

ÖZET**IL-4 R ALFAYA BAĞLANAN GÖZYAŞI LİPOKALİNİ MUTEİNLERİ**

Mevcut buluş, insan gözyaşı lipokalininden türetilen, IL 4 reseptörü alfaya bağlanan yeni muteinlerle ilgilidir. Muteinlerin dizileri amino asitlerin belirli kombinasyonlarını içerir. Özellikle mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısı, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 dizi konumlarının herhangi birinde veya daha fazlasında mevcuttur. Mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısı ayrıca olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 dizi konumlarının herhangi 2'sinde veya daha fazlasında mevcuttur. Buluş ayrıca, bu tip bir muteini kodlayan bir karşılık gelen nükleik asit molekülü ve bu tip bir muteinin ve bunun kodlayıcı nükleik asit molekülünün üretilmesi için bir yöntem de sağlamaktadır.

İSTEMLER

1. İnsan gözyaşı lipokalininin bir muteini olup, özelliği muteinin aşağıdakileri içermesidir:
 - 5 (i) aşağıdaki amino asit ikameleri Glu 27 → Arg, Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg, Met 31 → Ala, Leu 33 → Tyr, Ile 57 → Arg, Cys 61 → Trp, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Arg, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Cys, His 106 → Pro, Lys 108 → Gln; ve
 - (ii) amino asit ikamelerinin aşağıdaki kümelerinden biri
 - 10 (1) Arg 26 → Pro, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Ser, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gln, Glu 63 → Lys;
 - (2) Arg 26 → Ser, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Val, Met 55 → Ala, Leu 56 → Ala, Ser 58 → Ile, Glu 63 → Ser;
 - (3) Arg 26 → Ser, Asn 32 → Val, Glu 34 → Asn, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gln, Ser 58 → Lys, Glu 63 → Lys;
 - 15 (4) Arg 26 → Asn, Asn 32 → Lys, Glu 34 → Asp, Met 55 → Ala, Leu 56 → His, Ser 58 → Arg, Glu 63 → Gln;
 - (5) Arg 26 → Tyr, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → His, Met 55 → Ala, Leu 56 → His, Ser 58 → Ala, Glu 63 → Lys;
 - 20 (6) Arg 26 → Lys, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Arg, Met 55 → Ala, Leu 56 → Lys, Ser 58 → Asn, Glu 63 → Pro; veya
 - (7) Arg 26 → Glu, Asn 32 → His, Glu 34 → Gly, Met 55 → Ala, Leu 56 → Met, Ser 58 → Leu, Glu 63 → Lys; ve
 - 25 (iii) olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisine en az %75 özdeşlik olup, burada olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisi aşağıdakidir
 FHLLASDFFQDVSGTWYIKAMTVOREFFPMNLFSTPMTLTTEGGNLFKVTMLIS
 GRQGEVKAVLEKTDEPGKYTADGGKHVAMIRSHVKDHYIFYCEGE.LHGKPVVRGVKL
 VGRDPKNNLEALEDFEKAAGARGLSTESILIPROSETQSPGSD:
 ve burada mutein insan IL-4 reseptörü alfaya, 0,1 nM'nin altında bir ayrışma sabitiyle (K_D) bağlanır.
- 30 2. İstem 1'e göre mutein olup, özelliği ayrıca, aşağıdaki amino asit ikameleri kümesini içermesidir: (1) Val 53 → Phe, Val 64 → Tyr, Ala 66 → Leu.
3. Önceki istemlerin herhangi birine göre mutein olup, özelliği olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisinin ilk dört N-ucu amino asit kalıntıları ve/veya olgun insan

gözyaşı lipokalininin dizisinin son iki C-ucu amino asit kalıntıları silinmiş olmasıdır.

- 5 4. Önceki istemlerin herhangi birine göre mutein olup, özelliği muteinin SEQ ID NO: 4 ve 6-11'de ortaya konulduğu üzere bir amino asit dizisine sahip olmasıdır.
5. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre mutein içeren bir füzyon proteindir.
- 10 6. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre muteini veya istem 5'e göre füzyon proteinini kodlayan bir nükleotid dizisi içeren bir nükleik asit molekülüdür.
7. İstem 6'ya göre nükleik asit molekülünü ihtiva eden bir konak hücredir.
- 15 8. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre muteini veya istem 5'e göre füzyon proteinini içeren bir farmasötik veya bir tanısal bileşimdir.

TARİFNAME

IL-4 R ALFAYA BAĞLANAN GÖZYAŞI LİPOKALİNİ MUTEİNLERİ

Buluşun Sahası

5

Mevcut buluş, insan gözyaşı lipokalininin IL-4 reseptörü alfaya bağlanan muteinleriyle ilgilidir. Buluş ayrıca, bu tip bir muteini kodlayan karşılık gelen nükleik asit molekülleriyle de ilgilidir. Son olarak, buluş, bu tip bir lipokalin mutein içeren farmasötik bir bileşime yöneliktir.

10

Alt Yapı

Eşdeğerli-olmayan etkileşim yoluyla seçilen hedeflere seçimli olarak bağlanan proteinler, biyoteknoloji, tıp, biyoanalitiklerin yanı sıra genel olarak biyolojik ve yaşam bilimlerinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Antibiyotikler, yani immünoglobülinler, proteinlerin bu sınıfının önde gelen bir örneğidir. Manifoldun bu tip proteinlere ligandların/hedeflerin tanınması, bağlanması ve/veya ayrılmasıyla birlikte ihtiyaç duymasına rağmen, halihazırda neredeyse yalnızca immünoglobülinler kullanılmaktadır. Tanımlı ligand-bağlama karakteristiklerine sahip diğer proteinlerin

örneğin lektinlerin uygulanması özel vakalarla sınırlı kalmıştır.

Antikor-benzeri fonksiyonlara sahip ilave proteinli bağlayıcı moleküller, lipokalin familyasının, ligandları bağlamak için doğal olarak evrilmiş olan üyeleridir. Lipokalinler, omurgalılar, böcekler, bitkiler ve bakteriler dahil olmak üzere birçok organizmada ortaya çıkar. Lipokalin protein familyasının üyeleri (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) *FASEB J.* 1, 209-214) tipik olarak küçük, salgılanan proteinlerdir ve tek bir polipeptit zincirine sahiptir. Bir dizi farklı moleküler-tanınma özellikleriyle karakterizedirler: çeşitli, prensip olarak hidrofob moleküllere (mesela retinoidler, yağ asitleri, kolesteroler, prostaglandinler, biliverdinler, feromonlar, tastantlar ve odorantlar) bağlanma yetileri, spesifik hücre-yüzeyi reseptörlerine bağlanmaları ve makromoleküler kompleksleri oluşturmaları. Her ne kadar bunlar, geçmişte, birincil olarak taşıma proteinleri olarak sınıflandırılmış olsalar da, artık lipokalinlerin çeşitli fizyolojik fonksiyonları yerine getirdiği nettir. Bunlara retinol taşınmasındaki, koku almadaki, feromon sinyallemedeki ve prostaglandinlerin sentezindeki roller dahildir. Lipokalinler ayrıca bağışıklık yanıtının düzenlenmesine ve hücre homeostazına aracılık etmeye de dahil edilmiştir (örneğin,

Flower, D.R. (1996) *Biochem. J.* **318**, 1-14 ve Flower, D.R. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9-24'te incelenmiştir).

Lipokalinler, sıklıkla %20'den daha az dizi özdeşliğiyle, genel dizi korunmasının
5 olağandışı düşük seviyelerini paylaşır. Lipokalin yapısının merkez parçası, kesintisiz bir
hidrojen-bağlı β -haznesi oluşturmak için kendi üzerine geri kapalı bir sekiz-sarmallı
anti-paralel β -katmanından oluşur. Bu β -haznesi merkez bir boşluk oluşturur. Haznenin
bir ucu, dibi boyunca ilerleyen N-ucu peptit segmentinin yanı sıra β -sarmallarını
bağlayan üç peptit özesi tarafından sterik olarak blokedir. β -haznesinin diğer ucu
10 çözücüye açıktır ve dört adet esnek peptit özesi tarafından oluşturulan bir hedef-
bağlama alanını kapsar. Her biri farklı boyuttaki, şekildeki ve kimyasal karakterdeki
hedefleri barındırabilen çeşitli farklı bağlama modlarına sebebiyet veren, başka
durumlarda rijit lipokalin iskeleleri olan özelerin bu çeşitliliğidir (örneğin, Flower, D.R.
(1996), supra; Flower, D.R. et al. (2000), supra veya Skerra, A. (2000) *Biochim.*
15 *Biophys. Acta* **1482**, 337-350'de incelenmiştir).

Uluslararası patent başvurusu WO 99/16873, lipokalin familyasının, dört peptit özesinin
bölgesinde, bağlama cebini kapsayan silindirik β -haznesi yapısının uzunda yer alan ve
Pieris brassicae'nin bilin-bağlayıcı proteininin 28 ila 45, 58 ila 69, 86 ila 99 ve 114 ila
20 129 arasındaki amino asit konumlarını içeren doğrusal polipeptit dizisindeki o
segmentlere karşılık gelen, mutasyonlara uğratılmış amino asit konumlarına sahip
polipeptitlerini açıklamaktadır. Lipokalin familyasının üyelerinin post-translasyonel
olarak modifiye edilmiş olduğu bildirilmiştir, örneğin, fosforilasyon ve gözyaşı
lipokalininin glikosilasyonu (örneğin You, J., et al. (2010) *Electrophoresis* **31**, 1853-
25 1861). Yine de, bunların moleküler tanıma özellikleri için hiç post-translasyonel
modifikasyon gerekli değildir.

Uluslararası patent başvurusu WO 00/75308, bilin-bağlayıcı proteinin, digoksinine
özgül olarak bağlanan muteinlerini açıklarken uluslararası patent başvuruları WO
30 03/029463 ve WO 03/029471, sırasıyla, insan nötrofil jelatinaz-ilişkili lipokalinin
(hNGAL) ve apolipoprotein D'nin muteinleriyle ilgilidir. Bir lipokalin varyantının ligand
afinitesinin, özgüllüğünün yanı sıra yayılma stabilitesinin daha da geliştirilmesi ve ince
ayarı amacıyla, ilave amino asit kalıntılarının değiştirilmesi gibi, lipokalin familyasının
farklı üyelerini kullanan yaklaşımlar önerilmiştir (Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.*
35 **74**, 257-275; Schlehuber, S. and Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* **96**, 213-228) PCT

yayını WO 2006/56464, CTLA-4 için düşük nanomolar aralıkta bağlanma afinitesine sahip insan nötrofil jelatinaz-ilişkili lipokalinin muteinlerini açıklamaktadır.

Uluslararası patent başvurusu WO 2005/19256, gözyaşı lipokalininin, farklı veya aynı
 5 hedef ligand için en az bir bağlanma alanına sahip muteinlerini açıklamakta ve insan gözyaşı lipokalinlerinin oluşturulması için bir yöntem sağlamaktadır. Bu PCT yayınına göre, gözyaşı lipokalininin birincil dizisi, özellikle olgun insan gözyaşı lipokalininin 7-14, 24-36, 41-49, 53-66, 69-77, 79-84, 87-98 ve 103-110 amino asitlerini içeren öze bölgelerindeki belirli amino asit germeleri, bağlanma afinitelerine sahip muteinler
 10 oluşturmak amacıyla mutajeneze tabi tutulur. Ortaya çıkan muteinler seçili ligand için nanomolar aralıkta, birçok durumda >100 nM bağlanma afinitelerine (K_D) sahiptir. Uluslararası patent başvurusu WO 2008/015239, gözyaşı lipokalininin, IL-4 reseptörü alfa dahil olmak üzere belirli bir doğal-olmayan liganda bağlanan muteinlerini açıklamaktadır. Bağlanma afiniteleri, yüzey plazmon rezonans deneylerinde neredeyse
 15 1×10^{-10} M kadar düşük seviyeye ulaşacak şekilde nanomolar aralıktadır.

Lipokalin-1, gözyaşı ön-albümini veya von Ebner bezi proteini olarak da isimlendirilen insan gözyaşı lipokalinini (TLPC veya Tlc) özgün olarak insan gözyaşı sıvısının bir ana proteini (toplam protein içeriğinin yaklaşık olarak üçte biri) olarak tarif edilmiştir ancak
 20 prostat, böbrek üstü bezi, timüs, meme bezi, testis, burun mukozası ve trakeal mukoza dahil olmak üzere çeşitli diğer salgılayıcı dokuların yanı sıra hipofiz bezinin kortikotroflarında da tanımlanmıştır. Homolog proteinler resus maymununda, şempanzede, sıçanda, farede, domuzda, hemstırda, inekte, köpekte ve atta bulunmuştur. Gözyaşı lipokalinini, diğer lipokalinlere kıyasla olağandışı bir geniş ligand
 25 özgüllüğü sergilemesi açısından ve bağlı çözünmez lipitler için yüksek gelişigüzelliği açısından olağandışı bir lipokalin üyesidir (bakınız Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 241-248). Gözyaşı lipokalininin bu özelliği, proteinin korneada bakteriyel ve fungal büyümeyi önlemedeki fonksiyonuna atfedilmiştir. Yağ asitleri, yağ alkoller, fosfolipitler, glikolipitler ve kolesterol gibi farklı kimyasal sınıfların önemli bir sayıda
 30 lipofilik bileşenleri, bu proteinin endojen ligandlarıdır. İlginç bir şekilde, diğer lipokalinlerin aksine ligand (hedef) bağlamanın kuvveti, hem alkil amitleri hem yağ asitleri için hidrokarbon kuyruğunun uzunluğuyla koreledir. Böylelikle, gözyaşı lipokalinini en güçlü şekilde en az çözünür lipitleri bağlar (Glasgow, B.J. et al. (1995) *Curr. Eye Res.* **14**, 363-372; Gasymov, O.K. et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1433**, 307-320).
 35 Gözyaşı lipokalininin 1,8-Å kristal yapısı, bunun β -haznesinde olağan dışı şekilde

büyük bir boşluk açığa çıkarmıştır (Breustedt, D.A. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 1, 484-493). WO 2008/015239, insan gözyaşı lipokalininin, S191.4 B24 mutanı dahil olmak üzere, IL-4 reseptörü alfaya bağlanan mutantlarının yanı sıra söz konusu mutantların oluşturulması ve seçilmesi için yöntemleri açıklamaktadır.

5

Bu gelişmeye rağmen, basit ifadeyle insan gözyaşı lipokalininin muteinlerinin tanısal ve terapötik uygulamalarda uygunluğunu daha da geliştirmek amacıyla IL-4 reseptörü alfa için gelişmiş bağlanma özelliklerine, özellikle daha yüksek bağlanma afinitesine sahip bir insan gözyaşı lipokalinini muteinine sahip olmak halen arzu edilmektedir.

10

Buluşun kısa açıklaması

Dolayısıyla, buluşun bir amacı, IL 4 reseptörü alfa için yüksek bağlanma afinitesine sahip bir diğer insan gözyaşı lipokalinini muteini sağlamaktır.

15

Bu amaca, istemlerde, özellikle istem 1'de ortaya konan özelliklere sahip bir insan gözyaşı lipokalinini muteiniyle ulaşılır.

Bir birinci yönde mevcut açıklama, insan gözyaşı lipokalininin bir muteinini sağlamaktadır. Mutein IL 4 reseptörü alfaya bağlanır. Mutein, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 dizi konumlarının herhangi birinde veya daha fazlasında bir mutasyona uğratılmış amino asit kalıntısı içerir. Mutein ayrıca, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 dizi konumlarının herhangi ikisinde veya daha fazlasında bir mutasyona uğratılmış amino asit kalıntısı içerir. İnsan gözyaşı lipokalininin muteininin amino asit dizisi aşağıdaki amino asit kombinasyonları kümelerinin birini içerir: (1) Ser 26, Glu 34, Leu 55, Lys 58, (2) Ser 26, Asn 34, Ala 55, Lys 58, (3) Ser 26, Val 34, (4) Pro 26, Ser 34 (5) Pro 26, Ala 55, (6) Leu 26, Trp 34, Ala 55, (7) Leu 26, Trp 34, Ile 58, (8) Asn 26, Asp 34, (9) Asn 26, Ala 55, (10) Tyr 26, His 34, Ala 55, (11) Tyr 26, His 34, Ala 58, (12) Lys 26, Arg 34, Ala 55, (13) Lys 26, Arg 34, Asn 58, (14) Glu 26, Gly 34, Ala 55 ve (15) Glu 26, Gly 34, Leu 58.

"Konum" terimi buluşa göre kullanıldığında, ya bir amino asidin burada gösterilen bir amino asit dizisi içerisindeki konumu veya bir nükleotidin burada gösterilen bir nükleik asit dizisi içerisindeki konumu anlamına gelmektedir. "Karşılık gelen" terimi, burada

35

kullanıldığı şekliyle ayrıca, yalnızca önceki nükleotidlerin/amino asitlerin sayısıyla belirlenmeyen bir konumu da içermektedir. Dolayısıyla, ikame edilebilecek olan buluşa göre belirli bir amino asidin konumu, bir (mutant veya doğal suş) lipokalinde başka bir yerde amino asitlerin silinmesi veya eklenmesi nedeniyle değişebilir. Benzer şekilde,

- 5 ikame edilebilen buluşa göre belirli bir nükleotidin konumu da, promotör ve/veya (eksonlar ve intronlar dahil olmak üzere) herhangi bir diğer düzenleyici dizi veya gen dahil olmak üzere bir mutein veya doğal suş lipokalin 5'-transle edilmemiş bölgede (UTR) başka yerlerdeki silintiler veya ilave nükleotidler nedeniyle değişebilir.
- 10 Böylelikle, buluşa göre bir "karşılık gelen konum" altında tercihen, nükleotidlerin/amino asitlerin gösterilen sayı açısından farklı olabileceği ancak yine de benzer komşu nükleotidlere/amino asitlere sahip olabilecekleri anlaşılabacaktır. Değiş tokuşa edilebilen, silinebilen veya eklenebilen söz konusu nükleotidler/amino asitler de "karşılık gelen konum" terimi tarafından içermektedir.

15

- Spesifik olarak, açıklamanın bir Tlc lipokalininden farklı bir lipokalinin amino asit dizisinin bir nükleotid kalıntısının veya amino asit kalıntısının, bir lipokalin muteininin amino asit dizisinin, özellikle SEQ ID NO'lar: 2-11'in herhangi birinin veya Tlc'nin doğrusal polipeptit dizisinin (SEQ ID NO: 20) 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80,
- 20 83, 104-106 ve 108 konumunda bir veya daha fazla amino asit ikamesine sahip nükleotid dizisindeki veya amino asit dizisindeki belirli bir konuma karşılık gelip gelmediği belirlemek amacıyla, teknikte uzman bir kişi teknikte iyi-bilinen araçları ve yöntemleri, örneğin, ya elle veya Temel Lokal Hizalama Arama Aracının (Basic Local Alignment Search Tool) kısaltması olan BLAST 2.0 veya ClustalW gibi bilgisayar
- 25 programları veya dizi hizalamalarını oluşturmak için uygun herhangi bir diğer program kullanılarak hizalamaları kullanabilir. Dolayısıyla, SEQ ID NO'lar: 2-11'in herhangi birinin veya Tlc'nin doğrusal polipeptit dizisinin (SEQ ID NO: 20) 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 konumunda bir veya daha fazla amino asit ikamesine sahip bir lipokalin muteini "özne dizi" görevi görebilirken, Tlc'den farklı bir
- 30 lipokalinin amino asit dizisi "sorgulama dizisi" görevi görür.

- Buradaki açıklama, insan gözyaşı lipokalininin bir muteininin oluşturulmasının bir yöntemidir. Mutein IL-4 reseptörü alfaya bağlanır. Yöntem, bir insan gözyaşı lipokalinini kodlayan bir nükleik asit molekülünün, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 amino
- 35

- asit dizisi konumlarının herhangi birinde veya daha fazlasında mutajeneze tabi tutulmasını içerir. Yöntem ayrıca, bir insan gözyaşı lipokalinini kodlayan bir nükleik asit molekülünün, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 amino asit dizisi konumlarının herhangi ikisinde veya daha fazlasında mutajeneze tabi tutulmasını içerir. Olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 amino asit dizisi konumlarının herhangi ikisinin veya daha fazlasının en az biri. Bunun bir sonucu olarak, insan gözyaşı lipokalininin bir muteinini kodlayan bir veya daha fazla nükleik asit elde edilir. Kodlanan muteinin amino asit dizisi, aşağıdaki amino asit kombinasyonları kümelerinin birini içerir: (1) Ser 26, Glu 34, Leu 55, Lys 58, (2) Ser 26, Asn 34, Ala 55, Lys 58, (3) Ser 26, Val 34, (4) Pro 26, Ser 34, (5) Pro 26, Ala 55, (6) Leu 26, Trp 34, Ala 55, (7) Leu 26, Trp 34, Ile 58, (8) Asn 26, Asp 34, (9) Asn 26, Ala 55, (10) Tyr 26, His 34, Ala 55, (11) Tyr 26, His 34, Ala 58, (12) Lys 26, Arg 34, Ala 55, (13) Lys 26, Arg 34, Asn 58, (14) Glu 26, Gly 34, Ala 55 ve (15) Glu 26, Gly 34, Leu 58. Yöntem ayrıca, bu şekilde elde edilen bir veya daha fazla mutein kodlayan nükleik asit moleküllerinin bir ekspresyon sisteminde eksprese edilmesini de içerir. Yöntem bu sayede, bir veya daha fazla mutein elde edilmesini içerir. Yöntem ayrıca, bu şekilde elde edilen, IL 4 reseptörü alfaya bağlanan bir veya daha fazla muteinin seçim ve/veya izolasyon aracılığıyla zenginleştirilmesini de içerir.
- 20 Mevcut buluş, istem 6'ya göre bir nükleik molekülü sağlar. Nükleik asit molekülü, 1 ila 4 arasındaki istemlerin herhangi birine göre bir muteini kodlayan bir nükleotid dizisi içerir.
- Mevcut buluş, istem 7'ye göre bir konak hücre sağlar. Konak hücre, istem 6'ya göre bir nükleik asit molekülü ihtiva eder.
- 25 Mevcut buluş, istem 8'e göre farmasötik bir bileşim sağlar. Farmasötik bileşim, 1 ila 4 arasındaki istemlere göre bir insan gözyaşı lipokalininin bir muteinini içerir. Farmasötik bileşim ayrıca farmakolojik olarak kabul edilen bir ekşiپیyan içerir.
- 30 Buluş, sınırlayıcı-olmayan örneklerle ve eşlik eden çizimlerle birlikte değerlendirildiğinde ayrıntılı tarifname istinaden daha iyi anlaşılacaktır.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1, insan gözyaşı lipokalininin, IL-4 reseptörü alfaya bağlanma afinitesine haiz bir muteini olan S191.4-B24'ün polipeptit dizisini göstermektedir.

Şekil 2, IL-4 reseptörü alfa için yüksek afiniteye sahip emsal muteinlerin polipeptit dizilerini (SEQ ID NO'lar: 2-11) göstermektedir.

5 **Şekil 3**, TF-1 hücresi proliferasyonunun, IL-4 (**A**) ve IL-3 (**B**) varlığında buluşun muteinlerinin arttırılan miktarlarıyla önlenmesini göstermektedir.

Şekil 4, Şekil 3'ün IC₅₀ değerlerini ve buluşun bir insan gözyaşı lipokalini muteinlerinin, insan IL-4 reseptörü alfa gibi IL-4 reseptörü alfaya bağlanmasının Biacore ölçümlerinin verilerini göstermektedir.

10

Buluşun Detaylı Açıklaması

Mevcut buluş, insan gözyaşı lipokalininin, IL-4 reseptörü alfa için özellikle yüksek bir afiniteye sahip muteinlerini sağlamaktadır. Mevcut buluşun bir muteininin bir hedefi 15 olarak IL-4 reseptörü alfa tipik olarak bir memeli proteini, mesela bir insan proteinidir. İn vivo IL-4 reseptörü alfa, B hücrelerinde IgE antikorunu üretimini düzenlemek için interlökin 4 ve interlökin 12'ü bağlayabilir.

Buluşa göre muteinlerin bağlanma afiniteleri 0,1 nM'nin altında ve bazı uygulamalarda 20 yaklaşık 1 pikomolarlık (pM) bir K_D'ye sahiptir (karşılaştırınız Şekil 4). Buluşun lipokalin muteinleri dolayısıyla IL-4 alfa reseptörü alfayı saptanabilir afiniteyle, yani en az yaklaşık 0,1 nM, yaklaşık 10 pM veya daha az bir ayrışma sabitiyle bağlayabilir. Bir muteinin seçilen bir hedefe, mevcut durumda IL-4 reseptörü alfaya bağlanma afinitesi ölçülebilir ve bu sayede bir mutein-ligand kompleksinin K_D değerleri, teknikte uzman 25 kişilerce bilinen birden fazla yöntemle belirlenebilir. Bu yöntemlere, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, floresan titrasyon, rekabetçi ELISA, izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) gibi kalorimetrik yöntemler ve yüzey plazmon rezonansı (BIAcore) dahildir. Bu tip yöntemler için örnekler aşağıda ayrıntılı olarak verilmektedir (Bakınız örneğin Örnek 2).

30 İnsan interlökin-4 reseptörü alfa zinciri, SWISS PROT Veri Bankası Erişim No. P24394'ün (SEQ ID NO: 18) veya bunun fragmanlarının amino asit dizisine sahip olabilir. İnsan interlökin-4 reseptörü alfa zincirinin bir fragmanının resmedici bir örneği, IL-4 reseptörü alfanın 26 ila 232 arasındaki amino asitlerini içerir. İnsan IL-13 reseptörü alfa 1'in amino asit dizisi SEQ ID NO: 19'da gösterilmektedir.

35

Genel olarak, burada buluşun gözyaşı lipokalini muteinlerinin protein ligandlarıyla ilgili olarak kullanıldığı şekliyle “fragman” terimi, tam boy ligandın buluşa göre bir mutein tarafından tanınma ve/veya bağlanma becerisini koruyan, N-ucundan ve/veya C-ucundan kısaltılmış protein veya peptit ligandlarıyla ilgilidir.

5

IL-4 reseptörü alfayı bağlayan bir insan gözyaşı lipokalini muteini, bir IL-4 antagonisti ve/veya IL-13 antagonisti veya bir evrik IL-4 agonisti ve/veya evrik IL-13 agonisti görevi görebilir. Evrik bir agonist belirli bir reseptör için bir agonistle aynı bağlanma-alanına bağlanır ve ilgili reseptörün yapısal aktivitesini tersine çevirir. Şimdiye dek IL-4 reseptörlerinin intrinsik kinaz aktivitesine haiz olduğu bildirilmemiştir, böylece buluşun bir muteini tipik olarak bir IL-4 antagonisti ve/veya IL-13 antagonisti görevi görebilir. Bir uygulamada, insan gözyaşı lipokalini muteinleri insan IL-4 ve/veya insan IL-13’ün antagonistleri görevi görür. Bazı uygulamalarda, mutein, sinomolgus IL-4 IL-4 reseptörü alfayla çapraz-tepkendir ve bu itibarla IL-4 ve/veya IL-13 gibi sinomolgus ligandlarının bir antagonisti görevi görür. Bazı uygulamalarda, mutein, marmoset IL-4 IL-4 reseptörü alfayla çapraz-tepkendir ve bu itibarla IL-4 ve/veya IL-13 gibi marmoset ligandlarının bir antagonisti görevi görür.

IL-4 reseptörü alfa, insan gözyaşı lipokalininin bir doğal-olmayan ligandını tanımlamak için alınabilir. “Doğal-olmayan ligand” terimi, fizyolojik koşullar altında natif olgun insan gözyaşı lipokalinine bağlanmayan bir bileşiği ifade etmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle “insan gözyaşı lipokalini” terimi, SWISS-PROT Veri Bankası Erişim Numarası P31025’in proteinine karşılık gelen olgun insan gözyaşı lipokalinini ifade etmektedir. Olgun insan gözyaşı lipokalini, SWISS-PROT Erişim Numarası P31025’in dizisinde yer alan N-ucu sinyal peptidini içermez (bakınız Şekil 2).

Buluşun bir muteininin amino asit dizisi, diğer lipokalinlere (supra) dizi özdeşlikleriyle kıyaslandığında olgun insan gözyaşı lipokalinine yüksek bir dizi özdeşliğine sahiptir. Bu genel bağlamda buluşun bir muteininin amino asit dizisi, olgun insan gözyaşı lipokalininin amino asit dizisine en azından büyük ölçüde benzerdir. Buluşun bir muteininin, olgun insan gözyaşı lipokalininin dizilerine büyük ölçüde benzer olan ilgili bir dizisi, değiştirilen konumun veya dizinin muhafaza edilmesi şartıyla olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisine en az %95 dahil olmak üzere en az %75, en az %80, en az %82, en az %85, en az %87, en az %90 özdeşliğe sahip olup burada olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisi aşağıdakidir:

HHLLASDEEIQCVSGTWYLKAMTVOREFPEMNLESVTPMTLITLEGONLEAKVTMLISGRQDEVKA
VLEKTDEPGKYTADGGKHVAYIRSHVKOHYIFYCEGELHIGKPVRGVKIVGRDPKNNIFALFDFEK
AAGARGLSTESILIPRQSETCSPGSD

“Özdeşlik” terimiyle, dizilerin, benzerliklerini veya ilişkisini ölçen bir özelliği kastedilmektedir. Özdeşlik, özdeş kalıntılarının sayısının, kalıntıların toplam sayısına
5 bölünmesi ve sonucun 100 ile çarpılmasıyla ölçülür.

“Boşluklar”, bir hizalamada, amino asitlerin eklenmelerinin veya silinmelerinin sonucu olan boşluklardır. Böylelikle, tam olarak aynı dizinin iki kopyası %100 özdeşliğe sahiptir, ancak daha az şekilde oldukça korunmuş ve silintilere, eklentilere veya
10 değiştirmelere sahip olan diziler daha düşük bir özdeşlik derecesine sahip olabilir. Teknikte uzman kişiler, standart parametreler kullanılarak dizi özdeşliğinin belirlenmesi için çeşitli bilgisayar programlarının mevcut olduğunu fark edecektir, örneğin Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. **25**, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. **215**, 403-410) ve Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol.
15 **147**, 195-197).

Bir nükleik aside veya bir polipeptide istinaden “mutasyona uğratılmış” veya “mutant terimi, doğal oluşumlu nükleik asit veya polipeptide kıyasla, bir veya daha fazla nükleotidin veya amino asidin, sırasıyla, değişimini, silintisini veya sokuntusunu ifade
20 etmektedir.

Bazı uygulamalarda, açıklamaya göre bir mutein, 61 ve/veya 153 konumlarında bir natif sistein kalıntısının bir serin kalıntısı tarafından bir amino asit ikamesini içerir. Bu bağlamda, doğal suş gözyaşı lipokalininin, (ilgili bir naif nükleik asit kitaplığı
25 seviyesinde) sistein kalıntıları 61 ve 153 tarafından oluşturulan yapısal disülfid bağının (karşılaştırınız Breustedt, et al., 2005, supra) yok edilmesinin, yalnızca stabil olarak katlı gözyaşı lipokalini muteinleri değil ek olarak belirli bir doğal-olmayan liganda yüksek afiniteyle bağlanabilen muteinler de sağladığının bulunmuş olduğu kaydedilmektedir. Teoriyle sınırlı kalmaksızın, yapısal disülfid bağının ortadan
30 kaldırılmasının, doğal-olmayan suni disülfid bağlarının (spontan) oluşturulmasına veya bu bağların buluşun muteinlerinin içine kasti eklenmesine (bakınız Örnekler), bu sayede muteinlerin, örneğin, stabilitesinin artırılmasına olanak sağlanması hususunda bir diğer avantaj sağladığına da inanılmaktadır. Bazı uygulamalar, açıklamaya göre bir mutein, 101 konumunda bir natif sistein kalıntısının bir serin kalıntısı tarafından bir

amino asit ikamesini içerir. Ayrıca, bazı uygulamalarda, açıklamaya göre bir mutein, 111 konumunda bir natif arjinin kalıntısının bir prolin kalıntısı tarafından bir amino asit ikamesini içerir. Bazı uygulamalarda, açıklamaya göre bir mutein, 114 konumunda bir natif lizin kalıntısının bir triptofan kalıntısı tarafından bir amino asit ikamesini içerir.

5

Buluşa göre insan gözyaşı lipokalininin bir muteini tipik olarak, olgun insan gözyaşı lipokalininin 26 amino asit konumuna karşılık gelen konumda bir asparajin, bir glutamik asit, bir prolin, bir lizin, bir serin ve bir tirosinin birine sahiptir. Bazı uygulamalarda, buluşun bir muteini Arg 26 → Pro ve Glu 34 → Ser amino asit ikamelerini içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Pro ve Met 55 → Ala amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Ser ve Glu 34 → Val amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Ser, Glu 34 → Asn, Met 55 → Ala ve Ser 58 → Lys amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Asn ve Glu 34 → Asp amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Asn ve Met 55 → Ala amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Tyr, Glu 34 → His ve Met 55 → Ala amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Tyr, Glu 34 → His ve Ser 58 → Ala amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Lys, Glu 34 → Arg ve Met 55 → Ala amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun bir muteini Arg 26 → Lys, Glu 34 → Arg ve Ser 58 → Asn amino asit ikamelerin içeren bir diziye sahiptir.

Bazı uygulamalarda buluşun lipokalin muteini 26 konumunda asparajin, pirolin, lizin, serin ve tirosinde biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun lipokalin muteini 32 konumunda histidin, lizin, tirosin ve valinden biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun lipokalin muteini 34 konumunda arjinin, aspartik asit, asparajin, histidin, serin ve valinden biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir. Buluşun lipokalin muteini 55 konumunda alanin olan biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir. Buluşun lipokalin muteini 56 konumunda alanin, glutamin, histidin, metionin ve lizinden biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun lipokalin muteini 58 konumunda alanin, arjinin, asparajin, izolösin ve lizinden biri olan mutasyona uğratılmış bir amino

35

asit kalıntısına sahiptir. Bazı uygulamalarda buluşun lipokalin muteini 63 konumunda glutamin, lizin, prolin ve serinden biri olan mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir.

- 5 Bazı uygulamalarda buluşa göre bir mutein, Met 31 → Ala, Leu 33 → Tyr, Cys 61 → Trp, Asp 80 → Ser, Glu 104 → Leu, His 106 → Pro ve Lys 108 → Gln ikamelerinin tamamını içerir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir mutein bir Val 53 → Phe ikamesi içerir. Mutasyona uğratılmış amino asit kalıntısı ayrıca bir Val 64 → Tyr ikamesi de içerebilir. Ayrıca bir Ala 66 → Leu veya Ala 66 → Asp ikamesi de içerebilir.

10

- Burada ayrıca, insan gözyaşı lipokalininin, 61 ve 153 konumunda ortaya çıkan en azından sistein kalıntısının bir başka amino asit tarafında ikame edilen bir amino asidini ve olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 dizi konumlarındaki amino asit kalıntısının mutasyonunu içeren bir mutein de açıklanmaktadır. 26-28 ve 30-34 konumları AB özesinde yer alır, 53 ve 55 konumları bir beta-katmanının en ucunda yer alır ve ardından 56-58 konumları CD özesinde yer alır. Şaşırtıcı şekilde, 63, 64 ve 66 konumları bir beta-katmanı (β D) içerisinde bulunur ve 80 konumu bir α -helikal bölgede yer alır. 83 konumu, bu α -helikal bölgeyle bir beta-katmanı (β F) arasında bir tekli öze-
 15 tanımlayan amino asittir. 104-106 ve 108 konumlar, gözyaşı lipokalininin β -haznesi yapısının açık ucundaki bağlanma alanındaki GH özesinde yer alır. Bu bölgelerin tanımları burada Flower (Flower, 1996, supra, Flower, et al., 2000, supra) ve Breustedt et al. (2005, supra)'ya göre kullanılmaktadır. Bazı uygulamalarda, mutein, Cys 61 → Trp ve Cys 153 → Ser veya Ala amino asit ikamelerini içerir. Bu tip bir ikamenin, Cys
 20 61 ve Cys 153'ü bağlayan doğal oluşumlu disülfid köprüsünün oluşumunu engellemek ve böylelikle muteinin işlenmesini kolaylaştırmak için faydalı olduğu kanıtlanmıştır.

- Bazı uygulamalarda mutein, Arg 111 → Pro ve Lys 114 → Trp'den seçilen en az bir ilave amino asit ikamesi içerir. Buluşun bir muteini ayrıca, natif olgun insan gözyaşı
 30 lipokalininin dizisinin 101 konumunda, bir başka amino asitle ikame edilen sistein içerebilir. Bu ikame, örneğin, Cys 101 → Ser veya Cys 101 → Thr mutasyonu olabilir.

- Bazı uygulamalarda, mutein, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 dizi konumlarının
 35 her birinde mutasyona uğratılmış bir amino asit kalıntısına sahiptir.

Kalıntı bölgesinde, yani 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 dizi konumlarından farklılık gösteren bölgede, buluşun bir lipokalin muteini, mutasyona uğratılmış amino asit konumlarının dışında doğal suş (doğal) amino asit dizisi içerebilir.

5 Bazı uygulamalarda, buluşa göre bir lipokalin muteini ayrıca, bir dizi konumunda/konumlarında, bu tip bir mutasyon, en azından esasen muteinin bağlanma aktivitesini ve katlanmasını engellemediği veya buna müdahale etmediği sürece, bir veya daha fazla amino asit mutasyonu taşıyabilir. Bu tip mutasyonlar, yerleşik standart yöntemler kullanılarak DNA seviyesinde kolayca yapılabilir. Amino asit dizisinin

10 değişikliklerinin resmedici örnekleri sokuntuların ve silintilerin yanı sıra amino asit ikameleridir. Bu tip ikameler konservatif olabilir, yani bir amino asit kalıntısı, kimyasal olarak benzer, özellikle polaritenin yanı sıra boyutla ilgili benzer özelliklerde olan bir amino asit kalıntısıyla değiştirilir. Konservatif ikamelerin örnekleri, aşağıdaki grupların elemanları arasındaki değiştirmelerdir: 1) alanin, serin ve treonin; 2) aspartik asit ve

15 glutamik asit; 3) asparajin ve glutamin; 4) arjinin ve lizin; 5) izolösin, lösin, metionin ve valin ve 6) fenilalanin, tirosin ve triptofan. Diğer yandan, amino asit dizisinin içine konservatif-olmayan değişikliklerin eklenmesi de mümkündür. Ek olarak, tekli amino asit kalıntılarının değiştirilmesinin yerine, gözyaşı lipokalininin primer yapısının bir veya daha fazla kesintisiz amino asidinin ya sokulması veya silinmesi de, bu silintiler veya

20 sokuntular bir stabil katlı/fonksiyonel muteinle sonuçlandığı üzere mümkündür (bakınız örneğin, budanmış N- ve C-uçlarına sahip muteinlerin oluşturulduğu deney bölümü).

Amino asit dizisinin bu modifikasyonlarına, mutasyona uğratılmış lipokalin geninin veya bunun parçalarının, belirli kısıtlama enzimleri için yarıлма alanları katılmasıyla

25 basitleştirilmesi amacıyla tekli amino asit konumlarının yönlendirilmiş mutajenezi dahildir. Ek olarak, bu mutasyonlar ayrıca, bir lipokalin muteininin belirli bir hedef için afinitesinin daha da geliştirilmesi için de katılabilir. Ayrıca, mutasyonlar, muteinin, katlanma stabilitesinin, serum stabilitesinin, protein direncinin veya suda çözünürlüğünün geliştirilmesi veya gerekirse agregasyon eğiliminin indirgenmesi gibi

30 belirli karakteristiklerini modüle etmek amacıyla eklenebilir. Örneğin, doğal oluşumlu sistein kalıntıları, disüfit köprüsü oluşumunu engellemek için diğer amino asitlere mutasyon edilebilir. Ayrıca, yeni tepken grupları eklemek amacıyla, örneğin, polietilen glikol (PEG), hidroksietil nişasta (HES), biyotin, peptitler veya proteinler gibi diğer bileşiklere konjugasyon için veya doğal oluşumlu-olmayan disüfit bağlarının oluşumu

35 için diğer amino asit dizisi konumunun sisteine kasten mutasyon edilmesi de

mümkündür. Bir insan gözyaşı lipokalin muteininin amino asit dizisinin içine bir sistein kalıntısı eklemek için bu tip bir mutasyonun emsal ihtimallerine Thr 40→ Cys, Glu 73→ Cys, Arg 90→ Cys, Asp 95→ Cys ve Glu 131→ Cys ikameleri dahildir. 40, 73, 90, 95 ve/veya 131 amino asit konumlarının herhangi birinin tarafında oluşturulan tiol bölütü, 5 örneğin, ilgili bir gözyaşı lipokalin muteininin serum yarı-ömrünü arttırmak amacıyla muteinin PEGilatlanması veya HESilatlanması için kullanılabilir.

Mevcut buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı üzere, olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisinin ilk dört N-ucu amino asit kalıntılarının (His-His-Leu-Leu; konumlar 1-4) ve/veya 10 olgun insan gözyaşı lipokalininin dizisinin son iki C-ucu amino asit kalıntılarının (Ser-Asp; konumlar 157-158) silinmiş olduğu muteinleri de kapsamaktadır (karşılaştırınız, ayrıca Örnekler ve ekli Dizi Listesi). Doğal suş dizinin bir başka olası mutasyonu, 5 ila 7 arasındaki dizi konumlarındaki (Ala Ser Asp) amino asit dizisinin, PCT başvurusu WO 2005/019256'da tarif edildiği üzere Gly Gly Asp'ye değiştirilmesidir.

15 Buluşa göre bir gözyaşı lipokalin muteini, olgun insan gözyaşı lipokalinine kıyasla aşağıdaki amino asit ikamelerine sahiptir: Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Leu 33 → Tyr; Ile 57 → Arg; Cys 61 → Trp; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln. Bazı 20 uygulamalarda mutein ayrıca, Val 53 → Phe, Val 64 → Tyr, Ala 66 → Leu amino asit ikameleri kümesini de içermektedir.

Bazı uygulamalarda buluşa göre bir gözyaşı lipokalin muteini olgun insan gözyaşı lipokalinine kıyasla Arg 26 → Pro; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Ser; Met 55 → Ala; Leu 56 25 → Gln; Glu 63 → Lys amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir gözyaşı lipokalin muteini olgun insan gözyaşı lipokalinine kıyasla Arg 26 → Ser; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Val; Met 55 → Ala; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Ile; Glu 63 → Ser amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir gözyaşı lipokalin muteini olgun insan gözyaşı 30 lipokalinine kıyasla Arg 26 → Ser; Asn 32 → Val; Glu 34 → Asn; Met 55 → Ala; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Lys; Glu 63 → Lys amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir. Arg 26 → Tyr; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → His; Met 55 → Ala; Leu 56 → His; Ser 58 → Ala; Glu 63 → Lys amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir gözyaşı lipokalin muteini olgun insan gözyaşı lipokalinine kıyasla Arg 35 26 → Lys; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Arg; Met 55 → Ala; Leu 56 → Lys; Ser 58 → Asn;

Glu 63 → Pro amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir gözyaşı lipokalinini muteini olgun insan gözyaşı lipokalinine kıyasla Arg 26 → Glu; Asn 32 → His; Glu 34 → Gly; Met 55 → Ala; Leu 56 → Met; Ser 58 → Leu; Glu 63 → Lys amino asit ikamelerinin kombinasyonunu içerir.

5

Buluşun insan gözyaşı lipokalininin muteini, SEQ ID NO'lar: 4 ve 6-11'de ortaya konan amino asit dizilerinin herhangi birini veya bunun bir fragmanını veya varyantını içerebilir, esasen bunlardan oluşabilir veya bunlardan oluşabilir. Burada buluşun muteinleriyle ilgili olarak kullanıldığı şekliyle "fragman" terimi, tam-boy olgun insan gözyaşı lipokalininden türetilen, N-ucunda ve/veya C-ucunda kısaltılmış olan, yani N-ucu ve/veya C-ucu amino asitlerinin en az birinden yoksun proteinlerle veya peptitlerle ilgilidir. Bu tip fragmanlar, olgun insan gözyaşı lipokalininin primer dizisinin en az 10 veya daha fazla, mesela 20 veya 30 veya daha fazla ardışık amino asidini içerebilirler ve çoğunlukla olgun insan gözyaşı lipokalininin bir immün-analizinde saptanabilirler.

15

Mevcut buluşta kullanıldığı üzere "varyant" terimi, bir protein veya peptidin, amino asit dizisinin, örneğin ikameyle, silintiyle, sokuntuyla veya kimyasal modifikasyonla modifikasyonlarını içeren türevleriyle ilgilidir. Bu tip modifikasyonlar bazı uygulamalarda, protein veya peptidin fonksiyonelliğini indirgemez. Bu tip varyantlara proteinler dahil olup, burada bir veya daha fazla amino asit, ilgili D-steroizomerleriyle veya örneğin ornitin, hidrokspirolin, sitrulin, homoserin, hidrokسيلisin, norvalin gibi doğal oluşumlu 20 amino asitten farklı amino asitlerle değiştirilmiştir. Ancak, bu tip ikameler ayrıca konservatif de olabilir, yani bir amino asit kalıntısı kimyasal olarak benzer bir amino asit kalıntısıyla değiştirilir. Konservatif ikamelerin örnekleri, aşağıdaki grupların elemanları arasındaki değiştirmelerdir: 1) alanin, serin ve treonin; 2) aspartik asit ve glutamik asit; 3) asparajin ve glutamin; 4) arjinin ve lizin; 5) izolösin, lösin, metionin ve valin ve 6) fenilalanin, tirozin ve triptofan.

25

Buluşun bir gözyaşı lipokalinini muteini bir monomerik protein olarak var olabilir. Bazı uygulamalarda buluşa göre bir lipokalin muteini spontan olarak dimerize veya oligomerize olabilir. Stabil monomerle oluşturan lipokalin muteinlerinin kullanımı, örneğin daha hızlı difüzyon ve daha iyi doku nüfuzu yüzünden bazı uygulamalarda avantajlı olabilir. Diğer uygulamalarda, stabil homodimerleri veya multimerleri spontan olarak oluşturan bir lipokalin muteininin kullanımı, bu tip multimerler belirli bir hedefe (daha da) artan afinite ve/veya avidite sağlayabildiğinden avantajlı olabilir. Ayrıca,

35

lipokalin muteininin oligomerik formları daha yavaş ayrışma hızlarına veya uzatılmış serum yarı-ömrüne sahip olabilir. Stabil monomerle oluşturan muteinlerin dimerizasyonu veya multimerizasyonu arzu edilirse, bu örneğin, jun-fos alanları veya lösin-fermuarları gibi ilgili oligomerizasyon alanlarının buluşun muteinlerine 5 kaynaştırılmasıyla veya “Duokalinlerin” kullanılmasıyla başarılabılır (ayrıca bakınız aşağısı).

Mevcut buluşa göre bir lipokalin muteini, insan gözyaşı lipokalininin bir doğal oluşumlu formunun mutajenezi aracılığıyla elde edilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle “mutajenez” 10 terimi, deney koşullarının, insan gözyaşı lipokalininin belirli bir dizi konumundaki (Swiss-Prot veri bankası girişi P31025) doğal oluşumlu amino asidin, ilgili doğal polipeptit dizisindeki bu spesifik konumunda mevcut olmayan en az bir amino asitle ikame edilebileceği şekilde seçildiği anlamına gelmektedir. “Mutajenez” terimi ayrıca, dizi segmentlerinin boyunun, bir veya daha fazla amino asidin silinmesiyle veya 15 sokulmasıyla (ilave) modifikasyonunu da içerir. Böylelikle, örneğin, seçili bir dizi konumundaki bir amino asidin, doğal suş proteinin ilgili segmentinin boyuna kıyasla iki amino asit kalıntısının bir sokuntusuna yol açacak şekilde üç rastgele mutasyonun bir germesiyle değiştirilmesi buluşun kapsamı dahilindedir. Bu tip bir sokuntu veya silinti, buluşta mutajeneze tabi tutulabilen peptit segmentlerinin herhangi birinde birbirinden 20 bağımsız olarak eklenebilir. Buluşun emsal bir uygulamasında, çeşitli mutasyonların bir sokuntusu, seçilen lipokalin iskelesinin AB öznesinin içine eklenebilir (karşılaştırınız Uluslararası patent başvurusu WO 2005/019256). “Rastgele mutajenez” terimi, belirli bir dizi konumunda hiç önceden belirlenmiş tekli amino asidin (mutasyonunun) mevcut olmadığı ancak en az iki amino asidin belirli bir olasılıkla mutajenez esnasında ön 25 tanımlı bir dizi konumunda katılabildiği anlamına gelmektedir.

İnsan gözyaşı lipokalininin kodlama dizisi (Redl, B. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20282-20287), mevcut buluşta seçilen peptit segmentlerinin mutajenezi için bir başlangıç noktası olarak kullanılır. Anılan amino asit konumlarının mutajenezi için, 30 teknikte uzman kişi, alana-yönelik mutajenez için çeşitli yerleşik standart yöntemlere sahiptir. Yaygın olarak kullanılan bir teknik, sentetik oligonükleotidlerin, istenen dizi konumlarında dejenere bir baz bileşimi taşıyan karışımları kullanılarak mutasyonların PCR (polimeraz zincir tepkimesi) aracılığıyla eklenmesidir. Örneğin, NNK veya NNS kodonunun (burada N = adenin, guanin veya sitosin veya timin; K = guanin veya timin; 35 S = adenin veya sitosin) kullanımı, mutajenez esnasında 20 amino asidin tamamının

- artı durdurma kodonunun katılmasına olanak sağlarken, VVS kodonu, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val amino asitlerini polipeptit dizisinin seçilen konumunun içine katılmasından hariç tuttuğundan, muhtemel olarak katılan amino asitlerin sayısını 12'yle sınırlar; NMS kodonunun (burada M = adenin veya sitosin) kullanımı, Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val amino asitlerini seçili bir dizi konumunda katılmasından hariç tuttuğundan, örneğin, belirli bir seçili dizi konumundaki olası amino asitlerin sayısını 11'le kısıtlar. Bu açıdan, (düzenli 20 doğal oluşumlu amino asitten farklı) diğer amino asitler için, selenosistein veya pirolizin gibi kodonların da bir muteinin bir nükleik asidinin içine katılabileceği kaydedilmektedir. Ayrıca, Wang, L., et al. (2001) *Science* **292**, 498-500 veya Wang, L. and Schultz, P.G. (2002) *Chem. Comm.* **1**, 1-11'de tarif edildiği üzere, diğer olağandışı amino asitlerin, örneğin o-metil-L-tirosin veya p-aminofenilalaninin sokulması amacıyla, çoğunlukla durdurma kodonları olarak tanınan UAG gibi "suni" kodonları kullanmak da mümkündür.
- İndirgenmiş baz çifti özgüllüğüne sahip nükleotid inşa bloklarının, örneğin inosin, 8-okso-2'deoksiguanosin veya 6(2-deoksi- β -D-ribofuranosil)-3,4-dihidro-8H-pirimindo-1,2-oksazin-7-on (Zaccolo et al. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 589-603) kullanımı, mutasyonların seçilen bir dizi segmentinin içine eklenmesi için bir başka seçenektir.
- Bir diğer olasılık, üçlü-mutajenez olarak adlandırılan mutajenezdir. Bu yöntem, kodlama dizilerinin içine katılma için, her biri bir amino asit için kodlama yapan farklı nükleotid üçlülerinin karışımların kullanır (Virnekäs B, et al., 1994 *Nucleic Acids Res* **22**, 5600-5607).
- İlgili polipeptitlerin seçilen bölgelerinde mutasyonların eklenmesi için olası bir strateji, her bir kısmen, mutasyona uğratılacak karşılık gelen dizi segmentlerinin birinden türetilen dört oligonükleotidin kullanımına dayalıdır. Bu oligonükleotidleri sentezlerken, teknikte uzman bir kişi, mutasyona uğratılacak amino asit konumlarına karşılık gelen bu nükleotid üçlülerinin sentezi için nükleik asit inşa bloklarının karışımlarını kullanabilir, böylece tüm doğal amino asitleri kodlayan kodonlar rastgele şekilde ortaya çıkar ve bu da sonunda bir lipokalin peptit kitaplığının oluşturulmasıyla sonuçlanır. Örneğin, birinci oligonükleotid – mutasyona uğratılmış konumlardan ayrı – dizisinde, lipokalin polipeptidinin en N-ucu konumunda mutasyona uğratılacak peptit segmenti için kodlama sarmalına karşılık gelir. Dolayısıyla, ikinci oligonükleotid, polipeptit dizisinde takip eden ikinci dizi segmenti için kodlama-yapmayan sarmala karşılık gelir. Üçüncü

oligonükleotid bu sayede, karşılık gelen üçüncü dizi segmenti için kodlama sarmalına karşılık gelir. Son olarak, dördüncü oligonükleotid, dördüncü dizi segmenti için kodlama-yapmayan sarmala karşılık gelir. İlgili birinci ve ikinci oligonükleotidle ve gerekirse ayrı olarak ilgili üçüncü ve dördüncü oligonükleotidle bir polimeraz zincir
5 tepkimesi gerçekleştirilebilir.

Bu tepkimelerin her ikisinin çoğaltma ürünleri bilinen çeşitli yöntemlerle, mutasyonların seçilen konumlarda eklenmiş olduğu birinciyle dördüncü dizi segmentlerini içeren bir tekli nükleik asit olarak birleştirilebilir. Bu amaçla, ürünlerin her ikisi de örneğin, kuşatan
10 oligonükleotidlerin yanı sıra, ikinciyle üçüncü dizi segmenti arasındaki diziye katkıda bulunan bir veya daha fazla aracı nükleik asit molekülü kullanılarak yeni bir polimeraz zincir tepkimesine tabi tutulabilir. Mutajenez için kullanılan oligonükleotidlerin dizisi içerisindeki sayı ve düzenin seçiminde, teknikte uzman kişi sayısız alternatifte sahiptir.

Yukarıda tanımlanan nükleik asit molekülleri ligasyonla, bir lipokalin polipeptidi ve/veya vektörü kodlayan bir nükleik asidin eksik 5'- ve 3'-dizileriyle bağlantılanabilir ve bilinen bir konak organizmaya klonlanabilir. Ligasyon ve klonlama için birden fazla yerleşik prosedür mevcuttur. Örneğin, klonlayıcı vektörün dizisinde mevcut olan kısıtlama endonükleazları için tanıma dizileri, sentetik oligonükleotidlerin dizisinin içine işlenebilir.
20 Böylelikle, ilgili PCR ürününün ve enzimatik yarılmının güçlendirilmesinden sonra ortaya çıkan fragman, karşılık gelen tanıma dizileri kullanılarak kolayca klonlanabilir.

Mutajenez için seçilen protein için kodlama yapan gen içerisindeki daha uzun dizi segmentleri de bilinen yöntemler vasıtasıyla, örneğin artan hata oranı koşulları altında
25 polimeraz zincir tepkimesi kullanımıyla, kimyasal mutajenezle veya bakteriyel mutasyon yapıcı suşların kullanılmasıyla rastgele mutajeneze tabi tutulabilir. Bu tip yöntemler ayrıca, bir lipokalin muteininin hedef afinitesinin veya özgüllüğünün daha fazla optimizasyonu için de kullanılabilir. Muhtemelen deneysel mutajenezin segmentlerinin dışında oluşan mutasyonlar sıklıkla tolere edilir veya, örneğin, lipokalin
30 muteininin gelişmiş bir yayılma etkililiğine veya yayılma stabilitesine katkıda bulunuyorsa avantajlı oldukları kanıtlanabilir.

Açıklamaya göre bir yöntemde, bir insan gözyaşı lipokalini kodlayan bir nükleik asit molekülü ilk olarak, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 27, 28,
35 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 amino asit dizisi konumlarının

birinde veya daha fazlasında mutajeneze tabi tutulur. İkinci olarak, bir insan gözyaşı lipokalinini kodlayan nükleik asit molekülü, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 konumlarının ikisinde veya daha fazlasında mutajeneze tabi tutulur. Mutasyona uğratılacak ikinci amino asit konumlarından en az bir konum, 58 amino asit konumundan ve 63 amino asit konumundan seçilir.

Açıklamanın bir uygulamasında, insan gözyaşı lipokalininin bir muteininin oluşturulması için yöntem, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 amino asit konumlarının herhangi birinin kodonlarının en az 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16 veya 17'sinin mutasyona uğratılmasını içerir. Bir uygulamada, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 53, 55, 56, 57, 58, 63, 64, 66, 80, 83, 104, 105, 106 ve 108 amino asit dizisi konumlarının kodonlarının 22'sinin tamamı mutasyona uğratılır.

Yukarıda-belirtilen yöntemin bir uygulamasında, ek olarak olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 ve 108 amino asit konumlarının herhangi birinin kodonlarının en az 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15'i mutasyona uğratılır.

Açıklamanın bir diğer uygulamasında, yöntemler, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisindeki 61 ve 153 konumlarında sistein kodlayan kodonların her ikisinin mutasyonunu içerir. Bir uygulamada, 61 konumu, birkaç ihtimal saymak gerekirse bir alanin, fenilalanin, lizin, arjinin, treonin, asparajin, tirozin, metionin, serin, prolin veya triptofan kodlamak için mutasyona uğratılır. 153 konumunun mutasyona uğratıldığı uygulamalarda, bir serin veya alanin gibi bir amino asit 153 konumunda eklenebilir.

Burada tarif edildiği üzere açıklamanın bir başka uygulamasında, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 111 ve/veya 114 amino asit konumlarını kodlayan kodonlar, örneğin 111 konumunda bir arjinin ve 114 konumunda bir triptofan kodlamak için mutasyona uğratılır.

Açıklamanın yöntemlerinin başka bir uygulaması, olgun insan gözyaşı lipokalininin doğrusal polipeptit dizisinin 101 konumunda sisteini kodlayan kodonun mutajenezini içerir, böylece bu kodon herhangi bir başka amino asidi kodlar. Bir uygulamada, 101 konumunu kodlayan mutasyona uğratılmış kodon bir serin kodlar. Dolayısıyla, bazı uygulamalarda, 61, 101 ve 153 konumundaki sistein kodonlarının ya ikisi veya üçünün hepsi, bir başka amino asidin bir kodonuyla değiştirilir.

Yönteme göre, bir mutein, insan gözyaşı lipokainini kodlayan bir nükleik asitten başlayarak elde edilir. Bu tip bir nükleik asit mutajeneze tabi tutulur ve rekombinan DNA teknolojisi aracılığıyla uygun bir bakteriyel veya ökaryotik konak organizmanın içine eklenir. Gözyaşı lipokalininin bir nükleik asit kitaplığının elde edilmesi, teknikte antikor-benzeri özelliklere sahip lipokalin muteinlerinin, yani belirli bir hedefe yönelik afiniteye sahip muteinlerin oluşturulması için bilinen herhangi bir uygun teknik kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu tip kombinatorial yöntemlerin örnekleri ayrıntılı olarak örneğin WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256 veya WO 2006/56464'te tarif edilmektedir. Mutajeneze tabi tutulmuş olan nükleik asit dizilerinin uygun bir konakta ekspresyonundan sonra, birden fazla ilgili lipokalin muteini için genetik bilgi taşıyan, belirli bir hedefe bağlanan klonlar, elde edilen kitaplıktan seçilebilir. Bu klonların seçimi için, faj görüntüleme (Kay, B.K. et al. (1996) *supra*; Lowman, H.B. (1997) *supra* veya Rodi, D.J. ve Makowski, L. (1999) *supra*'da incelenmiştir), koloni tarama (Pini, A. et al. (2002) *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **5**, 503-510'da incelenmiştir), ribozom görüntüleme (Amstutz, P. et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 400-405'te incelenmiştir) veya Wilson, D.S. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3750-3755'te bildirildiği üzere mRNA görüntüleme veya spesifik olarak WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256 veya WO 2006/56464'te tarif edilen yöntemler gibi iyi bilinen teknikler kullanılabilir.

Muteini kodlayan nükleik asit molekülü, herhangi bir uygun ekspresyon sistemi kullanılarak eksprese edilir. Elde edilen mutein veya muteinler seçim ve/veya izolasyon aracılığıyla zenginleştirilir. Seçim örneğin rekabetçi koşullar altında gerçekleştirilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle rekabetçi koşullar, muteinlerin seçiminin, insan gözyaşı lipokalininin muteinlerinin ve belirli doğal-olmayan ligandının, yani IL-4 reseptörü alfanın, muteinlerin IL 4 reseptörü alfaya bağlanmasıyla rekabet eden ilave bir ligand

varlığında temas ettirildiği en az bir adımı kapsar. Bu ilave ligand hedefin fizyolojik bir ligandı, örneğin IL 4, hedefin kendisinin bir fazlalığı veya hedefin, en azından bir örtüşen epitopu buluşun muteinleri tarafından tanınan epitopa bağlayan ve böylelikle muteinlerin hedef bağlamasına müdahale eden herhangi bir diğer fizyolojik-olmayan ligandı olabilir. Alternatif olarak, ilave ligand muteinlerin bağlanmasıyla, muteinlerin bağlama alanından farklı bir epitopun, hedefe allosterik etkilerle komplekslenmesiyle rekabet eder.

Faj görüntüleme tekniğinin temperan M13 faj kullanan bir uygulaması (Kay, B.K. et al. (1996), *supra*; Lowman, H. B. (1997) *supra* veya Rodi, D.J., & Makowski, L. (1999), *supra*'da incelenmiştir), mevcut açıklamada kullanılabilen bir seçim yönteminin bir örneği olarak verilmektedir. Faj görüntüleme teknolojisinin, açıklamanın muteinlerinin seçimi için kullanılabilen bir başka uygulaması, Broders et al. (Broders et al. (2003) "Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display." *Methods Mol. Biol.* **205**:295-302) tarafından tarif edildiği üzere hiperfaj faj teknolojisidir. f1 gibi diğer temperan faj veya T7 gibi litik faj da kullanılabilir. Emsal seçim yöntemi için, mutasyona uğratılmış lipokalin nükleik asit dizisinin N-ucunda bir sinyal dizisine, mesela OmpA-sinyal dizisine ve M13 fajının veya bunun fragmanlarının, C-ucunda faj kapsidinin içine eklenebilen kapsit proteini pIII'e sahip bir füzyon proteini olarak ekspresyonuna olanak sağlayan M13 fajmidleri üretilir. Faj kapsid proteininin, doğal suş dizinin 217 ila 406 arasındaki amino asitlerini içeren C-ucu fragmanı Δ pIII, füzyon proteinlerinin üretilmesi için kullanılabilir. Bir uygulamada, pIII'ün, 201 konumundaki sistein kalıntısının eksik olduğu veya bir başka amino asit tarafından değiştirildiği bir C-ucu fragmanı kullanılır.

Dolayısıyla, açıklamanın yöntemlerinin bir diğer uygulaması, insan gözyaşı lipokalininin bir veya daha fazla muteini için kodlama yapan ve 3' ucundaki mutajenezden kaynaklanan bir nükleik asidin, belirli bir ligandın bağlanması için en az bir muteinin seçilmesi amacıyla M13-familyasının bir ipliksi bakteriyofajının kaplama protein pIII veya bu kaplama proteininin bir fragmanı için kodlama yapan bir genle uygun şekilde kaynaştırılmasını içerir.

Füzyon proteini, bir afinite etiketi gibi, füzyon proteinin veya bunun parçalarının hareketsizleştirilmesine, saptanmasına ve/veya saflaştırılmasına olanak sağlayan ilave bileşenler içerebilir. Ayrıca, lipokalini veya bunun muteinlerini kodlayan dizi bölgeleriyle faj kapsid geni veya bunun fragmanları arasında bir durdurma kodonu yer alabilmekte

olup, burada durdurma kodonu, mesela bir kehribar durdurma kodonu uygun bir baskılayıcı suş içinde translasyon esnasında en azından kısmen bir amino asidin içine transle edilir.

- 5 Örneğin, artık burada tarif edilen pTlc27 olarak da adlandırılan fajmid vektörü pTLPC27, insan gözyaşı lipokalin muteinlerini kodlayan bir fajmid kitaplığının hazırlanması için kullanılabilir. Gözyaşı lipokalin muteinleri için kodlama yapan buluşun nükleik asit molekülleri, iki *Bst*XI kısıtlama alanı kullanılarak vektörün içine sokulur. Ligasyondan sonra, *E. coli* XL1-Blue gibi bir uygun konak suş, çok sayıda bağımsız
- 10 klon sağlamak için ortaya çıkan nükleik asit karışımıyla dönüştürülür. İstenirse, bir hiperfajmid kitaplığının hazırlanması için ayrı bir vektör oluşturulabilir.

- Ortaya çıkan kitaplık müteakiben sıvı kültür içinde, fonksiyonel fajmidler üretmek amacıyla uygun bir M13-yardımcı faj veya hiperfajla süper enfekte edilir. Rekombinan
- 15 fajmid lipokalin muteinini yüzeyi üzerinde, kaplama proteini pIII veya bunun bir fragmanı ile bir füzyon olarak görüntülerken, füzyon proteininin N-ucu sinyal dizisi normal olarak yarılarak atılır. Diğer yandan, yardımcı faj tarafından tedarik edilen natif kapsid proteini pIII'ün bir veya daha fazla kopyasını da taşır ve böylelikle bir alıcıyı, genel olarak bir F- veya F'-plazmidi taşıyan bir bakteriyel suşu enfekte edebilir. Hiperfaj
 - 20 görüntüleme durumunda, hiperfajmidler lipokalin muteinlerini yüzeyleri üzerinde, enfektif kaplama proteini pIII ile ancak natif kapsid proteinsiz şekilde bir füzyon olarak görüntüler. Yardımcı faj veya hiperfajla enfeksiyon esnasında veya sonrasında, lipokalin muteiniyle kapsid proteini pIII arasında füzyon proteininin gen ekspresyonu, örneğin anhidrotetrasiklin eklenmesiyle indüklenebilir. İndükleme koşulları, elde edilen
 - 25 fajmidlerin önemli bir kesitinin yüzeyleri üzerinde en az bir lipokalin muteini görüntülediği şekilde seçilir. Hiperfaj görüntüleme durumunda, indükleme koşulları, lipokalin muteininin ve kapsid protein pIII'ten oluşan üç ila beş arasında füzyon proteini taşıyan hiperfajmidlerin bir popülasyonu ile sonuçlanır. Fajmidlerin izole edilmesi için, polietilen glikolle çöktürme gibi çeşitli yöntemler bilinmektedir. İzolasyon
 - 30 tipik olarak 6-8 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra meydana gelir.

- İzole edilen fajmidler daha sonra, arzu edilen hedefle inkübasyonla seçime tabi tutulabilecek olup, burada hedef, muteinleri taşıyan o fajmidlerin, kaplamalarında füzyon proteinleri olarak istenen bağlama aktivitesiyle en azından geçici
- 35 hareketsizleştirilmesine olanak sağlayan bir biçimde sunulur. Teknikte uzman kişi

tarafından bilinen çeşitli uygulamalar arasından, hedef, örneğin, serum albümin gibi bir taşıyıcı proteinler konjuge edilebilir ve bu taşıyıcı protein vasıtasıyla bu protein bağlayıcı yüzeye, örneğin polistirene bağlanabilir. Örneğin ELISA teknikleri için uygun olan veya “immün-çubuklar” olarak adlandırılan mikrotitre plakaları hedefin bu tip bir

5 hareketsizleştirilmesi için kullanılabilir. Alternatif olarak, hedefin, biyotin gibi diğer bağlayıcı gruplarla konjugatları kullanılabilir. Hedef daha sonra, bu grubu seçimli olarak bağlayan bir yüzey, örneğin streptavidin, nötravidin veya avidinle kaplı mikrotitre plakaları veya paramanyetik partiküller üzerinde hareketsizleştirilebilir. Hedef bir immünoglobülinin bir Fc kısmına kaynaştırılırsa, hareketsizleştirme, protein A veya

10 protein G ile kaplı yüzeylerle, örneğin mikrotitre plakalarıyla veya paramanyetik partiküllerle elde edilebilir.

Yüzeyler üzerinde mevcut olan özgül-olmayan fajmid-bağlama alanları, ELISA yöntemlerinde bilindikleri şekilde bloke edici solüsyonlarla doyurulabilir. Fajmidler daha

15 sonra tipik olarak, fizyolojik bir tampon varlığında yüzey üzerinde hareketsizleştirilen hedefle temas ettirilir. Bağlanmamış fajmidler birden fazla yıkamayla yok edilir. Yüzey üzerinde kalan fajmid partikülleri daha sonra ayrıştırılır. Ayrıştırma için, çeşitli yöntemler mümkündür. Örneğin, fajmidler proteazların eklenmesiyle veya asitlerin, bazların, deterjanların veya kaotropik tuzların varlığında veya ılımlı denşirme koşulları altında

20 ayrıştırılabilir. Bu tip bir yöntem, 2,2 pH'lık tamponlar kullanılarak ayrıştırma olup, burada eluat müteakiben nötrleştirilir. Alternatif olarak, fajmidlere bağlanma için hareketsizleştirilmiş hedefle rekabet etmek amacıyla serbest hedefin bir solüsyonu eklenebilir veya hedefe-özgü fajmidler, ilgi konusu hedefe özgül olarak bağlanan immünoglobülinlerle veya doğal ligand yapıcı proteinlerle rekabetle ayrıştırılabilir.

25 Daha sonra, *E. coli* hücreleri ayrıştırılan fajmidlerle enfekte edilir. Alternatif olarak, nükleik asitler ayrıştırılan fajmidlerden ekstrakte edilebilir ve dizi analizi, çoğaltma veya hücrelerin başka bir şekilde dönüştürülmesi için kullanılabilir. Bu şekilde elde edilen *E. coli* klonlarından başlayarak, taze fajmidler veya hiperfajmidler, M13 yardımcı fajlarla

30 veya yukarıda tarif edilen yöntemle göre hiperfajla süper enfeksiyonla yeniden üretilir ve bu şekilde çoğaltılan fajmidler bir kez daha hareketsizleştirilmiş hedef üzerinde bir seçime tabi tutulur. Yeterince zenginleştirilmiş biçimde buluşun muteinlerine sahip fajmidler elde etmek amacıyla sıklıkla birden fazla seçim döngüsü gereklidir. Seçim döngülerinin sayısı bazı uygulamalarda, müteakip fonksiyonel analizde, çalışılan

35 klonların en %0,1'inin belirli hedef için saptanabilir afiniteye sahip muteinler ürettiği bir

şekilde seçilir. Kullanılan kitaplığın boyutuna, yani kompleksliğine bağlı olarak, bu amaçla tipik olarak 2 ila 8 döngü gereklidir.

Seçilen muteinlerin fonksiyonel analizi için, bir *E. coli* suşu, seçim döngülerinden elde edilen fajmidlerle enfekte edilir ve karşılık gelen çift sarmallı fazmid DNA izole edilir. Bu fazmid DNA'dan ve ayrıca fajmidlerden ekstrakte edilen tek-sarmallı DNA'dan başlayarak, buluşun seçili muteinlerinin nükleik asit dizileri teknikte bilinen yöntemlerle belirlenebilir ve amin asit dizisi bundan çıkarılabilir. Tüm gözyaşı lipokalini muteininin mutasyona uğratılmış bölgesi veya dizisi başka bir ekspresyon vektörü üzerinde alt klonlanabilir ve uygun bir konak organizmada eksprese edilebilir. Örneğin, artık pTlc26 olarak da adlandırılan pTLPC26 vektörü, *E.coli* TG1 gibi *E.coli* suşlarında ekspresyon için kullanılabilir. Bu şekilde üretilen gözyaşı lipokalininin muteinleri çeşitli biyokimyasal yöntemlerle saflaştırılabilir. Örneğin pTlc26 ile üretilen bir gözyaşı lipokalini muteini, örneğin C-ucunda afinite etiketi olarak adlandırılan bir afinite peptidi taşıyabilir ve bu nedenle afinite kromatografiyle saflaştırılabilir. Bir afinite etiketinin örneklerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, biyotin, Strep-etiketi, Strep-etiketi II (Schmidt et al., supra), oligohistidin, polihistidin, bir immünoglobülin alanı, maltoz-bağlayıcı protein, glutation-S-transferaz (GST) veya kalmodulin bağlayıcı peptit (CBP) dahildir.

Bazı afinite etiketleri haptenlerdir, örneğin bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, dinitrofenol ve digoksijenindir. Bazı afinite etiketleri, FLAG®-peptidi (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-Gly), T7 epitopu (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly), maltoz bağlayıcı protein (MBP), herpes simpleks virüsü glikoproteini D'nin Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp dizisinin HSV epitopu, Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala dizisinin hemaglutinin (HA) epitopu, Veziküler Stomatit viral glikoprotein (Cys-Tyr-The-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Lys) VSV-G epitopu, Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg dizisinin E epitop etiketi, Gly-Val-Ser-Ser-Thr-Ser-Ser-Asp-Phe-Arg-Asp-Arg dizisinin E2 epitop etiketi, Glu-Glu-Thr-Ala-Arg-Phe-Gln-Pro-Gly-Tyr-Arg-Ser dizisinin memeli MAPK/ERK kinazlarının C-uçlarının Etiket-100 epitop etiketi, Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser dizisinin S-etiketi, Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu dizisinin c-myc transkripsiyon faktörünün "myc" epitopu ve Simyan Virüsü 5'in (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) paramiksovirüsünün P ve V proteinleri üzerinde mevcut küçük V5 epitopu gibi epitop etiketleridir. Ek olarak, ancak genellikle bir tekli etiket olmayarak, NusA, tiyoredoksin (TRX), küçük ubikutin-benzeri modifiye edici (SUMO) ve ubikutin (Ub) gibi

bir çözünme-güçlendirici etiket kullanılabilir. Haptenler ve epitop etiketleri, karşılık gelen bir antikorla veya bağlayıcı partner olarak bir antikor benzeri proteinli molekülle kombinasyon halinde kullanılabilir. Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser dizisinin S-peptit epitopu, ilgili bir antikorla birlikte veya bir bağlayıcı partner olarak S-proteinle kombinasyon halinde bir epitop etiketi olarak kullanılabilir (Hackbarth, JS, et al., BioTechniques (2004) 37, 5, 835-839).

Seçim ayrıca, diğer yöntemler aracılığıyla da gerçekleştirilebilir. Birçok karşılık gelen uygulama teknikte uzman kişi tarafından bilinmektedir veya literatürde tarif edilmektedir. Üstelik, yöntemlerin bir kombinasyonu uygulanabilir. Örneğin, “faj görüntülemeyle” seçilen veya en azından zenginleştirilen klonlar ek olarak “koloni taramaya” tabi tutulabilir. Bu prosedür, münferit klonların, bir hedef için saptanabilir bağlanma afinitesine sahip bir gözyaşı lipokalini muteininin üretimiyle ilgili olarak doğrudan izole edilebilir.

“Faj görüntüleme” tekniğinde veya “koloni tarama” yönteminde konak organizma olarak *E. coli* kullanımına ek olarak, diğer bakteriyel suşlar, maya veya ayrıca böcek hücreleri veya memeli hücreleri de bu amaçla kullanılabilir. Bir gözyaşı lipokalini muteininin yukarıda tarif edildiği üzere bir rastgele kitaplıktan seçiminin yanı sıra, tekrarlanan tarama döngülerinden sonra hedef için afiniteyle veya özgüllükle ilgili olarak hedef için bir miktar bağlanma aktivitesine çoktan haiz olan bir muteinin optimize edilmesi amacıyla sınırlı mutajenez dahil olmak üzere evrimsel yöntemler de uygulanabilir.

Teknikte uzman kişi tarafından, kompleks oluşumunun, bağlayıcı partnerlerin konsantrasyonu, rekabetçilerin varlığı, tampon sisteminin iyon şiddeti vb. gibi birçok faktöre bağlı olduğu kolayca anlaşılmaktadır. Seçim ve zenginleştirme genellikle, istenen hedefle kompleks halinde, en az 200 nM’lik bir ayrışma sabitine sahip lipokalin muteinlerinin izolasyonuna olanak sağlayan koşullar altında gerçekleştirilir. Ancak, yıkama ve ayrıştırma adımları değişen sertlik altında gerçekleştirilebilir. Kinetik karakteristiklerle ilgili bir seçim de mümkündür. Örneğin, seçim, hedefin hedeften yavaş bir ayrışmasını veya diğer bir deyişle düşük bir k_{off} hızı gösteren muteinlerle kompleks oluşumunu kolaylaştıran koşullar altında gerçekleştirilebilir. Alternatif olarak, seçim, muteinle hedef arasındaki kompleksin hızlı oluşumunu veya diğer bir deyişle yüksek bir k_{on} hızını kolaylaştıran koşullar altında gerçekleştirilebilir. Bir diğer örnekleyici alternatif olarak, tarama, (ya doğal suş gözyaşı lipokalinine veya çoktan ön-seçimli bir hedefe

yönelik afiniteye sahip bir muteine kıyasla) muteinlerin gelişmiş termostabilitesini seçen koşullar altında gerçekleştirilebilir.

Belirli bir hedefe afiniteye sahip bir mutein seçilmiş olduğunda, bu tip bir muteini, daha da yüksek afiniteli varyantların veya daha yüksek termostabilite, gelişmiş serum stabilitesi, termodinamik stabilite, gelişmiş çözünürlük, gelişmiş monomerik davranış, termal denşirmeye, kimyasal denşirmeye, proteolize veya deterjanlara vb. karşı gelişmiş direnç gibi gelişmiş özelliklere sahip varyantların müteakiben seçilmesi amacıyla bir başka mutajeneze ek tabi tutmak da ek olarak mümkündür. Daha yüksek afiniteyi hedefleme durumunda in vitro "afinite olgunlaştırması" olarak değerlendirilebilen bu diğer mutajenez, rasyonel tasarım veya rastgele bir mutasyona dayalı alana özgü mutasyonla elde edilebilir. Daha yüksek bir afinite veya gelişmiş özellikler elde etmek için başka bir olası yaklaşım, lipokalin muteininin dizi konumlarının seçili bir aralığı üzerinde nokta mutasyonlarıyla sonuçlanan hata-eğilimli PCR kullanımıdır. Hata-eğilimli PCR, Zaccolo et al. *J. Mol. Biol.* **255**, 589-603 tarafından tarif edilen gibi bilinen herhangi bir protokole göre gerçekleştirilebilir. Bu amaçlar için uygun rastgele mutajenezin diğer yöntemlerine, Murakami, H et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* **20**, 76-81 tarafından tarif edilen rastgele sokma/silme (RID) mutajenez veya Bittker, J. A et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* **20**, 1024-1029 tarafından tarif edildiği üzere homolog-olmayan rastgele rekombinasyon (NRR) dahildir. İstenirse, afinite olgunlaştırması ayrıca, digoksijenine yüksek afiniteye sahip bilin-bağlayıcı proteinin muteinlerinin elde edilmiş olduğu WO 00/75308 veya Schlehuber, S. et al., (2000) *J. Mol. Biol.* **297**, 1105-1120'de tarif edilen prosedüre göre de gerçekleştirilebilir.

Buluşun bir gözyaşı lipokalin muteini, IL 4 reseptörü alfa ile kompleks oluşumu için kullanılabilir. Mutein ayrıca, IL 4 reseptörü alfa'nın immünojenik bir fragmanına da bağlanabilir. IL-4 reseptörü alfa'nın immünojenik bir fragmanı, bir veya daha fazla epitopa, mimotopa veya diğer antijenik determinantlara sahip olan ve böylelikle bir bağışıklık yanıtı veya bir antikorun ortaya çıkabildiği bir bağışıklık yanıtı indükleyebilen bir fragmandır. İmmünojenik fragman tek bir epitop içerebilir veya birden fazla epitopa sahip olabilir. Bir antijen-sunucu sistem, örneğin bir taşıyıcı protein, bir bağışıklık sistemi tarafından tanınma için gereken boyutu sağlamak için kullanılabilir. İmmünojenik fragman için hiçbir belirli boyut sınırlaması geçerli değildir. Dolayısıyla, immünojenik fragman ayrıca bir "haptan", yani bizzat antijenik olması gerekmeyen veya özellikle küçük moleküler ağırlığı ve dolayısıyla boyutu nedeniyle düşük

immünojeniteye sahip olabilen bir fragmandır. Tipik olarak, immünojenik bir fragman, tek başına veya bir taşıyıcı üzerinde sunulduğunda, MHC molekülleri tarafından sunulursa bir immünoglobülin tarafından veya bir T hücresi reseptörü (TCR) tarafından bağlanabilir. Bir immünojenik fragman tipik olarak, tek başına veya antijen-sunucu sistem formunda sunulduğunda, örneğin B- ve/veya T-lenfositlerinin aktivasyonuna yol açan bir hümmoral bağışıklık yanıtını ve/veya hümmesel bağışıklık yanıtını indüklemeye kapasitesine sahiptir.

Buluşun bir muteininin hedefi, bir transmembran protein olan, 207 amino asitlik bir hücre dışı alan ihtiva eden interlökin-4 reseptörünün alfa zinciridir. Hücre dışı alanın salgılanan bir formu olan, CD124 olarak da bilinen ve IL-4 aktivitelerini bloke edebilen sIL-4R alfa mevcuttur. Buluşun bir muteini sIL-4 reseptörü alfanın yanı sıra IL 4 reseptörü alfanın hümmesel alanının herhangi bir kısmını bağlayabilir.

Bu bağlamda, ilgili muteinle ligandı arasındaki kompleks oluşumunun, ilgili bağlayıcı partnerlerin konsantrasyonları, rekabetçilerin varlığı, kullanılan tampon sisteminin pH'ı ve iyon şiddeti ve ayrışma sabitinin K_D belirlenmesi için kullanılan deney yöntemi (birkaçını saymak gerekirse örneğin floresan titrasyon, rekabetçi ELISA veya yüzey plazmon rezonans) veya hatta deneysel verinin değerlendirilmesi için kullanılan matematiksel algoritma gibi birçok farklı faktörden etkilendiği de kaydedilmektedir.

Bu nedenle, teknikte uzman kişi tarafından burada verilen K_D değerlerinin (ilgili muteinle ligandı arasında oluşan kompleksin ayrışma sabiti), belirli bir lipokalin muteininin belirli bir ligand için afinitesinin belirlenmesi için kullanılan yöntem ve deney düzeneğine bağlı olarak belirli bir deneysel aralık içerisinde değişebileceği bilinmektedir. Bu da, örneğin, K_D değerinin yüzey plazmon rezonansı (Biacore) yoksa rekabetçi ELISA ile mi belirlendiğine bağlı olarak ölçülen K_D değerlerinde hafif bir sapma veya bir tolerans aralığı olabileceği anlamına gelmektedir.

Mevcut buluşun kapsamında ayrıca, yukarıdaki muteinlerin, ilgili muteinin potansiyel immünojenitesine göre değiştirilmiş veya modifiye edilmiş olduğu biçimleri de yer almaktadır.

Sitotoksik T-hümmreleri, bir sınıf I majör histokompatibilite kompleksiyle (MHC) ilişkili bir antijen-sunucu hümmrenin hümmre yüzeyi üzerindeki peptit antijenlerini tanır. Peptitlerin

MHC moleküllerine bağlanma yetisi alele özgüdür ve immünojenesiteleriyle koreledir. Belirli bir proteinin immünojenesitesinin indirgenmesi amacıyla, bir proteindeki hangi peptitlerin belirli bir MHC molekülüne bağlanma potansiyeline sahip olduğunu öngörme yetisi çok değerlidir. Potansiyel T-hücresi epitoplarının tanımlanması için bilgisayarlı bir parça yaklaşımı kullanan yaklaşım önceden, belirli bir peptit dizisinin MHC sınıf I moleküllerine bağlanmasını öngörmek için tarif edilmiştir (Altuvia et al. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**, 244-250).

Bu tip bir yaklaşımdan ayrıca, buluşun muteinlerindeki potansiyel T-hücresi epitoplarının tanımlanması için ve hedeflenen kullanımına bağlı olarak öngörülen immünojenesitesi temelinde spesifik bir muteinin bir seçimini yapmak için faydalanılabilir. Ayrıca, T-hücresi epitopları ihtiva ettikleri öngörölmüş olan peptit bölgelerinin, bu T-hücresi epitoplarını indirmek veya ortadan kaldırmak ve böylelikle immünojenesiteyi minimize etmek için ilave mutajeneze tabi tutmak da mümkündür. Amfipatik epitopların genetik olarak işlenmiş antikorlardan yok edilmesi tarif edilmiştir (Mateo et al. (2000) *Hybridoma* **19**, 6, 463-471) ve mevcut buluşun muteinlerine uyarlanabilir.

Bu şekilde elde edilen muteinler, aşağıda tarif edilenler gibi terapötik ve tanısal uygulamalarda kullanımları için arzu edilen, minimize edilmiş bir immünojenesiteye haiz olabilir.

Bazı uygulamalar için, buluşun muteinlerini etiketli bir biçimde kullanmak da faydalıdır. Dolayısıyla, buluş ayrıca, enzim etiketleri, radyoaktif etiketler, renklendirilmiş etiketler, floresan etiketler, kromojenik etiketler, lüminesan etiketler, haptenler, digoksijeninler, biyotin, metil kompleksleri, metaller ve koloidal altından oluşan gruptan seçilen bir etikete konjuge edilen lipokalin muteinlerine yöneliktir. Mutein ayrıca bir düşük moleküler ağırlıklı organik bileşiğe de konjuge edilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle "düşük moleküler ağırlıklı organik bileşik" terimi, alifatik, alisiklik ve/veya aromatik bölütlere sahip olabilen bir monomerik karbon-esaslı bileşiği ifade etmektedir. Tipik uygulamalarda, düşük moleküler ağırlıklı bileşik, en az iki karbon atomlu ve bazı uygulamalarda 7 veya 12'den fazla olmayan döner karbon bağına sahip bir ana zincire sahip bir organik bileşiktir. Bu tip bir bileşik, yaklaşık 100 ila yaklaşık 2000 Dalton arasında, mesela yaklaşık 100 ila yaklaşık 1000 Dalton arasında bir moleküler ağırlığa sahiptir. Opsiyonel olarak bir veya iki metal atomu içerir.

Genel olarak, lipokalin muteininin, bir kimyasal, fiziksel, optik veya enzimatik tepkimede doğrudan veya dolaylı olarak saptanabilir bir bileşik veya sinyal oluşturan herhangi bir uygun kimyasal madde veya enzimle etiketlenmesi mümkündür. Fiziksel bir tepkime ve aynı zamanda optik tepkime/markör için bir örnek, bir radyoaktif etiket kullanılırken X-ışınlarının ışınlaması veya yayılması üzerine florışmanın yayılmasıdır. Alkalın fosfataz, yaban turpu peroksidaz veya β -galaktosidaz, kromojenik tepkime ürünlerinin oluşumunu katalize eden enzim etiketlerinin (ve aynı zamanda optik etiketlerin) örnekleridir. Genel olarak, antikorlar için yaygın olarak kullanılan tüm etiketler (yalnızca immünoglobülinlerin Fc parçasındaki şeker bölütüyle kullanılanlar hariç), mevcut buluşun muteinlerine konjugasyon için de kullanılabilir. Buluşun muteinleri ayrıca, örneğin, bu tip ajanların, hücrelerin belirli bir hücreye, dokuya veya organa hedeflenmiş aktarılması veya hücrelerin, örneğin, tümör hücrelerinin çevredeki normal hücreleri etkilemeden seçimli hedeflenmesi için herhangi bir uygun terapötik olarak aktif ajanla da konjuge edilebilir. Bu tip terapötik olarak aktif ajanların örneklerine, radyonüklidler, toksinler, küçük organik moleküller ve terapötik peptitler (mesela bir hücre yüzeyi reseptörünün agonistleri/antagonistleri görevi gören veya belirli bir hücresel hedef üzerindeki bir protein bağlanma alanı için rekabet eden peptitler) dahildir. Ancak, buluşun lipokalin muteinleri ayrıca, antisens nükleik asit moleküller, küçük etkileşen RNA'lar, mikro RNA'lar veya ribozomlar gibi terapötik olarak aktif nükleik asitlerle de konjuge edilebilir. Bu tip konjugatlar, teknikte iyi bilinen yöntemlerle üretilir.

Bir uygulamada, buluşun muteinleri ayrıca, buluşun muteinlerini vücut içerisinde arzu edilen bir bölgeye veya alana aktarmak amacıyla spesifik bir vücut bölgesini hedefleyen bir hedefleyici bölüte de eşlenebilir. Bu tip modifikasyonların arzu edilebildiği bir örnek, kan-beyin-bariyerinin geçilmesidir. Kan-beyin bariyerini geçmek amacıyla, aktif taşıma bu bariyeri geçer (bakınız, Gaillard PJ, et al., Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. *International Congress Series*, 2005 1277, 185-198 veya Gaillard PJ, et al. Targeted delivery across the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005 2, 2, 299-309. Bu tip bölütler örneğin 2B-Trans™ markası altında mümkündür (BBB technologies BV, Leiden, Hollanda)).

Yukarıda belirtildiği üzere, buluşun bir muteini bazı uygulamalarda, muteinin serum yarı-ömrünü uzatan bir bölüte konjuge edilebilir (bu bağlamda ayrıca bakınız, bu tip konjugasyon stratejilerinin, insan nötrofil jelatinaz-ilişkili lipokalinin, CTLA-4 için

- bağlanma afinitesine sahip muteinlerine istinaden tarif edildiği PCT yayını WO 2006/56464). Serum yarı-ömrünü uzatan bölüt, birkaçını saymak gerekirse, bir polialkilen, glikol molekülü, hidroksetil nişasta, yağ asidi molekülleri, mesela palmitik asit (Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* **52**, 1-9), bir immünoglobülinin bir Fc parçası, bir immünoglobülinin bir CH3 alanı, bir immünoglobülinin bir CH4 alanı, bunun albümini veya bir fragmanı, bir albümin bağlayıcı peptit veya bir albümin bağlayıcı protein, transferin olabilir. Albümin bağlayıcı protein bir albümin bağlayıcı protein, bir antikör, alan antikörleri dahil olmak üzere bir antikör fragmanı (bakınız örneğin US patenti 6.696.245) veya albümin için bağlanma aktivitesine sahip bir lipokalin bölütü olabilir. Dolayısıyla, buluşun bir lipokalin muteininin yarı-ömrünün uzatılması için uygun konjugasyon partnerlerine albümin (Osborn, B.L. et al., 2002 *supra J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548) veya bir albümin bağlayıcı protein, örneğin, bir bakteriyel albümin bağlayıcı alan, mesela streptokokal protein G'ninki (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83) dahildir. Konjugasyon partneri olarak kullanılabilen albümin bağlayıcı peptitlerin diğer örnekleri, örneğin, US patent başvurusu 2003/0069395'te veya Dennis et al. *supra* (2002)'de tarif edildiği üzere bir Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys konsensüs dizisine sahip olanlar olup, burada Xaa₁ Asp, Asn, Ser, Thr veya Trp'dir; Xaa₂ Asn, Gln, His, Ile, Leu veya Lys'dir; Xaa₃ Ala, Asp, Phe, Trp veya Tyr'dir ve Xaa₄ Asp, Gly, Leu, Phe, Ser veya Thr'dir.
- Diğer uygulamalarda, albüminin kendisi veya albüminin bir biyolojik aktif fragmanı, buluşun bir lipokalin muteininin konjugasyon partneri olarak kullanılabilir. "Albümin" terimi, insan serum albümini veya bovin serum albümini veya sıçan albümini gibi tüm memeli albüminlerini içerir. Albümin veya bunun fragmanı US patenti 5.728.553'te veya Avrupa patenti başvuruları EP 0 330 451 ve EP 0 361 991'de tarif edildiği üzere rekombinan olarak üretilir. Rekombinan insan albümini (Recombunin®) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, BK), muteinin yarı-ömrünü uzatmak amacıyla bir lipokaline konjuge edilebilir veya kaynaştırılabilir.
- Albümin-bağlayıcı protein bir antikör fragmanıysa, bir alan antikörü olabilir. Alan Antikörleri (dAb'ler), optimal güvenli ve etkinlik ürün profili yaratmak için biyofiziksel özellikler ve *in vivo* yarı-ömür üzerinde kesin kontrol sağlamak için işlenir. Alan Antikörleri, örneğin, Domantis Ltd. (Cambridge, BK ve MA, ABD) firmasından temin edilebilir.

Buluşun muteinlerinin serum yarı-ömrünü uzatmak için bir bölüt olarak transferin kullanılarak, muteinler glikosilatlı-olmayan transferinin N veya C ucuna veya her ikisine genetik olarak kaynaştırılabilir. Glikosilatlı-olmayan transferin 14-17 günlük bir yarı-ömre sahiptir ve bir transferin proteini benzer bir uzatılmış yarı-ömre sahip olacaktır.

5 Transferin taşıyıcı ayrıca yüksek biyoyararlanım, biyodağılım ve dolaşımda stabilite sağlar. Bu teknoloji piyasada BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, ABD) firmasından temin edilebilir. Bir protein stabilizörü/yarı-ömür uzatma partneri olarak kullanım için rekombinan insan transferini de (DeltaFerrin™) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, BK) firmasından satın alınabilir.

10

Bir immünoglobülinin bir Fc parçası, buluşun muteinlerinin serum yarı-ömrünü uzatmak amacıyla kullanılıyorsa, Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, ABD) firmasından satın alınabilen *SynFusion*™ teknolojisi kullanılabilir. Bu Fc-füzyonu teknolojisinin kullanımı daha uzun-etkili biyofarmasötiklerin yaratılmasına olanak sağlar ve örneğin

15 farmakokinetiklerin, çözünürlüğün ve üretim etkililiğinin geliştirilmesi için bir antikorun Fc bölgesine bağlı muteinin iki kopyasından oluşabilir.

Buluşun bir muteininin yarı-ömrünü uzatmak için yine başka bir alternatif, buluşun bir muteininin N- veya C-ucunu uzun, yapısı, esnek glisin-zengini dizilere (örneğin yaklaşık

20 20 ila 80 ardışık glisin kalıntısına sahip poli-glisin) kaynaştırmaktır. Örneğin, WO2007/038619'da açıklanan bu yaklaşık ayrıca "rPEG" (rekombinan PEG) olarak da adlandırılmıştır.

Konjugasyon partneri olarak polialkilen glikol kullanılıyorsa, polialkilen glikol ikameli,

25 ikamesi, doğrusal veya dallı olabilir. Ayrıca aktive edilmiş bir polialkilen türevi de olabilir. Uygun bileşiklerin örnekleri, WO 99/64016'da, US patenti 6.177.074'te veya interferonla ilgili olarak US patenti 6.403.564'te tarif edildiği üzere veya PEG-modifiye asparajinaz, PEG-adenosin deaminaz (PEG-ADA) veya PEG-süperoksit dismutaz gibi diğer proteinleri için tarif edildiği üzere polietilen glikol (PEG) molekülleridir (bakınız

30 örneğin, Fuertges et al. (1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release* **11**, 139-148). Polietilen glikol gibi bu tip bir polimerin moleküler ağırlığı, örneğin, yaklaşık 10.000, yaklaşık 20.000, yaklaşık 30.000 veya yaklaşık 40.000 Dalton dahil olmak üzere yaklaşık 300 ila yaklaşık 70.000 Dalton arasında değişebilir. Üstelik, örneğin US patentler 6.500.930 veya 6.620.413'te tarif

35 edildiği üzere, nişasta veya hidroksietil nişasta (HES) gibi karbohidrat oligo- ve

polimerleri de, serum yarı-ömrü uzatılması amacıyla buluşun bir muteinine konjuge edilebilir.

Yukarıdaki bölütlerin biri buluşun insan gözyaşı lipokalinini muteinine konjuge edilirse, bir amino asit yan zincirine konjugasyon avantajlı olabilir. Uygun amino asit yan zincirleri, insan gözyaşı lipokalininin amino asit dizisinde doğal olarak oluşabilir veya mutajenezle eklenebilir. Uygun bir bağlanma alanının mutajenez vasıtasıyla eklenmesi durumunda, bir olasılık, bir amino asidin uygun konumda bir sistein kalıntısıyla değiştirilmesidir. Bir uygulamada, bu tip mutasyon, Thr 40→ Cys, Glu 73→ Cys, Arg 90→ Cys, Asp 95→ Cys veya Glu 131→ Cys ikamesinin en az birini içerir. Bu konumların herhangi birinde yeni yaratılan sistein kalıntısı ardından, muteinin, muteinin serum yarı-ömrünü uzatan PEG veya bunun aktive edilmiş bir türevi gibi bölüte konjuge edilmesi için kullanılabilir.

Bir başka uygulamada, uygun amino asit yan zincirlerinin, buluşun muteinlerinin yukarıdaki bölütlerinin birine konjuge edilmesini engellemek amacıyla, suni amino asitler mutajenezle eklenebilir. Genel olarak, bu tip suni amino asitler daha tepken olacakları ve böylelikle istenen bölüte konjugasyonu kolaylaştıracakları şekilde tasarlanır. Bu tip bir suni amino asidin suni bir rRNA vasıtasıyla eklenebilen bir örneği para-asetil-fenilalanindir.

Burada açıklanan muteinlerin çeşitli uygulamaları için, bunları füzyon proteinleri biçiminde kullanmak avantajlı olabilir. Bazı uygulamalarda, buluşun insan gözyaşı lipokalinini muteini N-ucunda veya C-ucunda bir protein alanına veya bir sinyal dizisi ve/veya bir afinite etiketi gibi bir peptide kaynaştırılır.

Farmasötik uygulamalar için buluşun bir muteini, muteinin *in vivo* serum yarı-örünü uzatan bir füzyon partnerine kaynaştırılabilir (yine bakınız, uygun füzyon partnerlerinin, insan nötrofil jelatinaz-ilişkili lipokalinin, CTLA-4 için bağlanma afinitesine sahip muteinlerine istinaden tarif edildiği PCT yayını WO 2006/56464). Yukarıda tarif edilen konjugatlara benzer şekilde, füzyon partneri, birkaçını saymak gerekirse, bir immünoglobülinin bir Fc parçası, bir immünoglobülinin bir CH3 alanı, bir immünoglobülinin bir CH4 alanı, albümin, bir albümin bağlayıcı peptit veya bir albümin bağlayıcı protein olabilir. Yine, albümin bağlayıcı protein, bir bakteriyel albümin bağlayıcı protein veya albümin için bağlanma aktivitesine sahip bir lipokalin muteini olabilir. Dolayısıyla, buluşun bir lipokalin muteininin yarı-ömrünün uzatılması için uygun

füzyon partnerlerine albümin (Osborn, B.L. et al., (2002) *supra J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548) veya bir albümin bağlayıcı protein, örneğin, bir bakteriyel albümin bağlayıcı alan, mesela streptokokal protein G'ninki (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83) dahildir. Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35035-35043)'de veya US patent başvurusu 2003/0069395'te tarif edilen, Xaa₁ Asp, Asn, Ser, Thr veya Trp; Xaa₂ Asn, Gln, His, Ile, Leu veya Lys; Xaa₃ Ala, Asp, Phe, Trp veya Tyr ve Xaa₄ Asp, Gly, Leu, Phe, Ser veya Thr olduğu bir Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys konsensüs dizisine sahip albümin bağlayıcı peptitler de füzyon partneri olarak kullanılabilir. Ayrıca, buluşun bir lipokalin muteini için füzyon partneri olarak albüminin kendisini veya albüminin biyolojik olarak aktif bir fragmanını kullanmak da mümkündür. "Albümin" terimi, insan serum albümini, bovin serum albümini veya sıçan serum albümini gibi tüm memeli albüminlerini içerir. Albüminin veya bunun fragmanlarının rekombinan üretimi teknikte iyi bilinmektedir ve örneğin US patenti 5.728.553'te, Avrupa patent başvurusu EP 0 330 451 veya EP 0 361 991'de tarif edilmektedir.

Füzyon partneri buluşun lipokalin muteinine, enzimatik aktivite veya diğer moleküller için bağlanma afinitesi gibi yeni karakteristikler kazandırabilir. Uygun füzyon proteinlerinin örnekleri alkalın fosfataz, yaban turpu peroksidaz, glutation-S-transferaz, protein G'nin albümin-bağlayıcı alanı, protein A, antikor fragmanları, oligomerizasyon alanları, aynı veya farklı özgülüğe sahip ("Duokalinlerin" oluşumuyla sonuçlanan, karşılaştırınız Schlehuber, S. ve Skerra, A. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* **382**, 1335-1342) veya toksinlerdir.

Özellikle, buluşun bir lipokalin muteinini, ortaya çıkan füzyon proteinin her iki "bileşeninin" belirli bir terapötik ajan üzerinde birlikte eylemde bulunduğu şekilde ayrı bir enzim aktif alanıyla kaynaştırılması mümkün olabilir. Lipokalin muteininin bağlanma alanı, enzimin hedefin biyolojik fonksiyonunu ortadan kaldırmasına neden olarak, hastalığa-neden olan hedefe eklenir.

Rekombinan proteinlerin kolay saptanmasına ve/veya saflaştırılmasına olanak sağlayan Strep-tag® veya Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766), myc-etiketi, FLAG-etiketi, His₆-etiketi veya HA-etiketi gibi afinite etiketleri veya

glutation-S-transferaz gibi proteinler de uygun füzyon partnerlerinin diğer örnekleridir. Son olarak, yeşil floresan protein (GFP) veya sarı floresan protein (YFP) gibi kromojenik veya floresan özelliklere sahip proteinler de buluşun bir lipokalin muteini için uygun füzyon partnerleridir.

5

Burada kullanıldığı şekliyle “füzyon proteini” terimi ayrıca, bir sinyal dizisi ihtiva eden buluşa göre lipokalin muteinlerini de içerir. Bir polipeptidin N-ucundaki sinyal dizileri bu polipeptidi spesifik bir hücresel bölmeye, örneğin *E. coli*’nin periplazmına veya ökaryotik hücrelerin endoplazmik retikulumuna yönlendirir. Teknikte çok sayıda sinyal dizisi bilinmektedir. Bir polipeptidin *E. coli*’nin periplazmasının içine salgılanması için örnek bir sinyal dizisi OmpA-sinyal dizisidir.

10

Mevcut buluş ayrıca, burada tarif edildiği üzere muteinler için kodlama yapan nükleotid dizileri içeren nükleik asit molekülleriyle de (DNA ve RNA) ilgilidir. Genetik kodun eşenerjiliği belirli kodonların, aynı amino asidi özgülleyen diğer kodonlar tarafından ikamelerine izin verdiğinden, buluş, buluşun bir muteinini kodlayan spesifik bir nükleik asit molekülüyle sınırlı değildir, bir fonksiyonel mutein kodlayan nükleotid dizilerin içeren tüm nükleik asit moleküllerini kapsar.

15

20 Bu nedenle, mevcut buluş ayrıca buluşa göre bir muteini kodlayan bir nükleik asit dizisi de içerir.

Burada tarif edildiği üzere buluş ayrıca, gözyaşı lipokalinini muteinlerini kodlayan, deneysel mutajenezin gösterilen dizi konumlarının dışında ilave mutasyonlar içeren

25

Bu başvuruda açıklanan bir nükleik asit molekülü, bu nükleik asit molekülünün ekspresyonuna olanak sağlamak için bir düzenleyici diziye (veya düzenleyici dizilere) “uygun şekilde bağlı” olabilir.

30

DNA gibi bir nükleik asit molekülü, transkripsiyonel ve/veya translasyonel düzenlemeye dair bilgi ihtiva eden dizi öğeleri içerirse ve bu tip diziler polipeptidi kodlayan nükleotid dizisine “uygun şekilde bağlıysa”, “bir nükleik asit molekülünü eksprese edebilen” veya

35

“bir nükleotid dizisinin ekspresyonuna olanak sağlayabilen” olarak ifade edilir. Uygun bir bağlantı, düzenleyici dizi öğelerinin ve eksprese edilecek dizinin, gen ekspresyonunu sağlayan bir şekilde bağlandığı bir bağlantıdır. Gen ekspresyonu için gereken düzenleyici bölgelerin kesin yapısı türler arasında değişebilir, ancak genel olarak bu bölgeler, prokaryotlarda, hem *bizzat* promotörü, yani transkripsiyonun başlamasını yöneten DNA öğelerini ve ayrıca, RNA içine transkribe edildiğinde, translasyonun başlamasını sinyalleyecek olan DNA öğelerini ihtiva ettiği bir promotör içerir. Bu tip promotör bölgeleri normal olarak -, transkripsiyon ve translasyonun başlamasında yer alan, -35/-10 kutuları ve prokaryotlarda Shine-Dalgarno elemanı veya TATA kutusu, CAAT diziler ve ökaryotlarda 5'-capping elemanları gibi 5' kodlayıcı-olmayan diziler içerir. Bu bölgeler ayrıca, güçlendirici veya baskılayıcı elemanların yanı sıra natif polipeptidin, bir konak hücrenin spesifik bir bölmesine hedeflenmesi için transle edilen sinyal ve lider dizilerini de içerebilir.

Ek olarak, 3' kodlayıcı-olmayan diziler, transkripsiyonel sonlandırma, poliadenilasyon veya benzerlerinde yer alan düzenleyici elemanlar ihtiva edebilir. Ancak, bu sonlandırma dizileri belirli bir konak hücrede tatmin edici şekilde fonksiyonel değilse, bu durumda o hücrede fonksiyonel olan sinyallerle ikame edilebilirler.

Bu nedenle, buluşun bir nükleik asit molekülü, bir promotör dizisi gibi bir düzenleyici dizi içerebilir. Bazı uygulamalarda buluşun bir nükleik asit molekülü bir promotör dizisi ve bir transkripsiyonel sonlandırma dizisi içerir. Uygun prokaryotik promotörler, örneğin, *tet* promotörü, *lacUV5* promotörü veya T7 promotörüdür. Ökaryotik hücrelerde ekspresyon için faydalı promotörlerin örnekleri SV40 promotörü veya CMV promotörüdür.

Buluşun nükleik asit molekülleri ayrıca bir vektörün parçası veya bir plazmid, bir fajmid, bir faj, bir bakulovirüs, bir kozmid veya bir suni kromozom gibi herhangi bir başka türde klonlama aracı da olabilir.

30

Bir uygulamada, nükleik asit molekülü bir fazmid içinde yer alır. Bir fazmid vektörü, M13 veya f1 gibi bir temperan fajın genler arası bölgesini kodlayan bir vektörü veya bunun ilgi konusu cDNA'ya kaynaştırılan bir fonksiyonel parçasını simgeler. Bakteriyel konak hücrelerin bu tip bir fajmid vektörüyle ve uygun bir yardımcı fajla (örneğin M13K07, VCS-M13 veya R408) süper enfeksiyonundan sonra, bozulmamış faj partikülleri üretilir,

35

bu sayede kodlanan heterolog cDNA'nın, faj yüzeyi üzerinde görüntülenen karşılık gelen polipeptidine fiziksel eşlenmesi sağlanır (bakınız örneğin Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 401-424 veya Rodi, D.J. ve Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87-93).

5

Bu tip klonlama araçları, yukarıda tarif edilen düzenleyici dizilerin ve buluşun bir lipokalin muteinini kodlayan bir nükleik asit dizisinin dışında, ekspresyon için kullanılan konak hücreyle uyumlu bir türden türetilen replikasyon ve kontrol dizilerinin yanı sıra dönüştürülmüş veya transfekte edilmiş hücreler üzerinde seçilebilir bir fenotip sağlayan seçim markörleri içerebilir. Çok sayıda uygun klonlama vektörü teknikte bilinmektedir ve piyasada mevcuttur.

10

Buluşun lipokalin muteinlerini kodlayan DNA molekülü ve özellikle bu tip bir lipokalin muteininin kodlama dizisini ihtiva eden klonlama vektörü, geni eksprese edebilen bir konak hücre olarak dönüştürülebilir. Dönüştürme standart teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Böylelikle, buluş ayrıca, burada açıklandığı üzere bir nükleik asit molekülü ihtiva eden bir konak hücreye de yöneliktir.

15

Dönüştürülen konak hücreler, buluşun bir füzyon proteinini kodlayan nükleotid dizisinin ekspresyonu için uygun koşullar altında kültürlenir. Uygun konak hücreler, *Escherichia coli* (*E. coli*) veya *Bacillus subtilis* gibi prokaryotik veya *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, SF9 veya High5 böcek hücreleri, ölümsüzleştirilmiş memeli hücre çizgileri (örneğin HeLa hücreleri veya CHO hücreleri) veya primer memeli hücreleri gibi ökaryotik olabilir.

20

25

Açıklama ayrıca, buluşun bir muteininin üretilmesi için bir yöntemle de ilgili olup, burada mutein, muteinin bir fragmanı veya muteinin bir füzyon proteini ve bir başka polipeptit, genetik işleme yöntemleri aracılığıyla mutein için kodlama yapan nükleik asitten başlayarak üretilir. Yöntem *in vivo* gerçekleştirilebilir, mutein örneğin bir bakteriyel veya ökaryotik konak organizmada üretilir ve daha sonra bu konak organizmadan veya kültüründen izole edilebilir. Ayrıca, bir proteini *in vitro*, örneğin bir *in vitro* translasyon sisteminin kullanımıyla üretmek de mümkündür.

30

Mutein *in vivo* üretilirken, buluşun bir muteinini kodlayan bir nükleik asit (yukarıda önceden genel hatlarıyla verildiği üzere) rekombinan DNA teknolojisi aracılığıyla uygun

35

bir bakteriyel veya ökaryotik konak organizmanın içine eklenir. Bu amaçla, konak hücre ilk olarak, yerleşik standart yöntemler kullanılarak buluşun bir muteinini kodlayan bir nükleik asit molekülü içeren bir klonlama vektörüyle dönüştürülür. Konak hücre daha sonra, heterolog DNA'nın ekspresyonuna ve dolayısıyla karşılık gelen polipeptidin sentezine olanak sağlayan koşullar altında kültürlenir. Müteakiben, polipeptit ya hücreden veya yetiştirme vasatından geri kazanılır.

Buluşun gözyaşı lipokalin muteinlerinde, Cys 61 ile Cys 153 arasındaki doğal oluşumlu disülfid bağı yok edilir. Dolayısıyla, bu tip muteinler (veya bir intramoleküler disülfid bağı içermeyen herhangi bir diğer gözyaşı lipokalin muteini), indirgeyici bir redoks ortama sahip bir hücre bölmesinde, örneğin Gram-negatif bakterilerin sitoplazmasında üretilir. Buluşun bir lipokalin muteininin intramoleküler disülfid bağları içermesi durumunda, yeni oluşan polipeptidi, uygun bir sinyal dizisi kullanılarak oksitleyici bir redoks ortamına sahip bir hücre bölmesine yönlendirmek istenebilir. Bu tip bir oksitleyici ortam, *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerin periplazması tarafından, Gram-pozitif bakterilerin hücre dışı ortamında veya ökaryotik hücrelerin endoplazmik retikulumunun lümeninde sağlanabilir ve çoğunlukla yapısal disülfid bağların oluşumunu kolaylaştırır. Ancak, buluşun bir muteinini, *E. coli* gibi bir konak hücrenin sitosolü içinde üretmek de mümkündür. Bu durumda, polipeptit ya doğrudan bir çözünür ve yayılmış durumda elde edilebilir veya inklüzyon cisimcikleri biçiminde geri kazanılabilir ve ardından *in vitro* yeniden doğallaştırılır. Bir diğer opsiyon, oksitleyici bir hücre içi ortama sahip, böylelikle sitosol içinde disülfid bağlarının oluşumuna olanak sağlayan spesifik konak türlerin kullanımıdır (Venturi M, et al. (2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 1-8).

Ancak, buluşun bir muteininin yalnızca genetik mühendislik kullanılarak oluşturulması veya üretilmesi gerekli olmayabilir. Daha ziyade, bir lipokalin muteini ayrıca, Merrifield katı evre polipeptit sentezi gibi kimyasal sentezle veya *in vitro* transkripsiyon ve translasyonel da elde edilebilir. Örneğin, umut vaat eden mutasyonları moleküler modelleme kullanılarak tanımlanması ve daha sonra istenen (tasarlanan) polipeptidin *in vitro* sentezlenmesi ve belirli bir hedef için bağlanma aktivitesinin incelenmesi mümkündür. Proteinlerin katı evre ve/veya solüsyon evresi sentezi için yöntemler teknikte iyi bilinmektedir (bakınız örneğin Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 29-43).

Bir başka uygulamada, buluşun muteinleri, teknikte uzman kişilerce bilinen iyi-oturmuş yöntemler kullanılarak *in vitro* transkripsiyon/translasyonel üretilebilir.

5 Buluş ayrıca, en az bir adet buluşun insan gözyaşı lipokalininin muteinini veya bir füzyon proteini veya bunun bir konjugatını ve farmakolojik olarak kabul edilen bir eksipiyan içeren farmasötik bir bileşimle de ilgilidir.

10 Buluşa göre lipokalin muteinleri, proteinli ilaçlar için terapötik olarak etkili olan herhangi bir parenteral veya parenteral-olmayan (enteral) yol vasıtasıyla verilebilir. Buluşun muteinleri sistemik olarak veya topikal olarak, istendiği şekilde konvansiyonel toksik-olmayan farmakolojik olarak kabul edilen eksipiyanlar veya taşıyıcılar, katkılar ve araçlar ihtiva eden formülasyonlarda verilebilir.

15 Mevcut buluşun bir uygulamasında, farmasötik bir memeliye ve özellikle insanlara parenteral olarak verilir. Farmasötik bileşim bir sulu solüsyon, bir suda-yağ emülsiyonu veya bir yağda-su emülsiyonu olabilir.

20 Bu bağlamda, Meidan VM and Michniak BB (2004) Am. J. Ther. 11, 4, 312-316'da tarif edildiği üzere transdermal aktarım teknolojilerinin, örneğin iyontoforez, sonoforez veya mikro iğne-güçlendirilmiş aktarımın da, burada tarif edilen muteinlerin transdermal aktarımı için kullanılabileceği de kaydedilmektedir. Buluşun muteinleri sistemik olarak veya topikal olarak, çeşitli konvansiyonel toksik-olmayan farmakolojik olarak kabul edilen eksipiyanlar veya taşıyıcılar, katkılar ve araçlar ihtiva eden formülasyonlarda verilebilir.

25 Uygulanan muteinin dozajı, istenen engelleyici etkinin ya terapötik yanıtın elde edilmesi için geniş sınırlar içerisinde değişebilir. Örneğin, bileşiğin seçilen bir ligand için afinitesinin yanı sıra muteinle ligand arasındaki kompleksin *in vivo* yarı-ömrüne bağlı olacaktır. Ayrıca, optimal dozaj muteinin veya bunun füzyon proteinin veya konjugatının 30 biyodağılımına, veriliş yoluna, tedavi edilmekte olan hastalığın/bozukluğun ciddiyetine ve ayrıca hastanın tıbbi durumuna bağlı olacaktır. Örneğin, topikal uygulamalar için bir merhemde kullanıldığında, gözyaşı lipokalin muteininin yüksek bir konsantrasyonu kullanılabilir. Ancak, istenirse, mutein ayrıca bir sürekli salım formülasyonunda, örneğin lipozomal dispersiyonlar veya PolyActive™ veya OctoDEX™ (karşılaştırınız Bos et al., 35 Business Briefing: Pharmatech 2003, 1-6) gibi hidrojel-tabanlı polimer mikroküreler

olarak da verilebilir. Mevcut olan diğer sürekli salım formülasyonları örneğin PLGA tabanlı polimerler (PR pharmaceuticals), PLA-PEG tabanlı hidrojeller (Medincell) ve PEA tabanlı polimerlerdir (Medivas).

- 5 Dolayısıyla, mevcut buluşun muteinleri, farmakolojik olarak kabul edilen içeriklerin yanı sıra yerleşik hazırlama yöntemleri kullanılarak bileşimler halinde formüle edilebilir. Farmasötik bileşim ayrıca, örneğin, dolgular, bağlayıcılar, ıslatıcı ajanlar, glidantlar, stabilizörler, koruyucular, emülgatörler gibi katkı maddeleri ve ayrıca çözücüler veya çözündürücüler veya bir depo etkisi elde etmek için ajanlar da ihtiva edebilir. İkincisi, 10 füzyon proteinlerinin, lipozomlar ve mikrokapsüller gibi yavaş veya sürekli salım veya hedeflenmiş aktarım sistemlerinin içine de katılabilmesidir.

- Formülasyonlar, bir bakteri-tutucu filtre üzerinden filtrasyon dahil olmak üzere çeşitli araçlarla veya kullanımdan hemen önce steril suda veya diğer steril vasatta 15 çözünebilen veya dağılabilen steril katı bileşimler biçiminde sterilize edici ajanların katılmasıyla sterilize edilebilir.

- Burada tarif edilen bir lipokalin muteini, bizzat bir insan hasta dahil olmak üzere bir organizmaya veya farmakolojik olarak etken maddeler veya uygun taşıyıcılar veya 20 ekspiyan(lar) içerebilen veya bunlarla karıştırılabilen bir farmasötik bileşim içinde verilebilir. İlgili bir lipokalin muteini bileşiminin formülasyonu ve verilışı için teknikler, teknikte iyi oturmuş düşük moleküler ağırlıklı bileşikler için olanlara benzer veya bunlarla özdeştir. Emsal yollara, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, oral, transdermal ve parenteral aktarım dahildir.

- 25 Buluşun bir lipokalin muteinini içeren bir bileşim örneğin deri üzerinde veya bir yara üzerine uygulanabilir. Bazı uygulamalarda bir lipokalin muteini veya ilgili bir bileşim sistemik biçimden ziyade bir lokal biçimde, örneğin, enjeksiyon vasıtasıyla verilebilir.

- 30 Mevcut buluşun bir lipokalin muteinini içeren farmasötik bileşimler kendiliğinden bilinen bir biçimde, örneğin, konvansiyonel karıştırma, çözündürme, granülleme, draje-yapımı, düzleştirme, emülsiyonlaştırma, kapsülleme, yakalama veya liyofilize etme işlemleri aracılığıyla üretilebilir. Mevcut buluşa göre kullanım için bir farmasötik bileşim böylelikle, hidrojelin ve/veya peptidin/peptoidin farmasötik olarak kullanılabilen 35 preparasyonlar olarak işlenmesini kolaylaştıran ekspiyanlar ve yardımcı maddeleri

dahil olmak üzere bir veya daha fazla fizyolojik olarak kabul edilen taşıyıcı kullanılarak konvansiyonel bir biçimde formüle edilebilir. Doğru formülasyon, seçilen veriliş yoluna bağlıdır.

- 5 Enjeksiyon için, lipokalin mutinin veya ilgili bir bileşim sulu solüsyonlar olarak, örneğin Hanks solüsyonu, Ringer solüsyonu veya fizyolojik salin tamponu gibi fizyolojik olarak uygun tamponlar olarak formüle edilebilir. Transmukozal veriliş için, nüfuz edilecek bariyere uygun penetranlar formülasyonda kullanılır. Bu tip penetranlar teknikte genel olarak bilinmektedir.

10

- Oral veriliş için, lipokalin muteinin veya ilgili bir bileşim, bunların teknikte iyi bilinen farmakolojik olarak kabul edilen taşıyıcılarla birleştirilmesiyle kolayca formüle edilebilir. Bu tip taşıyıcılar lipokalin muteininin veya ilgili bir bileşimin yanı sıra mevcut olduğu durumda farmasötik olarak aktif bileşiğin, tedavi edilecek olan bir hasta tarafından oral sindirimi için tabletler, haplar, drajeler, kapsüller, sıvılar, jeller, şuruplar, bulamaçlar, süspansiyonlar ve benzerleri olarak formüle edilmesini sağlar. Oral kullanım için farmasötik preparasyonlar, tabletler veya draje içleri elde etmek için, istenirse, uygun yardımcı maddelerin eklenmesinden sonra bir katı eksipiyanın eklenmesiyle, opsiyonel olarak oluşan bir karışımın öğütülmesiyle ve granüllerin karışımının işlenmesiyle elde edilebilir. Uygun eksipiyanlar, özellikle, laktoz, sükroz, manitol veya sorbitol dahil olmak üzere şekerler gibi dolgular; örneğin, mısır nişastası, buğday nişastası, pirinç nişastası, patates nişastası, jelatin, gam tragasant, metil selüloz, hidroksipropilmetil-selüloz, sodyum karboksimetilselüloz ve/veya polivinilpirolidon (PVP) gibi selüloz preparasyonlardır. İstenirse, çapraz-bağlı polivinil pirolidon, agar veya aljinik asit veya bunun sodyum aljinat gibi bir tuzu gibi parçalayıcı ajanlar eklenebilir.
- 15
- 20
- 25

- Draje içleri uygun kaplamalarla sağlanır. Bu amaçla, opsiyonel olarak gam arabik, talk, polivinil pirolidon, karbopol jel, polietilen glikol ve/veya titanyum dioksit, lake solüsyonları ve uygun organik çözücüler veya çözücü karışımları ihtiva edebilen konsantre şeker solüsyonları kullanılabilir. Tanımlama için veya aktif bileşik dozlarının farklı kombinasyonlarının karakterize edilmesi için tabletlere veya draje kaplamalarına boyarmaddeler veya pigmentler eklenebilir.
- 30

- Oral olarak kullanılabilen farmasötik preparasyonlara, jelatinden yapılan sıkı-geçirme kapsüllerin yanı sıra jelatinden ve gliserol veya sorbitol gibi bir plastikleştiriciden
- 35

yapılan sızdırmaz kapsüller dahildir. Sıkı-geçirme kapsüller, laktoz gibi dolgular, nişastalar gibi bağlayıcılar ve/veya talk veya magnezyum stearat gibi kaydırıcılar ve opsiyonel olarak stabilizörlerle karışım halinde etken maddeleri ihtiva edebilir. Yumuşak kapsüllerde, peptitler/peptoidler, yağ asitleri, sıvı parafin veya sıvı polietilen glikoller gibi uygun sıvılarda süspanse edilebilir. Ek olarak, stabilizörler eklenebilir. Oral veriliş için tüm formülasyonlar, bu tip veriliş için uygun dozajlarda olmalıdır.

Lipokalin muteini, enjeksiyonla, örneğin, intramusküler enjeksiyonlarla veya bolus enjeksiyonlarla veya sürekli infüzyonla parenteral veriliş için formüle edilebilir. Enjeksiyon için formülasyonlar eklenen bir koruyucuyla birlikte birim dozaj formlarında, örneğin, ampuller olarak veya çok-dozlu konteynırlar olarak formüle edilebilir. İlgili bileşimler, yağlı veya sulu araçlarda süspansiyonlar, solüsyonlar veya emülsiyonlar gibi formlarda olabilir ve süspanse edici, stabilize edici ve/veya dağıtıcı ajanlar gibi formülatör ajanlar ihtiva edebilir.

Bu tip bir tedaviye ihtiyacı olan süje, birkaç örnek saymak gerekirse bir insan, bir köpek, bir fare, bir sıçan, bir domuz, sinomolgus gibi bir maymun gibi bir memeli olabilir. Mevcut buluşun bir muteini, bu tip bir hastalık veya bozukluğun gelişmesinde mevcut açıklamanın bir nükleik asit kitaplığının ekspresyon ürününe görüntülenebilen veya diğer şekillerde elde edilen gözyaşı lipokalini muteinlerine görüntülenebilen IL-4 reseptörü alfanın dahil olduğu herhangi bir hastalık veya bozukluğun tedavi edilmesi için kullanılabilir.

Bu bağlamda, çeşitli tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha yüksek bir sayıda yüksek afiniteli IL-4 reseptörleri eksprese ettiği kaydedilmektedir. Bu tip hücrelere melanom, meme kanseri, yumurtalık karsinom, mezotelyom, gliyoblastom, astrositom, renal hücre karsinom, baş ve boyun karsinom, AIDS'le ilişkili Kaposi sarkomu = AIDS KS, hormon bağımlı ve bağımsız prostat karsinom hücreleri ve prostat tümörlerinden primer kültürler gibi katı insan tümörü içerir, örneğin (karşılaştırınız Örneğin Garland, L, et al., (2005) Journal of Immunotherapy 28, 4, 376-381, Rand, RW, et al. Clinical Cancer Research. (2000) 6, 2157-2165; Husain SR, et al. (1999) Nature Medicine 5, 817-822; Puri RK, et al. Cancer Research (1996) 56, 5631-5637; Debinski W, et al veya Husain SR, et al. Cancer Research (1998) 58, 3649-3653, Kawakami K, et al. (2000) Cancer Research, 60, 2981-2987 veya Strome SE, et al. Clinical Cancer Research (2002) 8, 281-286). IL-4 reseptörlerinin aşırı ekspresyonunu belgeleyen

hücrelerin spesifik örneklerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, Burkitt lenfoma hücre çizgisi Jijoye (B-hücreli lenfom), prostat karsinom (LNCaP, DU145), baş ve boyun karsinom (SCC, KCCT873), Pankreatik kanser (PANC-1 hücre çizgisi), SCC-25: 13.000 (+/-500) h baş ve boyun kanseri hücre çizgisi (ATCC) dahildir. IL4R alfa zinciri, 5 IL4-içselleştirilmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla, bir toksine kaynaştırıldığında veya konjuge edildiğinde, IL-4 Reseptörü alfa zincirine bağlanan gözyaşı lipokalini muteinleri bu nedenle tümörlerin (kanseri) tedavisi için de kullanılabilir. Uygun toksinlerin örneklerine Psödomonas eksotoksin, pertüsis-toksini, difteri toksini, risin, saporin, psödomonas eksotoksin, kalikeamisin veya bunun bir 10 türevi, bir taksoid, bir maytansinoid, bir tübülisin ve bir dolastatin analogu dahildir. Dolastatin analoglarının örneklerine, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, auristatin E, monometilauristatin E, auristatin PYE ve auristatin PHE dahildir.

Kanserin tedavisi için, IL-4 Reseptörü alfa zincirine bağlanan muteinlerin sitostatik bir 15 ajana konjuge edilmesi de mümkündür. Bu tip sitostatik ajanların örneklerine Sisplatin, Karboplatin, Oksaliplatin, 5-Florourasil, Taksoer (Dosetaksel), Paklitaksel, Antrasiklin (Doksorubisin), Metotreksat, Vinblastin, Vinkristin, Vindesin, Vinorelbin, Dakarbazin, Siklofosfamid, Etoposid, Adriamisin, Kamptotesin, Kombretastatin A-4 ilişkili bileşikler, sülfonamidler, oksadiazolinler, benzo[b]tiyofenes sentetik spiroketal piranlar, 20 monotetrahidrofuran bileşikler, kurasin ve kurasin türevleri, metoksioestradiol türevleri ve Lökovorin dahildir.

Yukarıdaki açıklamadan görüldüğü üzere, mevcut buluşun bir muteini veya bunun bir füzyon proteinin veya bir konjugatı birçok uygulamada kullanılabilir. Genel olarak, bu tip 25 bir mutein, spesifik olarak Fc parçasının glikosilasyonuna dayananlar hariç antibiyotiklerin kullanıldığı tüm uygulamalarda kullanılabilir.

Bu nedenle, açıklamanın bir başka yönünde, buluşun insan gözyaşı lipokalini muteinleri, insan gözyaşı lipokalininin doğal-olmayan belirli bir ligandının 30 saptanmasında kullanılır. Bu tip kullanım, muteinin uygun koşullar altında, belirli ligandı ihtiva ettiğinden şüphelenilen bir numuneyle temas ettirilmesi, bu sayede muteinle belirli ligand arasında bir kompleksin oluşturulmasına olanak sağlanması ve komplekslenmiş muteinin uygun bir sinyalle saptanması adımlarını içerebilir.

Saptanabilir sinyale, yukarıda açıklandığı üzere bir etiket veya kendisine bağlanma, yani kompleks oluşumunu nedeniyle fiziksel özelliklerde bir değişiklik neden olabilir. Bunun bir örneği, değeri bir altın folyo gibi bir yüzey üzerinde hareketsizleştirilmiş olandan bağlayıcı partnerlerin bağlanması esnasında değişen plazmon yüzey
5 rezonanstır.

Burada açıklaman insan gözyaşı lipokalininin muteinleri ayrıca, insan gözyaşı lipokalininin belirli bir doğal-olmayan ligandının ayrılması için de kullanılabilir. Bu tip bir kullanım, muteinin uygun koşulları altında, söz konusu ihtiva etmesi gereken bir numuneyle temas ettirilmesi, bu sayede muteinle belirli ligand arasında bir kompleksin oluşturulmasına olanak sağlanması ve mutein/ligand kompleksinin numuneden ayrılması adımlarını içerebilir.

Muteinin hem belirli bir doğal-olmayan ligandın saptanması için hem belirli bir ligandın ayrılması için kullanımında, mutein ve/veya hedef uygun bir katı faz üzerinde hareketsizleştirilebilir.

Buluşun insan gözyaşı lipokalini muteinleri ayrıca, bir bileşiğin önceden seçilen bir alana hedeflenmesi için de kullanılabilir. Böyle bir amaç için, mutein, kompleks oluşumuna olanak sağlamak amacıyla ilgi konusu bileşikle temas ettirilir. Daha sonra, muteini ve ilgi konusu bileşiği içeren kompleks önceden seçilen alana aktarılır. Bu kullanım özellikle bir ilacın (seçimli olarak), ilaçla tedavi edilmesi gereken bir enfekte vücut parçası, doku veya organ gibi bir organizmadaki önceden seçilen bir alana aktarılması için uygundur ancak bununla sınırlı değildir. Muteinle ilgi konusu bileşik arasında bir kompleks oluşumunun yanında, mutein ayrıca, muteinin ve bileşiğin bir konjugatının sağlanması için belirli bileşikle de tepkimeye sokulabilir. Yukarıdaki komplekse benzer şekilde, bu tip bir konjugat, bileşiğin önceden seçilen hedef alana aktarılması için uygun olabilir. Mutein ve bileşiğin bu tip bir konjugatı ayrıca, muteini ve bileşiği birbirine eşdeğerli olarak bağlayan bir bağlayıcı da içerebilir. Opsiyonel olarak, bu tip bir bağlayıcı kan dolaşımında stabildir ancak hücresel bir ortamda yarılabılır.

Burada açıklanan muteinler ve türevleri böylelikle, antikorlara veya bunların fragmanlarına benzer birçok alanda kullanılabilir. Belirli bir muteinin veya bir konjugatın hedefinin veya bu hedefin bir füzyon proteininin hareketsizleştirilmesine veya ayrılmasına olanak sağlayacak şekilde bir desteğe bağlanma için kullanımlarına ek

olarak, muteinler bir enzim, bir antikor, bir radyoaktif madde veya biyokimyasal aktiviteye veya tanımlı bağlama karakteristiklerine sahip herhangi bir diğer grupla etiketleme için kullanılabilir. Bunu yaparak, bunların ilgili hedefleri veya bunların füzyon proteinlerinin konjugatları saptanabilir veya bunlarla temas ettirilebilir. Örneğin, buluşun

5 muteinleri, yerleşik analitik yöntemler (örneğin, ELISA veya Western Lekeleme) aracılığıyla veya mikroskopi veya immüno-sensörlerle kimyasal yapıların saptanması görevini de görebilir. Burada, saptama sinyali ya doğrudan uygun bir mutein konjugatının veya füzyon proteinin kullanılmasıyla veya dolaylı olarak bağlı muteinin bir antikor vasıtasıyla immüno-kimyasal saptanmasıyla oluşturulabilir.

10

Tıpta buluşun muteinleri için sayısız olası uygulamalar da mevcuttur. Bunların tanısal ve ilaç aktarımı için kullanımına ek olarak, buluşun, örneğin, dokuya- veya tümöre-özümlü hücresel yüzeyi bağlayan bir mutant polipeptidi oluşturulabilir. Bu tip bir mutein, örneğin, "tümör görüntüleme" için konjuge formda veya bir füzyon proteini olarak veya

15 doğrudan kanser terapisi için kullanılabilir. Dolayısıyla, mevcut buluş, buluşun bir muteinini ve eksipiyanlar, tamponlar (muteinlerin etiketlenmesi için kullanılabilen) etiketler gibi tanı için araçlar içeren bir tanısal bileşim sağlar.

20

Böylelikle, mevcut buluş ayrıca, buluşun insan gözyaşı lipokalini muteinlerinin, belirli bir doğal-olmayan ligandla kompleks oluşumu için kullanımını da içermektedir.

25

Burada tarif edilen bir başka ilgili kullanımı hedef doğrulamadır, yani bir hastalık veya bozukluğun gelişmesinde veya ilerleyişinde yer aldığı varsayılan bir polipeptidin gerçekten de bir şekilde o hastalık veya bozukluğun nedeni olup olmadığını analizidir.

Bir proteinin farmakolojik ilaç hedefi olarak doğrulanması için bu kullanım, mevcut buluşun bir muteininin, natif konformasyonunda bir proteinin bir yüzey alanını özgül olarak tanıma, yani natif bir epitopa bağlanma yetisinden faydalanır. Bu bağlamda, bu yetinin yalnızca sınırlı bir sayıda rekombinan antikorlar için bildirilmiş olduğu kaydedilmektedir. Ancak, buluşun bir muteininin, bir ilaç hedefinin doğrulanması için

30 kullanımı proteinlerin hedefler olarak saptanmasıyla sınırlı değildir, ayrıca protein alanlarının, peptitlerin, nükleik asit moleküllerinin, organik moleküllerin veya metal komplekslerinin saptanmasını da içerir.

Buluşun Emsal Uygulaması

35

Şekil 1, önceden açıklanan, IL-4 reseptörü alfa için bağlanma afinitesi sergileyen bir insan gözyaşı lipokalini muteininin (S191.4-B24) primer yapısını göstermektedir. İlk 21 kalıntı (altı çizili), periplazmik ekspresyon üzerine yarılan sinyal dizisini oluşturur. N-ucu T7-etiketi (italik) ve C-ucu Streptag-II (koyu), karakterize edilen proteinin parçalarıdır.

5 Şekil 1 ayrıca, doğal suş gözyaşı lipokalininin 4 N-ucu amino asit kalıntısının (His1 His2 Leu3 Ala4) yanı sıra son iki C-ucu amino asit kalıntısının (Ser157 ve Asp158) bu muteinde silindiğini de göstermektedir.

Şekil 2, IL-4 reseptörü alfa için yüksek afiniteye sahip emsal muteinlerin polipeptit dizilerini (SEQ ID NO'lar: 2-11) göstermektedir. 'SwissProt P31025' ile gösterilen sayılar, SwissProt veritabanının girdisinin işlenmemiş öncül dizisinin karşılık gelen amino asit konumu numaralandırılmasını göstermektedir. Wt TLc26 esasen, pTLc26 vektöründe doğal suş gözyaşı lipokalininin dizisine karşılık gelmektedir. Ancak, wt TLc26, olgun proteinin 61 ve 153 konumlarındaki sistein kalıntıları serin kalıntılarıyla

15 değiştirildiğinden, bir disülfid bağı içermez. Benzer şekilde, olgun proteinin 101 konumundaki bir serin kalıntısı bir serin kalıntısıyla değiştirilir. Ek olarak, olgun proteinin 111 konumunda bir arjinin kalıntısı bir prolinle değiştirilmiştir ve olgun proteinin 114 konumunda bir lizin kalıntısı bir triptofan ile değiştirilmiştir. Ayrıca, SwissProt girişi P31025'in dizisinde yer alan iki C-ucu amino asit dizide yer almaz.

20 AB4004, uluslararası patent başvuru WO 2008/015239'da açıklanan, mutasyona uğratılmış konumların koyu olarak gösterildiği bir randomizasyon kitaplığıdır. Randomize diziler, 53 ve 55 konumu haricinde J14'e özdeştir. M3-B24(PSM), PSM B24'ten sıcak noktaları göstermektedir.

Şekil 3, TF-1 hücresi proliferasyonu analizlerinin sonuçlarını göstermektedir. TF-1 hücreleri 1 saat süreyle 37°C'de, buluşun gösterilen muteinleriyle (S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20, S308.3 O10, S191.4 B24 [SEQ ID NO'lar: 2-11]), 72 saat süreyle 0,8 ng/ml IL-4 (**A**) veya 12 ng/ml IL-13 (**B**) eklenmesinden önce bir seyreltme serisinde inkübe edilmiştir. Proliferasyon, ³H-timidin

30 katılmasıyla ölçülmüştür.

Şekil 4, Şekil 3'ün IC₅₀ değerlerini ve IL-4 reseptörü alfa için afiniteye sahip insan gözyaşı lipokalininin muteinlerinin Biacore ölçümlerinin sonuçlarını göstermektedir. Yaklaşık olarak 400 RU IL-4 reseptörü alfa-Fc, önceden bir anti insan-Fc monoklonal

35 antikorla kaplanmış olan bir CM-5 çipi üzerinde yakalanmıştır. Müteakiben, 25 nM'lik bir

tekli konsantrasyondaki mutein akış hücresi üzerinden geçirilmiş ve rezonans birimlerindeki değişiklikler kaydedilmiştir. Herhangi bir IL-4 reseptörü alfa-Fc'ye sahip olmama dışında eşit olarak muamele edilen bir akış hücresinden referans sinyalleri çıkartılmıştır ve ortaya çıkan veriler, BIAevaluation yazılımı kullanılarak bir 1:1

5 Langmuir modeline uydurulmuştur. Yavaş ayrışma kinetikleri nedeniyle, sinyallerin herhangi bir IL-4 reseptörü alfa-Fc'ye sahip olmama dışında eşit olarak muamele edilen bir akış hücresinden sinyallerin çıkartılması ve yalnızca numune tamponunun enjekte edilmiş olduğu bir deneyden sinyalin çıkartılması için çift referanslama kullanılmıştır. Ortaya çıkan veriler, BIAevaluation yazılımı kullanılarak kütle-taşıma sınırlamasına

10 sahip bir 1:1 Langmuir modeline uydurulmuştur.

Aksi belirtilmediği sürece, teknikte rekombinan gen teknolojisinin yerleşik yöntemleri kullanılmıştır.

15 Örnekler

Örnek 1: S191.4-B24 muteinin bir alana-yönelik rastgele yaklaşık kullanılarak afinite olgunlaştırılması

20 PCT başvurusu WO 2008/015239'da tarif edilen S191.4-B24 muteinine (SEQ ID NO:2) dayalı varyantların bir kitaplığı, bu konumlar üzerindeki 20 amino asidin tamamına olanak sağlamak için 26, 32, 34, 55, 56, 58 ve 63 konumlarının randomizasyonu ile tasarlandı. Kitaplık esasen WO 2008/015239'un Örnek 1'inde tarif edildiği şekilde yapılandırıldı.

25

Fajmid seçimi WO 2008/015239'un Örnek 2'sinde tarif edildiği üzere, IL-4 reseptörü alfaya karşı rekabetçi bir monoklonal antikora birlikte, sırasıyla, uzatılmış yıkama süreleriyle (MAB230, R&D Systems; 1 saat yıkama) veya kısa inkübasyon süreleriyle (10 dakika) birleşik halde sınırlı hedef konsantrasyon (IL-4 reseptörü alfanın 0,5 nM ve

30 0,1 nM'si, Peprotech) kullanılarak gerçekleştirildi. Üç veya dört tur seçim gerçekleştirildi.

IL-4 reseptörü alfaya-özü muteinlerin hazırlama üretimi, pTLPC10 (SEQ ID NO: 1) ekspresyon vektörü üzerinde kodlanan ilgili muteini barındıran *E. coli* K12 suşu JM83

35 veya, yüksek miktarlarda proteinin gerekli olduğu durumlarda, WO 2008/015239'da tarif

edildiği üzere ilgili ekspresyon vektörünü barındıran *E. coli* suşu W3110 kullanılarak gerçekleştirildi.

Örnek 2: Biacore kullanılarak afinite ölçümü

5

Afinite ölçümleri esasen WO 2006/56464'ün Örnek 9'unda tarif edildiği üzere, (WO 2006/56464'te hedef yerine kullanılan 2000 RU insan CTLA-4 veya murin CTLA-4-Fc yerine) yaklaşık olarak 400 RU IL-4 reseptörü alfa-Fc'nin (R&D Systems) hareketsizleştirilmesi ve (WO 2006/56464'te kullanıldığı üzere 5 – 0,3 μ M konsantrasyonlarda 40 μ l numune saflaştırılmış lipokalin muteinlerinin yerine) 25 nM'lik bir konsantrasyonda 100 μ l muteinin enjekte edilmesi modifikasyonlarıyla gerçekleştirildi.

10

Örnek 3: TF-1 hücresi proliferasyonu analizleri

15

IL-4 ve IL-13-uyarılmış TF-1 hücresi proliferasyonu testleri esasen, Lefort et al. (Lefort S., et al., (1995) *FEBS Lett.* **366**, 2-3, 122-126)'da tarif edildiği üzere ve PCT başvurusu WO 2008/015239'un Örnek 10'unda tarif edildiği üzere gerçekleştirildi. TF-1 hücreleri 1 saat süreyle 37°C'de buluşun gösterilen muteinleriyle (S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20, S308.3 O10, S191.4 B24 [SEQ ID NO'lar: 3-11]), 72 saat süreyle 0,8 ng/ml IL-4 (a) veya 12 ng/ml IL-13 (b) eklenmesinden önce bir seyreltme dizisinde inkübe edildi. Proliferasyon 3 H-timidin katılmasıyla ölçüldü. Bir TF-1 proliferasyonu analizinden alınan sonuçlar Şekilde gösterilmektedir ve yüksek afiniteli varyantlar olan S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20 ve S308.3O10'un, IL-4'ün yanı sıra indüklenmiş IL-3'ün kuvvetli antagonistlerini olduğunu göstermektedir.

20

25

Buluş burada geniş kapsamlı ve jenerik olarak tarif edilmiştir. Jenerik açıklama dahilinde yer alan daha dar türlerin ve alt jenerik gruplamaların her biri de buluşun parçasını oluşturmaktadır. Buna, kesilip çıkartılmış materyalin burada spesifik olarak anılıp anılmadığına bakılmaksızın, familyadan herhangi bir ana maddeyi çıkartan bir şartla veya negatif kısıtlamayla buluşun jenerik tarifnamesi de dahildir.

30

Diğer uygulamalar aşağıdaki istemlerde bulunmaktadır. Ek olarak, buluşun özelliklerinin veya yönlerinin Markush grupları açısından tarif edildiği yerlerde, teknikte

35

uzman kişiler buluşun ayrıca bu sayede, Markush grubunun herhangi bir münferit üyesi elemanı veya üyelerinin alt grubu açısından da tarif edildiğini fark edecektir.

Dizi Listesi

- 5
- <110> Pieris AG
 - <120> IL-4 R alfaya bağlanan gözyaşı lipokalini muteinleri
 - <130> PIE14083PCT
 - <150> US 61/352 461
- 10
- <151> 2010-06-08
 - <160> 20
 - <170> PatentIn versiyonu 3.5
 - <210> 1
 - <211> 3700
- 15
- <212> DNA
 - <213> Yapay
 - <220>
 - <223> İfade vektörü pTLPC10

<400> 1

```

ccatcgaaatg gccagatgat taattccctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt      60
tattttaccc ctccttatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagtctg acaaaaatct      120
agataacgag ggcaaaaat gaaaaagaa gctatcgga ttgcagtggc actggetggg      180
ttcgctacgg tagcgcgagg ccagcgcatcg atgacgggtg gtcagcagat gggcgcccca      240
gacgagygag ttcaggatgt gtcagggaag tggatctga aggcctgac ggtggacagg      300
gagttccctg agatgaatct ggaatcggtg acacccatga cctcccgac cctgggaagg      360
ggcaacctgg aagcnaaggt caccatgctg ataagtggc ggagccagga ggtgaaggcc      420
gtcctggaga aaactgaag ggcgggaaaa tacaaggccg acgggggcaa gcaagtgga      480
tacctcatca ggtcgccagt gaaggaccac tacatctttt actctgaggg cgagctccac      540
gggaagccgg tcccaggggt ggggtctgtg ggcagagacc ccaagaanaa cctgggaagg      600
ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc cgcggactca gcacggagag cctcctcctc      660
cccaggcaga gngaaaacag ctctccaggg agcgcttggg ctccacgga gttcgaaaaa      720
taataagctt gacctgtgaa gtqaaaaatg ccgcacattg tgggacattt tttttgtctg      780
ccgtttacgg ctactgggtc acggtatctc acgsgccctg tagcgggcca ttaagcgcgg      840
cgggtgtggg ggttacgggc agcgtgaacg ctacacttgc cagcgcccta ggcgcgcctc      900
ctttcctttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgcgcg ctttccccct caagctctaa      960
atcggggggt ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcaactcgac cccaaaaaac     1020
ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt ttccgcctt     1080
tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaaactga acaacactca     1140
acctatctc ggctattct ttatgattat aagggaattt ggcgatttgc gactattggg     1200

```

tssaaatga gctgatttaa cnaaaattta acgcgaattt taacaaata ttaacgctta	1260
caatttcagg tggcaatttt cqqqdaaatg tqcqcqaaac ccttatttct ttaattttct	1320
aaatacattc aaatattgat cggctcatga gacaataacc ctgataaatg cttaataat	1380
attgssaaag gaagagtatg agtattcaac atttcctgtt cgcctttatt cccctttctg	1440
cggcattttg ccttcctgtt ttgcctcaac cagaacagct ggtgaaagta aaagtatctg	1500
aagatcagtt ggtgcaagc gtggtttaca tggaaatgga tctcaacagc ggttaagatcc	1560
ttgagatttt tggcccccga gaacgttttc caatgatgag caatttttaa gttctgctat	1620
gtggcgaggt attatccctg attgacgcgc ggcaagagca actgggtctc cgcatacaat	1680
attctcagaa tgaattggtt gactactcac cagtcacaga aaagctcttt cgggatggca	1740
tgacagttaq aqaattatgc agtgcctgca taacctgag tgataaact cgggccaaat	1800
tactttctgac aagataggga ggaacgaagc agtcaacccg ttttttggaa aaataggggg	1860
atcatgtaac tgcctttgat cgttcggcaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg	1920
agcgtgacac caagatgcct gtacaaatgg caacaaagtt ggcgaacata ttaactggcg	1980
aaataactta tctagcttcc cggcaacaaat tgatagactg gatggaggcg gataaagctg	2040
caagaaactt tctgcgctcg ccccttcacg ctgcctggtt tattgctgat aaactctgac	2100
cgggtgagcg tggctctcgc ggtatcattg cagcaactgg gacagatggt aagcctctcc	2160
gtatcgtagt taretcaag agggggagtc aggcacactat gytggaagca aatagacaga	2220
tgcctgagat agtgcctcac ctgactaagc attggttaga attaatgatg tctcgtttcg	2280
ataaaatga agtgattaac aggcatttag agtgccttaa tgaagttaga atcgaaggtt	2340
taaaacacag taactcgc cagaagctag gtgttagaga gactaatctg taaggcctg	2400
tssaaatga cgggcttttg ctgcacgctt tagccattga gatgttagat aggcacata	2460
ctcaattttg ccttttagaa ggggaagct ggcaagattt ttaagtaat aaagctaaaa	2520
gttttagatg tgccttacta agtcatcgcg atggagcaca agtcaattta ggttaacggc	2580
ctacagaaaa acagtatgca actctcgaac atcaattagc ctttttatgc caacaaqctt	2640
tttcaataga gaattgaatc tatgaactca ggcagtggg gaattttat ttagggttag	2700
tatttgaaga taaagagctt caagtgcctc aagaaagaaq ggaacacact actaatgata	2760
gtatgcagcc attattacga caagctatcg aattatttga taacaaaggt gcagagccag	2820
ccttcttatt cggcctttaa ttgactatct ggggtattga aaaaacactt aaatgtgaaa	2880
gtggttttta aaagcagact aacatttttc cgtgatgata atttcactag tttaaaagga	2940
tctaggtgaa gatccttttt gatcatctca tgacaaaaat cctttaacgt gagtcttcgt	3000
tcaatgagc gtcaagcccc gtgaaaaa tcacaggaat tctttgagat cctttttttc	3060
tgcgctaat ctgctccttg caaacaaaaa aacacacgct aacagcgtg gtttctttgc	3120

```

gggacaaaga gctaccaact ctttttccga aggtaaactgg cttcagcaga ggcacagatcc 3180
caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggcaccca cttaagaac telgtagcac 3240
ggctacata cctcctcttg ctatctctgt taccagtggc tcttgcctgt ggcgataagt 3300
ngtgtcttac aggggtggac tcaagagat agttacggga taaggcgcag nggtcgggct 3360
gaacgggggg ttcgtgcaca caqcccagct tggagcgac qacctacac qaactgagat 3420
acctacagcg tgaagtatga gaaagcgcca cgtttccga agggagaaag gggacaggt 3480
atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggaagttcca gggggaacg 3540
cctggatatc ttatagtctt gtcgggttcc gccacctctg acctgagcgt cgaattttgt 3600
gatgtctgtc aggggggggg agcctatgga aaaaagccag caacggggcc ttttaaggt 3660
tctggcctt ttctggctt ttgtgcaca tgaacgcaca 3700

```

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S191.4-B24 muteini

<400> 2

```

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Ser Ser Val
20         25         30

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

Phe Thr Ala Glu Arg Ser Gly Arg Trp Gln Glu Tyr Lys Leu Val Leu
50         55         60

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

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

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

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

```

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 3

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S351.5-M21 muteini

10 <400> 3

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Val
20 25 30

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

Leu Thr Leu Gln Arg Lys Gly Arg Trp Gln Glu Met Lys Asp Val Leu
50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 4

<211> 154

<212> PRT

15 <213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S276.2-K04 muteini

<400> 4

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

Ala Met Thr Val Asp Pro Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Ser Ser Val
20 25 30

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

Phe Thr Ala Gln Arg Ser Gly Arg Trp Gln Lys Tyr Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

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

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

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

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

5 Glu Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 5

<211> 154

<212> PRT

<213> Yapay

10 <220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-K12 muteini

<400> 5

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

Ala Met Thr Val Asp Leu Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Trp Ser Val
20 25 30

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

Phe Thr Ala Leu Arg Ile Gly Arg Trp Gln Ser Tyr Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

5 <210> 6

<211> 154

<212> PRT

<213> Yapay

<220>

10 <223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-F08 muteini

<400> 6

```

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Val Tyr Asn Ser Val
20      25      30

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

Phe Thr Ala Gln Arg Lys Gly Arg Trp Gln Lys Tyr Lys Leu Val Leu
50      55      60

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145     150

```

5 <210> 7

<211> 154

<212> PRT

<213> Yapay

<220>

10 <223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-L4 muteini

<400> 7

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

Ala Met Thr Val Asp Ser Arg Cys Pro Arg Ala Tyr Tyr Val Ser Val
 20 25 30

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

Phe Thr Ala Ala Arg Ile Gly Arg Trp Gln Ser Tyr Lys Leu Val Leu
 50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
 145 150

<210> 8

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-L20
 muteini

<400> 8

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

<210> 9

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-N1
 muteini

10 <400> 9

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 11

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-N20 muteini

10 <400> 11

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

Ala Met Thr Val Asp Glu Arg Cys Pro Arg Ala His Tyr Gly Ser Val
20 25 30

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

Phe Thr Ala Met Arg Leu Gly Arg Trp Gln Lys Tyr Lys Leu Val Leu
50 55 60

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

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

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

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

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

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly Ser Ala
145 150

<210> 12

<211> 456

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S276.2-K04 muteininin nükleotid dizisi

10 <400> 12

```

gacctagacg agggagattca ggaatgtgtca gggacgttgt atctgagggc catgacgggtg      60
gaccccccgt qccccccggc gtactacagc tcqqtgacac ccctgacccct caccacccctg      120
gaagggggga acctggaagc caagttcacc ggcagagggt cgggcccgtg gcagaagtac      180
aagtttgttc ttgagaaaac tcatgagcgc ggaacatata ctgacctcgg gggcagggac      240
gtggcatata tcatcaggtc gaagtggaag gacacatata tcttccatc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctgctgggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccggg gactcagcac ggagagcatt      420
ctcctcccca ggcagagcca aaccagctct ccaggg                                     456

```

<210> 13

<211> 459

<212> DNA

15 <213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-F08 muteininin nükleotid dizisi

<400> 13

```

gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacagtcgct gcccgcgggc ggtgtacaat tcggtgacac ccattgacct caccacccctg      120
gaagggggca acctggaagc caagtccacc gctcagcgga agggccggtg gcagaagtac      180
aaqttggtcc tggagaaaac tgatgagccg qgaaaataca ctgcctcccg gggcagccac      240
gtggcatata tctacaggtc gcaagtgaa gacctacta tctttcactc tgagggcctg      300
tcccccgqgc acccggtccc aaggtgtgtg ctggtggca gacaccccaa gaacaaacctg      360
gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc      420
ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccagggagc
                                                                                      459

```

<210> 14

<211> 456

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-L4 muteininin nükleotid dizisi

10 <400> 14

```

gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gactcgcgct gcccgcgggc gtattacgtg tcggtgacac ccattgacct caccacccctg      120
gaagggggca acctggaagc caagtccacc gcggcgcgga ttggccggtg gcagaagttac      180
aaqttggtcc tggagaaaac tgatgagccg qgaaaataca ctgcctcccg gggcagccac      240
gtggcatata ttatcaggtc gcaagtgaa gacctacta tctttcactc tgagggcctg      300
tcccccgqgc acccggtccc aaggtgtgtg ctggtggca gacaccccaa gaacaaacctg      360
gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcacc      420
ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccagggc
                                                                                      456

```

<210> 15

<211> 456

<212> DNA

15 <213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-L20 muteininin nükleotid dizisi

<400> 15

```

gectcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgttgt atctgaagga catgacgggtg    60
gacatctcgt gcccgccggc gaagtacgat tcqgtgacac ccctgacct caccacccctg    120

gaagggggca acctggaagc caagtccacc ggcgcatcggc ggggccgggtg gcagcagtac    180

aagttggtcc tggagaaaac tgaatgagccg ggaataataa ctgctccggc gggcaggcac    240

gtggcataca tcatcaggtc gcaagtgaag gacactaca tcttccactc tgagggcctg    300

tgcccccggc agccgggtcc aggggtgtgg ctgctgggca gagaccccaa gaacaaacctg    360

gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcc gactcagcac ggagagcatic    420

ctcatcccca gccagagcca aaccaactct ccagggg                                456

```

<210> 16

<211> 456

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-N1 muteininin nükleotid dizisi

10 <400> 16

```

gectcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgttgt atctgaagga catgacgggtg    60
gactatctcgt gcccgccggc gtattaccat tcqgtgacac ccctgacct caccacccctg    120

gaagggggca acctggaagc caagtccacc ggcgcatcggc ctgggccgggtg gcagaagtac    180

aagttggtcc tggagaaaac tgaatgagccg ggaataataa ctgctccggc gggcaggcac    240

gtggcataca tcatcaggtc gcaagtgaag gacactaca tcttccactc tgagggcctg    300

tgcccccggc agccgggtcc aggggtgtgg ctgctgggca gagaccccaa gaacaaacctg    360

gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcc gactcagcac ggagagcatic    420

ctcatcccca gccagagcca aaccaactct ccagggg                                456

```

<210> 17

<211> 456

<212> DNA

15 <213> Yapay

<220>

<223> IL-4R alfa için bağlanma afinitesi olan insan gözyaşı lipokalinin S308.5-N20 muteininin nükleotid dizisi

<400> 17

```

gcctcagacg aggagattca ggaatgtgtca gggacgtggt atctgaaagg catgacggtg      60
gacgagcgct gcccgcgggc gcattacggg tcggtgacac ccattgacct caccacctg      120
gaagggggca acctggaagc caagtccacc gctatgggtg tgggcgggtg gcagaagtac      180
aaqttggtcc tggagaaaac tgatgagccg qgaaaataca ctgcctcccg ggcacggcac      240
gtggcatata tcatcaggtc gcacgtgaag gacctataca tctttcactc tgaggggctg      300
tcccccgqgc aaccggtccc aaggtgtgtg ctggtgggca gaaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggaatttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcaggac ggagagcacc      420
ctcaccacca ggcagagcga aaccagctct ccaggg

```

456

<210> 18

<211> 825

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> İnsan IL-4 reseptörü

<400> 18

```

Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
1           5           10           15

Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn Met Lys Val Leu Gln Glu Pro
20           25           30

```

10

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met
 35 40 45
 Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu
 50 55 60
 Val Phe Leu Leu Ser Gln Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly
 65 70 75 80
 Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala
 85 90 95
 Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys
 100 105 110
 Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn
 115 120 125
 Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser
 130 135 140
 Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn
 165 170 175
 Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys
 180 185 190
 Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr
 195 200 205
 Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser
 210 215 220
 Tyr Arg Glu Pro Phe Gln Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser
 225 230 235 240
 Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr
 245 250 255
 Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
 260 265 270
 Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Gln
 275 280 285

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn
 290 295 300
 Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg
 305 310 315 320
 Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
 325 330 335
 Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp
 340 345 350
 Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Gln Ala Pro
 355 360 365
 Val Glu Cys Glu Glu Gln Glu Gln Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
 370 375 380
 Cys Ala Ser Pro Gln Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Gln Gly Arg Gln
 385 390 395 400
 Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly
 405 410 415
 Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu
 420 425 430
 Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe
 435 440 445
 Pro Ser Ala Gly Pro Cys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro
 450 455 460
 Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp
 465 470 475 480
 Asn Leu Thr Cys Thr Gln Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala
 485 490 495
 Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu
 500 505 510
 Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
 515 520 525
 Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
 530 535 540

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
 545 550 555 560

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
 565 570 575

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
 580 585 590

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
 595 600 605

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
 610 615 620

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
 625 630 635 640

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
 645 650 655

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
 660 665 670

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
 675 680 685

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
 690 695 700

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
 705 710 715 720

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
 725 730 735

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
 740 745 750

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
 755 760 765

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly
 770 775 780

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
 785 790 795 800

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
 805 810 815

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
 820 825

<210> 19

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<223> insan IL-13 reseptörü alfa 1

<400> 19

Met Glu Trp Pro Ala Arg Leu Cys Gly Leu Trp Ala Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln
 20 25 30

Pro Pro Val Thr Asn Leu Ser Val Ser Val Gln Asn Leu Cys Thr Val
 35 40 45

Ile Trp Thr Trp Asn Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu
 50 55 60

Trp Tyr Phe Ser His Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro
 65 70 75 80

Glu Thr Arg Arg Ser Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu
 85 90 95

Gln Val Gly Ser Gln Cys Ser Thr Asn Glu Ser Gln Lys Pro Ser Ile
 100 105 110

Leu Val Glu Lys Cys Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala
 115 120 125

Val Thr Glu Leu Gln Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys
 130 135 140

Ser Trp Leu Pro Gly Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu
 145 150 155 160

Tyr Tyr Trp His Arg Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile
 165 170 175

Phe Arg Glu Gly Gln Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val
 180 185 190

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp
 195 200 205
 Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser
 210 215 220
 Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn
 225 230 235 240
 Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His
 260 265 270
 Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu
 275 280 285
 Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro
 290 295 300
 Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile
 325 330 335
 Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val
 340 345 350
 Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys
 355 360 365
 Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile
 370 375 380
 Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys
 385 390 395 400
 Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
 420 425

<210> 20

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> insan gözyaşı lipokalin (Tlc)

<400> 20

Met Lys Pro Leu Leu Leu Ala Val Ser Leu Gly Leu Ile Ala Ala Leu
1 5 10 15

Gln Ala His His Leu Leu Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser
20 25 30

Gly Thr Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu
35 40 45

Met Asn Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly
50 55 60

Gly Asn Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln
65 70 75 80

Glu Val Lys Ala Val Leu Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr
85 90 95

Ala Asp Gly Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys
100 105 110

Asp His Tyr Ile Phe Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val
115 120 125

Arg Gly Val Lys Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala
130 135 140

Leu Glu Asp Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ser Ile Leu Ile Pro Arg Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Ser Asp
165 170 175

1

SwissProt P31025	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
AB4004	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
wt TLc26	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
M3-B24(PSM)	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
S191.4-B24	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S351.5-M21	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S276.2-K04	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-K12	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-F08	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L4	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N1	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.3-O10	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L

SwissProt P31025	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
AB4004	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
wt TLc26	E	A	K	V	I	M	L	I	S	G	R	S	Q	E	V
M3-B24(PSM)	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
S191.4-B24	E	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	E	Y
S351.5-M21	F	A	K	I	T	I	Q	R	K	G	R	W	Q	F	M
S276.2-K04	F	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-K12	F	A	K	F	T	A	I	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-F08	E	A	K	F	I	A	Q	H	K	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-L4	E	A	K	F	T	A	A	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-L20	F	A	K	F	T	A	H	R	R	G	R	W	Q	Q	Y
S308.5-N1	E	A	K	F	I	A	H	R	A	G	R	W	Q	K	Y
S308.3-O10	F	A	K	F	T	A	K	R	N	G	R	W	Q	P	Y
S308.5-N20	F	A	K	F	T	A	M	R	I	G	R	W	Q	K	Y

Şekil 2 (devamı sonraki sayfada)

SwissProt P31025	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
AB4004	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
wt TLc26	K	A	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
M3-B24(PSM)	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
S191.4-B24	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S351.5-M21	K	D	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S276.2-K04	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-K12	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-F08	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-L4	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-L20	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-N1	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.3-O10	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A
S308.5-N20	K	L	V	L	E	K	T	D	E	P	G	K	Y	T	A

SwissProt P31025	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
AB4004	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
wt TLc26	D	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
M3-B24(PSM)	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
S191.4-B24	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S351.5-M21	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S276.2-K04	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-K12	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-F08	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-L4	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-L20	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-N1	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.3-O10	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K
S308.5-N20	S	G	G	R	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K

Şekil 2 (devamı sonraki sayfada)

SwissProt P31025	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
AB4004	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
wt TLc26	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	L	H	G	K	P
M3-B24(PSM)	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
S191.4-B24	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S351.5-M21	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S276.2-K04	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-K12	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-F08	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-L4	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-L20	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-N1	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.3-O10	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P
S308.5-N20	D	H	Y	I	F	H	S	E	G	L	C	P	G	Q	P

SwissProt P31025	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142
AB4004	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
wt TLc26	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
M3-B24(PSM)	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
S191.4-B24	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S351.5-M21	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S276.2-K04	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-K12	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-F08	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-L4	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-L20	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-N1	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.3-O10	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L
S308.5-N20	V	P	G	V	W	L	V	G	R	D	P	K	N	N	L

Şekil 2 (devamı sonraki sayfada)

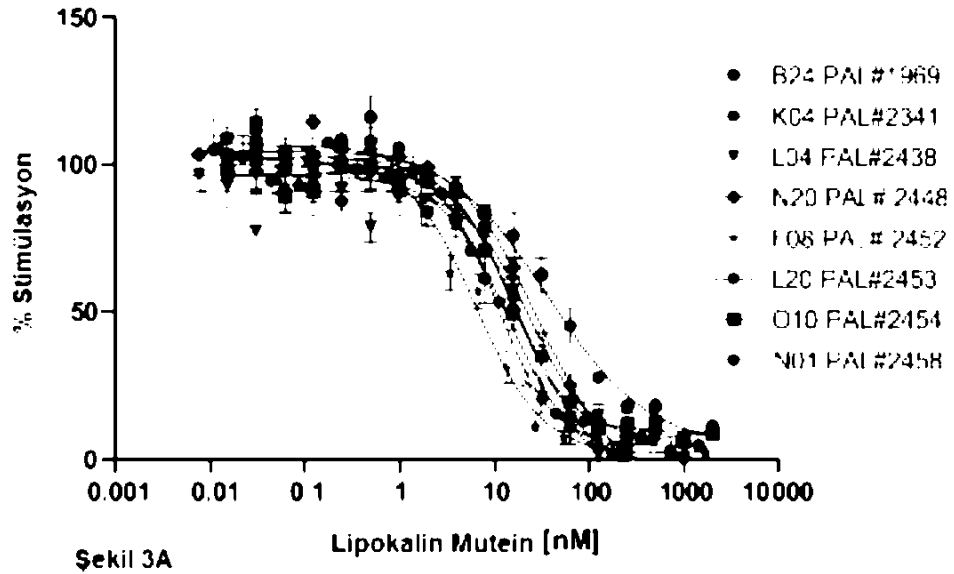
SwissProt P31025	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
AB4004	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
wt TLc26	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
M3-B24(PSM)	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
S191.4-B24	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S351.5-M21	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S276.2-K04	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-K12	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-F08	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-L4	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-L20	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-N1	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.3-O10	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-N20	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L

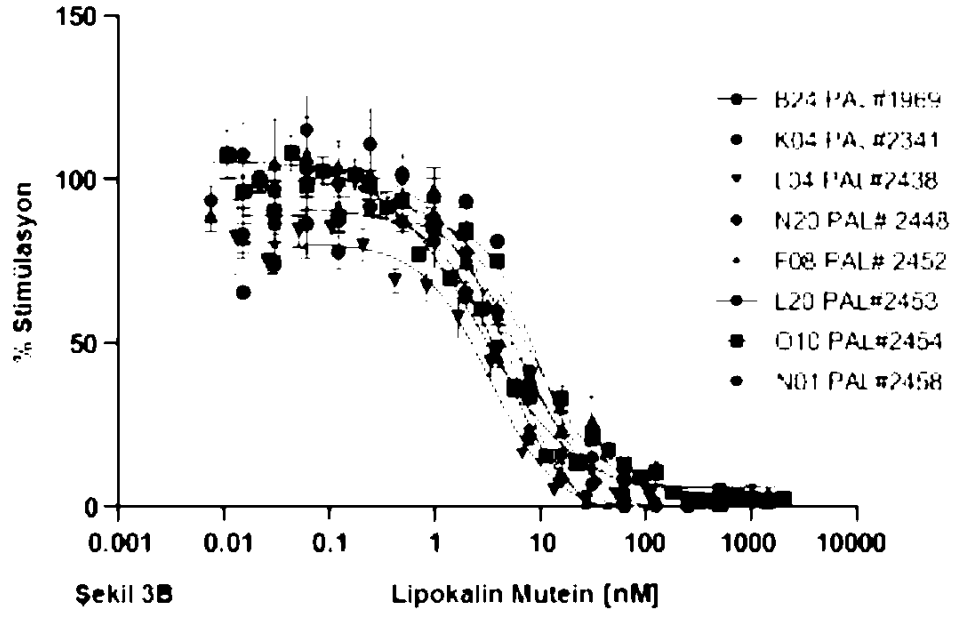
SwissProt P31025	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
AB4004	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
wt TLc26	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
M3-B24(PSM)	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
S191.4-B24	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S351.5-M21	S	T	F	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S276.2-K04	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-K12	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-F08	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-L4	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-L20	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-N1	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.3-O10	S	T	F	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-N20	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S

Şekil 2 (devamı sonraki sayfada)

SwissProt P31025	173	174
AB4004	155	156
wt TL26	P	G
M3-B24(PSM)	155	156
S191.4-B24	P	G
S305.5-M21	P	G
S276.2-K04	P	G
S308.5-K12	P	G
S308.5-F08	P	G
S308.5-L4	P	G
S308.5-L20	P	G
S308.5-N*	P	G
S308.3-O10	P	G
S308.5-N20	P	G

Şekil 2 (önceki sayfadan devam)





	IC50 TF1 Proliferasyon analizi IL-13 (nM)	IC50 TF1 Proliferasyon analizi IL-4 (nM)	Biacore afinitesi KD (M)
S276.2 K04	14.8	3.6	2.30E-11
S308.5 F08	7.4	3.8	2.01E-11
S308.5 N01	17.7	4.4	2.41E-11
S308.5 L20	14.4	5.3	2.49E-11
S308.5 L04	22.9	5.7	7.24E-11
S308.5 N20	27.6	5.9	3.48E-11
S308.3 O10	15.1	7.5	1.32E-12
S191.4 B24	35.9	9.1	1.10E-10

Şekil 4