



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0105609  
(43) 공개일자 2017년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
<i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>A61K 38/00</i> (2006.01)	피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하
<i>C07K 14/515</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01)	독일 프라이징 85354, 리제마이트너 스트라세 30
(52) CPC특허분류	(72) 발명자
<i>C07K 14/47</i> (2013.01)	벨 아이바, 라치다 시함
<i>A61K 38/00</i> (2013.01)	독일 뮌헨 80469 에르하르트슈트라쎄 15
(21) 출원번호 10-2017-7023448	알러스도르퍼, 안드레아
(22) 출원일자(국제) 2016년01월27일	독일 보른차흐 85283 모짜르트슈트라쎄 20에이
심사청구일자 없음	(뒷면에 계속)
(85) 번역문제출일자 2017년08월23일	(74) 대리인
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/051657	특허법인인나
(87) 국제공개번호 WO 2016/120307	
국제공개일자 2016년08월04일	
(30) 우선권주장	
15152826.2 2015년01월28일	
유럽특허청(EPO)(EP)	

전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 신생혈관형성에 특이적인 신규한 단백질

### (57) 요 약

본 개시내용은 Ang-2에 결합하고, 예를 들어 신생혈관형성을 저해 또는 감소시키기 위한 약제학적 적용분야를 포함하는 다양한 적용분야에서 사용될 수 있는 hNGAL 뮤테인을 제공한다. 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 1종 이상의 뮤테인의 제조 방법뿐만 아니라 1종 이상의 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 및 조합물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 이러한 뮤테인을 암호화하는 핵산 및 이러한 뮤테인 및 핵산 분자의 생성 방법에 관한 것이다. 추가로, 본 적용분야는 이들 뮤테인의 치료적 및/또는 진단적 용도뿐만 아니라 1종 이상의 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 및 조합물을 개시한다.

(52) CPC특허분류  
*C07K 14/515* (2013.01)  
*G01N 33/6893* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)  
*C07K 2319/30* (2013.01)  
*C07K 2319/31* (2013.01)  
*G01N 2333/515* (2013.01)

(72) 발명자

**비에텐만, 알렉산더**

독일 울름 89077 뤼르스테네커슈트라쎄 5

**로스, 크리스틴**

독일 다하우 85221 하인리히-니콜라우스-슈트라쎄  
26

**올월, 셰인**

독일 프라이징 85354 암 발드랜드 23에이

**길레 헨드릭**

독일 베를린 14057 레오날드슈트라쎄 7

**오돌리 로랑**

프랑스 툴루즈 31562 에비뉴 허버트 큐리안 3 피어  
레 파브레 리서치 앤드 디벨롭먼트 센터 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있는, 인간 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린(human neutrophil gelatinase associated lipocalin: hNGAL) 뮤테인.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 6에 기재된 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance: SPR) 기반 분석에서 비아코어(Biacore) T200 기기에 의해 측정할 때 약 5nM 이하의  $K_D$ 로 Ang-2에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 4에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 EC50 값으로 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 5에 기재된 경쟁 ELISA 형식 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 IC50 값에 의해 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 9에 기재된 세포 기반 증식 분석에서 약 5nM 이하의 IC50 값으로 Ang-2에 의해 매개된 림프 미세혈관 내피세포 증식을 저해 또는 감소시킬 수 있는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뮤테인은 성숙 hNGAL의 서열번호 16의 선형 폴리펩타이드 서열의 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 상기 성숙 hNGAL의 상기 선형 폴리펩타이드 서열의 위치 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 더 포함하는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인의 상기 아미노산 서열은 상기 성숙 hNGAL의 상기 선형 폴리펩타이드 서열에 비해 다음의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함하는, hNGAL 뮤테인: Leu 36→ Gln, Glu, His, Val, Met 또는 Phe; Ala 40→ Val, Tyr, His 또는 Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp 또는 Val; Gln 49→ Gly, Ile, Val, Glu 또는 Val; Tyr 52→ Trp, His, Thr 또는 Ser; Ser 68→ Gly, Asp, Gln, Glu 또는 Ile; Leu 70→ Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr 또는 Ala; Arg 72→ Gly, Ala, Trp, Thr 또는 Glu; Lys 73→ Pro, Phe, Leu, Arg, Ala 또는 Gln; Asp 77→ Asn, Lys, Ser 또는 Val; Trp 79→ Thr, Arg, Ser 또는 Asn; Arg 81→ Trp, His 또는 Tyr; Asn 96→ Gly, Ala, Pro, Gln 또는 Asp; Tyr 100→ Pro, Trp, Gly, Ser, Leu 또는 Asp; Leu 103→ Gly, Glu, Aso, Met 또는 Gln; Tyr 106→ Thr, Leu 또는 Phe; Lys 125→ His, Thr 또는 Gly; Ser 127→ Leu 또는 Met; Tyr 132→ Phe, Trp 또는 Val; 및 Lys 134→ Ala, Glu 또는 Trp.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인의 상기 아미노산 서열은 상기 성숙 hNGAL의 상기

선형 폴리펩타이드 서열에 비해 다음의 치환을 포함하는, hNGAL 뮤테인: Gln 28→ His; Asn 65→ Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87→ Ser; Asn 116→ Asp; Val 126→ Met 및 Asn 129→ Asp.

#### 청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 상기 성숙 hNGAL의 상기 서열번호 16의 선형 폴리펩타이드 서열의 서열 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는, hNGAL 뮤테인.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 상기 성숙 hNGAL의 상기 선형 폴리펩타이드 서열에 비해 다음의 아미노산 치환의 세트 중 하나를 포함하는, hNGAL 뮤테인:

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

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

- (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;
- (m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala; 또는
- (n) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Asp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala.

### 청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 서열번호 1 내지 14 및 이들의 기능성 단편 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 고친화도로 Ang-1에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 7에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 150nM 이하의 IC50 값으로서 측정된 친화도로 Ang-1에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 15

제1항 또는 제13항에 있어서, 상기 뮤테인은 인간 Ang-2와 마우스 Ang-2 둘 다와 교차 반응성인, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 7에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 IC50 값으로서 측정된 친화도로 마우스 Ang-2에 결합할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 뮤테인은 본질적으로 실시예 8에 기재된 경쟁 세포 ECL 형식에서 각각 약 25nM 이하의 IC50 값으로 hTie-2에 대한 인간 Ang-2 및 mTie-2m에 대한 마우스 Ang-2의 결합을 차단할 수 있는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 뮤테인은 상기 성숙 hNGAL의 상기 서열번호 16의 선형 폴리펩타이드 서열의 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는, hNGAL 뮤테인.

### 청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 서열번호 1 내지 14로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및 이들의 기능성 단편 또는 변이체를 포함하는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 야생형 hNGAL의 하나 이상의 아미노산을 치환하는 하나 이상의 비천연 시스테인 잔기를 포함하는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 천연 시스테인 잔기의 다른 아미노산에 의한 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 다른 아미노산은 세린 잔기인, hNGAL 뮤테인.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 유기 분자, 효소 표지, 방사성 표지, 촉색 표지, 형광 표지, 색원체 표지, 발광 표지, 합텐, 디옥시게닌, 바이오틴, 세포정지제, 독소, 금속 복합체, 금속 및 콜로이드금으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물에 컨쥬게이팅되는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 24**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 이의 C-말단에서 단백질, 또는 단백질 도메인 또는 웨타이드인 용합 상대에 용합되는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 25**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인은 상기 폴리펩타이드의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물에 컨쥬게이팅되는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 혈청 반감기를 연장시키는 상기 화합물은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸전분, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 웨타이드, 및 알부민 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는, hNGAL 뮤테인.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌(PEG) 또는 이의 활성화된 유도체인, hNGAL 뮤테인.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 핵산 분자의 발현을 허용하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된, 핵산 분자.

**청구항 30**

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 핵산 분자는 벡터 내에 또는 파지미드 벡터 내에 포함되는, 핵산 분자.

**청구항 31**

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포.

**청구항 32**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인을 생성하는 방법으로서, 상기 폴리펩타이드는 유전자 공학처리 방법에 의해 상기 폴리펩타이드에 대한 핵산 암호화로부터 시작해서 생성되는, hNGAL 뮤테인을 생성하는 방

법.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체에서 생성되고, 이 숙주 유기체 또는 이의 배양물로부터 단리되는, hNGAL 뮤테인을 생성하는 방법.

### 청구항 34

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인을 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 35

제26항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 1종의 약제학적으로 허용 가능한 보조제, 희석제 또는 담체를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

### 청구항 36

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 hNGAL 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트.

### 청구항 37

샘플 내 Ang-2의 검출 및/또는 측정을 위한 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 hNGAL 뮤테인의 용도.

### 청구항 38

적어도 (a) 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 hNGAL 뮤테인 및 (b) 항신생혈관제의 조합물.

### 청구항 39

제38항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인 및 상기 항신생혈관제는 동시에, 수반되어 또는 연속해서를 포함하여, 병용해서 투여되는, 조합물.

### 청구항 40

제38항에 있어서, 상기 hNGAL 뮤테인 및 상기 항신생혈관제는 독립적 시점에 개개 간격을 포함하여 서로 독립적으로 투여되는, 조합물.

### 청구항 41

제38항에 있어서, 상기 조합물은 단일 조성물에 포함되는, 조합물.

### 청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항신생혈관제는 (i) Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 및/또는 Tie-2의 길항제; (ii) Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF 및/또는 EG-VEGF의 길항제; (iii) 엘타 유사 리간드 4(DLL4, 혈관 특이적 노치(Notch) 리간드) 길항제, (iv) 표피성장인자 수용체(EGFR) 길항제 및 (v) 사이토카인 저해제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조합물.

### 청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항신생혈관제는 VEGF 저해제인, 조합물.

### 청구항 44

제33항에 있어서, 상기 VEGF 저해제는 VEGF-Trap, 베바시주맙(아바스틴(Avastin®)), 소라페닙(넥사바르(Nexavar®)), 수니티닙(수텐트(Sutent®)) 및 파조파닙(보트리엔트(Votrient®))으로 이루어진 군으로부터 선택된, 조합물.

### 청구항 45

제44항에 있어서, 상기 VEGF 저해제는 VEGF-A의 길항제 및/또는 VEGF-C의 길항제인, 조합물.

**청구항 46**

제38항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조합물은 추가적인 항신생혈관제를 더 포함하는, 조합물.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 제1 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 상기 제2 항신생혈관제는 VEGF-C 길항제인, 조합물.

**청구항 48**

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEGF-A의 길항제는 항-VEGF-A 항체 또는 VEGF-A에 특이적으로 결합하는 리포칼린 뮤테인인, 조합물.

**청구항 49**

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VEGF-C의 길항제는 항-VEGF-C 항체 또는 VEGF-C에 특이적으로 결합하는 리포칼린 뮤테인인, 조합물.

**청구항 50**

통제되지 않는(deregulated) 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 개선에 적합한 약제학적 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물의 용도.

**청구항 51**

대상체에서 Ang-2에 결합하는 방법으로서, 상기 대상체에 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 내지 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 Ang-2에 결합하는 방법.

**청구항 52**

대상체에서 신생혈관형성을 저해하는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 신생혈관형성을 저해하는 방법.

**청구항 53**

대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선시키는 방법.

**청구항 54**

대상체에서 Ang-2의 결합을 위한 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제48항 중 어느 한 항의 조합물의 용도.

**청구항 55**

대상체에서 신생혈관형성을 저해하기 위한, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물의 용도.

**청구항 56**

통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 개선을 위한, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성물 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물의 용도.

## 청구항 57

제53항 또는 제56항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 종양 성장, 눈 장애, 혈관 질환, 염증성 또는 감염성 질환, 암, 눈의 신혈관화 질환, 관절염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법 또는 용도.

## 청구항 58

대상체에서 신생혈관형성을 저해 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 hNGAL 뮤테인 또는 제34항 또는 제35항의 조성을 또는 제38항 내지 제49항 중 어느 한 항의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 신생혈관형성을 저해 또는 감소시키는 방법.

## 발명의 설명

### 배경기술

[0001]

기준의 혈관으로부터의 새로운 혈관의 형성인 신생혈관형성은 다수의 생리적 및 병리적 과정에 필수적이다. 정상적으로는, 신생혈관형성은 신생혈관 유발 및 항-신생혈관 인자에 의해 억제하게 조절되지만, 암, 눈의 신혈관화 질환, 관절염, 및 건선과 같은 질환의 경우에 과정은 예측에서 벗어난다. 문헌[Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995)]. 통제되지 않는(deregulated) 또는 원치않는 신생혈관형성과 관련되는 것으로 알려진 다수의 질환이 있다. 이러한 질환은 눈의 신혈관화, 예컨대 망막병증(당뇨망막병증을 포함), 노인성 황반변성, 건선, 혈관아세포종, 혈관종, 동맥경화증, 염증성 질환, 예컨대 류마티스성 또는 류마티스 염증성 질환, 특히 관절염(류마티스성 관절염을 포함), 또는 다른 만성 염증성 장애, 예컨대 만성 천식, 동맥 또는 이식후 아테로스clerosis 동맥경화증, 자궁내막증 및 신생물 질환, 예를 들어 소위 고형 종양 및 액체(또는 조혈) 종양(예컨대, 백혈병 및 럼프종)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 원치않는 신생혈관형성과 관련된 다른 질환은 당업자에게 분명할 것이다.

[0002]

다수의 신호 형질도입 시스템이 신생혈관형성의 조절에 연루되었지만, 가장 잘 특성 규명되고 가장 내피세포-선택적인 시스템 중 하나는 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현되는 Tie-2 수용체 타이로신 키나제("Tie-2" 또는 "Tie-2R"로서 지칭됨(또한 "ORK"로서 지칭됨); 뮤린 Tie-2는 또한 "tek"로서 지칭됨) 및 그의 리간드, 안지오포이에틴을 수반한다(Yancopoulos, G. D., et al., Nature 407 [2000] 242-48; Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13:1055-1066 [1999]).

[0003]

4가지의 공지된 안지오포이에틴; 안지오포이에틴-1("Ang-1", 대안적으로 ANGPT1 또는 Ang1로 약칭됨) 내지 안지오포이에틴-4("Ang-4")가 있다. 이들 안지오포이에틴은 또한 "Tie-2 리간드"로서 지칭됨(Davis, S., et al., Cell, § 7:1161-1169 [1996]; Grosios, K., et al, Cytogenet Cell Genet, § 4:118-120 [1999]; Holash, J., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1611 -1625 [1999]; Koblizek, T. I., et al, Current Biology, S:529-532 [1998]; Lin, P., et al, Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C, et al, Science, 277:55-60 [1997]; Papapetropoulos, A., et al, Lab Invest, 79:213-223 [1999]; Sato, T. N., et al, Nature, 375:70-74 [1998]; Shyu, K. G., et al, Circulation, 95:2081-2087 [1998]; Suri, C, et al, Cell, 07:1171-1180 [1996]; Suri, C, et al, Science, 252:468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96:1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., et al, J Biol Chem, 273:18514-18521 [1998]).

[0004]

Ang-1과 -2는 둘 다 3nM(Kd)의 친화도로 Tie-2에 결합한다(Maisonpierre, P. C, et al., Science 277 (1997) 55-60). Tie-2에 대한 Ang-1의 결합은 배양 내피세포에서 수용체 인산화반응을 자극하지만, Ang-2는 Tie-2 수용체 인산화반응을 작용화하고 길항하는 것으로 관찰되었다(문헌[Davis, S., et al, [1996], 상기 참조; Maisonpierre, P.C., et al, [1997], 상기 참조; Kim, I, J.H. Kim, et al, Oncogene 19(39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al, Cardiovascular Research 49(3): 659-70 (2001)]). 마우스 Tie-2 및 Ang-1 네아웃의 표현형은 유사한데, 이는 Ang-1-자극된 Tie-2 인산화반응이 내피세포-지지체 세포 접착의 유지를 통해 자궁 내 혈관 발생의 리모델링 및 안정화를 매개한다는 것을 시사한다(Dumont, D. J., et al, Genes & Development, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., et al, Nature, 376:10-14 [1995]; Suri, C, et al, [1996], 상기 참조). 혈관 안정화에서 Ang-1의 역할은 그것이 광범위하게 구성적으로 발현되는 성인에서 전환될 것으로 생각된다(Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997]; Zagzag, D., et al,

Experimental Neurology, 59:391-400 [1999]). 대조적으로, Ang-2 발현은 Ang-1 기능을 차단하여, 신생혈관 형성에 좋은 혈관 가소성(vascular plasticity) 상태를 유도하는 것으로 생각되는 혈관 리모델링 부위로 주로 제한된다(Hanahan, D., [1997], 상기 참조; Holash, J., et al, Science, 284:1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., et al, [1997], 상기 참조).

[0005] 인간 안지오포이에틴-2(Ang-2(대안적으로 ANGPT2 또는 Ang2로 약칭됨))는 문헌[Maisonpierre, P. C., et al., Science 277 (1997) 55-60 및 Cheung, A. H., et al, Genomics 48 (1998) 389-91]에 기재되어 있다. 수많은 공개된 연구는 알려진 바로는 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 상태에서 혈관-선택적 Ang-2 발현을 입증하였다(Bunone, G., et al, American Journal of Pathology, 155:1961 -1916 [1999]; Etoh, T., et al, Cancer Research, 67:2145-2153 [2001]; Hangai, M., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1611-1625 [2001]; Holash, J., et al, [1999] 상기 참조; Kuroda, K., et al, Journal of Investigative Dermatology, 116:113-120 [2001]; Otani, A., et al, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., et al, American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 [1998]; Tanaka, S., et al, J Clin Invest, 203:34-345 [1999]; Yoshida, Y., et al, International Journal of Oncology, 25:1221-1225 [1999]; Yuan, K., et al, Journal of Periodontal Research, 35:165-171 [2000]; Zagzag, D., et al, [1999] 상기 참조). 효과적인 항-Ang-2 요법은 암, 망막병증, 관절염 및 건선과 관련된 신생혈관형성-관련 질환을 지니는 방대한 집단의 환자에 대해 유익할 것이다.

[0006] 따라서 Ang-2를 특이적으로 인식하고 결합하는 새로운 화합물을 동정할 큰 필요가 있다. 이러한 화합물은 Ang-2 활성과 관련된 질환 상태에서 진단적 선별 및 치료적 개입에 유용하다. 따라서, 본 개시내용의 목적은 Ang-2 활성을 조절하기 위한 Ang-2의 특이적 결합 화합물을 제공하는 것이다. 본 명세서에 개시된 이러한 화합물은 인간 리포칼린 2로부터 유도된 뮤테인의 형태를 취한다(또한 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린, "hNGAL"로서 알려짐).

## 발명의 내용

### II. 정의

[0008] 다음의 목록은 본 명세서 전체적으로 사용되는 용어, 어구 및 약어를 정의한다. 본 명세서에 열거되고 정의된 모든 용어는 모든 문법적 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0009] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "Ang-1"은 비-인간 종(예를 들어, "마우스 Ang-1", "원숭이 Ang-1" 등)으로부터 구체화되지 않는 한, 스위스 프롯(Swiss Prot) Q15389 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편(예를 들어, 시험관내 또는 생체내 신생혈관형성을 유도할 수 있는 Ang-1 단백질의 단편)에 의해 정해지는 전장 단백질인 인간 Ang-1을 의미한다.

[0010] 비-인간 종(예를 들어, "마우스 Ang-2," "원숭이 Ang-2" 등)으로부터 유래된 것으로 구체화되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "Ang-2"는 스위스 프롯 015123으로 나타내는 전장 단백질인 인간 Ang-2(또한, 미국 특허 제6,166,185호의 도 6 참조; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨) 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편(예를 들어, 시험관내 또는 생체내 신생혈관형성을 유도할 수 있는 Ang-2 단백질의 단편)을 의미한다.

[0011] 비-인간 종(예를 들어, "마우스 Tie-2," "원숭이 Tie-2" 등)으로부터 유래된 것으로 구체화되지 않는 한, 용어 "Tie-2"(또한 당업계에서 "tek"로서 지칭됨)는 인간 Tie-2 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편을 지칭한다. 인간 Tie-2는 수탁번호 AAA61130 하에서 NCBI 단백질 서열 데이터베이스에서 제시한 바와 같은 아미노산 서열을 가진다.

[0012] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "검출 가능한 친화도"는 일반적으로 적어도 약  $10^{-5}$  M 이하의 친화상수로 선택된 표적에 결합하는 능력을 의미한다. 더 낮은 친화도는 ELISA와 같은 통상적인 방법에 의해 더 이상 측정 가능하지 않으며, 따라서 2차적 중요성을 가진다.

[0013] 선택된 표적(본 경우에, Ang-1 또는 Ang-2)에 대해 개시내용의 단백질(예를 들어, 인간 리포칼린 2의 뮤테인)의, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "결합 친화도"는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(이에 의해 뮤테인-리간드 복합체의 KD 값이 결정될 수 있다). 이러한 방법은 형광 적정, 직접적 ELISA, 경쟁 ELISA, 열량 측정 방법, 예컨대 등온적정형 열량계(ITC), 및 표면 플라즈몬 공명(비아코어(BIAcore))을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 방법은 당업계에 잘 확립되어 있으며, 이의 실시예를 또한 이하에 상술한다.

- [0014] 각각의 결합체와 그의 리간드 사이의 복합체 형성은 다수의 상이한 인자, 예컨대 각각의 결합 상태의 농도, 경쟁자의 존재, 사용되는 완충제 시스템의 pH 및 이온 강도, 및 해리 상수  $K_D$ 의 결정을 위해 사용되는 실험적 방법(예를 들어, 단지 몇 가지 예로 형광 적정, 직접적 ELISA, 경쟁 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명) 또는 심지어 실험 데이터의 평가를 위해 사용한 수학적 알고리즘에 의해 영향 받는다는 것이 주목된다.
- [0015] 따라서, 또한  $K_D$  값(각각의 결합체와 그의 표적 리간드 사이에 형성된 복합체의 해리 상수)은 주어진 리간드에 대한 특정 뮤테인의 친화도를 결정하기 위해 사용한 방법 및 실험 설정에 따라서, 특정 실험 범위 내에서 다를 수 있다는 것은 당업자에게 분명하다. 이는, 예를 들어,  $K_D$  값이 표면 플라즈몬 공명(비아코어)에 의해, 경쟁 ELISA에 의해, 또는 "직접적 ELISA"에 의해 결정되었는지의 여부에 따라서 측정된  $K_D$  값 또는 허용 범위에서 약간의 편차가 있을 수 있다는 것을 의미한다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 본 개시내용의 화합물, 예컨대 뮤테인이 표적(예를 들어, Ang-1 또는 Ang-2)에 "특이적으로 결합하거나" 또는 결합 특이성이 절대 특성은 아니지만, 상대적 특성이기 때문에, 그것이 표적화 하나 이상의 기준 표적 간을 구별할 수 있다면 표적에 대해 "결합 특이성"을 가진다. "특이적 결합"은, 예를 들어, 웨스턴 블로트, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-시험, IHC 및 웹타이드 스캔에 따라 결정될 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 리포칼린 2" 또는 "인간 Lcn 2" 또는 "인간 NGAL" 또는 "hNGAL"은 스위스 프롯/유니프롯(UniProt) 데이터 뱅크 수탁 번호 P80188에 의한 성숙 인간 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린(NGAL)을 지칭한다. 본 개시내용의 인간 리포칼린 2 뮤테인은 또한 본 명세서에서 "hNGAL 뮤테인"으로서 표기된다. 스위스 프롯/유니프롯 데이터 뱅크 수탁 번호 P80188에 나타내는 아미노산 서열은 바람직한 "기준 서열"로서 사용될 수 있고, 더 바람직하게는 서열번호 16에 나타낸 아미노산 서열은 기준 서열로서 사용된다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "뮤테인", "돌연변이된" 독립체(단백질이든 핵산이든 ), 또는 "돌연변이체"는 천연 유래(야생형) 핵산 또는 단백질 "기준" 스캐폴드에 비해 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "뮤테인"은 또한 그의 기능성 단편 또는 변이체를 포함한다. 본 개시내용에 기재된 특정 뮤테인의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 예를 들어, 검출 가능한 또는 훨씬 더 높은 친화도로 Ang-1 또는 Ang-2에 대한 결합 기능을 보유하고, 이러한 단편 또는 변이체는 본 명세서에 개시된 기준 뮤테인의 "기능성 단편 또는 변이체"이다.
- [0019] 본 개시내용의 뮤테인과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "단편"은 N-말단 및/또는 C-말단이 단축된, 즉, N-말단 및/또는 C-말단의 아미노산의 적어도 하나가 없는 전장 성숙 인간 리포칼린 2로부터 유래된 단백질 또는 웹타이드에 관한 것이다. 이러한 단편은 성숙 인간 리포칼린 2의 1차 서열의 적어도 10개 이상, 예컨대 20 또는 30개 또는 더 연속적인 아미노산을 포함할 수 있고, 보통 성숙 인간 리포칼린 2의 면역분석에서 검출 가능하다.
- [0020] 일반적으로, 본 개시내용의 뮤테인의 또는 본 개시내용에 따른 조합물의 대응하는 단백질 리간드에 대해 본 명세서에서 사용되는 용어 "단편"은 본 개시내용에 따른 뮤테인에 의해 인식되고/되거나 결합될 전장 리간드의 능력을 보유하는 N-말단 및/또는 C-말단이 단축된 단백질 또는 웹타이드 리간드에 관한 것이다.
- [0021] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "돌연변이유발"은 성숙 인간 리포칼린 2의 주어진 서열 위치에서 천연 유래 아미노산이 각각의 천연 폴리펩타이드 서열 내 이 특정 위치에 존재하지 않는 적어도 1종의 아미노산으로 치환될 수 있도록 실험 조건이 선택된다는 것을 의미한다. 용어 "돌연변이유발"은 또한 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 삽입에 의한 서열 세그먼트 길이의 (추가적인) 변형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 선택된 서열 위치에서 하나의 아미노산은 3개의 무작위 돌연변이의 신장에 의해 대체되어, 야생형 단백질의 각각의 세그먼트 길이에 비해 2개의 아미노산 잔기의 삽입을 야기한다는 것은 본 개시내용 범주 내이다. 이러한 삽입 또는 결실은 본 개시내용에서 돌연변이 유발이 실시될 수 있는 임의의 웹타이드 세그먼트에서 서로 독립적으로 도입될 수 있다.
- [0022] 용어 "무작위 돌연변이유발"은 사전 결정된 단일 아미노산(돌연변이)이 특정 서열 위치에서 존재하지만, 적어도 2개의 아미노산이 돌연변이 유발 동안 사전 결정된 서열 위치에서 특정 확률로 도입될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0023] "동일성"은 서열의 유사성 또는 관계를 측정하는 서열의 특성이다. 본 개시내용에서 사용되는 바와 같은 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 당해 서열을 갖는 본 개시내용의 폴리펩타이드의 서열의 (상동성) 정렬 후에 (이들 두 서열의 더 긴 것에서의 잔기 수에 대해) 쌍별로 동일한 잔기의 백분율을 의미한다. 서열 동일성은 동

일한 아미노산 잔기의 수를 잔기의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 측정한다.

[0024] 용어 "상동성"은 본 명세서에서 그의 보통의 의미로 사용되며, 동일한 아미노산뿐만 아니라 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 본 개시내용의 임의의 뮤테인)의 선형 아미노산 서열 내 동등한 위치에서 보존적 치환(예를 들어, 글루타메이트 잔기의 아스파테이트 잔기에 의한 교환)으로 간주되는 아미노산을 포함한다.

[0025] 서열 상동성 또는 서열 동일성 백분율은, 예를 들어, 프로그램 BLASTP, 버전 blastp 2.2.5(문헌[November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402])를 이용하여 본 명세서에서 결정할 수 있다. 본 실시형태에서, 상동성 백분율은 바람직하게는 쌍별 비교에서 기준으로서 바람직하게는 야생형 단백질 스캐폴드를 이용하여 프로펩타이드 서열을 포함하는 전체 폴리펩타이드 서열의 정렬에 기반한다(매트릭스: BLOSUM 62; 캡 코스트: 11.1; 컷 오프 값은  $10^{-3}$ 으로 설정). 이는 BLASTP 프로그램 산출물에서의 결과로서 표시한 "양성" (상동성 아미노산)의 수를 정렬을 위한 프로그램에서 선택된 아미노산의 총 수로 나눈 백분율로서 계산된다.

[0026] 구체적으로, 야생형 인간 리포칼린 2와 상이한 뮤테인의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열에서 특정 위치에 대응하는지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 당업계에 잘 공지된 수단 및 방법, 예를 들어, 수동으로 또는 컴퓨터 프로그램, 예컨대, 기본적 국소 정렬 검색 툴(Basic Local Alignment Search Tool)을 나타내는 BLAST2.0 또는 클러스털W(ClustalW) 또는 서열 정렬을 생성하는 데 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램을 이용하는 것에 의한 정렬을 사용할 수 있다. 따라서, 야생형 인간 리포칼린 2는 "대상 서열" 또는 "기준 서열"로서 작용할 수 있는 반면, 본 명세서에 기재된 야생형 인간 리포칼린 2와 상이한 뮤테인의 아미노산 서열은 "질의 서열"로서 작용한다. 용어 "기준 서열" 및 "야생형 서열은" 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0027] "캡"은 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 정렬에서의 간격이다. 따라서, 정확하게 동일한 서열의 두 복제물은 100% 동일성을 갖지만, 덜 고도로 보존되고, 결실, 첨가 또는 대체를 갖는 서열은 낮은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다. 당업자는 몇몇 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 Blast(Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), 및 스미스-워터만(Smith-Waterman)(Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197)이 표준 매개변수를 이용하여 서열 동일성을 결정하는 데 이용 가능하다는 것을 인식할 것이다.

[0028] 본 개시내용에서 사용되는 바와 같은 용어 "변이체"는 아미노산 서열의 변형, 예를 들어 치환, 결실, 삽입 또는 화학적 변형을 포함하는 단백질 또는 웨بت이드의 유도체에 관한 것이다. 이러한 변형은 일부 실시형태에서 단백질 또는 웨بت이드의 작용기를 감소시키지 않는다. 이러한 변이체는 단백질을 포함하되, 하나 이상의 아미노산은 그들 각각의 D-인체이성질체에 의해 또는 천연 유래 20종의 아미노산, 예를 들어, 오르니틴, 하이드록시프롤린, 시트룰린, 호모세린, 하이드록시라이신, 노르발린 이외의 아미노산에 의해 대체되었다. 그러나, 이러한 치환은 또한 보존적일 수 있으며, 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환의 예는 다음의 그룹의 구성원 중에서의 대체이다: 1) 알라닌, 세린, 및 트레오닌; 2) 아스파트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 아이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판.

[0029] "천연 서열" 인간 리포칼린 2는 천연으로부터 유래된 대응하는 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 리포칼린 2를 의미한다. 따라서, 천연 서열 인간 리포칼린 2는 각각의 천연 유래 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 천연 서열 폴리펩타이드는 천연으로부터 단리될 수 있거나 또는 재조합체 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열" 폴리펩타이드는 구체적으로는 인간 리포칼린 2의 천연 유래 절단 또는 분비 형태, 인간 리포칼린 2의 천연 유래 변이체 형태, 예컨대 대안적으로 스플라이싱된 형태 및 천연 유래 대립유전자 변이체를 포함한다. 폴리펩타이드 "변이체"는 천연 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적으로 활성인 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 변이체는, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 N- 또는 C-말단에서 첨가되거나 또는 결실되는 폴리펩타이드를 포함한다. 일반적으로 변이체는 천연 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 70%, 예를 들어 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성, 예를 들어 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 약 95% 아미노산 서열 동일성을 가진다.

[0030] 본 개시내용에 따라 사용될 때 용어 "위치"는 본 명세서에 도시된 아미노산 서열 내의 아미노산의 위치 또는 본 명세서에 도시된 핵산 서열 내의 뉴클레오타이드 위치를 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 하나 이상의 뮤테인의 아미노산 서열 위치와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "대응한다" 또는 "대응

하는"을 이해하기 위해, 대응하는 위치는 선행하는 뉴클레오타이드/아미노산의 수에 의해서만 결정되지는 않는 다. 따라서, 치환될 수 있는 본 개시내용에 따른 주어진 아미노산의 위치는 (돌연변이체 또는 야생형) 인간 리포칼린 2에서 다른 곳에서의 아미노산의 결실 또는 첨가에 기인하여 다를 수 있다. 유사하게, 치환될 수 있는 본 개시내용에 따른 주어진 뉴클레오타이드의 위치는 프로모터 및/또는 임의의 다른 조절 서열 또는 유전자(엑손 및 인트론을 포함)를 포함하는 뮤테인 또는 야생형 인간 리포칼린 2 5'-비번역 영역(UTR)에서 다른 곳에서의 결실 또는 첨가 뉴클레오타이드에 기인하여 다를 수 있다.

[0031] 따라서, 본 개시내용에 따르는 대응하는 위치에 대해, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치는 유사한 이웃하는 뉴클레오타이드/아미노산과 표시된 수가 상이할 수 있지만, 교환, 결실 또는 첨가될 수 있는 상기 이웃하는 뉴클레오타이드/아미노산은 또한 하나 이상의 대응하는 위치에 의해 포함된다는 것을 이해하는 것이 바람직하다.

[0032] 추가로, 본 개시내용에 따른 기준 스캐폴드에 기반한 뮤테인에서 대응하는 위치에 대해, 그들이 표시된 수와 상이하다고 하더라도, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치는 뮤테인 또는 야생형 인간 리포칼린 2에서 다른 곳의 위치에 구조적으로 대응한다는 것이 이해될 것이다.

[0033] 비천연 표적에 대해 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "유기 문자" 또는 "소유기 문자"는 문자량이 100 내지 2000달톤, 바람직하게는 100 내지 1000달톤 범위인, 적어도 2개(그러나 바람직하게는 7 또는 12개 이하의 회전 가능한 탄소 결합)의 탄소 원자를 포함하고, 선택적으로 1 또는 2개의 금속 원자를 포함하는 유기 문자를 나타낸다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 단어 "검출하다", "검출", "검출 가능한" 또는 "검출 가능한"은 정량적 수준과 정성적 수준 둘 다뿐만 아니라 이들의 조합으로 이해된다. 따라서 관심 대상 문자의 정량적, 반정량적 및 정성적 측정을 포함한다.

[0035] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유류, 더 바람직하게는 인간이다. 용어 "포유류"는 본 명세서에서 제한 없이, 단지 몇 개의 예를 들면, 인간, 가축 및 농장 동물 및 동물원 동물, 스포츠 동물, 또는 반려 동물, 예컨대 양, 개, 말, 고양이, 소, 래트, 돼지, 유인원, 예컨대 사이노몰구스 원숭이 등을 포함하는 포유류로서 분류되는 임의의 동물을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 바람직하게는, 본 명세서의 포유류는 인간이다.

[0036] "유효량"은 유리한 또는 목적으로 하는 결과를 달성하기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.

[0037] "샘플"은 임의의 대상체로부터 취한 생물학적 샘플로서 정의된다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 소변, 대변, 정액 또는 조직을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0038] 본 개시내용에 따른 용어 "전이"는 2차 종양이 생기는 환자에서 1차 종양으로부터 다른 곳의 하나 이상의 부위 까지의 암성 세포의 전파를 지칭한다. 암이 전이되었는지의 여부를 결정하기 위한 수단은 당업계에 공지되어 있으며, 뼈 스캔, 흉부 X-선, CAT 스캔, MRI 스캔 및 종양 마커 시험을 포함한다. 용어 "전이의 예방"은 1차 종양 또는 암의 전이가 예방, 지연 또는 감소되고, 따라서 2차 종양의 발생이 예방, 지연 또는 감소된다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 전이, 즉, 폐의 2차 종양은 예방 또는 감소되는데, 이는 폐에 대한 1차 종양으로부터의 암성 세포의 전이적 전파가 예방 또는 감소된다는 것을 의미한다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "암"은 증식성 질환, 예컨대 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐(NSCL) 암, 세기관지폐포 세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁 암, 난소 암, 직장 암, 항문부의 암, 복부암, 위암, 결장 암, 유방암, 자궁암, 나팔관의 암종, 자궁내막 암종, 자궁 경관의 암종, 질의 암종, 위음부의 암종, 호지킨병, 식도의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선암, 부갑상선 암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장 또는 자궁암, 신세포 암종, 신우 암종, 중피종, 간세포성암, 담즙암, 중추 신경계(central nervous system: CNS)의 신생물, 척추축 종양, 뇌줄기 신경교 종, 다형성 신경교아종, 성상세포종, 신경초종, 뇌실막세포종, 수막종, 편평상피암, 뇌하수체 선종 및 유잉 육종(임의의 상기 암의 난치성 형태, 또는 상기 암 중 하나 이상의 조합을 포함함)을 지칭한다.

[0040] 용어 "혈관 질환"은 암, 염증성 질환, 아테롬성 동맥 경화증, 혀혈, 외상, 폐혈증, COPD, 천식, 당뇨병, AMD, 망막병증, 뇌졸중, 비만증, 급성 폐 손상, 출혈, 혈관 누출, 예를 들어, 사이토카인 유도, 알레르기, 그레이브스병, 하시모토 자가면역 갑상선염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 거세포 동맥염, 류마티스 관절염, 전신 홍반 루푸스(SLE), 루푸스 신염, 크론병, 다발성 경화증, 케양성 대장염, 특히, 고형 종양, 안구내 신생혈관 증후군(예컨대, 증식성 망막병증 또는 노인성 황반변성(AMD)), 류마티스성 관절염 및 건선을 포함한다(Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931-10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991)

217-239; 및 Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., 및 Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp 1625-1710).

[0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "항체"는 이황화결합에 의해 상호 연결되는 4개의 폴리펩타이드 쇄, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이들의 다량체(예를 들어, IgM)를 지칭하는 것으로 의도된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 HCVR 또는  $V_H$ 로서 약칭) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉,  $C_H1$ ,  $C_H2$  및  $C_H3$ 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서 LCVR 또는  $V_L$ 로서 약칭) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 ( $C_L1$ )을 포함한다.  $V_H$  및  $V_L$  영역은 추가로 프레임워크 영역(framework regions: FR)으로 칭해지는 더 보존된 영역이 사이에 배치된 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)으로 칭해지는 과변이 영역으로 다시 분할될 수 있다. 각각의  $V_H$  및  $V_L$ 은 다음의 순서로 아미노-말단으로부터 카복시-말단까지 배열되는 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 개시내용의 상이한 실시형태에서, 항-Ang-2 항체의 FR(또는 이의 항원-결합 부분)은 인간 생식계열 서열과 동일할 수 있거나, 또는 천연 또는 인공 변형될 수 있다. 아미노산 공통서열은 2 이상의 CDR의 병렬 분석에 기반하여 나타낼 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "항체"는 또한 전체 항체 분자의 항원-결합 단편을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 항체의 "항원-결합 부분", 항체의 "항원-결합 단편" 등은 복합체를 형성하기 위해 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 천연 유래, 효소적으로 얻을 수 있는, 합성, 또는 유전자 공학 처리된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은, 예를 들어, 임의의 적합한 표준 기법, 예컨대 항체 가변 및 선택적으로 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 단백질 분해 또는 재조합 유전자 공학 처리 기법을 이용하여 전체 항체 분자로부터 유래될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어, 상업적 공급원, DNA 라이브러리(예를 들어, 파지-항체 라이브러리를 포함)로부터 용이하게 입수 가능하거나, 또는 합성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 입체배치로 배열하기 위해, 또는 코돈을 도입하거나, 시스테인 잔기를 생성하거나, 아미노산 등을 변형, 침가 또는 결실시키기 위해 DNA는 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 이용함으로써 시퀀싱 및 조작될 수 있다. 항원-결합 단편의 비제한적 예는 (i) Fab 단편; (ii)  $F(ab')_2$  단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변 영역(예를 들어, 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위를 포함한다. 다른 공학 처리된 분자, 예컨대 다이어바디(diabody), 트라이어바디(triabody), 테트라바디(tetraabody) 및 미니바디는 또한 본 명세서에서 사용되는 표현 "항원-결합 단편"에 포함된다. 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열을 지니는 프레임에 인접하여 또는 프레임 내에서 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다.  $V_L$  도메인과 결합된  $V_H$  도메인을 갖는 항원-결합 단편에서,  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 임의의 적합한 배열에서 서로에 대해 위치될 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체이고,  $V_H-V_H$ ,  $V_H-V_L$  또는  $V_L-V_L$  이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체  $V_H$  또는  $V_L$  도메인을 함유할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 나노몰 이하 범위의 IC50에서 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 7, 8, 9 및 11)이 인간 Ang-2와 그의 수용체 Tie-2 사이의 상호작용을 차단할 수 있다는 것을 보여주는 도면. 인간 Ang-2는 가변적 농도의 리포칼린 뮤테인과 함께 사전 인큐베이션하며, 비중화 인간 Ang-2를 고정 가용성 인간 Tie-2Fc와 함께 ELISA 플레이트 상에서 정량화하였다. 기준점 항체(서열번호 19/20)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 음성 대조군(서열번호 16)은 경쟁적 효과가 없다. 데이터를 단일-부위 결합 모델에 적합화시켰다.

도 2는 경쟁 ELISA 형식으로 측정한 바와 같은 리포칼린 뮤테인(서열번호 7 및 8)의 교차 반응성 프로파일 및 특이성을 도시한 도면. 리포칼린 뮤테인은 인간 Ang-1, 인간 Ang-2 및 마우스 Ang-2와 교차 반응성이다. 데이터를 단일-부위 결합 모델에 적합화시켰다.

도 3은 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 6 내지 14)이 인간 Ang-2와 그의 수용체 인간 Tie-2(HEK 세포 상에서 과발현됨) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다는 것을 보여주는 도면. 인간 Ang-2를 가변적 농도의 서열번호 1, 3, 6 내지 14와 함께 사전 인큐베이션시키고 나서, 비중화 ang-2를 항-HIS-태그 항체를 통해 검출하였다. 기준

점 항체(서열번호 19/20)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 데이터를 단일-부위 결합 모델에 적합화시켰다.

도 4는 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 6 내지 14)이 HEK 세포 상에서 과발현된 마우스 Ang-2와 인간 수용체 Tie-2 사이의 상호작용을 차단할 수 있다는 것을 보여주는 도면. 마우스 Ang-2를 서열번호 1, 3, 6 내지 14의 가변적 농도와 함께 사전 인큐베이션시켰고, 항-HIS-태그 항체를 통해 비중화 마우스 Ang-2를 검출하였다. 기준 점 항체(서열번호 19/20)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 데이터를 단일-부위 결합 모델에 적합화시켰다.

도 5는 리포칼린 뮤테인 서열번호 7, 8, 9 및 11이 세포 기반 증식 분석에서 hAng-2의 생물학적 활성을 차단할 수 있다는 것을 보여주는 도면. 분석에서, 서열번호 7, 8, 9, 11 및 16, IgG 아이소타입 음성 대조군 및 2개의 기준점 항체를 기아(starved) HLEC에 첨가하였다. 실험은 LEC 증식이 유사한 범위 IC50 값으로 서열번호 7, 8, 9, 11 및 기준점 항체 1 및 2(기준점 항체 1 : 서열번호 17/18; 기준점 항체 2: 서열번호 19/20에 의해 차단된다는 것을 나타낸다. IgG 아이소타입 및 서열번호 16 음성 대조군은 세포 증식에 대해 효과가 없었다. 데이터를 S자형 용량 반응 모델에 적합화시켰다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 개시내용은 Ang-2에 대해 결합 특이성을 갖는 폴리펩타이드를 제공하되, 폴리펩타이드는 검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 포함한다.
- [0045] 실시형태에서, 검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합하는 hNGAL 뮤테인은 천연 시스테인 잔기의 다른 아미노산, 예를 들어, 세린 잔기에 의한 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, 검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합하는 뮤테인은 야생형 hNGAL의 하나 이상의 아미노산을 치환하는 하나 이상의 비 천연 시스테인 잔기를 포함할 수 있다. 추가 특정 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 hNGAL 뮤테인은 시스테인 잔기에 의한 천연 아미노산의 적어도 2개의 아미노산 치환을 포함함으로써, 하나 이상의 시스테인 브릿지를 형성한다. 일부 실시형태에서, 상기 시스테인 브릿지는 적어도 2개의 루프 영역을 연결할 수 있다. 이들 영역의 정의는 본 명세서에 Flower(Flower, 1996, 상기 참조, Flower, et al., 2000, 상기 참조) 및 Breustedt et al.(2005, 상기 참조)에 따라 사용된다.
- [0046] 뮤테인 또는 이들의 조성물은 본 명세서에 개시된 바와 같은 Ang-2에 대해 특이성을 가지며, Ang-2의 적어도 한 가지의 생물학적 활성에 대해 길항, 또는 중화 또는 차단 활성을 가질 수 있다.
- [0047] 일 양상에서, 본 개시내용은 적어도 검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합하는 다양한 hNGAL 뮤테인을 포함한다. 이 의미에서, Ang-2는 기준 야생형 hNGAL의 비천연 리간드로서 간주되며, 여기서 "비-천연 리간드"는 생리적 조건 하에서 야생형 인간 리포칼린 2에 결합하지 않는 화합물을 지칭한다. 특정 서열 위치에서 하나 이상의 돌연변이를 지니는 야생형 hNGAL을 공학처리함으로써, 본 발명자들은 비-천연 리간드인 Ang-2에 대해 고친화도 및 고특이성이 가능하다는 것을 입증하였다. 일부 실시형태에서, 야생형 I 인간 리포칼린 2에 대한 특정 서열 위치를 암호화하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 심지어 더 많은 뉴클레오타이드 3개쌍(들)에서, 무작위 돌연변이유발은 뉴클레오타이드 3개쌍의 서브세트에 의해 이들 위치에서의 치환을 통해 수행될 수 있다.
- [0048] 추가로, 본 개시내용의 뮤테인은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열의 특정 서열 위치에 대응하는 서열 위치, 예컨대 인간 NGAL(서열번호 16)의 선형 폴리펩타이드 서열의 서열 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134의 적어도 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12을 포함하는, 임의의 하나 이상에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.
- [0049] 본 개시내용의 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 밖의 "모" 단백질 스캐폴드(예컨대, hNGAL)의 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 hNGAL 뮤테인은 또한 이러한 돌연변이가 적어도 본질적으로 뮤테인의 결합 활성 및 폴딩을 방해하지 않거나 또는 간섭하지 않는 한, 서열 위치/위치들에서 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 운반할 수 있다. 이러한 돌연변이는 확립된 표준 방법을 이용하여 DNA 수준에서 매우 용이하게 달성될 수 있다(Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). 아미노산 서열의 변경의 예시적인 예는 삽입 또는 결실뿐만 아니라 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 보존적일 수 있으며, 즉, 아미노산 잔기는 특히 극성뿐만 아니라 크기에 관해 화학적으로 유사한 특성의 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환의 예는 다음의 그룹의 구성원 중에서의 대체이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 아이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판. 반면에, 아미노산 서열에서 비보존적 변경을 도입하는 것이 가능하다. 추가

로, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 대신에, 이들 결실 또는 삽입이 안정한 폴딩/기능성 뮤테인(예를 들어, N- 및 C-말단이 절단된 hNGAL 뮤테인)을 초래하는 한, 인간 리포칼린 2의 1차 구조의 하나 이상의 연속적 아미노산을 삽입 또는 결실하는 것이 가능하다. 이러한 뮤테인에서, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 N- 또는 C-말단에서 첨가되거나 또는 결실된다. 일반적으로 이러한 뮤테인은 성숙 hNGAL의 아미노산 서열과 약 적어도 70%, 예를 들어 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0050] 본 명세서에 개시된 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 다른 리포칼린과의 서열 동일성과 비교할 때 성숙 hNGAL (서열번호 16)에 대해 높은 서열 동일성을 가진다. 이런 일반적 내용에서, 본 개시내용의 뮤테인의 아미노산 서열은 천연 야생형 hNGAL의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 유사하고, 단, 가능하게는 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 정렬에서 캡(이하에 나타내는 바와 같음)이 있다. 성숙 hNGAL의 서열과 실질적으로 유사한 개시 내용의 뮤테인의 각각의 서열은, 일부 실시형태에서, 성숙 hNGAL의 서열에 대해 적어도 70% 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 75% 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 80% 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 82% 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 85% 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 87% 동일성 또는 서열 상동성, 또는 적어도 90% 동일성 또는 서열 상동성, 예를 들어 적어도 95% 동일성 또는 서열 상동성을 가지며, 단, 변형된 위치 또는 서열이 보유되며, 하나 이상의 캡이 가능하다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 본 개시내용의 뮤테인은 해당 표적과 하나 이상의 기준 표적 간을 구별할 수 있다면, 표적(예를 들어, Ang-2)에 "특이적으로 결합"하는데, 결합 특이성은 절대적이지 않고, 상대적 특성이기 때문이다. "특이적 결합"은, 예를 들어, 웨스턴 블로트, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-시험, FACS, IHC 및 웹타이드 스캔에 따라 결정될 수 있다.

[0052] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 뮤테인은, 일부 실시형태에서, 단백질, 또는 단백질 도메인 또는 웹타이드인 융합 상대에 대해 그의 N-말단 및/또는 그의 C-말단에서 융합된다. 일부 실시형태에서, 단백질 도메인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다. 추가적인 특정 실시형태에서, 단백질 도메인은 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 일부민 결합 웹타이드, 또는 일부민 결합 단백질이다.

[0053] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 뮤테인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물에 컨쥬게이팅된다. 더 바람직하게는, 뮤테인은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸전분, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 일부민 결합 웹타이드 및 일부민 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물에 컨쥬게이팅된다.

[0054] 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 뮤테인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 개시내용은 상기 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포를 포함한다.

#### A. Ang-2에 대해 특이적인 예시적인 뮤테인

[0056] 일 양상에서, 본 개시내용은 Ang-2에 특이적인 신규한, 특이적 결합 인간 리포칼린 2(인간 Lcn2 또는 hNGAL) 뮤테인에 관한 것이다.

[0057] 본 개시내용의 일 실시형태는 검출 가능한 친화도, 예컨대 약 200nM 이하의  $K_D$ , 예컨대 약 150nM 이하로 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있는 뮤테인에 관한 것이다.

[0058] 일 양상에서, 본 개시내용은 본질적으로 실시예 6에 기재된 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance: SPR) 기반 분석에서 비아코어(Biacore) T200 기기에 의해 측정할 때 약 5nM 이하의 KD로 Ang-2에 결합할 수 있는 hNGAL 뮤테인을 제공한다.

[0059] 일부 추가 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 본질적으로 실시예 4에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 EC50 값으로 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있다.

[0060] 일부 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 본질적으로 실시예 5에 기재된 경쟁 ELISA 형식 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 IC50 값에 의해 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있다.

[0061] 일부 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 본질적으로 실시예 9에 기재된 세포 기반 증식 분석에서 약 5nM 이하의 IC50 값으로 Ang-2에 의해 매개된 림프 미세혈관 내피세포 증식을 저해 또는 감소 시킬 수 있다.

[0062] 일부 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 검출 가능한 친화도, 예컨대 약 200nM 이하, 예컨대 약 150nM 이하의  $K_D$ 로 측정된 친화도로 Ang-2와 Ang-1 둘 다에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에

서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 인간 Ang-1과 인간 Ang-2 둘 다와 교차반응성이다.

[0063] 일부 또한 추가 실시형태에서, 뮤테인은 본질적으로 실시예 7에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 150nM 이하의 IC50 값으로서 측정된 친화도로 Ang-1에 결합할 수 있다.

[0064] 일부 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 인간 Ang-2와 마우스 Ang-2 둘 다와 교차반응성이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 뮤테인은 검출 가능한 친화도, 예컨대 약 200nM 이하, 예컨대 약 150nM 이하의  $K_D$ 로 측정된 친화도로 인간 Ang-2와 마우스 Ang-2 둘 다에 결합할 수 있다.

[0065] 일부 또한 추가 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 뮤테인은 본질적으로 실시예 7에 기재된 ELISA 분석에서 측정될 때, 약 5nM 이하의 IC50 값으로서 측정된 친화도로 Ang-2에 결합할 수 있다.

[0066] 일부 또한 추가 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 뮤테인은 본질적으로 실시예 8에 기재된 경쟁 세포 ECL 형식에서 각각 약 25nM 이하의 IC50값으로 hTie-2에 대한 인간 Ang-2 및 mTie-2m에 대한 마우스 Ang-2의 결합을 차단할 수 있다.

[0067] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 인간 Ang-4과 교차반응성이 아니다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 마우스 Ang-3과 교차반응성이 아니다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 하나 이상의 hNGAL 뮤테인은 인간 VEGF-A와 교차반응성이 아니다.

[0068] 이와 관련하여, 본 개시내용은 폴리펩타이드에 관한 것이되, 상기 폴리펩타이드는 hNGAL 뮤테인을 포함하고, 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열에 비해 상기 hNGAL은 서열 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개 또는 짐지어 그 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리펩타이드는 검출 가능한 친화도로 Ang-2에 결합한다.

[0069] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL 선형 폴리펩타이드 서열(서열번호 16)의 서열 위치 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134 중 임의의 하나 이상에서 다음의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다: Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met 또는 Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His 또는 Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp 또는 Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu 또는 Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr 또는 Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu 또는 Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr 또는 Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr 또는 Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala 또는 Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser 또는 Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser 또는 Asn; Arg 81 → Trp, His 또는 Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln 또는 Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu 또는 Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met 또는 Gln; Tyr 106 → Thr, Leu 또는 Phe; Lys 125 → His, Thr 또는 Gly; Ser 127 → Leu 또는 Met; Tyr 132 → Phe, Trp 또는 Val; 및 Lys 134 → Ala, Glu 또는 Trp. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 이들 서열 위치에서 2 이상, 예컨대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16개 또는 짐지어 그 이상의 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.

[0070] 추가적으로, 본 개시내용에 따른 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열에 비해 다음의 치환을 포함할 수 있다: Gln 28 → His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met 및 Asn 129 → Asp.

[0071] 일부 추가적인 실시형태에서, Ang-2에 결합하는 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열에 비해 다음의 아미노산 치환을 포함한다:

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

[0072]

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

(l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;

(m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala; 또는

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

[0074]

[0075] 잔기 영역, 즉, 서열 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134과 상이한 영역에서, 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 밖에서 야생형 (천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0076]

[0076] 추가적인 특정 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 뮤테인은 서열번호 1 내지 14 또는 이의 기능성 단편 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 단편 또는 변이체는 서열번호 1 내지 14 중 임의의 하나에서 나타내는 뮤테인의 구조적 상동체이다.

[0077]

[0077] 본 개시내용의 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 서열번호 1 내지 14로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 대해 높은 서열 동일성, 예컨대 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90% 동일성, 예를 들어, 적어도 95% 동일성을 가질 수 있다.

[0078]

[0078] 일부 추가 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 인간 Ang-1, 인간 Ang-2 및/또는 마우스 Ang-2와 교차반응성 또는 이들에 결합하는 hNGAL 뮤테인은 서열번호 1 내지 14 및 이들의 기능성 단편 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0079]

[0079] 본 개시내용은 또한 서열번호 1 내지 14로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 hNGAL 뮤테인의 구조적 상동체를 포함하며, 이 구조적 상동체는 상기 hNGAL 뮤테인에 관해 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과 및 가장 바람직하게는 95% 초과의 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가진다.

[0080]

[0080] 본 개시내용에 따른 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 인간 리포칼린 2의 천연 유래 형태의 돌연변이 유발에 의해 얻어질 수 있다. 돌연변이유발의 일부 실시형태에서, 치환(또는 대체)은 보존적 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Ang-2에 결합하는 그의 능력을 보유하는 한, 임의의 치환(비보존적 치환 또는 이하의 예시적 치환으로부터의 하나 이상을 포함)이 생각되고/되거나, 이어서, 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는데, 이는 성숙 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열(스위스 프롯 데이터 뱅크 수탁 번호 P80188)에 대해 적어도 60%, 예컨대 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 더 높은 동일성이다.

[0081]

[0081] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 개시된 적어도 1종의 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 컨쥬게이트 또는 이의 융합 단백질, 및 선택적으로, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0082]

[0082] 따라서, 본 개시내용의 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 약제학적으로 허용 가능한 성분뿐만 아니라 확립된 제조 방법을 이용하여 조성물로 제형화될 수 있다(Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 약제학적으로 비활성인 무기 또는 유기 부형제가 사용될 수 있다.

[0083]

B. Ang-2에 대해 특이적인 뮤테인의 적용

- [0084] 최근에, ANG-2 네아웃 마우스 모델을 이용하여, 얀코풀로스(Yancopoulos) 그룹은 ANG-2가 출생 후 신생혈관형성에 필요하다는 것을 보고하였다(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23). 그들은 눈에서 유리체 맥관구조의 발생적으로 프로그래밍된 퇴행이 ANG-2 네아웃 마우스에서 생기지 않으며, 그들의 망막 혈관은 망막 중심 동맥으로부터 자라나지 못한다는 것을 나타내었다(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23). 그들은 또한 ANG-2의 결실이 림프 맥관구조의 패턴화 및 기능에서 엄청난 결함을 초래한다는 것을 발견하였다(Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411 -23). 추가로, 효과적인 항-Ang-2 요법은 암과 같은 질환을 치료하는 데 이점을 갖는 것으로 생각되는데, 이때 진행은 비정상 신생혈관형성에 의존하며, 여기서 과정의 차단은 질환 진행의 예방을 야기할 수 있다(Folkman, J., Nature Medicine. 1, (1995) 27-31). 게다가, Ang-2 발현은 다양한 염증성 및/또는 감염성 질환의 중증도와 상관 관계가 있는 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Siner et al., 2009, Shock 31 :348-353; Yeo et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA): 105: 17097-17102] 참조).
- [0085] 따라서 본 개시내용의 Ang-2에 대한 결합 친화도에 의한 뮤테인에 대한 수많은 가능한 적용은 의학에서, 예를 들어, 안과학 및 종양학에서 존재한다. 하나의 추가적인 양상에서, 본 개시내용은 샘플 내 Ang-2를 검출하기 위한 본 명세서에 개시된 이러한 뮤테인의 용도뿐만 아니라 각각의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0086] 본 개시내용은 또한 Ang-2와의 복합체 형성에 대해 기재한 바와 같이 Ang-2에 대해 결합 친화도를 지니는 하나 이상의 뮤테인의 사용을 수반한다.
- [0087] 따라서, 본 개시내용의 다른 양상에서, 개시된 뮤테인은 Ang-2의 검출을 위해 사용된다. 이러한 사용은 적합한 조건 하에서 하나 이상의 상기 뮤테인을, Ang-2를 함유하는 것으로 의심되는 샘플과 접촉시킴으로써, 뮤테인과 Ang-2 사이의 복합체를 형성하는 단계 및 적합한 신호에 의해 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0088] 검출 가능한 신호는 상기 설명한 바와 같은 표지에 의해 또는 결합, 즉, 복합체 형성 그 자체에 기인하는 물리적 특성의 변화에 의해 야기될 수 있다. 일 예는 표면 플라즈몬 공명인데, 이의 가치는 금 호일과 같은 표면 상에 고정된 것으로부터의 결합 상태의 결합 동안 변화된다.
- [0089] 본 명세서에 개시된 뮤테인은 또한 Ang-2의 분리를 위해 사용될 수 있다. 이러한 사용은 적합한 조건 하에서 하나 이상의 상기 뮤테인을, Ang-2를 함유하도록 제안된 샘플과 접촉시킴으로써, 뮤테인과 Ang-2 사이에 복합체를 형성하는 단계, 및 샘플로부터 복합체를 분리시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0090] Ang-2의 검출뿐만 아니라 Ang-2의 분리를 위한 개시된 뮤테인의 사용에서, 뮤테인 및/또는 Ang-2 또는 이의 도메인 또는 단편은 적합한 고체상 상에 고정될 수 있다.
- [0091] 따라서, 예를 들어, 샘플 내에서 문자, 예컨대 Ang-2의 존재 또는 부재뿐만 아니라 그의 농도 또는 수준이 결정될 수 있다.
- [0092] 따라서, 본 개시내용의 뮤테인은, 예를 들어, 진단적 목적을 위해, 샘플 내 Ang-2를 검출 및/또는 측정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 뮤테인은 Ang-2의 비정상 발현(예를 들어, 과발현, 저발현, 무발현 등)을 특징으로 하는 병태 또는 질환을 진단하기 위해 사용될 수 있다. Ang-2에 대한 예시적인 진단적 분석은, 예를 들어, 환자로부터 얻은 샘플을 뮤테인과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있되, 뮤테인은 검출 가능한 표지 또는 리포터 문자로 표지된다. 대안적으로, 비표지 뮤테인은 그 자체가 검출 가능하게 표지된 2차 문자와 조합하여 진단적 용도에서 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 문자는 방사성 동위 원소, 예컨대  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^{125}\text{I}$ ; 형광 또는 화학발광 모이어티, 예컨대 플루오레세인 아이소티오사이아네이트, 또는 로다민; 또는 효소, 예컨대 알칼리 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 호스래디쉬 폐록시다제, 또는 르시피라제일 수 있다. 샘플에서 Ang-2를 검출 또는 측정하기 위해 사용될 수 있는 구체적인 예시적 분석은 효소결합 면역 흡착 분석(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 및 형광-활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다.
- [0093] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 개시내용에 따라 Ang-2에 대해 결합 친화도를 지니는 뮤테인을 포함하는 진단적 또는 분석적 키트를 특징으로 한다.
- [0094] 추가 양상에서, 본 개시내용은 또한 개시된 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인 또는 약제학적 조성물의 제조를 위해 본 명세서에 기재된 이러한 뮤테인의 용도를 포함한다. 이렇게 얻은 약제학적 조성물은 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애, 예컨대 암, 눈의 신혈관화 질환(예컨대, 망막병증), 관절염 및 건선의 치료, 예방 및/또는 개선에 적합할 수 있다. 약제학적 조성물은 단일요법으로서 또는 병용요법으로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애, 예컨대 암, 눈의 신혈관화 질환

(예컨대, 망막병증), 관절염 및 건선의 치료를 위한 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인을 제공한다.

[0095] 또 다른 양상에서 진단에서 그들의 용도에 추가로, 본 개시내용은 대상체에서 Ang-2의 결합 및/또는 대상체에서 신생혈관형성의 저해 또는 감소를 위한 본 개시내용의 이러한 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물의 용도를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 대상체는 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애, 예컨대 암, 눈의 신혈관화 질환(예컨대, 망막병증), 관절염 및 건선으로 고통받을 수 있다.

[0096] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 상기 대상체에게 본 개시내용의 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 조합물의 Ang-2에 대해 결합 친화도를 지니는 유효량의 하나 이상의 뮤테인을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 Ang-2를 결합하는 방법을 특징으로 한다.

[0097] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 상기 대상체에게 본 개시내용의 Ang-2 또는 하나 이상의 조성물 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조합물에 대해 결합 친화도를 갖는 유효량의 하나 이상의 뮤테인을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 신생혈관형성을 저해 또는 감소시키는 방법을 수반한다. 일부 실시형태에서, 이러한 대상체는 통제되지 않는 신생혈관형성, 예컨대 암, 눈의 신혈관화 질환(예컨대, 망막병증), 관절염, 및 건선과 관련된 질환 또는 장애로 고통받을 수 있다.

[0098] 본 개시내용의 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물은, 특히, 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애를 포함하는 Ang-2 활성과 관련된 임의의 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 개선에 유용하다.

[0099] 예를 들어, 본 개시내용의 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물은 대상체에서 원치않는 신생혈관형성을 특징으로 하는 종양 성장, 예컨대 뇌 및 뇌척수막, 인두, 폐 및 기관지 나무, 위장관, 자성 및 웅성 생식기관, 근육, 뼈, 피부 및 부속지, 관절 조직, 비장, 면역계, 혈액 형성 세포 및 골수, 간 및 요관, 및 특수 감각 기관, 예컨대 눈에서 생기는 원발성 및/또는 전이성 종양에 관해 저해 또는 감소되는데 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 및 항원-결합 단편은 다음의 암 중 하나 이상을 치료하는데 사용된다: 신세포암종, 췌장암종, 유방암, 전립선암, 악성 신경교종, 골육종, 결장직장암, 악성 중피종, 다발성 골수종, 난소암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 활막육종, 갑상선암, 또는 흑색종.

[0100] 일부 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물은 또한 하나 이상의 눈 장애, 예컨대 망막병증의 치료, 예방 및/또는 개선에 유용할 수 있다. 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물을 이용하거나 또는 이에 의해 치료, 예방 및/또는 개선될 수 있는 예시적인 눈 장애는, 예를 들어, 노인 황반 변성, 당뇨망막병증, 및 맥락막 신생혈관과 관련된 기타 눈 장애, 혈관 누출, 망막 부종 및 염증을 포함한다. 추가적으로, 뮤테인은 조기 혈액생성 및 림프관신생 및 녹내장 수술 후 여과포에 대한 대식세포 동원을 방지하고, 임상 결과를 개선시키기 위한 녹내장 수술에 대한 보조제로서 투여될 수 있다.

[0101] 일부 추가적인 실시형태에서, 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물은 혈관 질환, 예컨대 고혈압, 당뇨병(비인슐린 의존적 진성당뇨병을 포함), 건선, 관절염(류마티스성 관절염을 포함), 천식, 패혈증, 신장병 및 부종을 치료, 예방 또는 개선하기 위해 사용된다. 일부 추가 실시형태에서, 이를 질환 또는 장애는 손상, 뇌졸중 또는 종양과 관련된다.

[0102] 더 나아가, 본 명세서에 개시된 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물은 하나 이상의 염증성 또는 감염성 질환을 치료, 예방 또는 개선하기 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용의 항-Ang-2 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물의 투여에 의해 치료, 예방 또는 개선될 수 있는 예시적인 감염성 질환은 말라리아(열대 말라리아 열원충(*Plasmodium falciparum*) 감염), 바이러스 출혈열(예를 들어, 뎅기열), 리케차(rickettsial) 감염, 독성 쇼크 증후군, 패혈증, C형 간염, 바르토넬라 바실리포르미스 감염(*Bartonella bacilliformis*), 리슈마니아증, 마이코박테리아 감염, 및 엡스타인-바르 바이러스(*Epstein-Barr virus*) 감염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0103] 본 개시내용은 또한 암 또는 혈관 질환의 전이 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 명세서에 개시된 뮤테인 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물의 용도를 상정한다.

[0104] 본 개시내용 또는 이러한 뮤테인을 포함하는 조성물 또는 조합물에 따른 Ang-2-결합 hNGAL 뮤테인은 치료적으로 유효한 임의의 비경구 또는 비경구가 아닌(예를 들어, 장관) 경로를 통해 투여될 수 있다. 치료적으로 유효한 경로는 목적으로 하는 구획, 시스템, 또는 위치에 대한 제제의 전달을 제공한다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 경로는 제제가 목적으로 하는 작용 부위에 유리한 또는 목적으로 하는 임상 결과를 유발하는 데 충분한 제제의

양을 제공하기 위해 투여될 수 있는 것이다.

### C. Ang-2-결합 뮤테인과 하나 이상의 항신생혈관제의 조합물

신생혈관형성은 정상 내피세포의 표면 상에서 수용체에 대한 신호전달 분자, 예컨대 혈관내피성장인자(VEGF)의 결합을 필요로 한다. VEGF 및 기타 내피 성장인자가 내피세포 상에서 그들의 수용체에 결합할 때, 새로운 혈관의 성장 및 생존을 촉진시키는 이들 세포 내의 신호가 개시된다. 효과적인 항-혈관형성 치료 양상을 개발하기 위한 한 가지 접근은 신생혈관형성, 바람직하게는 잘 단리된 신호전달 경로 상에서 작용하는 표적에 연루된 상이한 표적 상에서 작용하는 제제를 조합하는 것이었다.

따라서, 본 개시내용은 하나 이상의 항신생혈관제와 조합한 Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인의 용도를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "항신생혈관제"는 임의의 물질이 이러한 신호전달 분자 중 하나의 그의 수용체에 대한 결합을 저해 또는 방해할 수 있다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 항신생혈관제는 새로운 혈관의 성장 및 생존을 촉진하는 신호 중 하나를 차단할 수 있거나 또는 차단하는 데 기여한다.

일부 특정 실시형태에서, 항신생혈관제는 (i) Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 및/또는 Tie-2의 길항제; (ii) Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF 및/또는 EG-VEGF의 길항제; (iii) 멜타 유사 리간드 4(DLL4, 혈관 특이적 노치(Notch) 리간드) 길항제, (iv) 표피성장인자 수용체(EGFR) 길항제 및 (v) 사이토카인 저해제를 포함한다.

일부 또한 추가 실시형태에서, Ang-2 길항제는 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인, 항-Ang-2 항체(미국 특허 제 8,133,979호 참조; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨), 웨피바디(미국 특허 제8,129,331호 참조; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨), 또는 CovX-바디(예컨대, CVX-060, 미국 특허 제7,521,425호; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨)일 수 있다. 일부 추가 실시형태에서, DLL4 길항제는 항-DLL4 항체(예를 들어, 미국 특허 출원 제2009/0142354호에 개시된 항-DLL4 항체, 예컨대 REGN421 등)일 수 있다. 일부 추가 실시형태에서, EGFR 길항제는 항-EGFR 항체 또는 EGFR 활성의 소분자 저해제일 수 있다. 본 개시내용의 항-Ang-2 hNGAL 뮤테인과 조합하여 유리하게 투여될 수 있는 다른 항신생혈관제는 소분자 사이토카인 저해제를 포함하는 사이토카인 저해제 및 사이토카인, 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18에 및/또는 그들의 각각의 수용체에 결합하는 항체를 포함한다.

이와 관련하여, 본 개시내용은 또한 본 명세서에 언급된 임의의 항-Ang-2 hNGAL 뮤테인 및 VEGF, DLL4, EGFR, 또는 임의의 앞서 언급한 사이토카인 중 하나 이상의 길항제와 같은 항신생혈관제를 포함하는 치료적 조합물을 포함하되, 길항제는 앱타머, 안티센스 분자, 리보자임, siRNA, 웨피바디, 나노바디, 항체, 항체 단편(예를 들어, Fab 단편; F(ab')<sub>2</sub> 단편; Fd 단편; Fv 단편; scFv; dAb 단편; 공학 처리된 분자(예컨대, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디, 미니바디 및 최소 인식 단위); 항바이러스, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드 및/또는 비스테로이드 항-염증성 약물(NSAID)일 수 있다.

일부 실시형태에서, 상기 공학 처리된 분자는 EGF-유사 도메인, 크링글(Kringle)-도메인, 피브로넥틴 I형 도메인, 피브로넥틴 II형 도메인, 피브로넥틴 III형 도메인, PAN 도메인, G1 도메인, SRCR 도메인, 쿠니츠(Kunitz)/소 췌장 트립신 저해제 도메인, 텐다미스텟, 카잘형(Kazal-type) 세린 프로테아제 저해제 도메인, 트레포일(Trefoil)(P-형) 도메인, 폰빌레브란트 인자(von Willebrand factor) C형 도메인, 아나필락톡신(Anaphylatoxin)-유사 도메인, CUB 도메인, 티로글로불린 I형 반복부, LDL-수용체 클래스 A 도메인, 스시(Sushi) 도메인, 링크(Link) 도메인, 트롬보스폰딘 I형 도메인, 면역글로불린 도메인 또는 면역글로불린-유사 도메인(예를 들어, 도메인 항체 또는 카멜 중쇄 항체), C형 톡틴 도메인, MAM 도메인, 폰빌레브란트 인자 A형 도메인, 소마토메딘 B 도메인, WAP-형 4개의 이황화물 코어 도메인, F5/8 C형 도메인, 헤모페신 도메인, SH2 도메인, SH3 도메인, 라미닌-형 EGF-유사 도메인, C2 도메인, "카파바디"(III. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10:949-57 (1997)), "미니바디"(Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J 13:5303-9 (1994)), "다이어바디"(Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993)), "야누신(janusin)"(Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules(janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10:3655-3659 (1991) 및 Traunecker et al. "janusin: new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992)), 나노바디, 어드넥틴, 테트라넥틴, 마이크로바디, 애플린, 애피바디, 안키린, 크리스탈린, 크노틴, 유비퀴틴, 아연-핑거 단백질, 자가형광 단백질, 안키린 또는 안키린 반복부 단백질 또는 류신-풍부 반복부 단백질, 또는 아비머(avimer)(Silverman, Lu Q, Bakker A, To

W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in Nat Biotech. 2005 Nov 20 edition)일 수 있다.

[0112] 본 개시내용의 하나 이상의 추가적인 제제와 조합할 때, 항-Ang-2 hNGAL 뮤테인은 다른 제제(들)의 투여 전에, 동시에(예를 들어, 동일한 제형으로 또는 별개의 제형으로) 또는 후속하여 투여될 수 있다. hNGAL 뮤테인 및 항신생혈관제는 동시에, 수반되어 또는 연속해서를 포함하여, 병용해서 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 조합물, 상기 hNGAL 뮤테인 및 항신생혈관제는 투여될 수 있는 단일 조성물 중에 포함될 수 있다. 조성물은 활성 성분으로서 유효량의 상기 hNGAL 뮤테인 및 항신생혈관제를 적어도 1종의 약제학적으로 허용 가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 함께 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시내용의 조합물은 약제학적으로 허용 가능한 성분뿐만 아니라 확립된 제조 방법을 이용하여 조성물로 제형화될 수 있다(Gennaro and Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 약제학적으로 비활성 무기 또는 유기 부형제가 사용될 수 있다.

[0113] hNGAL 뮤테인 및 항신생혈관제는 또한 독립적 시점에 개개의 간격을 포함하여 서로 독립적으로 투여될 수 있다. hNGAL 뮤테인과 항신생혈관제의 조합물은 다양한 형태로 및 임의의 배향으로 제공될 수 있다.

[0114] 본 개시내용의 항-Ang-2 hNGAL 뮤테인 및 이들의 조합물은 또한 방사선 치료 및/또는 통상적인 화학요법을 또한 포함하는 치료 요법의 부분으로서 투여될 수 있다.

[0115] 일부 특정 실시형태에서, 항신생혈관제는 VEGFA EGF 수용체 시스템 및 엔지오포이에틴/Tie-2 수용체 시스템의 임의의 성분의 길항제이며; 이는 Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF, EG-VEGF, Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 또는 Tie-2 중 임의의 하나이다. VEGF-VEGFR 경로 및 Tie-2 경로는 생체내 신생혈관형성 과정에 필수적인 2개의 독립적 매개체로서 고려되어야 한다(Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91; Jendreyko, N., et al., Journal of Biological Chemistry, 278:47812-47819 (2003); Jendreyko, N., et al., PNAS, 102:8293-8298 (2005)).

[0116] 일부 또한 추가 실시형태에서, 항신생혈관제는 VEGF 저해제이다. VEGF 패밀리는 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 태반 성장 인자(PIGF) 및 내분비선 유래 VEGF(EG-VEGF)를 포함한다. VEGF 패밀리의 구성원은 3가지 관련된 수용체 타이로신 키나제; VEGFR1(fms-유사 타이로신 키나제 수용체, Flt1), VEGFR2(키나제 삽입 도메인-함유 수용체, KDR), 및 VEGFR3(다른 fms-유사 타이로신 키나제 수용체, Flt4)에 대해 상이한 친화도로 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0117] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "VEGF 저해제"는 VEGF-VEGFR 경로에 의해 신호전달을 감소시키는 임의의 물질을 의미한다. 따라서, VEGF 저해제는 VEGF 패밀리의 임의의 구성원 및/또는 수용체 타이로신 키나제의 임의의 하나를 저해 또는 방해할 수 있다. VEGF 저해제는 몇 가지만 예로 들면, 소분자, 웹타이드, 폴리웹타이드, 단백질, 더 구체적으로는 항-VEGF 항체, 항-VEGFR 항체, 인트라바디, 맥시바디, 미니바디, 다이어바디, Fc 융합 단백질, 예컨대 웹타이바디, 리셉티바디, 가용성 VEGF 수용체 단백질 및 단편을 포함하는 항체 및 다양한 기타일 수 있다. 다수의 VEGF 저해제는 VEGF에 대한 또는 VEGF 수용체에 대한 결합에 의해 작용한다. 다른 것은 VEGF에 또는 VEGF 수용체에 또는 VEGF 신호전달 경로의 다른 성분에 결합하는 인자에 대한 결합에 의해 더 간접적으로 작용한다. 또 다른 VEGF 저해제는 VEGF-VEGFR 경로 신호전달을 조절하는 조절 번역 후 변형을 변경함으로써 작용한다. 본 개시내용에 따른 VEGF 저해제는 또한 더 간접적인 메커니즘을 통해 작용할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 수반되는 메커니즘은 무엇이든지, VEGF 저해제가 저해제가 없을 때의 동일한 환경에 있는 것 이상으로 주어진 환경에서 VEGF-VEGFR 신호전달 경로의 효과적인 활성을 감소시킨다.

[0118] 일부 특정 실시형태에서, VEGF 저해제는 VEGF-Trap(예를 들어, 미국 특허 제7,087,411호 참조; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨), 항-VEGF 항체(예를 들어, 베바시주맙), VEGF 수용체의 소분자 키나제 저해제(예를 들어, 수니티닙, 소라페닙 또는 파조파닙), 항-VEGF 눈물 리포칼린 뮤테인(예를 들어, 국제 특허 출원 PCT/EP2007/057971 참조, 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨) 또는 항-VEGFR 눈물 리포칼린 뮤테인(예를 들어, 국제 특허 출원 PCT/EP2007/057971 참조, 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨)일 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, 항신생혈관제로서 VEGF 저해제는 VEGF-Trap(예를 들어, 미국 특허 제7,087,411호 참조; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨), 베바시주맙(아바스틴(Avastin®)), 소라페닙(넥사바르®), 수니티닙(수텐트®) 및 파조파닙(보트리엔트®)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0120] 일부 추가적인 실시형태에서, VEGF 저해제는 VEGF-A의 길항제, 예컨대 항-VEGF-A 항체(예를 들어, 베바시주맙)일 수 있다. 일부 다른 실시형태에서, VEGF-A 길항제는 VEGF-A에 대한 결합 특이성을 갖는 리포칼린 뮤테인일 수 있다(예를 들어, 국제 특허 출원 PCT/EP2007/057971; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨).
- [0121] 일부 추가적인 실시형태에서, VEGF 저해제는 VEGF-C의 길항제, 예컨대 항-VEGF-C 항체일 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 제6,403,088호 및 제8,486,397호; 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨). 일부 다른 실시형태에서, VEGF-C 길항제는 VEGF-C에 대해 결합 특이성을 갖는 리포칼린 뮤테인일 수 있다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 하나 초과(예컨대, 둘)의 항신생혈관제와 조합된 Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인에서, 하나의 제제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 제2 제제는 본 명세서에 언급된 VEGF-C 길항제이다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 (i) Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인 및 (ii) 대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성을 저해하기 위한 하나 이상의 항신생혈관제의 용도를 포함한다. 이러한 용도는 대상체에게 유효량의 (i) Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인 및 (ii) 하나 이상의 항신생혈관제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0124] 유사하게는, 본 개시내용은 (i) Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인 및 (ii) 대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애의 치료, 예방 또는 경감을 위한 하나 이상의 항신생혈관제의 용도를 개시한다. 일부 추가 실시형태에서, 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애는 암, 눈의 신혈관화 질환(예컨대, 망막병증), 관절염 및 건선을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나의 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 제2 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-C 길항제이다.
- [0125] Ang-2에 대해 검출 가능한 친화도를 갖는 hNGAL 뮤테인에 대한 추가적인 상세한 설명은 본 개시내용의 부문 A에서 찾을 수 있다.
- [0126] 특히 바람직한 실시형태에서, Ang-2에 특이적인 hNGAL 뮤테인은 서열번호 1 내지 14 및 이들의 기능성 단편 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 이러한 단편 또는 변이체는 서열번호 1 내지 14 중 임의의 하나에서 나타내는 뮤테인의 구조적 상동체이다.
- [0127] 본 개시내용은 또한 다음 중 적어도 하나: (i) Ang-2에 특이적인 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인 및 (ii) 하나 이상의 항신생혈관제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이며, 이 조성물은 통제되지 않는 신생혈관형성을 저해하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나의 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 제2 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-C 길항제이다.
- [0128] 이와 관련하여, 본 개시내용의 조합물은 약제학적으로 허용 가능한 성분뿐만 아니라 확립된 제조 방법을 이용하여 조성물로 제형화될 수 있다(Gennaro and Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 약제학적으로 비활성 무기 또는 유기 부형제가 사용될 수 있다.
- [0129] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체에게 적어도 다음을 포함하는 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선시키는 방법을 특징으로 한다: (i) Ang-2에 대해 검출 가능한 친화도를 갖는 hNGAL의 뮤테인 및 (ii) 하나 이상의 항신생혈관제. 일부 추가 실시형태에서, 통제되지 않는 신생혈관형성과 관련된 질환 또는 장애는 암, 눈의 신혈관화 질환(예컨대, 망막병증), 관절염 및 건선을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나의 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 제2 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-C 길항제이다.
- [0130] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체에게 적어도 다음을 포함하는 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 통제되지 않는 신생혈관형성을 저해 또는 감소시키는 방법을 수반한다: (i) Ang-2에 대해 검출 가능한 친화도를 갖는 hNGAL의 뮤테인 및 (ii) 하나 이상의 항신생혈관제. 일부 실시형태에서, 하나의 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-A 길항제이고, 제2 항신생혈관제는 본 명세서에 언급된 VEGF-C 길항제이다.
- [0131] **D. 본 개시내용의 뮤테인**
- [0132] Ang-2에 결합하는 본 개시내용의 뮤테인과 관련하여 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "에 대해 특이적"은 뮤테인이 Ang-2와 관련되거나, 이에 결합되거나 또는 반응한다는 것을 포함한다. 따라서, 관련되거나, 이에 결합되거나 또는 반응한다는 것은 뮤테인이 Ang-2에 특이적으로 결합한다는 것을 포함한다. 본 내용에서 용어 "특이적으로"는 뮤테인이 본 명세서에 기재된 바와 같은 Ang-2와 반응하지만, 본질적으로 다른 표적과는 반응하지 않는다

는 것을 의미한다. 뮤테인이 본 명세서에서 상기 나타낸 바와 같이 특이적으로 반응하는지의 여부는, 특히 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인과 Ang-2의 반응 및 상기 뮤테인과 다른 표적(들)과의 반응을 비교함으로써 용이하게 시험될 수 있다. "특이적 결합"은 또한, 예를 들어, 웨스턴 블로트, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-시험, FACS, IHC 및 펩타이드 스캔에 따라 결정될 수 있다.

[0133]

본 개시내용에 따른 뮤테인의 아미노산 서열은 다른 리포칼린과의 서열 동일성에 비교할 때 인간 리포칼린 2에 대해 높은 서열 동일성을 가진다(또한 상기 참조). 이런 일반적 내용에서, 본 개시내용에 따른 조합물의 뮤테인의 아미노산 서열은 대응하는 리포칼린의 아미노산 서열(야생형 hNGAL)과 적어도 실질적으로 유사하다. 본 개시 내용에 따른 조합물의 뮤테인의 각각의 서열은 성숙 hNGAL의 서열에 대해 실질적으로 유사하며, 예컨대 성숙 hNGAL의 서열에 대해 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90% 동일성, 예를 들어 적어도 95% 동일성이다. 이와 관련하여, 본 개시내용의 뮤테인은 물론 본 명세서에 기재된 바와 같은 치환에 비해 Ang-2에 결합할 수 있는 뮤테인을 제공할 수 있다. 전형적으로 hNGAL의 뮤테인은 - hNGAL의 천연 서열에 비해 - hNGAL의 리간드 결합 부위의 개방 말단에서의 4개의 루프에서 아미노산의 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 상기 설명한 바와 같이, 이를 영역은 Ang-2에 대한 뮤테인의 결합 특이성을 결정하는 데 필수적이다. 뮤테인 유래 hNGAL 또는 이의 상동체는 N-말단 영역 내 임의의 서열 위치에서 및/또는 천연 결합 포켓과 반대편에 위치된  $\beta$ -배럴 구조의 말단에 배열된 3개의 펩타이드 루프 BC, DE 및 FG에서 1, 2, 3, 4개 이상의 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.

[0134]

본 개시내용에 따른 뮤테인은 대응하는 천연 hNGAL 정렬에 비해 하나 이상, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 심지어 20개의 치환을 포함하고, 단, 이러한 뮤테인은 Ang-2에 결합할 수 있어야 한다. 예를 들어, 뮤테인은 hNGAL의 별개의 위치에 대응하는 위치에서(즉, 대응하는 위치에서) 치환을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 조합물의 뮤테인은 적어도 2개의 아미노산 치환(2, 3, 4, 5개 또는 심지어 그 이상을 포함), 천연 아미노산의 아르기닌 잔기에 의한 아미노산 치환을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 단백질 '기준' 스캐폴드의 핵산에 Ang-2와 결합할 수 있는 뮤테인을 생성하기 위한 목적으로 돌연변이유발이 실시된다.

[0135]

또한, 본 개시내용의 뮤테인은 뮤테인의 생물학적 활성에 영향을 미치는 일(그의 표적, 예를 들어 Ang-2에 결합) 없이 그의 N- 또는 C-말단, 바람직하게는 C-말단, 예컨대 스트렙-태그(Strep-tag), 예를 들어, 스트렙 II에서 이종성 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0136]

구체적으로, 야생형 hNGAL과 상이한 뮤테인의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 hNGAL의 아미노산 서열 내 특정 위치에 대응하는지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 당업계에 잘 공지된 수단 및 방법, 예를 들어, 수동으로 또는 기본적 국소 정렬 검색 툴을 나타내는 BLAST2.0 또는 클러스털W 또는 서열 정렬을 생성하는 데 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램을 이용하는 것에 의한 정렬을 사용할 수 있다. 따라서, 야생형 hNGAL은 "대상 서열" 또는 "기준 서열"로서 작용할 수 있는 반면, 본 명세서에 기재된 야생형 hNGAL과 상이한 뮤테인의 아미노산 서열은 "질의 서열"로서 작용한다. 용어 "기준 서열" 및 "야생형 서열"은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0137]

일부 실시형태에서, 치환(또는 대체)은 보존적 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Ang-2에 결합하는 그의 능력을 보유하는 한, 임의의 치환(비보존적 치환 또는 이하의 예시적 치환으로부터의 하나 이상을 포함)이 생각되고/되거나 이어서, 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는데, 이는 "본래" 서열에 대해 적어도 60%, 예컨대 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 더 높은 동일성이다.

[0138]

보존적 치환은 일반적으로 돌연변이될 아미노산에 따라 열거되는 다음의 치환이고, 각각 보존적이 되도록 취해질 수 있는 하나 이상의 대체(들)가 이어진다: Ala  $\rightarrow$  Gly, Ser, Val; Arg  $\rightarrow$  Lys; Asn  $\rightarrow$  Gln, His; Asp  $\rightarrow$  Glu; Cys  $\rightarrow$  Ser; Gln  $\rightarrow$  Asn; Glu  $\rightarrow$  Asp; Gly  $\rightarrow$  Ala; His  $\rightarrow$  Arg, Asn, Gln; Ile  $\rightarrow$  Leu, Val; Leu  $\rightarrow$  Ile, Val; Lys  $\rightarrow$  Arg, Gln, Glu; Met  $\rightarrow$  Leu, Tyr, Ile; Phe  $\rightarrow$  Met, Leu, Tyr; Ser  $\rightarrow$  Thr; Thr  $\rightarrow$  Ser; Trp  $\rightarrow$  Tyr; Tyr  $\rightarrow$  Trp, Phe; Val  $\rightarrow$  Ile, Leu. 기타 치환이 또한 허용 가능하며, 경험적으로 또는 다른 공지된 보존적 또는 비보존적 치환에 따라 결정될 수 있다. 추가 배향으로서, 다음의 8개 그룹은 각각 서로 보존적 치환을 나타내기 위해 전형적으로 취해질 수 있는 아미노산을 포함한다:

[0139]

a. 알라닌(Ala), 글리신(Gly);

[0140]

b. 아스파트산(Asp), 글루탐산(Glu);

[0141]

c. 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln);

- [0142] d. 아르기닌(Arg), 라이신(Lys);
- [0143] e. 아이소류신(Ile), 류신(Leu), 메티오닌(Met), 발린(Val);
- [0144] f. 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr), 트립토판(Trp);
- [0145] g. 세린(Ser), 트레오닌(Thr); 및
- [0146] h. 시스테인(Cys), 메티오닌(Met)
- [0147] 이러한 치환이 생물학적 활성에서 변화를 초래한다면, 아미노산 부류에 대해 예컨대 다음의 또는 이하에 추가로 기재하는 바와 같은 더 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물은 목적으로 하는 특징에 대해 선별될 수 있다. 이러한 더 실질적인 변화의 예는  $\text{Ala} \rightarrow \text{Leu}$ ,  $\text{Ile} \rightarrow \text{Arg}$ ;  $\text{Gln} \rightarrow \text{Asn}$ ,  $\text{Lys} \rightarrow \text{Asp}$ ,  $\text{Arg} \rightarrow \text{His}$ ,  $\text{His} \rightarrow \text{Asp}$ ;  $\text{Cys} \rightarrow \text{Ala}$ ;  $\text{Gln} \rightarrow \text{Glu}$ ;  $\text{Glu} \rightarrow \text{Gln}$ ;  $\text{His} \rightarrow \text{Lys}$ ;  $\text{Ile} \rightarrow \text{Met}$ ,  $\text{Ala} \rightarrow \text{Phe}$ ;  $\text{Leu} \rightarrow \text{Ala}$ ,  $\text{Met} \rightarrow \text{Nor류신}$ ;  $\text{Lys} \rightarrow \text{Asn}$ ;  $\text{Met} \rightarrow \text{Phe}$ ;  $\text{Phe} \rightarrow \text{Val}$ ,  $\text{Ile} \rightarrow \text{Ala}$ ;  $\text{Trp} \rightarrow \text{Phe}$ ;  $\text{Tyr} \rightarrow \text{Thr}$ ,  $\text{Ser} \rightarrow \text{Val}$ ;  $\text{Val} \rightarrow \text{Met}$ ,  $\text{Phe} \rightarrow \text{Ala}$ 이다.
- [0148] hNGAL의 생물학적 특성에서 실질적인 변화는 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체구조로서 치환 영역에서 폴리펩타이드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지함에 있어서 그들의 효과가 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 천연 유래 잔기는 통상적인 측쇄 특성에 기반하여 분류된다: (1) 소수성 : 노르류신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신; (2) 중성 친수성: 시스테인, 세린, 트레오닌; (3) 산성: 아스파트산, 글루탐산; (4) 염기성: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 라이신, 아르기닌; (5) 배향에 영향을 미치는 잔기: 글리신, 프롤린; 및 (6) 방향족: 트립토판, 타이로신, 페닐알라닌.
- [0149] 비-보존적 치환은 이를 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반한다. hNGAL의 적절한 입체구조를 유지함에 있어서 수반되지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화적 안정성을 개선시킬 수 있고, 비정상 가교를 방지한다. 정반대로, 시스테인 결합(들)은 그의 안정성을 개선시키기 위해 첨가될 수 있다.
- [0150] 상기 논의한 바와 같은 삽입을 포함하는 임의의 돌연변이는 확립된 표준 방법을 이용하여 핵산, 예를 들어 DNA 수준에 대해 매우 용이하게 달성될 수 있다. 아미노산 서열 변경의 예시적 예는 삽입 또는 결실뿐만 아니라 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 보존적일 수 있으며, 즉, 아미노산 잔기는 특히 다공성뿐만 아니라 크기와 관련하여 화학적으로 유사한 특성의 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환의 예는 다음의 그룹의 구성원 중에서의 대체이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 아이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판. 다른 한편으로, 또한 아미노산 서열에서 비보존적 변경을 도입하는 것이 가능하다. 추가로, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 대신에, 또한 이를 결실 또는 삽입이 안정한 폴딩/기능성 뮤테인을 초래하는 한, hNGAL의 1차 구조의 하나 이상의 연속적 아미노산을 삽입 또는 결실하는 것이 가능하다.
- [0151] 아미노산 서열의 변형은 특정 제한 효소에 대해 절단 부위를 혼입함으로써 돌연변이된 hNGAL 유전자 또는 그의 부분의 서브클로닝을 단순화하기 위한 단일 아미노산 위치의 관련된 돌연변이유발을 포함한다. 추가로, 이를 돌연변이는 또한 Ang-2와 같은 주어진 표적에 대해 뮤테인의 친화도를 추가로 개선시키기 위해 혼입될 수 있다. 더 나아가, 돌연변이는 필요하다면 뮤테인의 특정 특징을 조절하기 위해, 예컨대 폴딩 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 물 용해도를 개선시키기 위해 또는 응집 경향을 감소시키기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, 천연 유래 시스테인 잔기는 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다. 또한 새로운 반응기를 도입하기 위해, 예를 들어 다른 화합물, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분(HES), 바이오틴, 웨პ타이드 또는 단백질에 대한 컨쥬게이션을 위해, 또는 비천연 유래 이황화 결합의 형성을 위해 다른 아미노산 서열 위치를 시스테인으로 의도적으로 돌연변이시키는 것이 가능하다. 생성된 티올 모이어티는 뮤테인을 폐길화(PEGylate) 또는 헤실화(HESylate)하기 위해, 예를 들어, 각각의 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0152] 또한 새로운 반응기를 도입하기 위해, 예를 들어, 다른 화합물, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 전분(HES), 바이오틴, 웨პ타이드 또는 단백질에 대한 컨쥬게이션을 위해, 또는 비천연 유래 이황화 결합의 형성을 위해 다른 아미노산 서열 위치를 시스테인으로 돌연변이시키는 것이 가능하다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 상기 모이어티 중 하나가 본 개시내용의 뮤테인에 컨쥬게이팅된다면, 아미노산 측쇄에 대한 컨쥬게이션이 유리할 수 있다. 적합한 아미노산 측쇄는 hNGAL의 아미노산 서열에서 자연적으로 발생될 수 있거나 또는 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 적합한 결합 부위가 돌연변이유발을 통해 도입되는 경우에, 한

가지 가능성은 적절한 위치에서 시스테인 잔기에 의한 아미노산의 대체이다.

[0154] 인간 리포칼린 2의 뮤테인에 대해, 인간 리포칼린 2 뮤테인을 포함하는 리포칼린의 아미노산 서열 내로 시스테인 잔기를 도입하기 위한 이러한 돌연변이의 예시적인 가능성은 인간 NGAL의 야생형 서열의 서열 위치 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 146 또는 158에 대응하는 서열 위치 중 적어도 하나에서 시스테인(Cys) 잔기의 도입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 인간 리포칼린 2 뮤테인은, 스위스 프롯/유니프롯 데이터뱅크 수탁 번호 P80188의 서열에 비교하여, 시스테인이 다른 아미노산 잔기로 대체되고, 대응하는 시스테인이 서열 내로 재도입될 수 있는 서열을 가진다. 예로서, 아미노산 위치 87에서 시스테인 잔기는 이러한 경우에 본래 SWISS-PROT 수탁 번호 P80188의 서열에서 존재하는 시스테인으로 되돌아감으로써 도입될 수 있다. 임의의 아미노산 위치 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 146 및/또는 158의 측면에서 생성된 티올 모이어티는 뮤테인을 폐길화 또는 혜실화시키기 위해, 예를 들어, 각각의 인간 리포칼린 2 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0155] 다른 실시형태에서, 본 개시내용에 따른 뮤테인에 상기 화합물 중 하나의 컨쥬게이팅을 위한 적합한 아미노산 측쇄를 제공하기 위해, 인공 아미노산이 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 일반적으로, 이러한 인공 아미노산은 더 반응성이 되고, 그에 따라 목적으로 하는 화합물에 대한 컨쥬게이션을 용이하게 하도록 설계된다. 인공 tRNA를 통해 도입될 수 있는 이러한 인공 아미노산의 일 예는 파라-아세틸-페닐알라닌이다.

[0156] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 뮤테인은 그의 N-말단 또는 그의 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 웨타이드, 예를 들어, 신호 서열 및/또는 친화도 태그에 대해 융합될 수 있다.

[0157] 친화도 태그, 예컨대 스트렙-태그® 또는 스트렙-태그® II(Schmidt, T.G.M. et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 753-766), myc-태그, FLAG-태그, His<sub>6</sub>-태그 또는 HA-태그 또는 단백질, 예컨대 글루타티온-S-트랜스퍼라제는 또한 재조합 단백질의 용이한 검출 및/또는 정체를 허용하며, 적합한 융합 상태의 추가적인 예이다. 최종적으로, 색원체 또는 형광 특성을 갖는 단백질, 예컨대 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 황색 형광 단백질(YFP)은 본 개시내용의 뮤테인에 대해서도 적합한 융합 상태이다.

[0158] 일반적으로, 화학적, 물리적, 광학적 또는 효소적 반응에서 검출 가능한 화합물 또는 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 생성하는 임의의 적절한 화학 물질 또는 효소를 이용하여 본 개시내용의 뮤테인을 표지하는 것이 가능하다. 물리적 반응 및 동시에 광학적 반응/마커에 대한 예는 방사성 표지를 이용할 때 X-선의 조사 또는 방출시 형광의 방출이다. 알칼리성 포스파타제, 겨자무과산화효소 및  $\beta$ -갈락토시다제는 색원체 반응 산물의 형성을 촉매하는 효소 표지(및 동시에 광학적 표지)의 예이다. 일반적으로, 항체에 대해 통상적으로 사용되는 모든 표지(면역글로불린의 Fc 부분에서 당 모이어티와 함께 배타적으로 사용되는 것을 제외)는 또한 본 개시내용의 뮤테인에 대한 컨쥬게이션을 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용의 뮤테인은 또한 임의의 적합한 치료적 활성제, 예를 들어, 주어진 세포, 조직 또는 기관에 대해 이러한 제제의 표적화된 전달을 위해 또는, 예를 들어, 주위의 정상 세포에 영향을 미치는 일 없이 종양 세포의 세포 선택적 표적화를 위해 컨쥬게이팅될 수 있다. 이러한 치료적 활성제의 예는 방사성핵종, 독소, 소유기 분자, 및 치료적 웨타이드(예컨대, 주어진 세포 표적 상에서 단백질 결합 부위와 경쟁하는 세포 표면 수용체 또는 웨타이드의 작용제/길항제로서 작용하는 웨타이드)를 포함한다. 그러나, 본 개시내용의 뮤테인은 또한 치료적으로 활성인 핵산, 예컨대 안티센스 핵산 분자, 작은 간접 RNA, 마이크로 RNA 또는 리보자임과 컨쥬게이팅될 수 있다. 이러한 컨쥬게이트는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0159] 상기 표시된 바와 같이, 본 개시내용의 뮤테인은, 일부 실시형태에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티에 컨쥬게이팅될 수 있다(이와 관련하여 또한 국제 특허 출원 공개 WO 2006/56464, 이러한 컨쥬게이션 전략은 CTLA-4에 대해 결합 친화도를 갖는 인간 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린의 뮤테인에 대해 기재함). 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티는 단지 몇 가지 예를 들면, 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드록시에틸 전분, 지방산 분자, 예컨대 팔미트산(Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9), 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 일부민 결합 웨타이드, 또는 일부민 결합 단백질, 트랜스페린일 수 있다. 일부민 결합 단백질은 박테리아 일부민 결합 단백질, 항체, 도메인 항체를 포함하는 항체 단편(예를 들어, 미국 특허 제6,696,245호 참조), 또는 일부민에 대해 결합 활성을 갖는 뮤테인일 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 뮤테인의 반감기를 연장시키기 위한 적합한 컨쥬게이션 상태는 일부민 결합 단백질, 예를 들어, 박테리아 일부민 결합 도메인, 예컨대 연쇄상구균 단백질 G 중 하나를 포함한다(Konig, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). 컨쥬게이션 상태로서 사용될 수 있는 일부민 결합 웨타이드의 다른 예는 미국 특허 제2003/0069395호(본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨) 또는 데니스(Dennis) 등(문헌[Dennis, M.

S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35035-35043]에 기재되어 있는 바와 같이, 예를 들어, Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 공통서열을 갖는 것이며, 여기서 Xaa<sub>1</sub>은 Asp, Asn, Ser, Thr, 또는 Trp이고; Xaa<sub>2</sub>는 Asn, Gln, His, Ile, Leu, 또는 Lys이며; Xaa<sub>3</sub>은 Ala, Asp, Phe, Trp, 또는 Tyr이고; Xaa<sub>4</sub>는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser 또는 Thr이다.

[0160] 다른 실시형태에서, 알부민 그 자체(Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548), 또는 알부민의 생물학적 활성 단편은 본 개시내용의 뮤테인의 컨쥬게이션 상대로서 사용될 수 있다. 용어 "알부민"은 모든 포유류 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민 또는 소 혈청 알부민 또는 래트 알부민을 포함한다. 알부민 또는 이의 단편은 미국 특허 제5,728,553호 또는 유럽 특허 출원 제0 330 451호 및 제0 361 991호(본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 재조합적으로 생성될 수 있다. 재조합 인간 알부민(리콤부민(Recombumin)®) 노보자임 델타 리미티드(Novozymes Delta Ltd.) (영국에 소재한 노팅엄)는 뮤테인의 반감기를 연장시키기 위해 본 개시내용의 뮤테인에 컨쥬게이팅 또는 융합될 수 있다.

[0161] 알부민-결합 단백질이 항체 단편이라면, 이는 도메인 항체일 수 있다. 도메인 항체(dAb)가 최적의 안전성 및 효능 생성물 프로파일을 생성하기 위해 생물리학적 특성 및 생체내 반감기에 걸쳐 정확한 제어를 허용하도록 공학 처리된다. 도메인 항체는, 예를 들어 도만티스 리미티드(Domantis Ltd.) (영국 캠브릿지 및 미국 매사추세츠주에 소재)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0162] 본 개시내용의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티로서 트랜스페린을 이용하여, 뮤테인은 비글리코실화된 트랜스페린의 N 또는 C 말단, 또는 둘 다에 유전자 축합될 수 있다. 비글리코실화된 트랜스페린은 반감기가 14 내지 17일이며, 트랜스페린 융합 단백질은 유사하게 연장된 반감기를 가질 것이다. 트랜스페린 담체는 또한 높은 생체이용가능성, 생체 분포 및 순환 안정성을 제공한다. 이 기술은 바이오렉시스(BioRexis) (미국 펜실베이니아주에 소재한 바이오렉시스 파마슈티칼스 코포레이션(BioRexis Pharmaceutical Corporation))로부터 상업적으로 입수 가능하다. 단백질 안정제/반감기 연장 상대로서 사용하기 위한 재조합 인간 트랜스페린(델타페린(DeltaFerrin)(상표명))은 노보자임 델타 리미티드(영국 노팅엄에 소재)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0163] 면역글로불린의 Fc 부분이 본 개시내용의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키기 위한 목적을 위해 사용된다면, 신토닉스 파마슈티칼스 인코포레이티드(Syntonix Pharmaceuticals, Inc) (미국 매사추세츠주에 소재)로부터 상업적으로 입수 가능한 신퓨전(SynFusion)(상표명) 기법이 사용될 수 있다. 이 Fc-융합 기법의 사용은 더 길게 작용하는 바이오약품의 생성을 허용하며, 예를 들어, 약동학, 용해도 및 생성 효율을 개선시키기 위해 항체의 Fc 영역에 연결된 뮤테인의 2개 복제물로 이루어질 수 있다.

[0164] 본 개시내용의 뮤테인의 반감기를 연장시키기 위한 또 다른 대안은 긴, 비구조화된, 가요성 글리신-풍부 서열(예를 들어 약 20 내지 80개의 연속적인 글리신 잔기를 갖는 폴리 글리신)을 뮤테인의 N- 또는 C-말단에 융합시키는 것이다. WO2007/038619에서 개시된 이런 접근은, 예를 들어, 또한 용어 "rPEG"(재조합 PEG)였다.

[0165] 폴리알킬렌 글리콜이 컨쥬게이션 상대로서 사용된다면, 폴리알킬렌 글리콜은 치환, 비치환, 선형 또는 분지형일 수 있다. 이는 또한 활성화된 폴리알킬렌 유도체일 수 있다. 적합한 화합물의 예는 인터페론과 관련하여 WO 99/64016에서, 미국 특허 제6,177,074호에서 또는 미국 특허 제6,403,564호에서 기재된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자, 또는 다른 단백질, 예컨대 PEG-변형 아스파라기나제, PEG-아데노신 데아미나제(PEG-ADA) 또는 PEG-수퍼옥사이드 디스무타제에 대해 기재된 바와 같다(예를 들어, 문헌[Fuertges et al. (1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins* J. Control. Release 11, 139-148] 참조). 이러한 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 300 내지 약 70,000 달톤의 범위일 수 있으며, 예를 들어, 분자량이 약 10,000, 약 20,000, 약 30,000 또는 약 40,000 달톤인, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 게다가, 예를 들어 미국 특허 제6,500,930호 또는 제6,620,413호에 기재된 바와 같이, 탄수화물 올리고- 및 중합체, 예컨대 전분 또는 하이드록시에틸 전분(HES)은 혈청 반감기 연장의 목적을 위해 본 개시내용의 뮤테인에 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0166] 추가로, 본 명세서에 개시된 뮤테인은 모이어티에 축합될 수 있고, 다른 분자에 대한 효소적 활성 또는 결합 친화도와 같은 본 개시내용의 뮤테인의 새로운 특징을 부여할 수 있다. 적합한 융합 상대의 예는 알칼리성 포스파타제, 겨자무과산화효소, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 단백질 G의 알부민-결합 도메인, 단백질 A, 항체 단편, 올리고머 도메인 또는 독소이다.

[0167] 특히, 얻어진 융합 단백질의 "성분"이 둘 다 주어진 치료적 표적 상에서 함께 작용하도록 별개의 효소 활성 부위와 함께 본 명세서에 개시된 뮤테인을 융합하는 것을 가능하게 할 수 있다. 뮤테인의 결합 도메인은 질환 원

인 표적에 부착하여, 효소 도메인이 표적의 생물학적 기능을 없애게 한다.

- [0168] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 뮤테인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자(DNA 및 RNA)에 관한 것이다. 유전자 암호의 축중이 특정 아미노산의 동일한 아미노산을 구체화하는 다른 코돈으로의 치환을 허용하기 때문에, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 바와 같이 뮤테인을 암호화하는 특정 핵산 분자로 제한되지 않지만, 기능성 뮤테인을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 모든 핵산 분자를 포함한다. 이와 관련하여, 본 개시내용은 본 개시내용의 일부 뮤테인을 암호화하는 서열번호 21 내지 34에 나타낸 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0169] 본 개시내용의 일 실시형태에서, 상기 방법은 인간 NGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(서열번호 16) 서열 위치 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 및 134에 대응하는 서열 위치 중 적어도 하나 또는 심지어 그 이상에 대한 뉴클레오타이드 3개쌍 암호에서 핵산 분자에 돌연변이유발을 실시하는 단계를 포함한다.
- [0170] 본 개시내용은 또한 실험적 돌연변이유발의 표시된 서열 위치 밖에서 추가적인 돌연변이를 포함하는, 본 개시내용의 뮤테인을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 이러한 돌연변이는 종종 용인되거나 또는 심지어, 예를 들어 그들이 뮤테인의 개선된 폴딩 효율, 혈청 안정성, 열 안정성 또는 리간드 결합 친화도에 유리하게 되는 것으로 증명될 수 있다.
- [0171] 본 출원에서 개시된 핵산 분자는 이 핵산 분자를 발현시키는 조절 서열(또는 조절 서열들)에 "작동 가능하게 연결"될 수 있다.
- [0172] 핵산 분자, 예컨대 DNA는, 그것이 전사 및/또는 번역 조절에 관한 정보를 포함하는 서열 요소를 포함한다면, "핵산 분자를 발현시킬 수 있는" 또는 "뉴클레오타이드 서열을 발현시킬 수 있는"으로 언급되며, 이러한 서열은 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 "작동 가능하게 연결"된다. 작동 가능한 결합은 조절 서열 요소 및 발현될 서열이 유전자 발현을 가능하게 하는 방법으로 연결되는 결합이다. 유전자 발현에 필수적인 조절 영역의 정확한 특성은 종마다 다를 수 있지만, 일반적으로 이들 영역은 원핵생물에서, 프로모터 그 자체, 즉, 전사의 개시를 지시하는 DNA 요소뿐만 아니라 RNA로 전사될 때 전사의 개시를 신호전달할 DNA 요소를 둘 다 포함하는 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터 영역은 정상적으로는 전사 및 번역의 개시에 수반된 5' 비암호 서열, 예컨대 -35/-10 박스 및 원핵생물에서 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 요소 또는 진핵생물에서 TATA 박스, CAAT 서열 및 5'-캡핑 요소를 포함한다. 이들 영역은 또한 숙주 세포의 특정 구획에 대해 천연 폴리펩타이드를 표적화하기 위한 인핸서 또는 리프레서 요소뿐만 아니라 번역된 신호 및 리더 서열을 포함할 수 있다.
- [0173] 추가로, 3' 비암호 서열은 전사 종결, 폴리아데닐화 등에 연루된 조절 요소를 포함할 수 있다. 그러나, 이들 종결 서열이 특정 숙주 세포에서 만족스럽게 기능하지 않는다면, 그들은 해당 세포에서의 신호 기능으로 치환될 수 있다.
- [0174] 따라서, 본 개시내용의 핵산 분자는 조절 서열, 예컨대 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 본 개시내용의 핵산 분자는 프로모터 서열 및 전사 종결 서열을 포함한다. 적합한 원핵생물 프로모터는, 예를 들어, *tet* 프로모터, *lacUV5* 프로모터 또는 *T7* 프로모터이다. 진핵생물 세포에서 발현에 유용한 프로모터의 예는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.
- [0175] 본 개시내용의 핵산 분자는 또한 백터 또는 임의의 다른 종류의 클로닝 비히클, 예컨대 플라스미드, 파지미드, 파지, 바큘로바이러스, 코스미드 또는 인공 염색체의 부분일 수 있다.
- [0176] 일 실시형태에서, 핵산 분자는 파지미드에 포함된다. 파지미드 백터는 용원성 파지의 유전자간 영역, 예컨대 M13 또는 f1, 또는 관심 대상의 cDNA에 융합된 이의 기능성 부분을 암호화하는 백터를 나타낸다. 이러한 파지미드 백터 및 적절한 헬퍼 파지(예를 들어, M13K07, VCS-M13 또는 R408)에 의한 박테리아 숙주 세포의 초감염 후에, 무손상 파지 입자가 생성됨으로써, 암호화된 이종성 cDNA가 파지 표면 상에 나타난 그의 대응하는 폴리펩타이드에 물리적으로 결합할 수 있게 한다(예를 들어, 문헌[Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401 -424, 또는 Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93] 참조).
- [0177] 이러한 클로닝 비히클은 상기 기재한 조절 서열 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 뮤테인을 암호화하는 핵산 서열을 제외하고, 발현을 위해 사용되는 숙주 세포와 양립 가능한 종으로부터 유래된 복제 및 제어 서열뿐만 아니라 형질전환 또는 형질감염된 세포에 대해 선택 가능한 표현형을 부여하는 선택 마커를 포함할 수 있다. 다수의

적합한 클로닝 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 상업적으로 입수 가능하다.

[0178] 본 명세서에 기재된 바와 같은 뮤테인을 암호화하는 DNA 문자, 및 특히 이러한 뮤테인의 암호 서열을 포함하는 클로닝 벡터는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포로 형질전환될 수 있다. 형질전환은 표준 기법을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0179] 형질전환된 숙주 세포는 본 개시내용의 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 조건 하에서 배양된다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)(이콜라이(*E. coli*)) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 또는 진핵생물, 예컨대 사카로마이세스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 퍼키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), SF9 또는 High5 곤충 세포, 불멸 포유류 세포주(예를 들어, HeLa 세포 또는 CHO 세포) 또는 1차 포유류 세포일 수 있다.

[0180] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 뮤테인의 생성을 위한 방법에 관한 것이되, 뮤테인 또는 폴리펩타이드, 뮤테인의 단편 또는 뮤테인의 융합 단백질은 유전자 공학처리 방법에 의해 뮤테인 또는 폴리펩타이드에 대한 핵산 암호화로부터 시작하여 생성된다. 상기 방법은 생체내에서 수행될 수 있고, 뮤테인 또는 폴리펩타이드는, 예를 들어 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체에서 생성될 수 있으며, 이어서, 이 숙주 유기체 또는 그의 배양물로부터 단리된다. 또한, 예를 들어 시험관내 번역 시스템의 사용에 의해 시험관내에서 단백질을 생성하는 것이 가능하다.

[0181] 생체내 뮤테인을 생성할 때, 이러한 뮤테인 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 재조합 DNA 기법(상기에 이미 약술한 바와 같음)에 의해 적합한 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체 내로 도입된다. 이 목적을 위해, 숙주 세포는 처음에 확립된 표준 방법을 이용하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 뮤테인을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 벡터로 형질전환된다. 이어서, 숙주 세포는 이종성 DNA를 발현을 허용하고, 따라서, 대응하는 폴리펩타이드의 합성을 허용하는 조건 하에서 배양된다. 후속적으로, 폴리펩타이드는 세포로부터 또는 배양 배지로부터 회수된다.

[0182] 일부 실시형태에서, 본 출원에 개시된 핵산 분자, 예컨대 DNA는 본 개시내용의 융합 단백질의 발현을 허용하기 위해 다른 본 개시내용의 핵산 분자에 "작동 가능하게 연결"될 수 있다. 이와 관련하여, 작동 가능한 결합은 제1 핵산 분자의 서열 요소 및 제2 핵산 분자의 서열 요소가 단일 폴리펩타이드로서 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 방법으로 연결되는 결합이다.

[0183] 추가로, 일부 실시형태에서, Cys 76과 Cys 175 사이의 천연 유래 이황화 결합은 본 개시내용의 hNGAL 뮤테인에서 제거될 수 있다. 따라서, 이러한 뮤테인은 환원성 산화환원 환경을 갖는 세포 구획에서, 예를 들어, 그램 음성 박테리아의 세포질에서 생성될 수 있다.

[0184] 본 개시내용의 뮤테인이 분자내 이황화 결합을 포함하는 경우에, 적절한 신호 서열을 이용하여 산화성 산화환원 환경을 갖는 세포 구획에 초기 폴리펩타이드를 보내는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 산화 환경은 그램 양성 박테리아의 세포외 환경에서 또는 진핵생물 세포의 내형질 망상 조직에서 그램 음성 박테리아, 예컨대 이콜라이의 주변질에 의해 제공될 수 있으며, 보통 구조적 이황화 결합의 형성을 선호한다.

[0185] 그러나, 또한 숙주 세포, 바람직하게는 이콜라이의 사이토졸에서 본 개시내용의 뮤테인을 생성하는 것이 가능하다. 이 경우에, 뮤테인 또는 폴리펩타이드는 가용성 및 폴딩 상태로 직접적으로 얻어질 수 있거나 봉입체 형태, 다음에 시험관내 복원으로 회수될 수 있다. 추가적인 선택은 산화적 세포내 환경을 갖는 특정 숙주 균주의 사용인데, 이는 이렇게 해서 사이토졸 내 이황화 결합의 형성을 허용할 수 있다(Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 1-8.).

[0186] 그러나, 본 명세서에 기재된 바와 같은 뮤테인 또는 폴리펩타이드는 반드시 유전자 공학 처리의 사용에 의해서만 만들어지거나 또는 생성되지 않을 수도 있다. 오히려, 이러한 뮤테인 또는 폴리펩타이드는 또한 메리필드 (Merrifield) 고체상 폴리펩타이드 합성과 같은 화학적 합성에 의해 또는 시험관내 전사 및 번역에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 유망한 돌연변이가 분자 모델링을 이용하여 동정되고, 이어서 원하는(목적으로 하는) 시험관내 폴리펩타이드를 합성하고, Ang-2에 대한 결합 활성을 조사하는 것이 가능하다. 단백질의 고체상 및/또는 용액상 합성을 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 29-43] 참조).

[0187] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 뮤테인 또는 폴리펩타이드는 당업자에게 공지된 잘 확립된 방법을 이용하여

시험관내 전사/번역에 의해 생성될 수 있다.

[0188] 당업자는 본 개시내용에 의해 상정되는 뮤테인 또는 이의 폴리펩타이드를 제조하는 데 유용한 방법을 인식할 것 이지만, 이의 단백질 또는 핵산 서열은 본 명세서에 명확하게 개시되어 있지 않다. 검토로서, 아미노산 서열의 이러한 변형은 특정 제한 효소에 대해 절단 부위를 혼입함으로써 돌연변이된 hNGAL 유전자 또는 그의 부분의 서브클로닝을 단순화하기 위해, 예를 들어 단일 아미노산 위치의 관련된 돌연변이 유발을 포함한다. 추가로, 이들 돌연변이는 또한 그의 표적(예를 들어, 각각 Ang-2 또는 Ang-1)에 대한 뮤테인의 친화도를 추가로 개선시키기 위해 혼입될 수 있다. 더 나아가, 돌연변이는 필요하다면, 폴딩 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 물 용해도를 개선시키기 위해 또는 응집 경향을 감소시키기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, 천연 유래 시스테인 잔기는 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다.

[0189] 본 명세서에 개시된 뮤테인 또는 이의 폴리펩타이드 및 그들의 유도체는 항체 또는 이의 단편과 유사한 다수의 분야에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 효소, 항체, 방사성 물질 또는 생화학적 활성 또는 정해진 결합 특징을 갖는 임의의 다른 그룹으로 표지를 위해 뮤테인이 사용될 수 있다. 이를 위하여, 그들의 각각의 표적 또는 이의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질은 검출되거나 또는 그들과 접촉될 수 있다. 추가로, 본 개시내용의 뮤테인 또는 이의 폴리펩타이드는 확립된 분석 방법(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블로트) 또는 현미경법 또는 면역센서에 의해 화학적 구조를 검출하는 역할을 할 수 있다. 이와 관련하여, 검출 신호는 적합한 뮤테인 컨쥬게이트 또는 융합 단백질의 사용에 의해 직접적으로 또는 항체를 통해 뮤테인에 결합된 면역화학적 검출에 의해 간접적으로 생성될 수 있다.

[0190] 본 개시내용의 추가적인 목적, 이점 및 특징은 제한하는 것으로 의도되지 않는 다음의 실시예 및 이의 부착되는 도면의 실현 시 당업자에게 명확하게 될 것이다. 따라서, 본 개시내용이 예시적인 실시형태 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되지만, 본 명세서에 구현된 본 개시내용의 변형 및 변화는 당업자에 의해 의존될 수 있고, 이러한 변형 및 변화는 본 개시내용의 범주 내인 것으로 고려된다는 것이 이해되어야 한다.

## V. 실시예

### 0192] 실시예 1: Ang-2에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선택

[0193] 인간 Ang-2에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선택을 위해 성숙 hNGAL의 무작위 돌연변이유발에 의해 생성된 라이브리리를 사용하였다.

[0194] 이들 라이브리리로부터의  $2 \times 10^{12}$  개 파지미드를 200nM 바이오틴일화된 인간 Ang-2(알엔디 시스템(R & D System))과 함께 인큐베이션시켰다. 뉴트라비딘 또는 스트랩타비딘으로 코팅한 상자성 비드를 사용하여 표적/파지미드 복합체를 포획하고, 이를 후속적으로 자석을 이용하여 단리시켰다. PBST 또는 PBS를 이용하여 비드를 세척함으로써 비결합 파지미드를 제거하였다. 결합 파지미드를 300 $\mu$ l의 70mM 트라이에틸아민을 이용하여 처음 용리시킨 후에, 100 $\mu$ l의 1M 트리스-C1 pH 6.0을 이용하여 상청액을 즉시 중화시켰다. 1회 즉시의 세척 주기 후에, 남아있는 파지미드를 100mM 글리신 pH 2.2를 이용하여 10분 동안 용리시킨 다음, 50 $\mu$ l의 0.5M 트리스-염기를 이용하여 즉시 중화시켰다. 용리 분획을 둘 다 풀링하고 나서, 재증폭을 위해 4mL의 이콜라이 XL1-블루 배양물을 감염시키기 위해 사용하였다.

[0195] 4회의 연속적인 라운드의 선택을 수행하였다. 제4 선택 라운드의 산출물로 감염시킨 이콜라이 세포로부터 파지미드 DNA를 제조하였고, hNGAL 뮤테인 카세트를 분해에 의해 단리시켰다. hNGAL 뮤테인 카세트를 마찬가지로 절단 벡터 내로 삽입하고, 테트라사이클린 프로모터의 제어 하에 상기 hNGAL 뮤테인의 박테리아 생성을 허용하였다. CaCl<sub>2</sub>-적격 TG1-F' 세포를 결찰 혼합물과 함께 형질전환시키고, LB/Amp 플레이트 상에 플레이팅하였다.

[0196] Ang-2 특이적 뮤테인의 최적화를 위해, 뮤테인 서열번호 1 및 서열번호 3에 기반하여 추가적인 라이브리리를 생성하였다. 선택 위치의 편향된 무작위화 또는 오류 유발 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기반 방법 중 하나를 이용하여 라이브리리를 생성하였다. 최적화된 뮤테인의 선택을 염격성이 증가된 것을 제외하고 상기 기재한 바와 같이 제조하였다.

### 0197] 실시예 2: 고속대량 ELISA 선별을 이용하여 Ang-2에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 동정

[0198] 개개 콜로니를 사용하여 2xYT/Amp 배지를 접종하고 나서, 정지상까지 밤새(14 내지 18시간) 성장시켰다. 후속적으로, 50 $\mu$ l의 2xYT/Amp를 정지상 배양물로부터 접종하고 나서, 3시간 동안 37°C에서 인큐베이션시키고, 이어서, 0.6 내지 0.8의 OD595에 도달될 때까지 22°C로 이동시켰다. 1.2 $\mu$ g/mL 안하이드로테트라사이클린으로 보충한 10 $\mu$ l의 2xYT/Amp의 첨가에 의해 뮤테인의 생성을 유도하였다. 다음날까지 배양물을 22°C에서 인큐베이션시켰다.

PBS/T 중의  $40\mu\ell$ 의 5%(w/v) BSA의 첨가 및 1시간 동안 25°C에서 인큐베이션 후에 선별 분석에서 사용을 위해 배양물을 준비하였다.

[0199] 인간 Ang-2에 대한 단리된 뮤테인의 특이적 결합을 미량정량판 상에서 4°C에서 밤새 뉴트라비딘과 스트렙타비딘의 1:1 혼합물(PBS 중의  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 코팅함으로써 시험하였다. PBST 중의 2% BSA로 1시간 동안 플레이트를 차단한 후에, PBS/T 중의  $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 코팅된 미량정량판 상에서 선택을 위해 사용한 바이오텐일화된 표적을 포획하였다. 바이오텐일화된 표적 없이 동일한 방식으로 코팅한 플레이트를 선별에서 음성 대조군 표적으로서 사용하였다. 후속적으로,  $20\mu\ell$ 의 BSA-차단된 배양물을 포획 표적 또는 알도스테론 중 하나를 함유하는 코팅 미량정량판에 첨가하고 나서, 1시간 동안 25°C에서 인큐베이션시켰다. 겨자무과산화효소(뵈팅겐에 소재한 IBA)와 컨쥬게이팅된 항-스트렙 태그 항체와 함께 1시간 인큐베이션 후에 결합된 뮤테인을 검출하였다. 정량화를 위해,  $20\mu\ell$ 의 퀀타블루(Quantablu) 형광원 폐록시다제 기질을 첨가하고 나서, 여기 과장 320nm 및 방출 과장 430nm에서 형광을 결정하였다. 이어서, Ang-2에 특이적으로 결합하는 뮤테인을 시퀀싱하였다.

[0200] 친화도 및 안정성이 증가된 뮤테인을 선택하기 위해, i) 감소된 항원 농도 및/또는 ii) Tie-2 Fc(렐리아테크(Reliatech))와의 경쟁 및/또는 iii) 표적 플레이트에 대한 첨가 전에 65°C 또는 70°C에서 선별 상청액의 인큐베이션 및/또는 iv) 역선별 형식을 이용하여 선별을 수행하고, 항-스트렙태그 항체(퀴아젠(Qiagen))로 코팅한 미량정량판 상의 스트렙태그를 통해 뮤테인을 포획하고 나서, 상이한 농도의 표적을 첨가하고, HRP-표지 항-His-태그 항체(어빔(Abeam))를 통해 검출하였다.

#### [0201] 실시예 3: 뮤테인의 발현

[0202] 독특한 뮤테인을 스트렙-태그® II를 포함하는 C-말단 서열(서열번호 15)을 이용하여 발현시키고, 스트렙-탁틴(Strep-Tactin) 친화도 크로마토그래피 및 분취 크기 배제 크로마토그래피를 이용하는 발현 후에 뮤테인을 정제하기 위해 2YT-Amp 배지에서 적용 가능하였다.

#### [0203] 실시예 4: ELISA 기반 상황에서 Ang-2에 대한 뮤테인의 친화도

[0204] 뮤테인의 결합을 샌드위치 ELISA 분석에 의해 시험하였다. 상세하게는, 형광 측정에 적합한 384-웰 플레이트(그레이너(Greiner) 플루오틴트랙(FLUOTRAC)(상표명) 600, 검정색 편평 바닥, 고결합)를 4°C에서 밤새 PBS 중에서  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로  $20\mu\ell$ 의 Ang-2로 코팅하였다. 세척한 후에, 0.1% 트윈(Tween) 20 및 2% BSA(PBS-T/BSA)를 함유하는  $100\mu\ell$ 의 차단 완충제를 이용하여 Ang-2-코팅 웰을 실온에서 1시간 동안 차단하였다.

[0205]  $20\mu\ell$ 의 연속희석된 뮤테인을 PBS-T/BSA 1시간 동안 실온(RT)에서 인큐베이션시켰다.

[0206] 잔여 상청액을 폐기하고 나서,  $20\mu\ell$ 의 HRP-표지된 항-스트렙태그 항체를 PBS-T/BSA 중에서 사전 결정한 최적 농도로 첨가하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척한 후에,  $20\mu\ell$ 의 형광원 HRP 기질(퀀타블루(Quantablu), 씨모(Thermo))을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 반응을 15 내지 60분 동안 진행시켰다. 형광 미량정량판 판독기(테칸(Tecan) 또는 몰레큘러 디바이시즈(Molecular Devices))를 이용하여 플레이트 상의 모든 웰의 형광 강도를 판독하였다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 4 소프트웨어를 이용하여 곡선 적합화를 수행하였다. 얻어진 EC50 값을 이하의 표 1에서 요약한다.

표 1

뮤테인 서열번호	EC50 평균 [nM]
서열번호 1	3.7
서열번호 2	3
서열번호 3	2.8
서열번호 5	3.5
서열번호 7	2.1
서열번호 8	2.4
서열번호 9	2.1
서열번호 11	2.3

[0207]

[0208] 실시예 5: Ang-2에 결합하는 리포칼린 뮤테인 작용의 경쟁적 방식

선택된 뮤테인이 경쟁적 방식에서 인간 Ang-2에 결합하는지의 여부를 경쟁 ELISA 형식 분석을 이용하여 시험관내에서 시험하였다(도 1에서 예시적인 리포칼린 뮤테인 참조). 본 실험에서, 일정 농도의 인간 Ang-2를 다양한 농도의 리포칼린 뮤테인과 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 용액 중에서 이를 사전 인큐베이션한 후에, 리포칼린 뮤테인/Ang-2 혼합물의 분취액을 인간 Tie-2 수용체로 코팅한 ELISA 플레이트에 옮겨서 hTie-2에 결합하기 위해 차단되지 않은 hAng-2 농도를 측정하였다.

[0210] 300rpm에서 진탕하면서 모든 인큐베이션 단계를 수행하고 나서, 바이오텍(Biotek) EL405 셀렉트 CW 세척기(바이오텍)를 이용하여  $80\mu\text{l}$ 의 PBS-T 완충제(PBS, 0.05% 트윈 20)와 함께 각각 인큐베이션하는 단계 후에 5회 동안 플레이트를 세척하였다. 제1 단계에서, 384 웰 플레이트를 PBS 중에서 4°C에서 밤새  $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로  $20\mu\text{l}$ 의 가용성 인간 hTie-2 Fc(렐리아테크)로 직접 코팅하였다. 세척한 후에, hTie-2 Fc 코팅 웰을  $60\mu\text{l}$ 의 PBS-T/BSA(0.1% 트윈 20을 함유하는 PBS 중의 2% BSA)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 차단하였다.

[0211] 고정된 농도의 0.5 nM 인간 Ang-2를, 적합한 시작 농도를 이용하여 PBS-T/BSA 완충제 중의 피코몰 범위에 이르기 까지 1:3 비로 연속희석한 다양한 농도의 서열번호 1 내지 14, 또는 음성 대조군으로서 서열번호 16 및 양성 대조군으로서 기준점 항체 1 및 2(각각 서열번호 17/18 및 19/20)와 함께 용액 중에서 인큐베이션시켰다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후에, 실온에서 20분 동안 비결합(유리) 또는 비경쟁적으로 결합된 hAng-2를 포획하기 위해 hTie-2 Fc-코팅 플레이트에  $20\mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을 옮겼다. ELISA 판독 결과의 절대 유리 Ang-2 농도로의 전환을 허용하기 위해(이하 참조), 다양한 농도의 hAng-2를 함유하는 표준 곡선을 PBS-T/BSA에서 제조하고, 동일한 플레이트 상에서도 20분 동안 인큐베이션시켰다.

[0212] 결합 hAng-2의 검출 및 정량화를 허용하기 위해, 잔여 상청액을 폐기하고 나서,  $20\mu\text{l}$ 의 항-HIS-태그 HRP-표지 항체를 PBS-T/BSA 중의 농도에서 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 세척 후에,  $20\mu\text{l}$ 의 퀸타 블루를 각각의 웰에 첨가하고 나서, 모든 웰의 형광 강도를 형광 미량정량판 판독기(테칸 및 몰레클러디바이어스)를 이용하여 판독하였다.

[0213] 다음과 같이 평가를 수행하였다: 유리 hAng-2 농도  $c(\text{Ang-2})_{\text{유리}}$ 를 (병행하여 결정한 표준 곡선으로부터) 계산하고, 서열번호 1 내지 14, 16, 및 기준점 항체 1 및 2(각각 서열번호 17/18 및 19/20) 농도,  $c(\text{서열번호 1 내지 14, 16, 17/18 및 19/20})$ 에 대해 플로팅하였다. hAng-2/hTie-2 Fc-복합체의 형성이 50%만큼 차단되는 서열번호 1 내지 14, 16, 17/18 및 19/20 농도(IC50)를 얻기 위해, 자유 매개변수로서 총 추적자 농도  $c(\text{Ang-2})_{\text{tot}}$  및 IC50 값을 이용하여 곡선을  $c(\text{Ang-2})_{\text{유리}} = c(\text{Ang-2})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{서열번호 1 내지 14, 16, 17/18 및 19/20}) / \text{IC50})$ 에 따라 단일-부위 결합 모델을 이용하는 비선형 회귀에 의해 적합화하였다(도 1에 나타낸 바와 같음). 그래프패드 프리즘 4 소프트웨어를 이용하여 곡선 적합화를 수행하였다. 얻어진 IC50 값을 이하의 표 2에서 요약한다.

표 2

뮤테인 서열번호	IC50 평균 [nM]
서열번호 1	0.5581
서열번호 2	1.711
서열번호 3	0.3194
서열번호 4	0.4123
서열번호 5	0.8613
서열번호 6	0.06273
서열번호 7	0.06193
서열번호 8	0.07083
서열번호 9	0.09287
서열번호 10	0.07940
서열번호 11	0.09877
서열번호 12	0.1312
서열번호 13	0.1842
서열번호 14	0.1054
서열번호 19/20	0.03067
서열번호 17/18	0.01580

[0214]

## 실시예 6: 비아코어에서 결정한 Ang-2에 결합하는 뮤테인의 친화도

[0215] 표면 플라스몬 공명(SPR) 기반 분석에서, 비아코어 T200 기기(GE 헬스케어)를 사용하여 hAng-2에 대한 뮤테인의 결합 친화도를 측정하였다. 적절한 과량의 EZ-링크 NHS-PEG4-바이오틴(써모)를 적용하여 Ang-2 및 음성 대조군(서열번호 16)에 대한 결합을 위해 선택한 뮤테인을 2시간 동안 실온에서 바이오틴일화시켰다. 제조 설명서에 따라 제바 스핀 탈염 플레이트(써모)를 이용하여 비반응 바이오틴으로부터 바이오틴일화된 샘플을 정제하였다.

[0216] SPR 친화도 분석에서, 바이오틴일화된 뮤테인 및 음성 대조군을 바이오틴 포획 키트(GE 헬스케어(GE Healthcare))를 이용하여 센서칩 상에서 포획하였다: 센서칩 캡을 ssDNA 올리고를 이용하여 사전 고정시켰다. 비희석 바이오틴 포획 시약(상보성 ss-DNA 올리고과 컨쥬게이팅된 스트렙타비딘)을  $2\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 300초 동안 적용하였다. 후속적으로,  $0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 바이오틴일화된 뮤테인 또는 음성 대조군을  $5\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속에서 300초 동안 적용하였다. 분석물 Ang-2가 다량체 분자이기 때문에, 최소 리간드 밀도를 지니는 표면을 생성하여 칩 표면 상에서의 2가 상호작용을 최소로 감소시키는 것을 목표로 하였다. 기준 통로에 바이오틴 포획 시약만을 부하하였다.

[0217] 결합 친화도를 결정하기 위해, 1 내지  $27\text{nM}$  범위의 농도로 인간 Ang-2의 4회 희석물을 HBS-EP+ 완충제(GE 헬스케어)에서 제조하고 나서, 제조한 칩 표면에 적용하였다.  $30\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속을 적용하여, 샘플 접촉 시간 180초 및 해리 시간 4600초로 다회 주기 동역학 접근을 사용하였다. 모든 측정을  $25^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다. 센서칩 캡 표면의 시약을  $0.25\text{M NaOH}$ 와 함께  $6\text{M Gua-HCl}$ 의 주입에 의해 달성한 다음, 추가로 실행 완충제 또는 물 및 안정화 기간 120초를 이용하여 세척하였다. 비아코어 T200 평가 소프트웨어(V 1.0)를 이용하여 데이터를 평가하였다. 이중 참조를 사용하였다. 분석물이 다량체인 것으로 알려져 있다고 할지라도 1:1 결합 모델을 사용하여 원 데이터를 적합화하였다.

[0218] 리포칼린 뮤테인의 선택을 위한 얻어진 동역학 상수를 이하의 표 3에 요약한다. 이러한 예시적인 리포칼린 뮤테인(서열번호 7, 8, 9 및 11)을 0.2 내지  $1.4\text{nM}$  범위의 친화도로 인간 Ang-2에 결합하는 한편, 음성 대조군(서열번호 16)에 대해 결합은 검출 가능하지 않다. 10 미만의  $R_{\text{max}}$  값을 지니는 매우 낮은 리간드 밀도를 이용하여 다량체 상호작용을 무시할 만한 수준으로 감소시킨다는 추정에 기반하여 적합화된 값을 유도하였다는 것을 주목

하여야 한다.

### 표 3

뮤테인 서열번호	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [s <sup>-1</sup> ]	KD [nM]	Rmax [RU]
서열번호 9	3.2E+05	9.4E-05	0.29	5.4
서열번호 7	1.8E+05	2.6E-04	1.43	8.1
서열번호 8	3.5E+05	1.3E-04	0.37	6.5
서열번호 11	4.0E+06	8.7E-04	0.21	2.6

[0220]

#### 실시예 7: Ang-1 및 Ang-2에 대한 리포칼린 뮤테인의 특이성 및 종 교차반응성

[0221] 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11)의 및 기준점 항체(서열번호 17/18)의 특이성 및 종 교차반응성을 "용액 경쟁 ELISA" 분석(예시적인 리포칼린 뮤테인 도 2 참조)에 의해 시험하였고, 이의 원칙은 다음과 같았다: 일정한 농도의 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 기준점 항체(서열번호 17/18)를 가변적 농도의 리간드(인간 Ang-2, 인간 Ang-1, 인간 Ang-4, 마우스 Ang2 및 마우스 Ang 3뿐만 아니라 음성 대조군(알앤디 시스템)으로서 hVEGF-A)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 용액 중에서 이를 사전 인큐베이션한 후에, 남아있는 농도의 유리 리포칼린 뮤테인 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11, 및 유리 기준점 항체를 측정하기 위해 고정된 hAng-2를 이용하여 뮤테인/리간드 혼합물의 분취액을 ELISA 플레이트에 옮겼다. 유리(비결합) 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11, 및 유리 기준점 항체의 농도를 정량적 ELISA 설비를 통해 결정하였다. 이 분석은 모든 리간드가 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18 상의 동일한 결합 부위를 표적화한다는 것, 즉, 리간드가 서로 경쟁적으로 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18에 결합한다는 것에 의존한다는 것을 주목한다.

[0222] 다음의 상세한 실험적 프로토콜에서, 인큐베이션 및 세척 단계를 경쟁적 ELISA 프로토콜에서 상기 기재한 바와 같이 수행하였다(실시예 5 참조). 형광 측정에 적합한 384-웰 플레이트(그레이너 플루오락(Greiner FLUOTRAC) (상표명) 600, 검정색 편평 바닥, 고-결합)를 4°C에서 밤새 5µg/ml PBS 중의 20µl의 h 안지오포이에틴 2로 코팅하였다. 세척 후에, Ang-2-코팅 웰을 100µl의 차단 완충제(PBS-T/BSA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다.

[0223] 고정된 농도의 0.1nM의 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18을 적합한 시작 농도를 이용하여 다양한 농도의 리간드(hAng-2, mAng-2, hAn1, mAng-3 및 hAng-4 및 VEGF-A)를 이용하여 PBS-T/BSA 중에서 피코몰 범위에 이르기 까지 1:3 비로 연속희석한 용액 중에서 인큐베이션시켰다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후에, 비결합(유리 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18)을 포획하기 위해 hAng-2에 고정 시 20µl의 반응 혼합물을 실온에서 20분 동안 384-웰 플레이트에 옮겼다. ELISA 판독 결과의 절대 유리 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18 농도(이하 참조)로의 전환을 허용하기 위해, 다양한 농도의 서열번호 1, 3, 7, 8, 9, 11 및 17/18을 함유하는 표준 곡선을 PBS-T/BSA에서 제조하고 나서, 동일한 ELISA 플레이트도 20분 동안 인큐베이션시켰다.

[0224] 잔여 상청액을 폐기하고 나서, 20µl의 HRP-표지 항-리포칼린-뮤테인 항체를 PBS-T/BSA에서 사전 결정한 최적의 농도에서 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 리포칼린 뮤테인의 혼합물을 이용하는 토끼의 면역화에 의해 항-리포칼린-뮤테인 항체를 얻었고, 후속적으로 제조업자의 설명서에 따라 키트(EZ-링크 플러스 활성화 폐록시다제, 씨모 사이언티픽)를 이용하여 HRP에 결합시켜 항체-HRP 컨쥬게이트를 얻었다. 세척 후에, 20µl의 형광원 HRP 기질(퀀타블루, 피어스(Pierce))을 각각의 웰에 첨가하였고, 반응을 60분 동안 진행시켰다. 제니오스 플러스 마이크로플레이트(Genios Plus Microplate) 판독기(테칸)를 이용하여 플레이트 상에서 모든 웰의 형광 강도를 판독하였다. 데이터를 평가하기 위해, 표준 곡선 결과에 기반하여 유리 뮤테인 농도( $c$ (뮤테인)<sub>유리</sub>)를 계산하였고, 리간드 농도( $c$ (리간드))에 대해 플로팅하였다. hAng-2/뮤테인 복합체의 형성이 50%(IC50)만큼 차단되는 리간드 농도를 얻기 위해, 자유 매개변수로서 총 추적자 농도  $c$ (뮤테인)<sub>tot</sub> 및 IC50 값으로  $c$ (뮤테인)<sub>유리</sub> =  $c$ (뮤테인)<sub>tot</sub>/(1 +  $c$ (리간드)/IC50))에 따라 단일-부위 결합 모델을 이용하는 비선형 회귀에 의해 곡선을 적합화하였다. 그래프패드 프리즘 4 소프트웨어를 이용하여 곡선 적합화를 수행하였다. 상기 곡선 적합화로 다음의 표 4에 요약하는 결과를 수득하였다.

표 4

	용액 결합 ELISA IC50 : nM					
	hAng-1	hAng-2	mAng-2	hAng-4	mAng-3	hVEGF-A
서열번호 17/18	26	0.6	0.07	N/A	N/A	N/A
서열번호 3	N/A	1.4	1.8	N/A	N/A	N/A
서열번호 1	>100	2.5	0.65	N/A	N/A	N/A
서열번호 11	0.89	0.49	0.05	N/A	N/A	N/A
서열번호 8	9.3	0.5	0.08	N/A	N/A	N/A
서열번호 7	0.47	0.41	0.05	N/A	N/A	N/A
서열번호 9	1.9	0.76	0.11	N/A	N/A	N/A

[0226]

[0227] 도 2에서 도시하는 바와 같이, 데이터는 서열번호 8이 인간 및 마우스 Ang-2에 대해 고친화도를 나타내었고, 서열번호 7이 인간 및 마우스 Ang-2에 대해서뿐만 아니라 인간 Ang-1에 대해 고친화도를 나타내었다는 것을 보여준다.

[0228] 실시예 8: hTie-2 발현 세포에 대한 인간 및 마우스 Ang-2의 결합을 차단하는 리포칼린 뮤테인

[0229] hTie-2 과발현 HEK 세포에 대해 경쟁적 세포 전기화학발광(ECL) 분석 형식을 이용하여 경쟁적 방식에서 리포칼린 뮤테인이 인간 Ang-2 및 마우스 Ang-2에 결합하는지의 여부를 시험하였다(도 3 및 도 4 참조). 이 실험에서, 일정한 농도의 인간 Ang-2 및 마우스 Ang-2를 가변적 농도의 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 6 내지 14) 및 기준점 항체(서열번호 19/20)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 용액 중의 이런 사전 인큐베이션 후에, 리포칼린 뮤테인/Ang-2 혼합물을 분취액을 hTie-2 과발현 HEK 세포로 코팅한 MSD 플레이트에 옮겨서 hTie-2에 각각 결합하는 것이 차단되지 않은 hAng-2 또는 mAng-2의 농도를 측정하였다.

[0230] 모든 인큐베이션 단계를 실온에서 수행하였고, 바이오텍 EL405 셀렉트 CW 세척기(바이오텍)를 이용하여  $80\mu\text{l}$ 의 PBS 완충제와 함께 2회 동안 각각 인큐베이션하는 단계 후에 플레이트를 세척하였다. 제1 단계에서, 384 웰 플레이트를 폴리 D 라이신으로 5분 동안 사전 코팅시키고 나서, PBS로 2회 세척하였다.  $10^4$  개 HEK:hTie-2 세포/웰을 과종하고 나서, 웰의 표면에  $37^\circ\text{C}$ 에서 밤새 접착시켰다. 세척 후에, 세포 코팅 웰을  $60\mu\text{l}$ 의 PBS/카세인(PBS 중의 2% 카세인)으로 1시간 동안 실온에서 차단하였다.

[0231] 적합한 시작 농도의 서열번호 1, 3, 6 내지 14 및 기준점 항체를 이용하여 PBS-/카세인 완충제 중에서 피코몰 범위에 이르기까지 1:3 비로 연속희석한 다양한 농도의 서열번호 1, 3, 6 내지 14 및 기준점 항체(서열번호 19/20)에 의해 용액 중에서 고정된 농도의 인간 Ang-2 또는 마우스 Ang-2를 인큐베이션시켰다. 1시간 실온에서 인큐베이션 후에,  $20\mu\text{l}$ 의 반응 혼합물을 HEK:hTie-2-코팅 플레이트에 옮겨서 1시간 동안 실온에서 경쟁적으로 비결합 hAng-2를 포획하였다. 다양한 농도의 hAng-2 또는 마우스 Ang-2를 함유하는 표준 곡선을 PBS/카세인 중에서 제조하고 나서, 마찬가지로 동일한 플레이트에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0232] 결합 hAng-2 및 마우스 Ang-2의 검출 및 정량화를 허용하기 위해, 잔여 상청액을 폐기하고 나서,  $20\mu\text{l}$ 의 혼합물 항-HIS-태그 항체(어빔) 및 설포태그 표지 항-염소 항체(메조스케일 디스커버리(Mesoscale Discovery))를 PBS/카세인 중에서  $1\mu\text{l}/\text{m}\text{l}$ 의 농도로 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 세척 후에,  $35\mu\text{l}$ 의 무 계면 활성제 판독 완충제를 각각의 웰에 첨가하고 나서, 모든 웰의 ECL 신호를 메조스케일 디스커버리 판독기를 이용하여 판독하였다.

[0233] 그래프패드 프리즘 4 소프트웨어를 이용하여 평가 및 곡선 적합화를 수행하고, 수득한 결과를 이하의 표 5에서 요약한다.

표 5

뮤테인 서열번호	hAng2 IC50 [nM]	mAng-2 IC50 [nM]
서열번호 3	10.73	23.17
서열번호 1	18.91	3.982
서열번호 6	3.464	1.206
서열번호 7	3.596	1.228
서열번호 8	3.746	1.245
서열번호 9	3.817	1.39
서열번호 10	4.626	1,046
서열번호 11	4.793	1.448
서열번호 12	5.287	3.118
서열번호 13	5.431	7.343
서열번호 14	6.41	2.32
서열번호 19/20	1.999	0.8826

[0234]

## [0235] 실시예 9: 세포 기반 증식 분석에서 Ang-2의 리포칼린-뮤테인-매개 차단

림프 미세혈관 내피세포(LEC)를 사용하는 단기간 증식 생체분석의 적용에 의해 hAng-2의 생물학적 활성을 중화시키는 서열번호 1, 3, 7 내지 9 및 11의 리포칼린 뮤테인의 능력을 평가하였다. hAng-2-중화 효과를 갖는 제제에 의해 LEC 증식을 저해할 수 있다. 분석에서, 서열번호 1, 3, 7 내지 9 및 11을 배양물 중의 혈청 기아 LEC 세포에 첨가하였다. 배양물 중에서 3일 후에, 살아있는 세포 수를 정량화함으로써 증식 정도를 평가하였다. 셀 타이터-글로 발광 세포 생존도 분석(프로메가(Promega))을 이용하여 이를 수행하여 ATP 수준을 측정하고, 이를 대사적으로 활성인 세포의 수와 상호 관련 짓는다. hAng-2를 중화시키는 서열번호 1, 3, 7 내지 9 및 11의 능력을 그들의 IC50 값, 즉, hAng-2 매개 증식의 최대 절반의 저해를 야기하는 리포칼린 뮤테인의 농도에 의해 평가하였다.

[0237]

분석 설정의 상세한 절차를 본 명세서에서 다음에 기재한다. LEC를 EBM, 5% 소 태아 혈청 및 MV2 보충 키트에서 유지하였다. 웰 당 25 $\mu$ l로 96 웰 백색의 투명한 편평 바닥 플레이트(그레이너(Greiner))에서 분석을 수행하였다.

[0238]

LEC 세포를 제조업자의 설명서(PAA 래버토리즈(PAA Laboratories))에 따라 표준 조건(37°C, 5% CO2 분위기)) 하에 세포 배양 플라스크에서 배양시켰다.

[0239]

실험의 제1일에, 제조업자의 설명서에 따라 타이로신/EDTA를 이용하여 접착 세포를 그들의 기질로부터 해리시켰다. 후속적으로, 세포를 1000rpm으로 5분 동안 원심분리시키고 나서, EBM 중에서 재현탁시키고, 100 $\mu$ m 셀 스트레이너(cell strainer)(팔콘(Falcon))를 통해 여과시켜 세포 응집물을 제거하였다. 이어서, 세포를 최종 용적 100 $\mu$ l를 이용하여 웰 당 3200개 세포의 밀도로 96-웰 편평 바닥 조직 배양 플레이트(그레이너)에서 과종하였다. 그들을 표준 조건 하에 1시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0240]

서열번호 1, 3, 7 내지 9, 11의 음성 대조군(서열번호 16 및 인간 IgG 아이소타입 항체(다이아노바(Dianova))) 및 기준점 항체 1 및 2(각각 서열번호 17/18 및 19/20)의 1시간 연속 희석 후에 웰에 첨가하였다. 모든 적정 시리즈를 분석 배지에서 연속적 1:3 희석물 및 적합한 시작 농도를 이용하여 수행하였다. 후속적으로, 세포를 72시간 동안 37°C에서 증식시켰다. 72시간 후에 세포 증식을 정량화하기 위해, 25 $\mu$ l의 셀 타이터-글로 시약을 각각의 웰 내의 세포에 첨가하고 나서, 세포 용해를 유도하기 위해 오비탈 진탕기 상에서 2분 동안 인큐베이션하고, 페라스타 FS(PheraStar FS) 판독기를 이용하여 발광을 측정하였다.

[0241]

샘플 농도에 대해 표준화된 신호 및 S자형 용량 반응 모델을 이용하는 데이터의 비선형 회귀를 플롯팅함으로써 그래프패드 프리즘 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어 인코포레이티드(GraphPad Software Inc.))를 이용하여

IC50 값을 결정하였다.

[0242] 실험 결과를 **도 5**에 나타낸다. 상기 개시한 증식 분석은 3가지 독립적 실험을 나타낸다. 결과를 이하의 **표 6**에 요약한다.

**표 6**

뮤테인 서열번호	IC50 평균 [nM]
서열번호 1	2.252
서열번호 3	2.806
서열번호 7	0.1992
서열번호 8	0.0780
서열번호 9	0.1423
서열번호 11	0.1692
서열번호 17/18	0.0668
서열번호 19/20	0.0435

[0243]

[0244] 서열번호 8은 평균 EC50 0.07nM을 나타내고, 기준점 항체 1(서열번호 17/18)은 EC50 0.06nM을 나타내며, 기준점 항체 2(서열번호 19/20)는 EC50 0.04nM을 나타내었다. 음성 대조군은 증식에 대해 효과가 없었다. 따라서 데이터는 서열번호 8 및 기준점 항체가 이 기능성 분석에서 비슷한 효능을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0245]

실시예 10: 뮤테인의 안정성 평가

[0246]

얻어진 융점( $T_m$ )뿐만 아니라 리포칼린 뮤테인(서열번호 1, 3, 7 내지 9, 11)에 대한 융점의 개시를 기준점 항체(서열번호 17/18)에 비교하여 이하의 **표 7**에 열거한다. 선택한 리포칼린 뮤테인은  $T_m$ 의 범위가 65 내지 77°C인데, 이는 분자의 양호한 안정성을 나타낸다.

**표 7**

Ang-2 특이적 리포칼린 뮤테인 및 기준점 항체의  
나노DSC에 의해 결정한 바와 같은  $T_m$  및 개시

뮤테인 서열번호	$T_m$ [°C]	용융의 개시 [°C]
서열번호 1	64	59
서열번호 3	66	59
서열번호 7	76	68
서열번호 8	73	63
서열번호 9	77	70
서열번호 11	75	65
서열번호 17/18	69.5 / 76.1 / 83.4	64

[0247]

[0248] 저장 안정성을 평가하기 위해, PBS 중의 농도 1mg/ml에서 예시적인 뮤테인을 1주 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 활성 뮤테인을 정량적 ELISA 설비에서 측정하였다. 단량체 단백질을 분석적 크기 배제 크로마토그래피에서 측정하였다. 서열번호 1, 3, 7 내지 9 및 11에 대해 얻은 데이터를 이하의 **표 8**에 나타낸다.

[0249]

단백질 활성을 시험하기 위해, 다음의 ELISA를 적용하였다: 형광 측정에 적합한 384-웰 플레이트(그레이너 플루오틴(FLUOTRAC)(상표명) 600, 검정색 편평 바닥, 고-결합)을 PBS 중에서 5μg/ml의 농도로 4°C에서 20μl의 Ang-2(써모 사이언티픽)로 코팅하였다. 세척 후에, 100μl의 차단 완충제(0.1 % v/v 트윈-20을 함유하는 PBS 중

의 2% w/v BSA)를 이용하여 Ang-2-코팅 웰을 1시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 세척하였고, 20 $\mu$ l의 적절하게 희석된 단백질 표준, 비스트레스 기준 샘플 또는 스트레스 샘플을 ELISA 플레이트에 옮기고 나서, 인큐베이션시켰다. 플레이트-결합 단백질을 정량화하기 위해, ELISA 플레이트를 세척하고, 잔여 상청액을 폐기하고 나서, 20 $\mu$ l의 HRP-표지 항-hNGAL 항체를 차단 완충제 중의 사전 결정한 최적의 농도로 첨가하고, 인큐베이션시켰다. 세척 후에, 20 $\mu$ l의 형광원 HRP 기질(퀀타블루, 피어스)을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 반응을 20 내지 30분 동안 진행시켰다. 형광 마이크로플레이트 판독기(테칸)를 이용하여 플레이트 상에서 모든 웰의 형광 강도를 판독하였다.

[0250] 달리 언급되지 않는 한, 모든 인큐베이션 단계를 1시간 동안 실온에서 수행하고, 각각의 인큐베이션 단계 후에, 바이오텍 ELx405 셀렉트 CW 세척기를 이용하여 플레이트를 5회 동안 100 $\mu$ l의 PBS-T 완충제(PBS, 0.05% 트윈 20)로 세척하였다.

[0251] 상기 기재한 ELISA를 위해, 0.008 내지 500ng/ml 범위의 11회 희석을 포함하는 교정 곡선을 생성하고, 각각의 샘플에 대해 교정 곡선의 선형 범위 내에서 3회의 상이한, 독립적 희석물을 제조하였다. 희석을 위해 1% 인간 또는 뮤린 혈장으로 선택적으로 보충한 차단 완충제를 사용하였다.

[0252] 4모수 로지스틱(4 Parameter Logistic: 4PL) 비선형 회귀 모델을 이용하여 교정 곡선을 적합화하고 나서, 시험 샘플에 대한 활성 단백질 농도를 계산하기 위해 사용하였다. 결정한 활성 단백질 농도를 동일 농도 및 동일한 매트릭스에서 저장한 비스트레스 샘플에 대해 언급하였다.

[0253] 0.3ml/분의 유속으로 용리액으로서 PBS(깁코(Gibco))를 이용하여 2개의 수퍼덱스(Superdex) 75 5/150 GL 칼럼(GE 헬스케어)을 연이어 지니는 애질런트 HPLC 시스템 상에서 분석 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다.

[0254] 혈장 중의 저장 안정성을 평가하기 위해, 0.5mg/ml 농도로 예시적인 뮤테인을 인간 및 마우스 혈장에서 1주 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 활성 뮤테인을 상기 기재한 바와 같이 정량적 ELISA 설비에서 측정하였다.

[0255] 모든 시험 조건 및 시험 결과 하에서 안정한 것으로 증명된 모든 시험한 리포칼린 뮤테인을 이하의 표 8에서 요약한다.

#### 표 8

3회 냉동/해동 주기(F/T) 후 안정성: PBS 중에서 37°C에서 1주 저장 및 분석적 SEC에서 qELISA 및 단량체 함량에서 활성의 회복에 의해 평가한 인간(hu) 또는 마우스(mu) 혈장 중의 1주 저장: qELISA에서의 안정 = 100 +/- 15%; aSEC에서의 안정 = 100 +/- 5%(비스트레스 기준 샘플에 비교한 단량체 피크 면적의 회복); 기준을 포함하는 모든 샘플에 대해, 100 면적 백분율의 단량체 함량을 검출하였다.

뮤테인 서열번호	냉동/해동		1주 PBS37°C		1주 hu 혈장	1주 mu 혈장
	Q ELISA	HPLC	Q ELISA	HPLC		
서열번호 2	104	100	94	97	-	-
서열번호 3	95	98	100	96	-	-
서열번호 1	102	103	99	105	-	-
서열번호 7	-	-	-	-	99	85
서열번호 8	-	-	-	-	89	93
서열번호 9	-	-	-	-	99	100
서열번호 11	-	-	-	-	100	89
서열번호 17/18	108	109	87	103	-	-

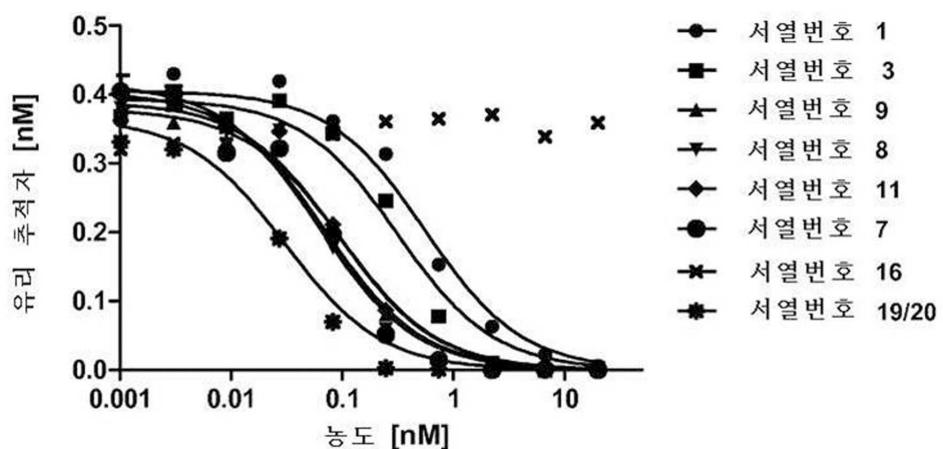
[0256]

[0257] 본 명세서에 예시적으로 기재한 실시형태를 본 명세서에 특이적으로 개시되지 않은 임의의 요소들, 제한 또는 제한들 없이 적합하게 실행할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "함유하는(containing)" 등은 확장적으로 제한 없이 판독할 것이다. 추가적으로, 본 명세서에서 사용되는 용어 및 발현은 설명의 용어로서 제한 없이 사용되었고, 나타내고 기재한 임의의 동등한 특징 및 이의

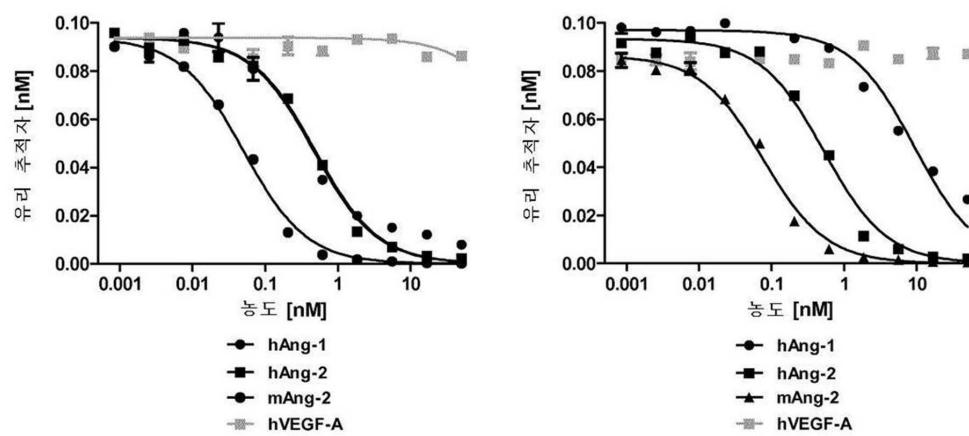
부분을 제외하는 그러한 용어의 사용 및 표현을 의도하지 않지만, 청구되는 본 발명의 범주 내에서 다양한 변형이 가능하다는 것을 인식한다. 따라서, 본 실시형태는 바람직한 실시형태 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되었지만, 이의 변형 및 변화가 당업자에 의해 의존될 수 있다는 것과, 이러한 변형 및 변화가 본 발명의 범주 내에서 고려된다는 것이 이해되어야 한다. 본 명세서에 기재된 모든 특허, 특히 출원, 교재 및 상호심사 공보는 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 더 나아가, 본 명세서에 참고로 포함된 참고문헌에서 용어의 정의 또는 사용이 본 명세서에 제공된 해당 용어의 정의와 일치하지 않거나 또는 반대인 경우, 본 명세서에 제공된 해당 용어의 정의를 적용하며, 참고문헌의 해당 용어 정의는 적용하지 않는다. 일반적 개시내용 내에 속하는 각각의 더 좁은 종 및 하위개념 그룹화는 또한 본 발명의 부분을 형성한다. 이는 삭제된 물질이 본 명세서에 구체적으로 인용되는지와 관계없이, 임의의 대상 물질을 속으로부터 제거하는 음성 제한을 조건부로 본 발명의 일반적 설명을 포함한다. 추가로, 특징이 마쿠쉬 그룹에 관해 기재된 경우, 당업자는 본 개시내용이 또한 이에 의해 마쿠쉬 그룹의 임의의 개개 구성원 또는 구성원의 하위그룹에 관해 기재한다는 것을 인식할 것이다. 추가 실시형태는 다음의 청구범위로부터 분명하게 될 것이다

## 도면

### 도면1



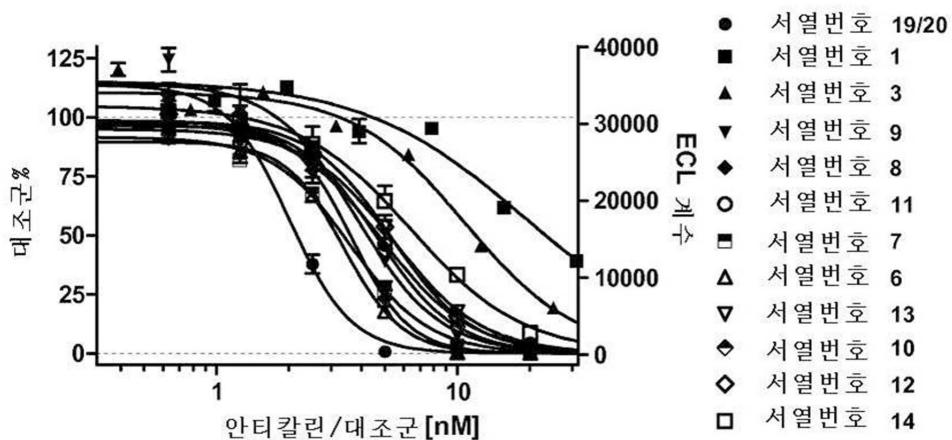
### 도면2



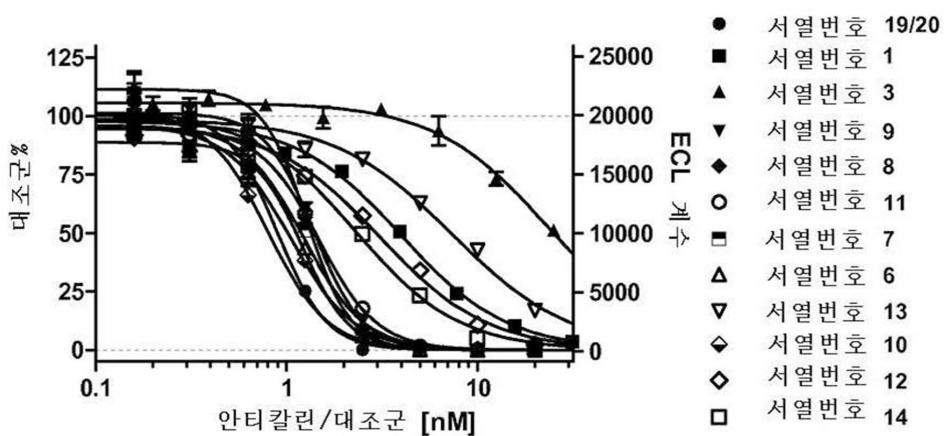
서열번호 7

서열번호 8

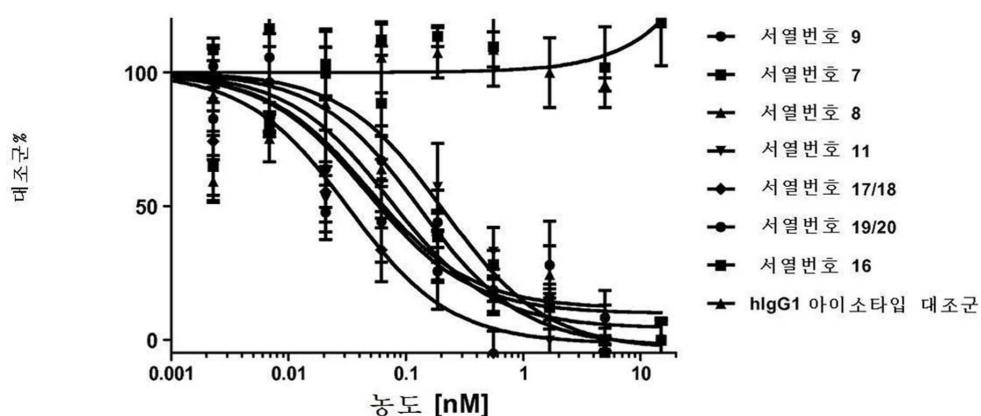
도면3



도면4



도면5



## 서열목록

&lt;110&gt; Pieris AG

<120> Novel proteins specific for angiogenesis

<130> PIE15265PCT

<150> EP 15152826.2

<151> 2015-01-28

<160> 34

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hNGAL mutein

<400> 1

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Asn Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Thr Ile

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Met His Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Gly

<210> 3  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hNGAL mutein

<400> 3

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

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

<210> 4

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Trp Leu Lys Lys Cys Lys Tyr Asn Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Trp 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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Glu 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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 7

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

1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr			
20	25	30	
Val Val Gly His Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			
35	40	45	
Glu Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr			
50	55	60	
Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile			
65	70	75	80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly			
85	90	95	
Ile Lys Ser Pro Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser			
100	105	110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Leu Gln			
115	120	125	
Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu			
130	135	140	
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly			
145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile			
165	170	175	
Asp Gly			
<210> 8			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> hNGAL mutein			
<400> 8			
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val			
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr			

20	25	30
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile		
65	70	75
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly		
85	90	95

Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Leu Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		

<210> 9			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> hNGAL mutein			
<400> 9			
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val			
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr			
20	25	30	
Val Val Gly His Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			

35	40	45
Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile		
65	70	75
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly		
85	90	95
Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser		
100	105	110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Leu Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly		

<210>	10		
<211>	178		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	hNGAL mutein		
<400>	10		
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val			
1	5	10	15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr			
20	25	30	
Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			
35	40	45	
Gln Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr			

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile

65	70	75	80
Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly			
85	90	95	
Ile Lys Ser Leu Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser			
100	105	110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Leu Gln			
115	120	125	
Asn Arg Glu Phe Phe Glu 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> 12			
<211> 178			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> hNGAL mutein			
<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 Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro			
35	40	45	
Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr			
50	55	60	
Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile			
65	70	75	80
His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn			

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

<210>	13	
<211>	178	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hNGAL mutein	
<400>	13	
Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val		
1	5	10
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr		
20	25	30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro		
35	40	45
Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr		
50	55	60
Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile		
65	70	75
His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp		
85	90	95
Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser		

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

Asp Gly

<210>	14
<211>	178
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	hNGAL mutein
<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 Met Ala Gly Asn Trp Asp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro	
35	40
45	
Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr	
50	55
60	
Asp Val Thr Gln Val Ala Phe Glu Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile	
65	70
75	
80	
His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln	
85	90
95	
Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser	
100	105
110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Met Gln	

115

120

125

Asn Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
 165 170 175  
 Asp Gly

<210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Strep-tag

<400> 15  
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10  
 <210> 16  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hNGAL wild-type  
 <400> 16

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

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

Val Val Gly 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 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> 17

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> benchmark antibody 1 heavy chain

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr		
100	105	110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser		
115	120	125
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
130	135	140
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
145	150	155
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
165	170	175
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
180	185	190
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
195	200	205
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
210	215	220
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
225	230	235
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
305	310	315
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
325	330	335
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		

340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; benchmark antibody 1 light chain

&lt;400&gt; 18

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 19

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> benchmark antibody 2 heavy chain

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Leu Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Ala Pro Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430  
  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 20  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> benchmark antibody 2 light chain  
 <400> 20  
  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr  
 20 25 30  
  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Gln			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210>	21		
<211>	536		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	hNGAL mutein		
<400>	21		
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag			60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggccaaagc cgaaattac			120
atcctgcgtg aggataagga tccggaaaa atgtggcga ccattacga gttgaaagaa			180
gataaatcat ataacgtcac cggagtgagc tttggaccta agaaatgcaa ttacaccatt			240
tggacctttg tgcggggag ccagccggc gagttactt taggcggaat taaaagtct			300

ccggcgaa catcaaccc ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agcacgtgct gcagaaccgc gagtttttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgac ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536

<210> 22  
 <211> 536  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> hNGAL mutein  
 <400> 22

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcgtc cgaaatcac	120
cgtctcggtg aggataagga tccggaaaa atgcacgcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgacc ttgcattca agaaatgcaa ttaccgtatt	240
cacaccccttgcggggag ccagccggc gagtttactt taggcaatataaaagtgg	300

ccggcgaga catcaaccc ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agaccgtat gcagaaccgc gagtttttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgac ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536

<210> 23  
 <211> 536  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> hNGAL mutein  
 <400> 23

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
--	----

aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcgtc cgaaatgg	120
tacctcggtg aggataagga tccgatcaa atgaccgcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac ccaagtggaa ttgagcaaa agaaatgcaa atacagcatt	240
cacaccccttgcggggag ccagccggc gagtttactt taggcaatataaaagtgg	300
ccggcgaca catcaactgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggagtgat gcagaaccgc gagtttttgc caatcacact gtacggcgc	420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
<210> 24	
<211> 536	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hNGAL mutein	
<400> 24	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcgaggc cgaaatgtt	120
gagctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgaccgcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttggctga agaaatgcaa atacaatatt	240
cacaccttg tgccgggag ccagccggc gagttactt taggcgaat taaaagtgga	300
ccggcgtga catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agaccgtat gcagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
<210> 25	
<211> 536	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hNGAL mutein	
<400> 25	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcccaagc cgaaattac	120
tggctgcgtg aggataagga tccgatcaa atgtctgcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac catcgtgtac ttaccgtg agaaatgcag ctaccgtatt	240
tacaccttg tgccgggag ccagccggc gagttactt taggcctat taaaagtac	300
ccggcgtaca catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agcacgtat gcagaaccgc gagtggttg agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc	480

ctccctgaaa accacatcg tttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
<210> 26	
<211> 535	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hNGAL mutein	
<400> 26	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgc ttggcaggc cgaaattat	120
attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgggggtgtcg tttgggccta agaaatgcaa ttacaggatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcggat taaaagtct	300
ccggccaga catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcg tttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	535
<210> 27	
<211> 536	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hNGAL mutein	
<400> 27	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtgc ttggcaggc cgaaattat	120
attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgtct tttggccga agaaatgcaa ttacaggatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcggat taaaagtct	300
ccggccata catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttgc agatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcg tttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
<210> 28	

<211> 536  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> hNGAL mutein  
<400> 28

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60  
aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtggcaggc cgaaattat 120

attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtggcga ccattacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgtcg tttgggccta agaaatgcaa ttacaggatt 240  
tggacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcgtat taaaagtgt 300  
ccggcggga catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttggatcacact gtacggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag 536

<210> 29  
<211> 536  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> hNGAL mutein  
<400> 29

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60  
aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagtggcagtc cgaaattat 120  
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtggcga ccattacga gttgaaagaa 180  
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgtct tttgggccta agaaatgcaa ttaccgtatt 240  
tggacctttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcgtat taaaagtccg 300

ccggcggga catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttggatcacact gtacggcgc 420  
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag 536

<210> 30  
<211> 535  
<212> DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 30

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagttag ttggcaggg cgaaattat 120  
 attctgcgtg aggataagga tccgcagaaa atgtgggcga ccattacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgggtgtct tttggggcta agaaatgcgt ttacaggatt 240  
 tggaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcgtat taaaagtccg 300  
 ccggcggta catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttg agatcacact gtacggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaaggcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca 535

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 536

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 31

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagttag ttggcaggg cgaaattat 120  
 attctgcgtg aggataagga tccggtaaa atgtgggcga ccattacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgggtgtct tttgggtcta agaaatgcaaa ttacaggatt 240

tggaccttg tgccggggag ccagccggc gagttactt taggcggat taaaagtctt 300  
 ccggcggta catcaacttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagtttttg agatcacact gtacggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaaggcga gctgaaggaa aatttatcc gctttccaa atctctggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag 536

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 32

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcggtgc cgaaattgg	120
tacctgcgtg aggataagga tccgatcaa atgaccgca ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
cacaccttg tgccggggag ccagccgggc gagttactt taggcaacat taaaagttgg	300
ccggcgaca catcaccgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacgacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggagtgtat gcaggatcgc gaggttttg caatcacact gtacggcgc	420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gttttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 33

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aactccagg acaaccaatt ccatggaaa tggatgtcg tggcggtgc cgaaattgg	120
tacctgcgtg aggataagga tccgatcaa atgaccgca ccattacga gttgaaagaa	180

gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
cacaccttg tgccggggag ccagccgggc gagttactt taggcaacat taagagttgg	300
ccggcgaca catcaccgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggaatgtat gcaggaccgc gaggttttg caatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gttttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 535

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; hNGAL mutein

&lt;400&gt; 34

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtagctgt taggtatggc cgaaattgg	120
gatctgcgtg aggataagga tccgattaa atgacggcga ccattacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac ccaggtggcg tttgagcaga agaaatgca a gtactcgatt	240
cataccttg tgccggggag ccagccggc gagtttactt taggcccagat taaaagttgg	300
ccgggcgata catcacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggggggtat gcagaaccgc gaggtgtttg ctatcacact gtacggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttccaa atctctggc	480
ctccctgaaa accacatgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535