemplo de la divulgación, el método incluye someter la molécula de ácido nucleico a mutagénesis en tripletes de nucleótidos que codifican al menos uno, o incluso más, de las posiciones de secuencia correspondientes a las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de NGAL humana (SEQ ID NO: 2).

En otro ejemplo del método según la divulgación, una molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana se somete en primer lugar a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana (SEQ ID NO: 1). En segundo lugar, la molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana también se somete a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 101, 111, 114 y 153 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura.

La divulgación también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las muteínas de lipocalina de la divulgación, que incluyen mutaciones adicionales fuera de las posiciones de secuencia indicadas de mutagénesis experimental. Tales mutaciones a menudo se toleran o incluso pueden resultar ventajosas, por ejemplo, si contribuyen a una eficiencia de plegado mejorada, estabilidad en suero, estabilidad térmica o afinidad de unión a ligando de las muteínas.

Una molécula de ácido nucleico dada a conocer en esta solicitud puede estar "operativamente unida" a una secuencia reguladora (o secuencias reguladoras) para permitir la expresión de esta molécula de ácido nucleico.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se denomina "capaz de expresar una molécula de ácido nucleico" o capaz de "permitir la expresión de una secuencia de nucleótidos" si incluye elementos de secuencia que contienen

información con respecto a la regulación transcripcional y/o de traducción, y tales secuencias están “operativamente unidas” a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la que los elementos de secuencia reguladora y la secuencia que va a expresarse están conectados de una manera que permite la expresión génica. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies, pero en general estas regiones incluyen un promotor que, en procariotas, contiene tanto el promotor en sí mismo, es decir, elementos de ADN que dirigen el inicio de la transcripción, así como elementos de ADN que, cuando se transcribe en ARN, señalará el inicio de la traducción. Tales regiones promotoras normalmente incluyen secuencias no codificantes en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, tales como las cajas de secuencia -35/-10 y el elemento Shine-Dalgarno en procariotas o la secuencia de caja TATA, secuencias CAAT, y elementos de protección en el extremo 5' (del inglés, *5'-capping elements*) en eucariotas. Estas regiones también pueden incluir elementos potenciadores o represores, así como secuencias señal y líder traducidas para dirigir el polipéptido nativo hacia un compartimento específico de una célula huésped.

Además, las secuencias no codificantes en 3' pueden contener elementos reguladores implicados en la terminación transcripcional, poliadenilación o similares. Si, sin embargo, estas secuencias de terminación no son satisfactoriamente funcionales en una célula huésped particular, entonces pueden sustituirse con señales funcionales en esa célula.

Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico de la divulgación puede incluir una secuencia reguladora, tal como una secuencia promotora. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la divulgación incluye una secuencia promotora y una secuencia de terminación de transcripción. Promotores procariotas adecuados son, por ejemplo, el promotor *tet*, el promotor *lacUV5* o el promotor T7. Ejemplos de promotores útiles para la expresión en células eucariotas son el promotor de SV40 o el promotor de CMV.

Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación también pueden ser parte de un vector o cualquier otro tipo de vehículo de clonación, tal como un plásmido, un fagómido, un bacteriófago, un baculovirus, un cósmido o un cromosoma artificial.

En una realización, la molécula de ácido nucleico se incluye en un fasmido. Un vector fasmídico indica un vector que codifica la región intergénica de un bacteriófago temperado, tales como M13 o f1, o una parte funcional del mismo fusionada con el ADNc de interés. Después de la superinfección de las células huésped bacterianas con tal vector fagómido y un bacteriófago auxiliar apropiado (por ejemplo, M13K07, VCS-M13 o R408) se producen partículas de bacteriófago intactas, permitiendo de ese modo el acoplamiento físico del ADNc heterólogo codificado a su polipéptido correspondiente presentado en la superficie del bacteriófago (véase, por ejemplo, Lowman, H. B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424, o Rodi, D. J., y Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93).

Tales vehículos de clonación pueden incluir, aparte de las secuencias reguladoras descritas anteriormente y una secuencia de ácido nucleico que codifica una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento, secuencias de replicación y control derivadas de una especie compatible con la célula huésped que se usa para la expresión, así como marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células transformadas o transfectadas. Se conocen en la técnica un gran número de vectores de clonación adecuados, y están disponibles comercialmente.

La molécula de ADN que codifica una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento, y en particular un vector de clonación que contiene la secuencia de codificación de una muteína de este tipo puede transformarse en una célula huésped capaz de expresar el gen. La transformación puede realizarse usando técnicas estándar. Por lo tanto, la divulgación también se refiere a una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico como se da a conocer en el presente documento.

Las células huésped transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de la divulgación. Células huésped adecuadas pueden ser procariotas, tales como *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Bacillus subtilis*, o eucariotas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células de insecto SF9 o High5, líneas celulares inmortalizadas de mamífero (por ejemplo, células HeLa o células CHO) o células primarias de mamífero.

La divulgación también se refiere a un método para la producción de una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento, en donde la muteína, un fragmento de la muteína o una proteína de fusión de la muteína y otro polipéptido (por ejemplo, otra muteína de lipocalina) se produce a partir del ácido nucleico que codifica la muteína por medio de métodos de modificación mediante ingeniería genética. El método puede llevarse a cabo *in vivo*, la muteína de lipocalina puede producirse, por ejemplo, en un organismo huésped bacteriano o eucariota y luego aislarse de este organismo huésped o su cultivo. También es posible producir una proteína *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de traducción *in vitro*.

Cuando se produce la muteína de lipocalina *in vivo*, se introduce un ácido nucleico que codifica tal muteína en un organismo huésped bacteriano o eucariota adecuado por medio de tecnología de ADN recombinante (como ya se describió anteriormente). Para este propósito, la célula huésped se transforma primero con un vector de clonación que

incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento usando métodos estándar establecidos. La célula huésped se cultiva después en condiciones, que permiten la expresión del ADN heterólogo y, por lo tanto, la síntesis del polipéptido correspondiente. Posteriormente, el polipéptido se recupera o bien de la célula o bien del medio de cultivo.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, dada a conocer en esta solicitud puede estar "operativamente unida" a otra molécula de ácido nucleico de la divulgación para permitir la expresión de una proteína de fusión de la divulgación. A este respecto, una unión operable es una unión en el que los elementos de secuencia de la primera molécula de ácido nucleico y los elementos de secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico están conectados de una manera que permite la expresión de la proteína de fusión como un único polipéptido.

Además, en algunas realizaciones, el enlace disulfuro natural entre Cys 76 y Cys 175 puede eliminarse en muteínas de NGAL de la divulgación. También en algunas realizaciones para muteínas de Tlc de la divulgación, el enlace disulfuro de origen natural entre Cys 61 y Cys 153 puede eliminarse. Por consiguiente, tales muteínas pueden producirse en un compartimento celular que tiene un medio redox reductor, por ejemplo, en el citoplasma de bacterias Gram-negativas.

En caso de que una muteína de lipocalina de la divulgación incluya enlaces disulfuro intramoleculares, puede preferirse dirigir el polipéptido emergente a un compartimento celular que tiene un medio redox oxidante usando una secuencia señal apropiada. Un entorno oxidante de este tipo puede proporcionarse por el periplasma de bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*, en el medio extracelular de bacterias Gram-positivas o en la luz del retículo endoplásmico de células eucariotas y generalmente favorece la formación de enlaces disulfuro estructurales.

Sin embargo, también es posible producir una muteína de la divulgación en el citosol de una célula huésped, preferentemente *E. coli*. En este caso, el polipéptido puede obtenerse o bien directamente en un estado soluble y plegado o bien recuperarse en forma de cuerpos de inclusión, seguido de renaturalización *in vitro*. Una opción adicional es el uso de cepas huésped específicas que tienen un medio intracelular oxidante, que puede permitir así la formación de enlaces disulfuro en el citosol (Venturi *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8).

Sin embargo, una muteína de lipocalina como se describe en el presente documento puede no generarse o producirse necesariamente solo mediante el uso de ingeniería genética. Más bien, una muteína de este tipo también puede obtenerse por síntesis química tal como síntesis de polipéptidos en fase sólida de Merrifield o por transcripción y traducción *in vitro*. Por ejemplo, es posible que se identifiquen mutaciones prometedoras usando modelado molecular y luego sintetizar el polipéptido *in vitro* deseado (diseñado) e investigar la actividad de unión para CD137. Métodos para la síntesis en fase sólida y/o en fase de disolución de proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bruckdorfer, T. *et al.* (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43).

En otra realización, las muteínas de lipocalina de la divulgación pueden producirse mediante transcripción/traducción *in vitro* empleando métodos bien establecidos conocidos por los expertos en la técnica.

El experto apreciará métodos útiles para preparar muteínas de lipocalina contempladas por la presente divulgación, pero cuyas secuencias de ácidos nucleicos o proteínas no se dan a conocer explícitamente en el presente documento. Como una visión general, tales modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos individuales para simplificar la subclonación de un gen de lipocalina mutado o sus partes incorporando sitios de escisión para determinadas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar aún más la afinidad de una muteína de lipocalina por su diana (por ejemplo, CD137, respectivamente). Además, pueden introducirse mutaciones para modular determinadas características de la muteína, tales como para mejorar la estabilidad de plegado, estabilidad en suero, resistencia de proteínas o solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, residuos de cisteína de origen natural pueden mutarse a otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro.

Las muteínas de lipocalina dadas a conocer en el presente documento y sus derivados pueden usarse en muchos campos similares a anticuerpos o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, las muteínas de lipocalina pueden usarse para marcar con una enzima, un anticuerpo, una sustancia radiactiva o cualquier otro grupo que tenga actividad bioquímica o características de unión definidas. Al hacerlo, sus respectivas dianas o conjugados o proteínas de fusión de los mismos pueden detectarse o ponerse en contacto con los mismos. Además, las muteínas de lipocalina de la divulgación pueden servir para detectar estructuras químicas por medio de métodos analíticos establecidos (por ejemplo, ELISA o inmunoelctrotransferencia de tipo Western) o por microscopía o inmunosensores. A este respecto, la señal de detección puede generarse o bien directamente mediante el uso de un conjugado de muteína o proteína de fusión adecuada o bien indirectamente mediante la detección inmunoquímica de la muteína unida a través de un anticuerpo.

Objetos, ventajas, y características adicionales de esta divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos y las figuras adjuntas de la misma, que no se pretende que sean limitantes.

V. Ejemplos

Ejemplo 1: Selección y optimización de muteínas que se unen específicamente a CD137

Las muteínas de lipocalina específicas de CD137 representativas dadas a conocer en esta solicitud se seleccionaron de bibliotecas de mutantes sin modificar basadas en NGAL humana y Tlc humana. Se emplearon diferentes estrategias y dianas para obtener muteínas que se unen a CD137. Dianas recombinantes utilizadas fueron la fusión de Fc disponible comercialmente del dominio extracelular completo de CD137 de ser humano (huCD137-Fc, R&D Systems 838-4B) y subdominios individuales de CD137 humana, todos generados como fusiones al fragmento Fc humano. Como una diana no fusionada con Fc alternativa, se empleó el dominio extracelular CD137 humana marcado con His (Invitrogen, 10041-H08H-250). Alternativamente, se empleó una selección basada en células usando células CHO transfectadas con el ADNc completo de CD137 humana. Las selecciones basadas en proteínas y células se realizaron usando procedimientos estándar. Los clones obtenidos después de la selección se sometieron a un proceso de cribado como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 2: Identificación de muteínas que se unen específicamente a CD137 usando cribado ELISA de alto rendimiento

Muteínas de lipocalina individuales fusionadas con una etiqueta Strep-tag de extremo terminal C (SEQ ID NO: 23, véase el ejemplo 3) se usaron para inocular medio 2xYT/Amp y se cultivaron durante la noche (14-18 h) a fase estacionaria. Posteriormente, Se inocularon 50 µl de 2xYT/Amp de los cultivos en fase estacionaria y se incubaron durante 3 h a 37 °C y después se desplazaron a 22 °C hasta que se alcanzó una DO₅₉₅ de 0,6-0,8. La producción de muteínas se indujo mediante la adición de 10 µl de 2xYT/Amp suplementado con 1,2 µg/ml de anhidrotetraciclina. Se incubaron cultivos a 22 °C hasta el día siguiente. Después de la adición de 40 µl de BSA al 5 % (p/v) en PBS/T y la incubación durante 1 h a 25 °C, los cultivos estaban listos para su uso en ensayos de cribado.

La unión de las muteínas aisladas a CD137 humana se sometió a prueba recubriendo huCD137-Fc (5 µg/ml en PBS) de la especie relevante durante la noche a 4 °C en placas de microtitulación. Después de bloquear la placa con PBST que contenía BSA al 2 %, se añadieron 20 µl de cultivos bloqueados con BSA a las placas de microtitulación y se incubaron durante 1 h a 25 °C. Se detectaron muteínas unidas con anticuerpo etiqueta anti-StrepTag conjugado con peroxidasa de rábano picante (1 h de incubación; IBA, Goettingen). Para la cuantificación, se añadieron 20 µl de sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu y se determinó la fluorescencia resultante a una longitud de onda de excitación de 330 nM y una longitud de onda de emisión de 420 nM.

Para seleccionar muteínas con mayor resistencia a la temperatura, se incubaron cultivos bloqueados con BSA durante 1 hora a 60°C y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de añadirlos a placas de microtitulación recubiertas con CD137 y bloqueadas con BSA como se describió en el párrafo anterior. Las muteínas se procesaron posteriormente como se describió en el párrafo anterior y se seleccionaron en cuanto a la expresión bacteriana, purificación y caracterización adicional.

Ejemplo 3: Expresión de muteínas

Se expresaron muteínas únicas con la etiqueta de extremo terminal C SAWSHQPFEK (SEQ ID NO: 21) o PSAWSHQPFEK (SEQ ID NO: 22); incluyendo un enlace de SA o PSA y Strep-tag® II, WSHQPFEK (SEQ ID NO: 23) en *E. coli* en medio 2YT-Amp para purificar las muteínas después de la expresión usando cromatografía de afinidad con estreptactina y cromatografía preparativa de exclusión por tamaño. Finalmente, muteínas de lipocalina se sometieron a una etapa de agotamiento de endotoxinas utilizando columnas Mustang E. Las muteínas de lipocalina purificadas se caracterizaron como se detalla en todos los siguientes ejemplos.

Ejemplo 4: Afinidad de muteínas que se unen a la proteína de fusión CD137-Fc humana determinada por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se usó resonancia de plasmón superficial (SPR) para medir la cinética de unión y la afinidad de las muteínas de lipocalina representativas dadas a conocer en el presente documento.

El análisis de SPR de la unión de las muteínas representativas a la proteína de fusión CD137-Fc humana (huCD137-Fc) se realizó a 37 °C en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando HBS-EP+ (1x; BR-1006-69; GE Healthcare) como tampón de migración.

Antes de las mediciones de proteínas, se realizaron tres ciclos de regeneración con fines de acondicionamiento. La regeneración de la superficie del chip derivatizado se logró aplicando MgCl₂ 3 M durante 60 s seguido de glicina 10 mM, pH 1,7 durante 180 s. El anticuerpo anti-IgG-Fc humana se utilizó para inmovilizar huCD137-Fc en una etapa posterior y se tomó del kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare, BR-1008-39). Se inmovilizó en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de amina estándar y el tampón de inmovilización incluido en el kit (acetato de sodio 10 mM pH 5,0), dando como resultado una densidad de ligando de aproximadamente 13000 unidades de resonancia (UR). Por consiguiente, se trató el canal de referencia.

Se capturó huCD137-Fc a una concentración de 0.5 µg/ml en esta superficie durante 180 s a un caudal de 10 µl/min en tampón HBS-EP+. No se aplicó ninguna proteína diana al canal de referencia. Posteriormente, las muteínas de lipocalina se aplicaron en una serie de diluciones apropiada en tampón HBS-EP+ a un caudal de 30 µl/min. La regeneración de la superficie de chip derivatizado se logró como se describió anteriormente. Los datos se evaluaron con el software de evaluación Biacore T200 (V 2.0). Se usó referencia doble y se usó el modelo de unión 1:1 para ajustar los datos en bruto.

La figura 1 muestra los trazados de SPR y las curvas de ajuste determinadas para las muteínas de lipocalina sometidas a prueba, con las correspondientes SEQ ID NO proporcionadas en los gráficos. Los datos se representan para la unión a huCD137-Fc. Hay señales de unión de SPR claras hacia la diana humana, mientras que los controles negativos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 no muestran unión. Las afinidades resultantes de un ajuste de estos datos se proporcionan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

SEQ ID AA	K _D huCD137 [nM]
SEQ ID NO: 5	162
SEQ ID NO: 6	112
SEQ ID NO: 7	110
SEQ ID NO: 8	151
SEQ ID NO: 9	209
SEQ ID NO: 10	112
SEQ ID NO: 11	269
SEQ ID NO: 12	36
SEQ ID NO: 13	2
SEQ ID NO: 14	9
SEQ ID NO: 15	23
SEQ ID NO: 16	30
SEQ ID NO: 17	50
SEQ ID NO: 18	77
SEQ ID NO: 19	98
SEQ ID NO: 20	138
SEQ ID NO: 3 (control)	sin unión
SEQ ID NO: 4 (control)	sin unión

Ejemplo 5: Ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar la competencia entre CD137L humana y muteínas en la unión a proteína de fusión CD137-Fc humana

Con respecto a una muteína de lipocalina descrita en esta solicitud que se une a CD137, generalmente, son posibles dos modos de unión: en el primer caso, el sitio de unión de la muteína se superpone con el sitio de unión del ligando de CD137 humana (CD137L) a CD137. Cuando tal muteína de lipocalina se une a CD137, esto interfiere con la unión de CD137L a CD137 y concomitantemente conduce a la interferencia con la señalización de CD137L natural ("unión competitiva"); en el segundo caso, el sitio de unión de la muteína no se superpone con el sitio de unión de CD137L y tal muteína de lipocalina puede unirse a CD137 sin interferir con la unión de CD137L y la señalización de CD137L natural ("unión no competitiva").

La agrupación de CD137 a través de su ligando activa las rutas de señalización en sentido 3' de CD137. En el caso de células T, la activación de CD137 conduce a la estimulación conjunta de las respuestas activadoras de células T, tales como la proliferación y la producción de citocinas proinflamatorias.

Otra forma de inducir la agrupación de CD137 es usar agentes de unión a CD137 inmovilizada. Cuando se recubre sobre la placa (por ejemplo, sobre una placa de cultivo de plástico y se incuban las células T en la placa), tanto los aglutinantes de CD137 competitivos como no competitivos logran la agrupación de CD137 y, por lo tanto, activan la señalización en sentido 3'.

Por lo tanto, por un lado, aglutinantes de CD137 tanto competitivos como no competitivos, cuando se aplican como se ha descrito anteriormente, pueden activar las rutas de señalización en sentido 3' de CD137.

Una unión a CD137 competitiva, por otro lado, puede emplearse para inhibir la interacción CD137/CD137L natural, y de este modo suprimir la señalización natural inducida por el encuentro de células CD137-positivas con células que expresan CD137L, por ejemplo, células presentadoras de antígeno. Tal modo de acción es deseable en los casos en que se desea suprimir una reacción inflamatoria o autoinmune inapropiadamente fuerte.

Para demostrar que esta solicitud proporciona tanto las muteínas de tipo competitivo como las muteínas de tipo no competitivo, los inventores emplearon un experimento de resonancia de plasmón superficial (SPR). Se usó para

investigar la competencia entre CD137L y tres muteínas de lipocalina representativas dadas a conocer en el presente documento en la unión a la proteína de fusión CD137-Fc humana (huCD137-Fc). En este ensayo, se investiga si una muteína de lipocalina puede unirse al complejo preformado de CD137 y CD137L; si este no es el caso, entonces esto es evidencia de que el epítipo de unión a muteína de lipocalina en CD137 se superpone con el epítipo de unión a CD137L en CD137. Por lo tanto, la muteína respectiva se une competitivamente a CD137 con respecto a la interacción CD137/CD137L. Si tanto CD137L como la muteína de lipocalina pueden unirse al mismo tiempo, entonces la unión no es competitiva con respecto a la interacción CD137/CD137L.

El ensayo de competición se realizó a 37 °C en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando HBS-EP+ (1x; BR-1006-69; GE Healthcare) como tampón de migración. El kit de captura de biotina (*Biotin CAPture Kit*, GE Healthcare) se usó para inmovilizar huCD137-Fc biotinilada en una superficie de chip. Las proteínas CD137-Fc se biotinilaron usando química de NHS estándar. El reactivo de captura de biotina no diluido (*Biotin CAPture Reagent*) (estreptavidina conjugada con oligonucleótido de ADNmc) se capturó en un chip sensor CAP con el oligonucleótido de ADNmc complementario inmovilizado previamente. Posteriormente, la proteína CD137-Fc biotinilada a 2 µg/ml se aplicó durante 300 s a un caudal de 5 µl/min. La regeneración de la superficie del chip se logró aplicando guanidinio-HCl 6 M en NaOH 250 mM durante 120 s a un caudal de 10 µl/min.

En los dos primeros ciclos de medición, se determinó la unión exitosa de CD137L a CD137 en las condiciones experimentales, y se obtuvo el nivel de referencia para la unión individual de una muteína de lipocalina sometida a prueba en ausencia de ligando. En el tercer ciclo, CD137 se saturó con CD137L antes de añadir la muteína de lipocalina como se describe en detalle a continuación.

El ligando de CD137-Fc humana (R&D Systems 2295-4L-025/CF) se aplicó a la proteína CD137-Fc inmovilizada a una concentración de 500 nM y un caudal de 30 µl/min durante 30 segundos. Después de la regeneración, las muteínas de lipocalina se aplicaron a una concentración de 5 µM a un caudal de 30 µl/min durante 30 s. Finalmente, después de otro ciclo de regeneración, se aplicó el ligando de CD137 humana-Fc a las proteínas CD137-Fc inmovilizadas a una concentración de 500 nM durante 30 s, seguido directamente de las muteínas a una concentración de 5 µM durante 30 s, ambas a un caudal de 30 µl/min. La regeneración de la superficie del chip se logró aplicando guanidinio-HCl 6 M en NaOH 250 mM durante 120 s a un caudal de 10 µl/min. Los diagramas de detección (sensogramas) resultantes se analizaron visualmente y se determinó si el ligando de CD137-Fc unido tuvo un impacto en la interacción de las muteínas con las proteínas CD137-Fc inmovilizadas. Los diagramas de detección (sensogramas) de los ciclos fueron interacción de ligando de CD137-Fc o se aplicaron muteínas solas que sirvieron como controles.

Ejemplos representativos para el segmento relevante de los diagramas de detección (sensogramas) resultantes se proporcionan en figura 2 para las muteínas de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. El trazado de SPR para la unión de la muteína de lipocalina respectiva a huCD137-Fc sola se marca con una flecha con un cuerpo continuo. El trazado de SPR para la unión de la muteína de lipocalina a huCD137-Fc que se ha saturado con CD137L se marca con una flecha con un cuerpo discontinuo. Los datos muestran que la muteína de SEQ ID NO: 5 por ejemplo, no puede unirse a huCD137-Fc en presencia de CD137L (figura 2A). Por el contrario, tanto la muteína de SEQ ID NO: 12 como la muteína de SEQ ID NO: 13 se unen a huCD137-Fc con una respuesta muy similar tanto en ausencia como en presencia de CD137L, mostrando que no hay competencia en la unión entre las muteínas de lipocalina y CD137L. Estos datos se resumen en tabla 2.

Tabla 2:

SEQ ID AA	Modo de unión
SEQ ID NO: 5	competitiva
SEQ ID NO: 12	no competitiva
SEQ ID NO: 13	no competitiva

Ejemplo 6: Análisis FACS de muteínas de lipocalina que se unen a células que expresan CD137 humana

Se emplearon estudios de FACS para evaluar la unión específica de muteínas de lipocalina y controles negativos a células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma estable con CD137 humana (CHO-huCD137). La línea celular se generó usando el sistema Flp-In (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las células CHO Flp-In transfectadas simuladamente sirvieron como control negativo.

Las células CHO transfectadas se mantuvieron en medio F12 de Ham (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FCS, Biochrom) y 500 µg/ml de higromicina B (Roth). Se cultivaron células en matraces de cultivo celular en condiciones estándar según las instrucciones del fabricante (37 °C, atmósfera de CO₂ al 5 %). Para disociar las células adherentes para subcultivos o experimentos de FACS, se empleó Accutase (PAA) se empleó según las instrucciones del fabricante.

Para realizar el experimento, se incubaron células Flp-In CHO positivas y negativas para CD137, con muteínas de lipocalina, y la muteína unida se marcó usando anticuerpos primarios anti-lipocalina y anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia, que se detectaron mediante análisis FACS como se describe a continuación.

Se preincubaron 1×10^5 células por pocillo durante 1 h en PBS helado que contenía suero bovino fetal al 5 % (PBS-FCS). Posteriormente, se añadió una serie de diluciones de muteínas de lipocalina y controles negativos que típicamente variaban desde 10 μ M hasta 1 nM a las células y la incubación continuó en hielo durante 1 h. Las células se lavaron dos veces en PBS helado usando centrifugación a 300 g y después se incubaron con un anticuerpo primario de conejo anti-lipocalina (Pieris, (anti-hNGAL de conejo policlonal y anti-hTLC de conejo; Pieris) durante 30 min en hielo. Las células se lavaron dos veces en PBS helado, se resuspendieron en PBS-FCS y se incubaron 30 min en hielo con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con el colorante fluorescente Alexa488 (Life Technologies). Las células se lavaron posteriormente y se analizaron usando un citómetro de flujo Guava easyCyte HT. Típicamente, se estableció una ventana de adquisición para excluir células no viables y se registraron 5000 eventos. Los resultados numéricos se expresan como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

Los histogramas de FACS para todos los clones sometidos a prueba se proporcionan en la figura 3. En los gráficos respectivos, se representan las SEQ ID NO de las muteínas de lipocalina respectivas. En línea con los datos de SPR (figura 1, tabla 1), todas las muteínas muestran una unión clara a CD137 expresada en células. La CE_{50} resultante de un ajuste de estos datos se proporciona en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3:

SEQ ID AA	CE_{50} CHO::hCD137 [nM]
SEQ ID NO: 6	61,1
SEQ ID NO: 7	67,6
SEQ ID NO: 8	234,6
SEQ ID NO: 9	113,3
SEQ ID NO: 11	53
SEQ ID NO: 13	4,3
SEQ ID NO: 14	4,5
SEQ ID NO: 15	7,8
SEQ ID NO: 17	17,9
SEQ ID NO: 18	13,7
SEQ ID NO: 20	18
SEQ ID NO: 3 (control)	sin unión
SEQ ID NO: 4 (control)	sin unión

Ejemplo 7: Ensayo de activación de células T funcional usando muteínas de lipocalina recubiertas

Se empleó un ensayo de activación de células T para evaluar la capacidad de un conjunto de muteínas de lipocalina de unión a CD137 representativas para estimular de manera conjunta respuestas de células T. Las muteínas sometidas a prueba (SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15) abarcaron una afinidad de SPR que varía de 2 nM a >23 nM en el ejemplo 4 (véase la tabla 1). Como se comentó en el ejemplo 5, hay varias formas de inducir la agrupación de CD137 y en este experimento se aplicaron agentes de unión a CD137 inmovilizadas. En este experimento, las muteínas de lipocalina se recubrieron sobre una placa de plástico junto con un anticuerpo anti-CD3 humano (Muronomab, Janssen-Cilag) y las células T purificadas se incubaron posteriormente sobre la superficie recubierta en presencia de anticuerpo anti-CD28 humano soluble (clon 28.2; eBioscience). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se usaron para proporcionar un estímulo subumbral a las células T que podrían coestimularse por la estimulación conjunta de CD137. Como lectura, se midieron los niveles de interleucina 2 (IL-2) sobrenadante. Un aumento de la producción de IL-2 es uno de los rasgos característicos de la activación de células T, y el aumento en los niveles de IL-2 por estimulación conjunta con un anticuerpo anti-CD137 se ha descrito en la bibliografía (Fisher T. S. *et al.*, Cancer Immunol Immunother (2012) 61:1721-1733). Como control negativo, se utilizó SEQ ID NO: 4. A continuación, se proporciona una descripción detallada del experimento.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes voluntarios sanos de las capas leucocitarias mediante centrifugación a través de un gradiente de densidad de polisacarosa (Biocoll 1,077 g/ml de Biochrom), siguiendo los protocolos de Biochrom. Los linfocitos T se aislaron de las PBMC resultantes usando un kit de purificación de células T de selección (*Pan T-cell purification Kit*, de Miltenyi Biotec GmbH) y los protocolos del fabricante, las células T purificadas se resuspendieron en un tampón que consistía en 90 % de FCS y 10 % de DMSO, se congelaron inmediatamente usando nitrógeno líquido y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso posterior. Para el ensayo, las células T se descongelaron durante 16 h y se cultivaron en medios de cultivo (RPMI 1640, Life Technologies) suplementados con 10 % de FCS y 1 % de penicilina-estreptomina (Life Technologies).

El siguiente procedimiento se realizó usando triplicados para cada condición experimental. Las placas de cultivo tisular de fondo plano se recubrieron durante la noche a 4 °C usando 200 μ l de una mezcla de 0,5 μ g/ml de anticuerpo anti-

CD3 y 25 µg/ml de anticuerpos anti-lipocalina de conejo (anticuerpo policlonal de conejo anti-hNGAL, Pieris). Este último se empleó para permitir la inmovilización de muteínas de lipocalina mediante captura por afinidad. Al día siguiente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS, y 50 µl de muteínas de lipocalina de unión a CD137 de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, todas a una concentración de 25 µg/ml, se capturaron en las placas recubiertas previamente durante 1 h a 37 °C. Se empleó SEQ ID NO: 4 del mismo modo y sirvió como control negativo. Después de lavar nuevamente dos veces con PBS, se añadieron 100 µl de la suspensión de células T (correspondiente a 5 x 10⁴ células T) en medios de cultivo suplementados con 2 µg/ml de anticuerpo hCD28 a cada pocillo. Se cubrieron placas con un sello permeable a gases (4ltitude) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % durante 3 días. Posteriormente, se evaluó la IL-2 en el sobrenadante.

Los niveles de IL-2 humana en los sobrenadantes de cultivo celular agrupados se cuantificaron usando el kit DuoSet IL-2 de R&D Systems. En la primera etapa, una placa de 384 pocillos se recubrió a temperatura ambiente durante 2 h con 1 µg/ml de "anticuerpo de captura de IL-2 humana" (R&D System) diluido en PBS. Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 80 µl de PBS-T (PBS que contenía Tween20 al 0,05 %) usando una lavadora Biotek EL405 select CW (Biotek). Después de 1 h de bloqueo en PBS-T que contiene adicionalmente caseína al 1 % (p/p), el sobrenadante agrupado y una serie de concentraciones de un patrón de IL-2 diluido en medio de cultivo se incubaron en la placa de 384 pocillos durante la noche a 4 °C. Para permitir la detección y cuantificación de la IL-2 capturada, se añadió una mezcla de 100 ng/ml de anticuerpo de detección de cabra biotinilado anti-hIL-2-Bio biotinilado (R&D System) y 1 µg/ml de estreptavidina marcada con marcador Sulfotag (Mesoscale Discovery) en PBS-T que contenía caseína al 0,5 % y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadieron 25 µl de tampón de lectura a cada pocillo y se leyó la señal de electroquimioluminiscencia (ECL) de cada pocillo usando un lector de Mesoscale Discovery. El análisis y la cuantificación se realizaron usando software de Mesoscale Discovery.

Los datos resultantes se representan gráficamente en la figura 4A. Hay una concentración de IL-2 claramente aumentada en el sobrenadante debido a la activación de células T para las muteínas de lipocalina de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4. El experimento indica que, todas las muteínas sometidas a prueba pueden coestimular una respuesta de células T cuando se recubren en una placa de cultivo de plástico.

Ejemplo 8: Ensayo de activación de células T funcional usando muteínas de lipocalina en disolución

Para someter a prueba si las muteínas de lipocalina representativas también activan CD137 por simple unión sin agrupación, el ensayo del ejemplo 7 se llevó a cabo de manera análoga al ejemplo 5, pero usando muteínas de lipocalina solubles en lugar de muteínas de lipocalina capturadas. En este ensayo, placas de cultivo tisular de fondo plano se recubrieron como se describió anteriormente, pero usando solo anticuerpo anti-CD3. Las placas se procesaron como se describió anteriormente hasta después de la etapa de adición de células T (incluyendo 2 µg/ml de hCD28), que fue seguido por la adición de 50 µl de las muteínas de lipocalina en disolución a una concentración de 25 µg/ml.

Los datos resultantes se representan gráficamente en la figura 4B. No hay un aumento significativo en la concentración de IL-2 en el sobrenadante debido a la activación de células T para cualquiera de las muteínas de lipocalina sometidas a prueba en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4. El experimento indica que las muteínas de lipocalina monoméricas en disolución, a una concentración que es suficiente para saturar todos los receptores de CD137, no coestimulan las células T.

Ejemplo 9: Ensayo de activación de células T funcional usando muteínas de lipocalina recubiertas

Para investigar con más detalle la capacidad de la muteína de SEQ ID NO: 13 para coestimular respuestas de células T, se empleó un ensayo de activación de células T como en el ejemplo 7. Como lecturas, se evaluaron la proliferación continua de las células T después de tres días de incubación usando un pulso de BrdU de 4 h, y se midieron IL-2 e interferón gamma sobrenadantes (niveles de IFN-γ). Además de la proliferación y la producción de IL-2, un aumento de la producción de IFN-γ es un rasgo característico adicional de la activación de células T, y el aumento en los niveles de IFN-γ por estimulación conjunta con un anticuerpo anti-CD137 se ha descrito en la bibliografía (Jure-Kunkel, M. *et al.*, patente estadounidense 7288638).

Como control negativo, se utilizó SEQ ID NO: 4 de muteína de lipocalina de tipo silvestre. Este experimento, en algunos aspectos, se llevó a cabo de manera idéntica al experimento descrito en el ejemplo 8. A continuación, se proporciona una descripción detallada del experimento.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de donantes voluntarios sanos de las capas leucocitarias mediante centrifugación a través de un gradiente de densidad de polisacarosa (Biocoll 1,077 g/ml de Biochrom), siguiendo los protocolos de Biochrom. Los linfocitos T se aislaron de las PBMC resultantes usando un kit de purificación de células T de selección (*Pan T-cell purification Kit*, de Miltenyi Biotec GmbH) y los protocolos del fabricante. Las células T purificadas se resuspendieron en un tampón que consistía en un 90 % de FCS y un 10 % de DMSO, se congelaron inmediatamente usando nitrógeno líquido y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso

posterior. Para el ensayo, las células T se descongelaron durante 16 h y se cultivaron en medios de cultivo (RPMI 1640, Life Technologies) suplementados con 10 % de FCS y 1 % de penicilina-estreptomina (Life Technologies).

El siguiente procedimiento se realizó usando triplicados para cada condición experimental. Se recubrieron placas de cultivo tisular de fondo plano durante la noche a 4 °C usando 200 µl de una mezcla de 5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 y 25 µg/ml de anticuerpo de núcleo estructural anti-lipocalina de conejo (anticuerpo policlonal de conejo anti-hNGAL, Pieris). Este último se empleó para permitir la inmovilización de SEQ ID NO: 13 mediante captura por afinidad. Como control negativo, se recubrió un control de isotipo IgG1 a 5 µg/ml en lugar del anticuerpo anti-CD3, junto con el anticuerpo de núcleo estructural de anti-lipocalina de conejo de 25 µg/ml. Al día siguiente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS, y se capturaron 50 µl de una serie de diluciones de SEQ ID NO: 13 que varían desde 50 µg/ml hasta 0,8 µg/ml en siete etapas en las placas recubiertas previamente durante 1 h a 37 °C. Como control negativo, se capturó SEQ ID NO: 4 a tres concentraciones (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml). Como control negativo adicional, se capturó SEQ ID NO: 13 a 50 µg/ml a los pocillos que habían sido recubiertos con el isotipo IgG1 y el anticuerpo de captura anti-hNGAL (véase anteriormente). Después de lavar nuevamente dos veces con PBS, se añadieron 100 µl de la suspensión de células T (correspondiente a 5×10^4 células T) en medios de cultivo a los pocillos. Esto se realizó o bien en presencia o bien en ausencia de anticuerpo hCD28 a una concentración de 2 µg/ml. Las placas se cubrieron con un sello permeable a gases (4titude) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % durante 3 días. Posteriormente, se evaluaron la concentración de IL-2 e IFN- γ en el sobrenadante, así como la proliferación celular.

Con el fin de cuantificar la proliferación de células T, el kit ELISA de proliferación celular quimioluminiscente basado en la incorporación de BrdU (Roche) se usó según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el día 3, se añadieron 10 µl de disolución de marcado de BrdU a cada pocillo y se permitió que continuara la proliferación durante 4 h más a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Las placas se centrifugaron a 300 g durante 10 min y los sobrenadantes de los triplicados se agruparon y se almacenaron inmediatamente a -20 °C para la posterior cuantificación de IL-2 e IFN- γ . Las placas se secaron posteriormente a 60 °C durante 1 hora. Se añadieron 200 µl de disolución "FixDenat" a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La BrdU incorporada se marcó con un anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa mediante 2 h de incubación a temperatura ambiente. Los niveles de BrdU se evaluaron cuantificando una reacción catalizada por peroxidasa quimioluminiscente en un lector PheraStar FS.

Los niveles de IL-2 e IFN- γ humana en los sobrenadantes de cultivo celular agrupados se cuantificaron usando los kits IL-2 DuoSet e IFN- γ DuoSet de R&D Systems. El procedimiento se lleva a cabo de manera análoga para ambas citocinas, y se describe solo para IL-2 a continuación. En la primera etapa, una placa de 384 pocillos se recubrió a temperatura ambiente durante 2 h con 1 µg/ml de "anticuerpo de captura de IL-2 humana" (R&D System) diluido en PBS. Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 80 µl de PBS-T (PBS que contenía Tween20 al 0,05 %) usando una lavadora Biotek EL405 select CW (Biotek). Después de 1 h de bloqueo en PBS-T que contenía adicionalmente un 1 % de caseína (p/p), el sobrenadante agrupado y una serie de concentraciones de un patrón de IL-2 diluido en medio de cultivo se incubaron en la placa de 384 pocillos durante la noche a 4 °C. Para permitir la detección y cuantificación de la IL-2 capturada, se añadió una mezcla de 100 ng/ml de anticuerpo de detección anti-hIL-2-Bio de cabra biotinilado (R&D System) y 1 µg/ml de estreptavidina marcada con marcador Sulfotag (Mesoscale Discovery) en PBS-T que contenía un 0,5 % de caseína y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadieron 25 µl de tampón de lectura a cada pocillo y se leyó la señal de electroquimioluminiscencia (ECL) de cada pocillo usando un lector Mesoscale Discovery. El análisis y la cuantificación se realizaron usando el software de Mesoscale Discovery.

El resultado del experimento se representa en la figura 5. Lecturas de proliferación, IL-2 e IFN- γ en el sobrenadante para el experimento usando tanto anticuerpos anti-CD3 como anti-CD28 se proporcionan en la figura 5A, 5C y 5E, respectivamente. Las mismas lecturas para el experimento realizado solo con anticuerpo anti-CD3 se proporcionan en las figuras 5B, 5D y 5F.

En el experimento que emplea estimulación por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, hay un claro aumento dependiente de la dosis en la tasa de proliferación (figura 5A), que es hasta 14 veces mayor que para el control negativo de SEQ ID NO: 4. La proliferación en ausencia de AcM anti-CD3 (columna marcada como "IgG1") es insignificante. Con respecto a la producción de IL-2 (figura 5C), también hay un claro aumento dependiente de la dosis que se estabiliza en una respuesta máxima a una concentración de recubrimiento de SEQ ID NO: 13 de 6,25 µg/ml y a concentraciones más altas permanecen constantemente a niveles de hasta aproximadamente 6 veces en comparación con el control negativo. Con respecto a la producción de IFN- γ (figura 5E), el patrón es muy similar, con niveles máximos de IFN- γ que alcanzan hasta valores de hasta 2,5 veces en comparación con el control negativo.

En el experimento que emplea estimulación mediante AcM anti-CD3 solo, se encontró de nuevo un claro aumento dependiente de la dosis en la tasa de proliferación (figura 5A), que es hasta 4 veces mayor que para el control negativo de SEQ ID NO: 4. Parece haber una respuesta máxima en 6,25 µg/ml de concentración de recubrimiento de SEQ ID NO: 13, que alcanza un valor de 15 veces en comparación con el control negativo. A concentraciones tanto más altas

como más bajas, la respuesta es menos pronunciada. Con respecto a la producción de IFN- γ , hay un aumento dependiente de la dosis que se estabiliza en una respuesta máxima a una concentración de recubrimiento de SEQ ID NO: 13 de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ y a concentraciones más altas permanecen constantemente a niveles de hasta aproximadamente 2,5 veces en comparación con el control negativo.

En general, el experimento mostrado en este ejemplo 9 demuestra claramente una coestimulación significativa de la respuesta de células T por la muteína de SEQ ID NO: 13 con respecto a la proliferación, producción de IL-2 y producción de IFN- γ , tanto en presencia como en ausencia de estimulación de CD28.

Lista de secuencias

<110> Pieris AG

<120> Proteínas novedosas específicas para CD137

<130> PIE15347PCTEP

<140> EP 16721149.9

<141> 04-05-2016

<150> EP15166184.0

<151> 04-05-2015

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Tlc humana de tipo silvestre

<400> 1

ES 2 932 425 T3

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

5 <210> 2
<211> 178
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> hNGAL de tipo silvestre
<400> 2

ES 2 932 425 T3

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 152

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Control negativo

10

<400> 3

ES 2 932 425 T3

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> 178

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Control negativo

10

<400> 4

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

ES 2 932 425 T3

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 5

<211> 152

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

10

<400> 5

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

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

ES 2 932 425 T3

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

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala 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 Val Cys Asp Gly Ser 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> 6
<211> 152
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Muteína de lipocalina

<400> 6

Thr 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 Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

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

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Arg 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

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

ES 2 932 425 T3

				85					90					95			
	Ser	Glu	Gly	Val	Cys	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Trp	Leu	Val	
				100					105					110			
	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys	
			115					120					125				
	Thr	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>	7															
	<211>	152															
5	<212>	PRT															
	<213>	Artificial															
	<220>																
	<223>	Muteína de lipocalina															
10	<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	Glu	Gly	Cys	Arg	Pro	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Val	
				20					25					30			
	Thr	Pro	Met	Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys	
			35					40					45				
	Val	Thr	Met	Ala	Ile	Asp	Gly	Pro	Ala	Gln	Glu	Val	Asn	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	Arg	Asp	His	Tyr	Ile	Phe	Tyr	
					85					90					95		
	Ser	Glu	Gly	Val	Cys	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Trp	Leu	Val	
				100					105					110			
	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Asn	Asn	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys	
			115					120					125				
	Thr	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

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 8

Val 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 Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

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

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Arg 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 Glu Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

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

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

Thr 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> 9

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 9

ES 2 932 425 T3

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 Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

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

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala 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 Val Cys Asp Gly Ser 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 Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 10
<211> 152
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Muteína de lipocalina

<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 Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

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

ES 2 932 425 T3

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Ala 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 Val Cys Asp Gly Ser 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

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

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 11

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 11

Thr 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 Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

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

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Ala 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

ES 2 932 425 T3

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser 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 Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly
145 150

<210> 12

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Muteína de lipocalina

<400> 12

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 13

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Muteína de lipocalina

<400> 13

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

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

ES 2 932 425 T3

165

170

175

Asp Gly

<210> 14

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Muteína de lipocalina

<400> 14

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 15
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Muteína de lipocalina

<400> 15

10

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

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

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Asp Ile
 65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
 85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
 115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 16
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Muteína de lipocalina

ES 2 932 425 T3

<400> 16

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Ser Lys Met
35 40 45

Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr
50 55 60

Gly Val Ser Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile Met Thr Phe
65 70 75 80

Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser
85 90 95

Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr
100 105 110

Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu
115 120 125

Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu
130 135 140

Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu
145 150 155 160

Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
165 170 175

5

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 17

15

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

ES 2 932 425 T3

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Val Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 18

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Muteína de lipocalina

<400> 18

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

ES 2 932 425 T3

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

His Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 19

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 19

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

ES 2 932 425 T3

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80

Ser Thr Leu Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 20

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Ser Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

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

ES 2 932 425 T3

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

Asp Gly

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Etiqueta 1 de extremo terminal C

<400> 21

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

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Etiqueta 2 de extremo terminal C

<400> 22

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

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Etiqueta Strep-tag

<400> 23

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1

5

<210> 24

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 24

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60

gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggccggc acaggaggtg 180

aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacat 240

gttgccctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg 300

tgcgatgggt ctctgttcc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 25

<211> 459

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 25

acctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg 60

gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120

gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggccggc acaggaggtg 180

agagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgacgg cggtaaacat 240

gatgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg 300

tgcgatgggt ctctgttcc ggggtgtgg ctctgtgggca gagacccga gaacaacctg 360

gaagccttgg aggactttga gaaaaccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420

ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggccca 459

<210> 26

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína de lipocalina

<400> 26

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg 60
gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggccggc acaggaggtg 180
aacgcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacad 240
gttgccctata tcattcgcag ccatgtgaga gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg 300
tgcgatgggt ctctgttcc gggggtgtgg ctctgtggga gggaccccgga gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaaaccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatt 420
ctcattccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 27
<211> 459
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Muteína de lipocalina

<400> 27
gtctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg 60
gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt 120
gaaggcggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggccggc acaggaggtg 180
agagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacad 240
gttgccctata tcattcgcag ccatgtggaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg 300
tgcgatgggt ctctgttcc gggggtgtgg ctctgtggga gagaccccgga gaacaacctg 360
gaagccttgg aggactttga gaaaaccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggccca 459

<210> 28
<211> 459
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Muteína de lipocalina

<400> 28
gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg 60
gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gtctaccctt 120

	gaagggcggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggcccggc acaggaggtg	180
	aaagcagtgt tagagaagac agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacaat	240
	gttgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg	300
	tgcgatgggt ctctgttcc ggggggtgtg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
	gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
	ctcatcccca ggcagatcga aaccagctct ccagggcca	459
	<210> 29	
	<211> 459	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Muteína de lipocalina	
	<400> 29	
	gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg	60
	gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
	gaagggcggca atctggaggc tgaggtcacc atggcaatag atgggcccggc acaggaggtg	180
	aaagcagtgt tagagaaggc agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacaat	240
	gttgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg	300
	tgcgatgggt ctctgttcc ggggggtgtg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
	gaagccttgg aggactttga gaaaaccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
	ctcatcccca gtcagatcga aaccagctct ccagggcca	459
	<210> 30	
15	<211> 459	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Muteína de lipocalina	
	<400> 30	
	acctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc gatgacggtg	60
	gatgaggggt gtcgtccttg gaatatattt tcagttacgc caatgactct gactaccctt	120
	gaagacggca atctggaggc taaggtcacc atggcaatag atgggcccggc acaggaggtg	180
	aaagcagtgt tagagaaggc agatgaaccg ggtaaataata cggccgatgg cggtaaacaat	240
	gttgcctata tcattcgcag ccatgtgaaa gatcattaca tcttttatag cgagggcggtg	300
	tgcgatgggt ctctgttcc ggggggtgtg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg	360
	gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc	420
25	ctcatcccca ggcagatcga aaccagctct ccagggcca	459

5	<210> 31		
	<211> 534		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Muteína de lipocalina		
	<400> 31		
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60	
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaag tggatatgtgg taggtcaggc agggaaatatt	120	
	aaactcagag aagacaaaga cccgaacaag atgatggcca ccatctatga gctgaaagaa	180	
15	gacaagagct acaatgtcac cgggtgtcact tttgacgaca agaagtgtac ttacgctatc	240	
	tctactttttg ttccagggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaaaat taagagtttc	300	
	cctggacata cgagttctct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg	360	
	gtgttcttca agttcgtttt ccaaaacagg gaggaattct acatcacctt ctacgggaga	420	
	accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc	480	
20	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534	
	<210> 32		
	<211> 534		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Muteína de lipocalina		
	<400> 32		
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60	
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt	120	
30	aggctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa	180	
	gataaatcat atgacgtcac catggtgaag tttgatgata agaaatgcat gtacgatatt	240	
	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtttt	300	
	ccggggccata catcatcgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360	
	gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggggc	420	
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480	
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534	
	<210> 33		
	<211> 534		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Muteína de lipocalina		
	<400> 33		

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt	120
aggctgcgtg aggataagga tccgaataaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgcggtggcg tttgatgata agaaatgcac gtacgatatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtttt	300
ccgggccata catcatcgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 34
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Muteína de lipocalina

<400> 34	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt	120
aagctgcgtg aggataagga tccgaataaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgcggtggcg tttgatgata agaaatgcac gtacgatatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtttt	300
ccgggccata catcatcttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 35
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Muteína de lipocalina

<400> 35	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt 120
aagctgcgtg aggatagtaa aatgatggcg accatttacg agttgaaaga agataaatca 180
tatgacgtca ccggtgtgag ttttgatgat aagaaatgca cgtacgctat tatgaccttt 240
gtgccgggga gccagccggg cgagtttact ttaggcaaga ttaaaagttt tccgggccat 300
acatcatcgt tggccgcgt cgtgagcacc aactacaacc agcatgccat ggtgttcttc 360
aagtttgtgt ttcagaaccg cgaggagttt tatatcacac tgtacgggcg cacgaaagaa 420
ctgacaagcg agctgaagga aaattttatc cgcttttcca aatctctggg cctccctgaa 480
aaccacatcg tcttccctgt cccaatcgac cagtgtatcg acggc 525

<210> 36
<211> 534
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Muteína de lipocalina

<400> 36
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt 120
aagctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cggggtgacg tttgatgata agaaatgcag gtacgatatt 240
tcgacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaagat taaaagtttt 300
ccgggccata catcatcgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 37
<211> 534
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Muteína de lipocalina

<400> 37
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt 120
aggctgcgtg aggataagga tccgcataaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cggggtgact tttgatgata agaaatgcac gtacgctatt 240
tcgacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtttt 300

	ccggggccata catcatcttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 38	
	<211> 534	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Muteína de lipocalina	
	<400> 38	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt	120
	aagctgcgtg aggataagga tccgaataaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cggggtgact tttgatgata agaaatgcac gtacgctatt	240
	tctacccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaagat taaaagtttt	300
	ccggggccata catcatcgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534
	<210> 39	
15	<211> 534	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Muteína de lipocalina	
	<400> 39	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagcttg tcgggcaggc cggaaatatt	120
	aggctgcgtg aggataagga tccgtctaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgctgtgacg tttgatgata agaaatgcaa ttacgctatt	240
	tctacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtttt	300
	ccggggccata catcatcgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agtttgtgtt tcagaaccgc gaggagtttt atatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

REIVINDICACIONES

1. Una muteína de lipocalina que es capaz de unirse a CD137 con una afinidad medida por una K_D de 300 nM o inferior,

en donde la muteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-11, y en donde la secuencia de aminoácidos de la muteína comprende uno de los siguientes conjuntos de residuos de aminoácidos mutados en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimon humana madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; y Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser; o

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser;

o

en donde la muteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20, y en donde la secuencia de aminoácidos de la muteína comprende uno de los siguientes conjuntos de residuos de aminoácidos mutados en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

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

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe;

Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr; o

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr.

2. La muteína según la reivindicación 1,

en donde la muteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-11, y en donde la secuencia de aminoácidos de la muteína comprende uno de los siguientes conjuntos de residuos de aminoácidos mutados en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; y Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; y Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys

101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser; o

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; y Cys 153 → Ser,

en donde la muteína se une preferiblemente a CD137 con una afinidad medida por una K_D de 270 nM o inferior y/o preferiblemente con un valor de CE_{50} de 250 nM o inferior.

3. La muteína según la reivindicación 2, en donde la muteína es capaz de interferir con la unión de CD137L a CD137.

4. La muteína según la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-11.

5. La muteína según la reivindicación 1,

en donde la muteína comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20, y en donde la secuencia de aminoácidos de la muteína comprende uno de los siguientes conjuntos de residuos de aminoácidos mutados en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

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

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr; o

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser

68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; y Lys 134 → Tyr;

5 en donde la muteína

(i) preferiblemente se une a CD137 con una afinidad medida por una K_D de 150 nM o inferior, y/o

(ii) preferiblemente se une a CD137 con un valor de CE_{50} de 18 nM o inferior, y/o

10 (iii) en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, es preferiblemente capaz de inducir una mayor concentración de IL-2, y/o

15 (iv) en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, preferiblemente no conduce a una mayor concentración de IL-2, y/o

(v) en comparación con el control negativo de SEQ ID NO: 4, es preferiblemente capaz de inducir una mayor proliferación de IL-2 e IFN- γ .

20 6. La muteína según la reivindicación 5, en donde la muteína no interfiere con la unión de CD137L a CD137.

7. La muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 y 6, en donde la muteína tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20, o en donde la muteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-20.

25 8. La muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 y 6, que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 13.

30 9. La muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la muteína se conjuga con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula orgánica, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador coloreado, un marcador fluorescente, un marcador cromogénico, un marcador luminiscente, un hapteno, digoxigenina, biotina, un agente citostático, una toxina, un complejo de metal, un metal, y oro coloidal, y/o

35 en donde la muteína se fusiona en su extremo terminal N y/o su extremo terminal C con un compañero de fusión que es una proteína, un dominio de proteína, o un péptido, y/o

40 en donde la muteína se conjuga con un compuesto que extiende la semivida en suero de la muteína, seleccionado del grupo que consiste en una molécula de polialquilenglicol, una molécula de polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón, una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, y una proteína de unión a albúmina.

45 10. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una muteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 10.

50 12. Un método de producción de una muteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la muteína se produce a partir del ácido nucleico que codifica la muteína por medio de métodos de modificación mediante ingeniería genética, en donde la muteína se produce en un organismo huésped bacteriano o eucariota y luego se aísla de este organismo huésped o su cultivo, o en donde la muteína se produce *in vitro*, opcionalmente mediante el uso de un sistema de traducción *in vitro*.

55 13. Una o más muteína(s) de lipocalina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s) para su uso en terapia.

60 14. La una o más muteína(s) de lipocalina o una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s) para el uso según la reivindicación 13, en donde el uso comprende

(i) unión de CD137, que comprende aplicar la una o más muteína(s) de lipocalina o la una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s),

65 (ii) activación de las rutas de señalización en sentido 3' de CD137, que comprende aplicar la una o más muteína(s) de lipocalina o la una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s),

(iii) inducción de la proliferación de linfocitos T, que comprende aplicar la una o más muteína(s) de lipocalina o la una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s),

5 (iv) interferencia con la unión de CD137L a CD137, que comprende aplicar la una o más muteína(s) de lipocalina o la una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s),

10 (v) reducción de la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que comprende aplicar la una o más muteína(s) de lipocalina o la una o más composición/composiciones que comprende(n) tal(es) muteína(s), o

(vi) tratamiento de cáncer, una enfermedad infecciosa, o una enfermedad autoinmunitaria.

15. Una composición farmacéutica que comprende la muteína de lipocalina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

15

Figura 1

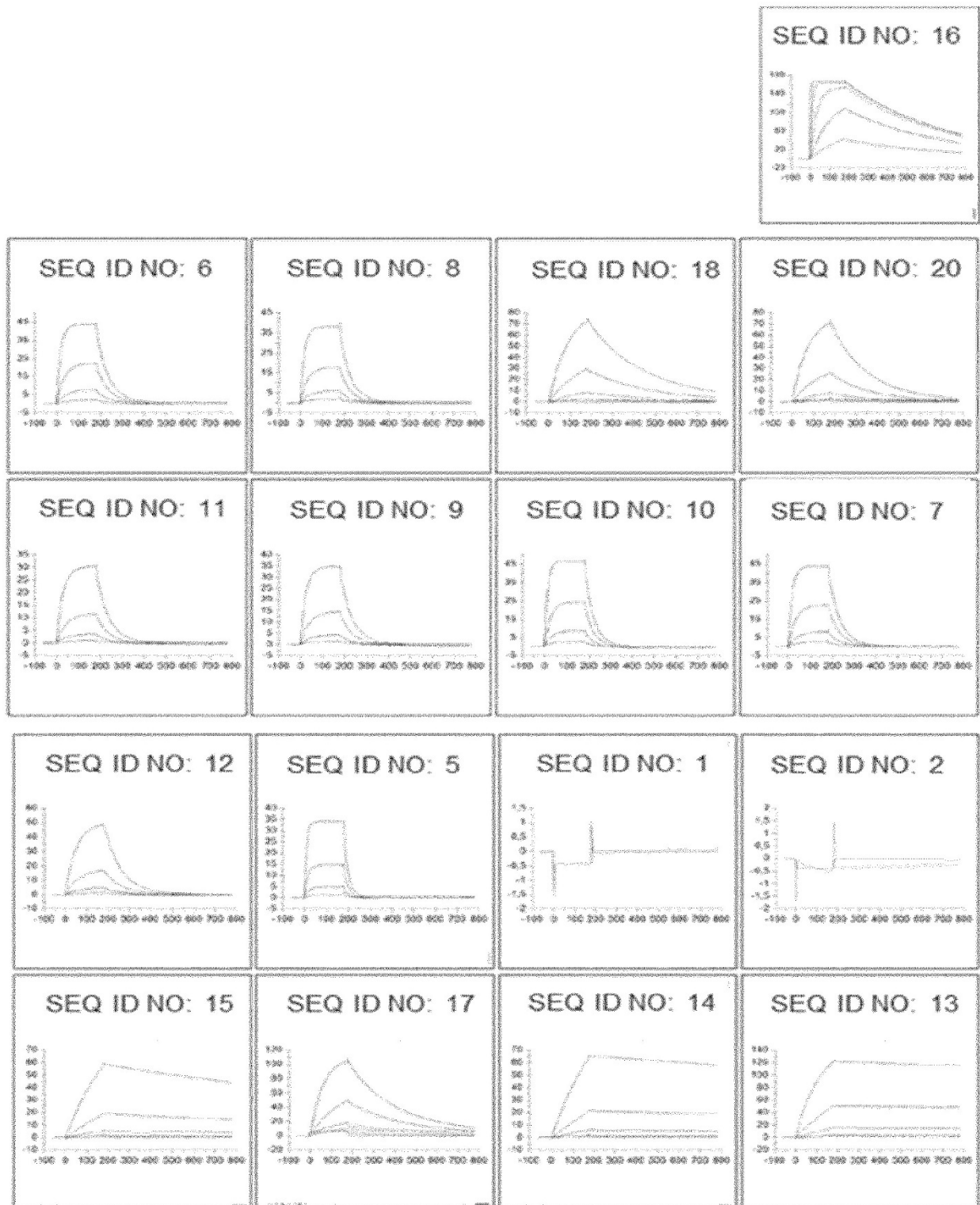


Figura 2

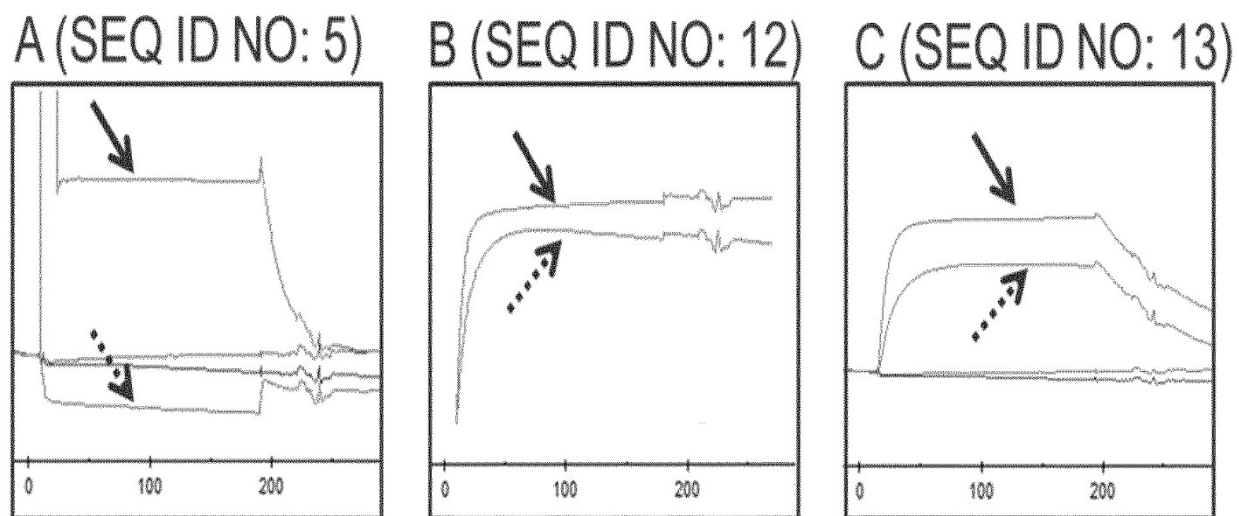


Figura 3

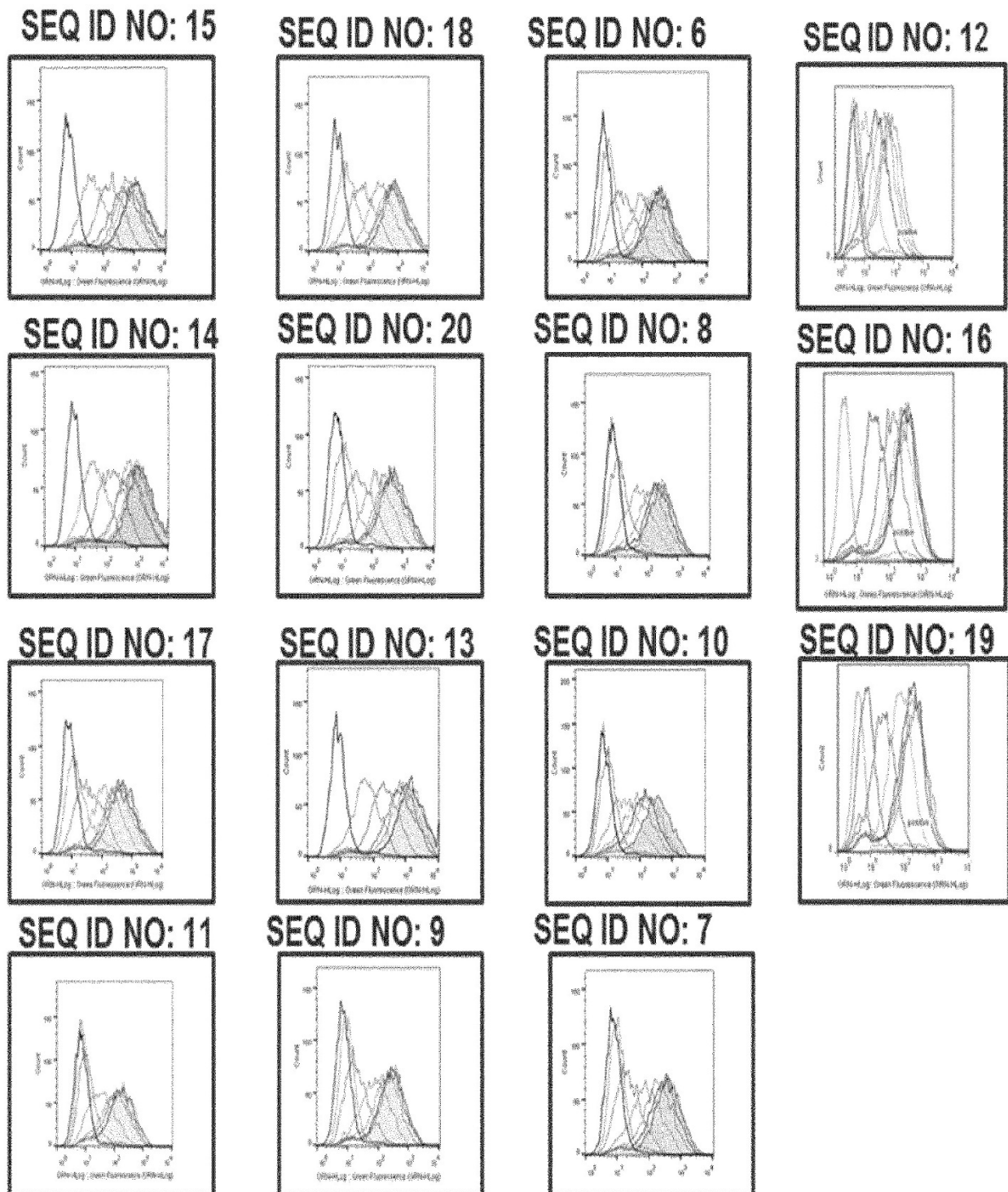


Figura 4

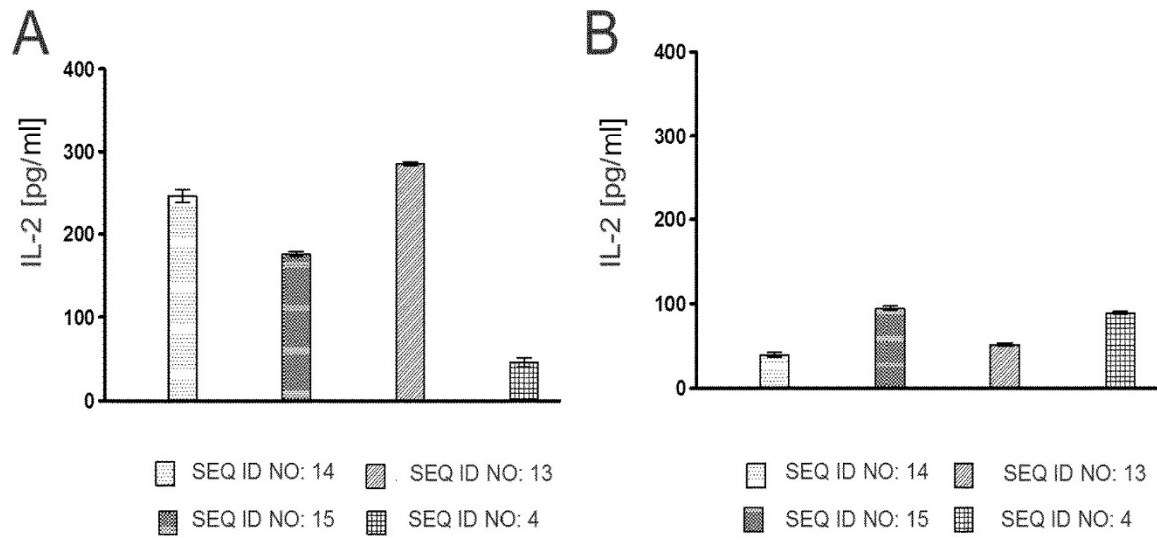


Figura 5

