



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0116158  
(43) 공개일자 2017년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/47* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C07K 14/47* (2013.01)  
*A61K 38/00* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-7026032  
(22) 출원일자(국제) 2016년02월16일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2017년09월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/053226  
(87) 국제공개번호 WO 2016/131804  
국제공개일자 2016년08월25일  
(30) 우선권주장  
15305242.8 2015년02월18일  
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인  
**사노피**  
프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54  
(72) 발명자  
**코르바이, 카르슈텐**  
독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스  
스 도이칠란트 게엠베하 내  
**스토펙, 하이케**  
독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스  
스 도이칠란트 게엠베하 내  
(뒤틀면에 계속)  
(74) 대리인  
**양영준, 심미성**

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **피오베르딘 및 피오켈린에 특이적인 신규한 단백질**

**(57) 요약**

본 개시는 피오베르딘 과(family)의 일원 또는 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 제공하며, 예를 들어, P. 에 어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 약학적 적용을 포함하는 다양한 적용에서 이용될 수 있다. 본 개시는 또한 본원에 기재된 1종 이상의 피오베르딘-결합 또는 피오켈린-결합 뮤테인을 제조하는 방법뿐만 아니라 상기 뮤테인 중 1종 이상을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 개시는 또한 상기 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자 및 상기 뮤테인 및 핵산 분자의 생성을 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 출원은 이들 뮤테인의 치료적 및/또는 진단적 용도뿐만 아니라 상기 뮤테인 중 1종 이상을 포함하는 조성물을 개시한다.

(52) CPC특허분류

*C07K 14/4703* (2013.01)

(72) 발명자

**크뤼프, 요헨**

독일 65926 프랑크푸르트 암 마인 사노피-아벤티스  
도이칠란트 게엠베하 내

**칼란드라, 베른하르트**

프랑스 91385 쉘리-마자랭 세텍스 빼에흐 브호솔레  
뜨 에비뉴 1 사노피 프랑스 내

**레이, 아스트리드**

프랑스 13669 툴루즈 세텍스1 베빠13669 데스빠니  
루트 195 사노피 프랑스 내

**카르스트, 나탈리**

프랑스 94403 비트리 쉬르 센 요셉 드빌 루 24 사  
노피 프랑스 내

**모레즈, 미셸**

프랑스 31036 툴루즈 세텍스 데스빠니 루트 195 사  
노피 프랑스 내

**프레즈, 로랑**

프랑스 31036 툴루즈 세텍스 데스빠니 루트 195 사  
노피 프랑스 내

**로스, 크리스틴**

독일 85354 프라이징 리제-마이트너 스트라쎬 30  
피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

**알라스도르퍼, 안드레아**

독일 85354 프라이징 리제-마이트너 스트라쎬 30  
피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하

**비텐만, 알렉산더**

독일 89542 허브레히팅켄 시쉬어비호 4

**히너, 말론**

독일 85354 프라이징 리제-마이트너 스트라쎬 30  
피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하 내

**룬드, 브래들리**

미국 03766 뉴햄프셔주 뉴 햄프셔드 레바논 이스  
트만 힐 로드 5

**엔슨, 크리스티안**

독일 84028 란츠후트 알리스타트 357

**휠스마이어, 마틴**

독일 67354 퇴머 리나-소머-스트라쎬 12/2

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

검출 가능한 친화성으로 피오베르딘(pyoverdine) 타입 I, II, III 또는 피오켈린(pyochelin)에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 포함하는, 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 대한 결합 특이성을 갖는 폴리펩티드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, hNGAL 뮤테인이 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 34, 36, 39 내지 42, 44 내지 47, 49, 52, 54 내지 55, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 및 145에 해당하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩티드.

#### 청구항 3

제1항 또는 제29항의 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

#### 청구항 4

제3항의 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩티드를 생성시키는 방법으로서, 폴리펩티드가 유전 공학 방법에 의해 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로부터 시작하여 생성되는, 방법.

#### 청구항 6

(i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

#### 청구항 7

대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린을 결합시키는 방법으로서, 유효량의 제13항의 조성물을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 8

개별적이거나 혼합된 1개 이상의 용기 및 제6항의 조성물을 포함하는 키트.

#### 청구항 9

대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린의 결합을 위한, (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드의 용도.

#### 청구항 10

대상체에서 피오켈린 및/또는 피오베르딘을 통해 P. 에어루지노사에 의한 철-흡수를 방지하거나 감소시키기 위한, 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린의 결합을 위한, (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드의 용도.

**청구항 11**

대상체에서 P. 에어루지노사 균막 감염의 치료 또는 경감을 위한, 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및 /또는 피오켈린의 결합을 위한, (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 제1항에 따른 폴리펩티드의 용도.

**청구항 12**

제1항 또는 제2항에 따른 2종 이상의 폴리펩티드의 조합물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

설명

피오베르딘 및 피오켈린에 특이적인 신규한 단백질

**배경 기술**

I. 배경

슈도모나스 에어루지노사(Pseudomonas aeruginosa)(P. 에어루지노사)는 주로 조직 손상과 관련된 급성 감염을 야기시키는 기회감염 병원체이다. P. 에어루지노사는 유치 장치(indwelling device) 및 유전 장애인 남성성염증을 갖는 환자의 폐 조직에 균막을 형성한다. 균막 감염은 통상적인 항생제 치료법으로 치료하기 어렵다. 그러나, 철이 P. 에어루지노사에 의한 적절한 균막 형성에 필수적인 것이 연구에서 입증되었고, 따라서 철-흡수 시스템은 항-슈도모나스 치료법에 대한 잠재적 표적이다.

P. 에어루지노사는 분비되는 철-결합 시데로포어(siderophore)인 피오켈린(pyochelin) 및 피오베르딘(pyoverdine)을 이용하여 숙주 환경에서 철을 수집할 수 있다. 피오베르딘(Pvd)은 펩티드-연결 하이드록사메이트- 및 카테콜레이트-타입 리간드이며, 피오켈린(Pch)은 살리실레이트 및 2개 분자의 시스테인의 유도체화된 퀴누계이트이고, 페놀, 카르복실레이트 및 아민 리간드 작용기를 갖는다. Pvd 및 Pch 둘 모두는 P. 에어루지노사 독성에서 역할이 입증되었고, 일부 상승작용을 나타낸다. 둘 모두의 시데로포어를 만들 수 없는 이중-결핍 돌연변이체는 2종의 시데로포어 중 단지 1종만 만들 수 없는 단일-결핍 돌연변이체보다 독성에서 훨씬 더 약독화된다(Takase et al., Infection and immunity, Apr.2000, p.1834-1839). 또한, 피오베르딘은 여러 독성 인자뿐만 아니라 피오베르딘 자체의 생성을 조절하는 신호전달 분자로 작용하는 한편; 피오켈린은 제2 철(ferric iron) 이외에 P. 에어루지노사의 병원성에 대한 제1 철(ferrous iron) 및 아연과 같은 2가 금속을 획득하기 위한 시스템의 일부일 수 있음이 제시되었다(Visca et al., 1992).

3종의 구조적으로 상이한 피오베르딘 타입 또는 그룹이 P. 에어루지노사 ATCC 15692(Briskot et al., 1989, Liebig's Ann Chem, p.375-384), P. 에어루지노사 ATCC 27853(Tappe et al., 1993, J.Prakt-Chem., 335, p.83-87) 및 천연 분리물인 P. 에어루지노사 R(Gipp et al., 1991, Z. Naturforsch, 46c, p.534-541)의 여러 P. 에어루지노사 균주로부터 확인되었다. 또한, 88개의 임상 분리물 및 상기 언급된 2종의 수집 균주에 대한 비교 생물학적 연구는 참조 균주에 따라 P. 에어루지노사 ATCC 15692(타입 I Pvd 또는 Pvd I), P. 에어루지노사 ATCC 27853(타입 II Pvd 또는 Pvd II) 및 임상 분리물 P. 에어루지노사 R 및 pa6(타입 III Pvd 또는 Pvd III)의 3종의 상이한 균주-특이적 피오베르딘-매개 철 흡수 시스템을 나타내었다(Cornells et al., 1989, Infect Immun., 57, p.3491-3497; Meyer et al., 1997, Microbiology, 143, p.35-43).

각각의 피오베르딘 타입은 숙시닐, 숙신아미드 또는 α-케토글루타릴의 측쇄에서 상이한 3종의 일원(서브타입), 즉, Pvd 타입 I 숙시닐, Pvd 타입 I 숙신아미드, Pvd 타입 I α-케토글루타릴, Pvd 타입 II 숙시닐, Pvd 타입 II 숙신아미드, Pvd 타입 II α-케토글루타릴, Pvd 타입 III 숙시닐, Pvd 타입 III 숙신아미드 및 Pvd 타입 III α-케토글루타릴을 갖는다.

각각의 P. 에어루지노사 균주는 1종의 Pvd 타입을 발현하고, 즉, P. 에어루지노사 ATCC 15692는 타입 I Pvd를 발현하고, P. 에어루지노사 ATCC 27853은 타입 II Pvd를 발현하고, P. 에어루지노사 R 및 pa6는 타입 III Pvd를 발현하며, 이에 의해 각각의 Pvd 타입은 각각의 타입의 3종 모두의 일원을 포함하고, 상기 각각의 균주는 또

한 피오켈린을 발현한다.

- [0009] 이와 관련하여, 본 발명자는 P. 에어루지노사의 병원성에 중요한 표적으로서 피오베르딘 및 피오켈린을 확인하였고, 통상적인 항생제에 의해 부과되는 강한 선택압을 발생시키지 않으면서 본원에 개시된 바와 같은 상기 표적, 즉, 측쇄에서 상이한 3중 일원의 모든 타입(서브타입)을 포함하는 Pvd의 각각의 타입(Pvd I s, Pvd I sa, Pvd I aKG, Pvd II s, Pvd II sa, Pvd II aKG, Pvd III s, Pvd III sa, Pvd III aKG)뿐만 아니라 Pch, 및 자유 시테로포어뿐만 아니라 결합된 철을 갖는 시테로포어의 모든 경우에 대한 특이적 억제제를 개발하였다. 또한, 본 발명자는 자유 피오켈린과 철-로딩된 피오켈린을 구별하는 억제제를 선택하였다.
- [0010] 본 발명은 기존 공동 연구 계약의 당사자인 Pieris AG, Sanofi-Aventis 및 Sanofi-Pasteur Inc.를 대신하여 수행된 활동의 결과로서 이루어졌으며, 공동 연구 계약의 범위 내에서 이루어졌다.

**발명의 내용**

- [0011] II. 정의
- [0012] 하기 목록은 본 명세서 전체에 걸쳐 사용되는 용어, 어구 및 약어를 정의한다. 본원에 나열되고 정의된 모든 용어는 모든 문법적 형식을 포함하도록 의도된다.
- [0013] 본원에서 사용되는 "피오베르딘"은 철-결핍 성장 조건하에서 그람 음성 박테리아 슈도모나스 에어루지노사에 의해 생성되고, 철에 대한 높은 친화성을 갖는 형광 시테로포어를 의미한다. 피오베르딘은 디하이드록시퀴놀린 발색단, 측쇄 및 가변적인 펩티드 사슬의 3개의 구조적 부분으로 구성된다. 펩티드 사슬 모이어티는 수용체 인지 및 결합에 관여한다. 펩티드 사슬에서 상이한 3종의 상이한 Pvd가 확인되었다(타입 I 내지 III). 피오베르딘 타입의 크기 및 아미노산 조성은 각각의 종뿐만 아니라 피오베르딘 인지 특이성에 대해 독특하다. 3종의 P. 에어루지노사 균주는 구별될 수 있으며, 각각은 상이한 피오베르딘 타입(타입 I 내지 III, 도 1) 및 인지체 FpVA 수용체를 생성한다.
- [0014] 본원에서 사용되는 "피오켈린"은 P. 에어루지노사에 의해 생성되는 페놀, 카르복실레이트 및 아민 리간드 작용기를 갖고, 제2 철을 용해시키는 살리실레이트 및 2개 분자의 시스테인의 티아졸린 유도체화된 컨주게이트를 의미한다. 피오켈린은 페놀레이트를 갖지만, 하이드록사메이트 또는 카테콜레이트 모이어티를 갖지 않는 구조적으로 독특한 시테로포어이다(도 1 참조).
- [0015] 본원에서 사용되는 "검출 가능한 친화성"은 일반적으로 적어도 약  $10^{-5}$  M 또는 그 미만의 친화성 상수로 선택된 표적에 결합하는 능력을 의미한다. 더 낮은 친화성은 일반적으로 ELISA와 같은 일반적인 방법으로 더 이상 측정할 수 없으므로 이차적으로 중요하다.
- [0016] 본원에서 사용되는 선택된 표적(본 발명의 경우, 피오베르딘 또는 피오켈린)에 대한 본 발명의 개시의 단백질(예를 들어, 인간 리포칼린 2의 뮤테인) 또는 이의 융합 폴리펩티드의 "결합 친화성"은 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(이에 의해, 뮤테인-리간드 복합체의 KD 값이 결정될 수 있다). 상기 방법은 형광 적정, 직접 ELISA, 경쟁 ELISA, 열량측정 방법, 예를 들어, 등온 적정 열량측정법(ITC), 및 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 방법은 당 분야에서 잘 확립되어 있으며, 이들의 예가 또한 하기에 상술된다.
- [0017] 각각의 결합체와 이의 리간드 사이의 복합체 형성은 많은 상이한 요인, 예를 들어, 각각의 결합 파트너의 농도, 경쟁자의 존재, 사용되는 완충 시스템의 pH 및 이온 강도, 및 해리 상수  $K_D$ 의 결정에 사용되는 실험 방법(몇 가지 예를 들어, 형광 적정, 직접 ELISA, 경쟁 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명) 또는 심지어 실험 데이터의 평가에 사용되는 수학적 알고리즘에 의해 영향을 받는 것을 또한 인지해야 한다.
- [0018] 따라서,  $K_D$  값(각각의 결합체와 이의 표적/리간드 사이에 형성된 복합체의 해리 상수)이 제공된 리간드에 대한 특정 뮤테인의 친화성을 결정하기 위해 사용되는 방법 및 실험 설정에 따라 특정 실험 범위 내에서 가변적일 수 있음이 당업자에게 또한 명백하다. 이는, 예를 들어,  $K_D$  값이 표면 플라즈몬 공명(Biacore), 경쟁 ELISA 또는 "직접 ELISA"에 의해 결정되었는지의 여부에 따라 측정된  $K_D$  값 또는 허용 범위에서 약간의 편차가 있을 수 있음을 의미한다.
- [0019] 본원에서 사용되는 "뮤테인", "돌연변이된" 존재물(단백질이거나 핵산이건 간에) 또는 "돌연변이체"는 천연 발생(야생형) 핵산 또는 단백질 "참조" 스캐폴드에 비해 1개 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산의 교환, 결실 또

는 삽입을 나타낸다. 상기 용어는 또한 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인의 단편 및 변이체를 포함한다. 본 발명의 개시의 뮤테인, 이의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같은 피오베르딘 또는 피오켈린에 결합하는 기능을 보유한다.

- [0020] 본 발명의 개시의 뮤테인과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 N-말단 및/또는 C-말단이 짧아진, 즉, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산 중 적어도 하나가 결여된 전장 성숙 인간 리포칼린 2로부터 유래된 단백질 또는 펩티드에 관한 것이다. 상기 단편은 성숙 인간 리포칼린 2의 일차 서열의 적어도 10개, 예를 들어, 20개 또는 30개 이상의 연속적 아미노산을 포함할 수 있으며, 일반적으로 성숙 인간 리포칼린 2의 면역검정에서 검출 가능하다. 일반적으로, 본 발명의 개시의 뮤테인 또는 본 발명의 개시에 따른 조합물 또는 본원에 기재된 융합 단백질의 해당 단백질 리간드와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "단편"은 본 발명의 개시에 따른 뮤테인에 의해 인지되고/되거나 결합되는 전장 리간드의 능력을 보유한 N-말단 및/또는 C-말단이 짧아진 단백질 또는 펩티드 리간드에 관한 것이다.
- [0021] 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이유발"은 성숙 인간 리포칼린 2의 제공된 서열 위치에서 천연 발생하는 아미노산이 각각의 천연 폴리펩티드 서열 내의 상기 특정 위치에서 존재하지 않는 적어도 하나의 아미노산에 의해 치환될 수 있도록 실험 조건이 선택되는 것을 의미한다. 용어 "돌연변이유발"은 또한 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 삽입에 의한 서열 세그먼트 길이의 (추가적) 변형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 선택된 서열 위치의 하나의 아미노산이 3개의 무작위 돌연변이의 스트레치(stretch)에 의해 대체되어 야생형 단백질의 각각의 세그먼트의 길이에 비해 2개의 아미노산 잔기의 삽입을 발생시키는 것이 본 발명의 개시의 범위 내이다. 상기 삽입 또는 결실은 본 발명의 개시에서 돌연변이유발에 적용될 수 있는 임의의 펩티드 세그먼트 내에 서로 독립적으로 도입될 수 있다.
- [0022] 용어 "무작위 돌연변이유발"은 특정 서열 위치에 미리 결정된 단일 아미노산(돌연변이)이 존재하지 않고, 돌연변이유발 동안 미리 규정된 서열 위치에 적어도 2개의 아미노산이 특정 확률로 통합될 수 있음을 의미한다.
- [0023] "동일성"은 서열의 유사성 또는 관계를 판단하는 서열의 특성이다. 본 발명의 개시에서 사용되는 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 본 개시의 폴리펩티드의 서열과 당해 서열의 (상동성) 정렬 후 이들 2개의 서열 중 더 긴 서열의 잔기 수와 관련하여 쌍을 이룬 동일한 잔기의 백분율을 의미한다. 서열 동일성은 동일한 아미노산 잔기의 수를 잔기의 전체 수로 나누고, 결과에 100을 곱함으로써 측정된다.
- [0024] 용어 "상동성"은 이의 일반적인 의미로 본원에서 사용되며, 동일한 아미노산뿐만 아니라 본 발명의 개시의 폴리펩티드(예를 들어, 본 발명의 개시의 임의의 뮤테인)의 선형 아미노산 서열 내의 동등한 위치에서 보존성 치환(예를 들어, 아스파테이트 잔기에 의한 글루타메이트 잔기의 교환)인 것으로 간주되는 아미노산을 포함한다.
- [0025] 서열 상동성 또는 서열 동일성의 백분율은, 예를 들어, 프로그램 BLASTP, 버전 blastp 2.2.5(November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402)를 이용하여 본원에서 결정될 수 있다. 이러한 구현예에서, 상동성 백분율은 바람직하게는 쌍을 이룬 비교에서 참조로서 야생형 단백질 스캐폴드를 이용하여 폴리펩티드 서열을 포함하는 전체 폴리펩티드 서열의 정렬(행렬: BLOSUM 62; 갭 비용: 11.1;  $10^{-3}$ 으로 설정된 컷오프 값)을 기초로 한다. 이는 정렬을 위해 프로그램에 의해 선택되는 아미노산의 전체 수에 의해 나누어진 BLASTP 프로그램 출력 내의 결과로서 표시되는 "양성"(상동성 아미노산)의 수의 백분율로 계산된다.
- [0026] 구체적으로, 야생형 인간 리포칼린 2와 상이한 뮤테인의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열의 특정 위치에 해당하는지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 당 분야에 널리 공지된 수단 및 방법, 예를 들어, 수작업에 의하거나 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 또는 ClustalW를 의미하는 BLAST2.0과 같은 컴퓨터 프로그램 또는 서열 정렬을 발생시키기에 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램을 이용한 정렬을 이용할 수 있다. 따라서, 야생형 인간 리포칼린 2는 "대상 서열" 또는 "참조 서열"로 작용할 수 있는 반면, 본원에 기재된 야생형 인간 리포칼린 2와 상이한 뮤테인의 아미노산 서열은 "질의 서열"로 작용할 수 있다. 용어 "참조 서열" 및 "야생형 서열"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0027] "갭"은 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 정렬 내의 공백이다. 따라서, 정확하게 동일한 서열의 2개의 카피는 100% 동일성을 갖지만, 덜 고도로 보존되고, 결실, 첨가 또는 대체를 갖는 서열은 더 낮은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다. 당업자는 표준 파라미터를 이용하여 서열 동일성을 결정하기 위해 여러 컴퓨터 프로그램, 예를 들어, Blast(Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), 및 스미스-워터만(Smith-Waterman)(Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197)이 이용 가능한 것을 인지할 것이다.

- [0028] 본 개시에서 사용되는 용어 "변이체"는, 예를 들어, 치환, 결실, 삽입 또는 화학적 변형에 의한 아미노산 서열의 변형을 포함하는 단백질 또는 펩티드의 유도체에 관한 것이다. 상기 변형은 일부 구현예에서 단백질 또는 펩티드의 기능성을 감소시키지 않는다. 상기 변이체는 1개 이상의 아미노산이 이들 각각의 D-입체이성질체 또는 천연 발생의 20개의 아미노산이 아닌 아미노산, 예를 들어, 오르니틴, 하이드록시프롤린, 시트룰린, 호모세린, 하이드록시리신, 노르발린에 의해 대체된 단백질을 포함한다. 그러나, 상기 치환은 또한 보존성일 수 있고, 즉, 아미노산 잔기는 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체된다. 보존성 치환의 예는 1) 알라닌, 세린, 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 리신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌, 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판의 그룹의 일원 사이에서의 대체이다.
- [0029] "천연 서열" 인간 리포칼린 2는 천연으로부터 유래되는 해당 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 리포칼린 2를 의미한다. 따라서, 천연 서열 인간 리포칼린 2는 각각의 천연 발생 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 천연 서열 폴리펩티드는 천연으로부터 분리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열" 폴리펩티드는 구체적으로 인간 리포칼린 2의 천연 발생의 트렁케이셔널 형태 또는 분비된 형태, 천연 발생 변이체 형태, 예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태 및 인간 리포칼린 2의 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 폴리펩티드 "변이체"는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적 활성 폴리펩티드를 의미한다. 상기 변이체는, 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에서 1개 이상의 아미노산 잔기가 첨가되거나 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 일반적으로, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 예를 들어, 적어도 약 80%, 예를 들어, 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다.
- [0030] 본 발명의 개시에 따라 사용되는 경우 용어 "위치"는 본원에 도시된 아미노산 서열 내의 아미노산의 위치 또는 본원에 도시된 핵산 서열 내의 뉴클레오티드의 위치를 의미한다. 1종 이상의 뮤테인의 아미노산 서열 위치의 문맥상에서 본원에서 사용되는 용어 "해당" 또는 "해당하는"을 이해하기 위해, 해당 위치는 선행 뉴클레오티드/아미노산의 수에 의해서만 결정되지 않는다. 따라서, 치환될 수 있는 본 발명의 개시에 따른 제공된 아미노산의 위치는 (돌연변이체 또는 야생형) 인간 리포칼린 2의 다른 곳에서의 아미노산의 결실 또는 첨가로 인해 가변적일 수 있다. 유사하게, 치환될 수 있는 본 개시에 따른 제공된 뉴클레오티드 위치는 프로모터 및/또는 임의의 다른 조절 서열 또는 유전자(엑손 및 인트론을 포함함)를 포함하는 뮤테인 또는 야생형 인간 리포칼린 2 5'-비번역 영역(UTR) 내의 다른 곳에서의 결실 또는 추가 뉴클레오티드로 인해 가변적일 수 있다.
- [0031] 따라서, 본 발명의 개시에 따른 해당 위치에 대해, 뉴클레오티드/아미노산의 위치가 표시된 수에서 유사한 이웃하는 뉴클레오티드/아미노산과 상이할 수 있으나, 교환되거나, 결실되거나, 첨가될 수 있는 상기 이웃하는 뉴클레오티드/아미노산은 또한 하나 이상의 해당 위치에 의해 포함되는 것으로 이해되는 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 개시에 따른 참조 스캐폴드를 기초로 한 뮤테인의 해당 위치에 대해, 뉴클레오티드/아미노산의 위치가 이들이 표시된 수에서 상이할지라도 뮤테인 또는 야생형 인간 리포칼린 2의 다른 곳에서의 위치에 구조적으로 해당하는 것으로 이해하는 것이 바람직하다.
- [0033] 비-천연 표적에 대해 본원에서 사용되는 용어 "유기 분자" 또는 "작은 유기 분자"는 적어도 2개의 탄소 원자를 포함하나, 바람직하게는 7개 또는 12개 이하의 회전 가능한 탄소 결합을 포함하고, 100 내지 2000 달톤, 바람직하게는 100 내지 1000 달톤의 범위 내의 분자량을 갖고, 선택적으로 1개 또는 2개의 금속 원자를 포함하는 유기 분자를 나타낸다.
- [0034] 본원에서 사용되는 용어 "검출하다", "검출", "검출 가능한" 또는 "검출하는"은 정량적 및 정성적 수준 둘 모두 뿐만 아니라 이들의 조합으로 이해된다. 따라서, 이는 관심 분자의 정량적, 반-정량적 및 정성적 측정을 포함한다.
- [0035] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 용어 "포유동물"은 단지 몇가지 예를 들어 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예를 들어, 양, 개, 말, 고양이, 소, 래트, 돼지, 유인원, 예를 들어, 시노몰구스 원숭이 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 나타내는 것으로 본원에서 사용된다. 바람직하게는, 포유동물은 본원에서 인간이다.
- [0036] "유효량"은 이롭거나 원하는 결과를 얻기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0037] "샘플"은 임의의 대상체로부터 획득된 생물학적 샘플로 정의된다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 소변, 대변, 정액 또는 조직을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

**도면의 간단한 설명**

III. 도면의 설명

도 1은 P. 에어루지노사 시테로포어의 구조를 제시한다. 도 1a 내지 도 1c는 3종의 P. 에어루지노사 피오베르딘의 구조를 제시한다. 도 1a: Pvd 타입 I의 구조(문헌[Birskot et al., 1989] 참조); 도 1b: Pvd 타입 II의 구조(문헌[Birskot et al., 1989] 참조); 도 1c: Pvd 타입 III의 구조(Gipp et al., 1991); 도 1d: 발색단 부분에 부착된 R은 숙시닐, 숙신아미드 또는  $\alpha$ -케토글루타릴 측쇄일 수 있다; 도 1e: 피오켈린의 구조(Brandel et al., 2011).

도 2는 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:16에 결합하는 Pvd I s (+Fe)(도 2a), 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:36에 결합하는 Pvd II s (+Fe)(도 2b), 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:53에 결합하는 Pvd III (+Fe)(도 2c) 및 SEQ ID NO:62에 결합하는 피오켈린 (+Fe)(도 2d)에 대한 표면 플라즈몬 공명에 의한 결합 속도(on-rate) 및 분리 속도(off-rate)의 통상적인 측정을 제공한다. 또한, 음성 대조군 리포칼린 SEQ ID NO:64에 대한 1200 nM의 각각의 시테로포어(피오켈린에 대해서는 200 nM)의 결합의 부재가 도 2e 내지 도 2h에 제시된다.

도 3은 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:35에 대한 예시적 특이성 및 교차반응성 프로파일을 제시한다. 피오베르딘 II 숙시닐, 숙신아미드 및  $\alpha$ -케토글루타릴에 대한 특정 결합이 입증된 반면, 타입 I 및 타입 III의 피오베르딘, 피오켈린, 엔테로박틴(Enterobactin) 및 데스페록사민(Desferoxamin)에 대한 결합의 부재가 제시된다. 2  $\mu$ M의 높은 농도가 모든 분석물에 대해 사용된다.

도 4는 성장 억제 검정으로부터의 예시적 데이터를 제시한다. 도 4a: Pvd I 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:16은 뮤테인이 없이 성장하는 대조군 배양에 비해 Pvd I 특이적 P. 에어루지노사 균주(ATCC27853)의 성장 억제를 제시한다. 도 4b: Pvd II 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:19 및 36은 뮤테인이 없이 성장하는 대조군 배양에 비해 Pvd II 특이적 P. 에어루지노사 균주(ATCC15692)의 성장 억제를 제시한다. SEQ ID NO:36은 SEQ ID NO:19에 비해 더 높은 결합 친화성을 갖고, 더 큰 성장 억제를 제시한다. 도 4c: Pvd III 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:53은 뮤테인이 없이 성장하는 대조군 배양에 비해 Pvd III 특이적 P. 에어루지노사 균주(ATCC33360)의 성장 억제를 제시한다. 도 4d: Pch 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:62는 뮤테인이 없이 성장하는 대조군 배양에 비해 철 흡수를 위해 Pch에 의존하는 Pvd I 녹아웃 P. 에어루지노사 균주(ATCC15692  $\Delta$ pvdA)의 성장 억제를 제시한다. 10  $\mu$ M 리포칼린 뮤테인이 검정에서 적용되었다.

도 5는 마우스의 P. 에어루지노사 유발 폐 감염 모델에서 박테리아 공격 1시간 전 및 박테리아 공격시의 SEQ ID NO:19의 투여가 용량-의존 방식으로 마우스에서 감염의 발생을 방지하는 것을 제시한다. 200  $\mu$ g/마우스의 SEQ ID NO:19로 시작하여 유의한 방지 효과가 관찰되었고, 2000  $\mu$ g/마우스에서 최대 효과가 관찰되었다.

도 6은 위치 1의 시작 메티오닌, 위치 2의 리신, 위치 3 내지 8의 핵사히스티딘 태그, 위치 9 내지 15의 아미노산 DYDIPTT의 링커 영역(SEQ ID NO:132), 위치 16 내지 22의 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제 절단 부위 ENLYFQG(SEQ ID NO:133)에 뒤따르는 위치 23으로부터 이어지는 관심 뮤테인의 아미노산 서열을 포함하는 결정화를 위해 발현된 아미노산 서열을 제시한다.

도 7은 SEQ ID NO:31 - Pvd-Fe 복합체 구조를 제시한다. 2개의 SEQ ID NO:31 분자, 즉, 비대칭 유닛으로부터의 사슬 A 및 사슬 B의 중첩.

도 8은 SEQ ID NO:31 및 Pvd-Fe 상호작용을 제시한다. 비대칭 유닛으로부터의 2개의 분자가 중첩된다. Pvd-Fe와 상호작용하는 측쇄가 도시된다.

도 9는 Pvd 조성을 제시한다. 철 결합과 관련된 산소 원자가 박스로 표시된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

IV. 본 발명의 개시의 상세한 설명

본 발명의 개시는 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 대한 결합 특이성을 갖는 폴리펩티드를 제공하며, 상기 폴리펩티드는 검출 가능한 친화성으로 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 포함한다.

본원에서 사용되는 용어 "인간 리포칼린 2" 또는 "인간 Lcn 2" 또는 "인간 NGAL" 또는 "hNGAL"은 SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 접근 번호(Data Bank Accession Number) P80188을 갖는 성숙 인간 호중구 젤라틴분

해효소-관련 리포칼린(NGAL)을 나타낸다. 본 발명의 개시의 인간 리포칼린 2 뮤테인은 또한 "hNGAL 뮤테인"으로 본원에서 지칭될 수 있다. SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 접근 번호(Data Bank Accession Number) P80188에 제시된 아미노산 서열은 바람직한 "참조 서열"로 사용될 수 있고, 더욱 바람직하게는 SEQ ID NO:1에 제시된 아미노산 서열이 참조 서열로 사용된다.

[0042] 일부 구현예에서, 검출 가능한 친화성으로 피오베르딘(타입 I, II 또는 III) 또는 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인은 또 다른 아미노산, 예를 들어, 세린 잔기에 의한 천연 시스테인 잔기의 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 검출 가능한 친화성으로 피오베르딘 또는 피오켈린에 결합하는 뮤테인은 야생형 hNGAL의 1개 이상의 아미노산을 치환하는 1개 이상의 비-천연 시스테인 잔기를 포함할 수 있다. 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 hNGAL 뮤테인은 시스테인 잔기에 의한 천연 아미노산의 적어도 2개의 아미노산 치환을 포함함으로써 1개 이상의 시스테인 브릿지를 형성한다. 일부 구현예에서, 상기 시스테인 브릿지는 적어도 2개의 루프 영역을 연결시킬 수 있다. 이들 영역의 정의는 플라워(Flower)(Flower, 1996, 상기, Flower, et al., 2000, 상기) 및 브뤼슈테트 등(Breustedt et al.)(2005, 상기)에 따라 본원에서 이용된다.

[0043] 일부 구현예에서, 본 개시의 hNGAL 뮤테인은 엔테로박틴에 결합하지 않는다.

[0044] 일 양태에서, 본 발명의 개시는 적어도 검출 가능한 친화성으로 피오베르딘 또는 피오켈린에 결합하는 다양한 hNGAL 뮤테인을 포함한다. 이러한 의미에서, 피오베르딘 또는 피오켈린은 참조 야생형 hNGAL의 비-천연 리간드로 간주되며, 여기서 "비-천연 리간드"는 생리학적 조건하에서 야생형 인간 리포칼린 2에 결합하지 않는 화합물을 나타낸다. 특정 서열 위치에 1개 이상의 돌연변이를 갖도록 야생형 hNGAL을 공학 처리함으로써, 본 발명자는 비-천연 리간드인 피오베르딘 및 피오켈린에 대한 높은 친화성 및 높은 특이성이 가능함을 입증하였다. 일부 구현예에서, 야생형 I 인간 리포칼린 2의 특정 서열 위치를 인코딩하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 심지어 더 많은 뉴클레오티드 트리플렛(들)에서, 뉴클레오티드 트리플렛의 부분집합에 의한 상기 위치에서의 치환을 통해 무작위 돌연변이유발이 수행될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 개시의 뮤테인은 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 28, 34, 36, 39 내지 42, 44 내지 47, 49, 52, 54 내지 55, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 및 145와 같은 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열의 특정 서열 위치에 해당하는 서열 위치 중 어느 1개 이상, 예를 들어, 적어도 어느 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.

[0046] 본 발명의 개시의 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 "모(parental)" 단백질 스캐폴드(예를 들어, hNGAL)의 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 hNGAL 뮤테인은 또한 돌연변이가 뮤테인의 결합 활성 및 폴딩을 적어도 본질적으로 방해하지 않거나 간섭하지 않는 한 서열 위치/위치들에서 1개 이상의 아미노산 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 돌연변이는 확립된 표준 방법을 이용하여 DNA 수준에서 매우 용이하게 달성될 수 있다(Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). 아미노산 서열의 변경의 예시적 예는 삽입 또는 결실뿐만 아니라 아미노산 치환이다. 상기 치환은 보존성일 수 있고, 즉, 아미노산 잔기는 특히 극성뿐만 아니라 크기와 관련하여 화학적으로 유사한 특성의 아미노산 잔기로 대체된다. 보존성 치환의 예는 1) 알라닌, 세린, 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 리신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌, 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판의 그룹의 일원 사이에서의 대체이다. 다른 한편으로, 아미노산 서열에 비-보존성 변경을 도입시키는 것이 또한 가능하다. 또한, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 것 대신에, 결실 또는 삽입이 안정적인 폴딩된/기능성 뮤테인(예를 들어, 트렁케이션된 N-말단 및 C-말단을 갖는 hNGAL 뮤테인)을 발생시키는 한 인간 리포칼린 2의 일차 구조의 1개 이상의 연속적 아미노산을 삽입하거나 결실시키는 것이 또한 가능하다. 상기 뮤테인에서, 예를 들어, 1개 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에서 첨가되거나 결실된다. 일반적으로, 상기 뮤테인은 성숙 hNGAL의 아미노산 서열과 적어도 약 70%, 예를 들어, 적어도 약 80%, 예를 들어, 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 예시적 예로서, 본 개시는 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열의 4개의 아미노산 잔기(G-N-I-K; 위치 95 내지 98; SEQ ID NO:130)가 결실된 상기 정의된 바와 같은 hNGAL 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO:46)을 포함한다.

[0047] 본원에 개시된 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 다른 리포칼린과의 서열 동일성과 비교할 때 성숙 hNGAL(SEQ ID NO:1)과 높은 서열 동일성을 갖는다. 이러한 일반적인 상황에서, 본 발명의 개시의 뮤테인의 아미노산 서열은 천연 야생형 hNGAL의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 유사하나, 단, 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인

정렬 내의 갭(하기에 정의되는 바와 같음)이 존재할 수 있다. 성숙 hNGAL의 서열과 실질적으로 유사한 본 발명의 개시의 뮤테인의 각각의 서열은 일부 구현예에서 성숙 hNGAL의 서열과 적어도 70%의 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 75%의 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 80%의 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 82%의 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 85%의 동일성 또는 서열 상동성, 적어도 87%의 동일성 또는 서열 상동성, 또는 적어도 90%의 동일성 또는 서열 상동성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성 또는 서열 상동성을 가지나, 단, 변경된 위치 또는 서열은 유지되어야 하고, 하나 이상의 갭이 가능하다.

- [0048] 본원에서 사용되는 본 발명의 개시의 뮤테인은 표적과 1개 이상의 참조 표적 사이를 구별할 수 있는 경우 표적 (예를 들어, 피오베르딘 또는 피오켈린)에 "특이적으로 결합"하는데, 이는 결합 특이성이 절대적인 것이 아니라 상대적 특성이기 때문이다. "특이적 결합"은, 예를 들어, 웨스턴 블롯, ELISA-검정, RIA-검정, ECL-검정, IRMA-검정, FACS, IHC 및 펩티드 스캔에 따라 결정될 수 있다.
- [0049] 일 구현예에서, 본 발명의 개시의 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 이의 C-말단에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 단백질 도메인인 융합 파트너에 융합된다. 추가의 특정 구현예에서, 단백질 도메인은 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩티드, 또는 알부민 결합 단백질이다.
- [0050] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시의 뮤테인은 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물에 컨주게이션된다. 더욱 바람직하게는, 뮤테인은 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩티드, 및 알부민 결합 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물에 컨주게이션된다.
- [0051] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시는 본원에 개시된 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명의 개시는 상기 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포를 포함한다.
- [0052] 피오베르딘에 특이적인 뮤테인.
- [0053] P. 에어루지노사 분리물의 연구는 이제까지 피오베르딘을 3종의 상이한 타입으로 분류하는 것을 도왔다(Meyer et al., Use of Siderophores to Type Pseudomonads: The Three Pseudomonas Aeruginosa Pyoverdine Systems, Microbiology, 1997; vol. 143 no. 1 35-43). 각각 P. 에어루지노사 분리물의 대략 42%는 Pvd 타입 I의 것과 동일한 피오베르딘 시스템을 갖고, P. 에어루지노사 분리물의 42%는 Pvd 타입 II와 유사하게 거동하는 한편, P. 에어루지노사 분리물의 16%는 Pvd 타입 III에 속한다(Cornelis et al., 1989a; 표 4). 각각의 타입은 숙시닐, 숙신아미드 또는 α-케토글루타릴의 측쇄에서 상이한 3종의 일원(서브타입), 즉, Pvd 타입 I 숙시닐, Pvd 타입 I 숙신아미드, Pvd 타입 I α-케토글루타릴, Pvd 타입 II 숙시닐, Pvd 타입 II 숙신아미드, Pvd 타입 II α-케토글루타릴, Pvd 타입 III 숙시닐, Pvd 타입 III 숙신아미드 및 Pvd 타입 III α-케토글루타릴을 갖는다.
- [0054] 상이한 타입의 피오베르딘을 생성하는 P. 에어루지노사를 다루기 위해, 본 발명의 개시는 상이한 타입의 피오베르딘에 특이적인 hNGAL 뮤테인을 제공한다. 본 개시는 또한 상기 뮤테인에 대한 유용한 적용, 본원에 기재된 피오베르딘-결합 hNGAL 뮤테인을 제조하는 방법뿐만 아니라 상기 뮤테인을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 개시의 피오베르딘-결합 hNGAL 뮤테인뿐만 아니라 이의 조성물은 샘플에서 피오베르딘을 검출하는 방법 또는 대상체에서의 피오베르딘의 결합 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 개시에 의해 제공되는 용도에 수반하는 이들 특징을 갖는 상기 hNGAL 뮤테인은 이전에 기재된 적이 없다.
- [0055] 피오베르딘은 천연 야생형 hNGAL에 결합하지 않는 반면, hNGAL의 천연 리간드인 엔테로박틴은 높은 친화성으로 hNGAL의 칼릭스(calyx)에 도킹한다. 따라서, 피오베르딘은 독성 인자 및 hNGAL 인지를 피하는 스텔스 시테로포어로서 P. 에어루지노사가 감염을 확립하도록 한다(Peek et al., Pyoverdine, the Major Siderophore in Pseudomonas aeruginosa, Evades NGAL Recognition, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012).
- [0056] 따라서, 인간 리포칼린 2로도 언급되는 인간 호중구 젤라틴분해효소 관련 리포칼린(NGAL)으로부터 유래된 뮤테인을 제공하는 것이 본 개시의 목적이며, 상기 뮤테인은 천연의 야생형 hNGAL과 대조적으로 피오베르딘에 대한 높은 특이성을 갖는다.
- [0057] 피오베르딘에 특이적인 예시적 뮤테인.
- [0058] 일 양태에서, 본 개시는 피오베르딘의 한 타입, 예를 들어, Pvd 타입 I, Pvd 타입 II 또는 Pvd 타입 III에 특이적인 신규한 특정-결합 인간 리포칼린 2(인간 Lcn2 또는 hNGAL) 뮤테인에 관한 것이다.

- [0059] 본 발명의 개시의 일 구현에는 검출 가능한 친화성, 예를 들어, 약 200 nM 이하, 예를 들어, 약 150 nM 이하의  $K_D$ 로 측정된 친화성으로 피오베르딘의 한 타입에 결합할 수 있는 뮤테인에 관한 것이다.
- [0060] 일 양태에서, 본 발명의 개시는, 예를 들어, 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하, 예를 들어, 15 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 Pvd 타입 I에 결합할 수 있는 hNGAL 뮤테인을 제공한다.
- [0061] 일부 추가의 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 I 숙시닐, Pvd 타입 I 숙신아미드 및 Pvd 타입 I a-케토글루타릴에 결합할 수 있다.
- [0062] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 I 숙시닐에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.
- [0063] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd I 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0064] 이와 관련하여, 본 발명의 개시는 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 hNGAL 뮤테인을 포함하고, 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 상기 hNGAL은 서열 위치 28, 36, 39 내지 41, 46, 49, 52, 54 내지 55, 59, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 및 136에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개 또는 심지어 그 초과 또는 심지어 그 초과 또는 심지어 그 초과 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 Pvd 타입 I 숙시닐, Pvd 타입 I 숙신아미드 및 Pvd 타입 I a-케토글루타릴을 포함하는 Pvd 타입 I에 결합한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 Pvd-타입-I-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 36, 40 내지 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134 중 어느 하나 이상에서 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다: Leu 36 → Asn, Thr, Val, Trp 또는 Phe; Ala 40 → Gly, Asn, Thr 또는 Phe; Ile 41 → Arg, Ala, Thr, Phe 또는 Trp; Gln 49 → Ile, Leu, Val, Ala 또는 Pro; Tyr 52 → Met, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp, Val 또는 Glu; Leu 70 → Gln, Trp, Asp 또는 Thr; Arg 72 → Trp, Ala, Ser, Leu, Pro 또는 Glu; Lys 73 → Asp, Leu, Ala, Glu 또는 Asn; Asp 77 → Arg, Leu, Tyr, Ser, Gln, Thr, Ile 또는 Asn; Trp 79 → Gln, Asp, Ser, Arg, Met 또는 Glu; Arg 81 → Gln, Gly, Ile, Glu, His 또는 Asp; Asn 96 → His, Ile, Gly, Tyr 또는 Asp; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe 또는 Tyr; Leu 103 → Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp 또는 Asn; Tyr 106 → His, Gln 또는 Phe; Lys 125 → Arg, Ser, Trp, Tyr, Val 또는 Gly; Ser 127 → Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr, His, Ile, Val 또는 Asp; Tyr 132 → Trp, Asn, Gly 또는 Lys; 및 Lys 134 → Asn, His, Trp, Gly, Gln 또는 Asp. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 이들 서열 위치에서 2개 이상, 예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 심지어 그 초과 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0066] 또한, 본 발명의 개시에 따른 Pvd-타입-I-결합 hNGAL 뮤테인은 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함할 수 있다: Gln 28 → His; Lys 46 → Glu; Thr 54 → Val 또는 Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp 또는 Gln; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser 또는 Asn; 및 Thr 136 → Ala.
- [0067] 일부 추가의 구현예에서, Pvd 타입 I에 결합하는 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 아미노산 대체를 포함한다:
- [0068] Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gln; Cys 87 → Ser; Asn 96 → His; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → His; Tyr 106 → His; Lys 125 → Arg; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Asp;
- [0069] Gln 28 → His; Leu 36 → Thr; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Trp; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Tyr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → His; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Gln;

- [0070] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Lys; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ala; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0071] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Gly;
- [0072] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0073] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Phe; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Glu; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Leu 103 → Tyr; Tyr 106 → His; Lys 125 → Val; Ser 127 → His; Tyr 132 → Lys; Lys 134 → Trp;
- [0074] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0075] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0076] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0077] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asn; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0078] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0079] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0080] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → sER; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0081] Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 →

Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;

[0082] Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;

[0083] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → sER; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His; 또는

[0084] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → sER; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His.

[0085] 나머지 영역, 즉, 서열 위치 28, 36, 39 내지 41, 46, 49, 52, 54 내지 55, 59, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 및 136와 상이한 영역에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0086] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO:2 내지 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0087] 본 발명의 개시의 Pvd-타입-I-결합 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:2 내지 18로 구성된 군으로부터 선택되는 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다.

[0088] 본 발명의 개시는 또한 SEQ ID NO:2 내지 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 hNGAL 뮤테인의 구조적 동족체를 포함하며, 상기 구조적 동족체는 상기 hNGAL 뮤테인과 관련하여 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과,의 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다.

[0089] 본 개시에 따른 Pvd-타입-I-결합 hNGAL 뮤테인은 인간 리포칼린 2의 천연 발생 형태의 돌연변이유발에 의해 획득될 수 있다. 돌연변이유발의 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)은 보존성 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Pvd 타입 I에 결합하는 이의 능력을 보유하고/하거나 성숙 인간 리포칼린 2(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188)의 아미노산 서열과 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 이보다 높은 동일성의 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는 한 비보존성 치환 또는 하기의 예시적인 치환 중 하나 이상을 포함하는 임의의 치환이 예견된다.

[0090] 또 다른 양태에서, 본 발명의 개시는, 예를 들어, 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하, 예를 들어, 5 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 Pvd 타입 II에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 제공한다.

[0091] 일부 또 다른 추가 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 II 숙시닐, Pvd 타입 II 숙신아미드 및 Pvd 타입 II a-케토글루타릴에 결합할 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 II 숙시닐에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.

- [0093] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd II 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0094] 일부 다른 구현예에서, 뮤테인은 실시예 10에 본질적으로 기재된 검정에서 피오베르딘 타입 II를 발현하는 P. 에어루지노사 균주의 성장을 억제하거나 감소시킬 수 있다.
- [0095] 이와 관련하여, 본 발명의 개시는 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 hNGAL 뮤테인을 포함하고, 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 상기 hNGAL은 서열 위치 28, 36, 40 내지 41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 또는 심지어 그 초과와 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 Pvd 타입 II에 결합한다.
- [0096] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 Pvd-타입-II-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 36, 40 내지 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134 중 어느 하나 이상에서 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다: Leu 36 → Asn, Ile 또는 Val; Ala 40 → Glu, Gly, Asn, Thr 또는 His; Ile 41 → Arg, Val 또는 Thr; Gln 49 → Gly, Ala 또는 Pro; Tyr 52 → Asn, Gly, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp, Arg 또는 Glu; Leu 70 → Arg 또는 Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser 또는 Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln 또는 Arg; Asp 77 → His, Ile, Met, Lys, Gly 또는 Asn; Trp 79 → Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe 또는 Trp; Arg 81 → Glu, Ser, Tyr 또는 Asp; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn 또는 Ala; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe 또는 Tyr; Leu 103 → Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp 또는 Val; Tyr 106 → Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met 또는 Phe; Lys 125 → Ala, Ile 또는 Asn; Ser 127 → Lys, Arg, Ser, Met, Asp 또는 Asn; Tyr 132 → Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly 또는 Val; 및 Lys 134 → Trp 또는 Tyr. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 이들 서열 위치에서 2개 이상, 예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 심지어 그 초과 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0097] 또한, 본 발명의 개시에 따른 Pvd-타입-II-결합 hNGAL 뮤테인은 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함할 수 있다: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp 또는 Gln 및 Cys 87 → Ser.
- [0098] 일부 추가의 구현예에서, Pvd 타입 II에 결합하는 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 아미노산 대체를 포함한다:
- [0099] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0100] Gln 28 → His; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Met; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Met; Lys 134 → Trp;
- [0101] Gln 28 → His; Leu 36 → Ile; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Ala; Lys 125 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0102] Gln 28 → His; Ala 40 → Asn; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Ile; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0103] Gln 28 → His; Ala 40 → His; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ala; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Asn; Lys 134 →

Trp;

- [0104] Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Asn; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Thr; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Tyr;
- [0105] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Gly; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Ile; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0106] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0107] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0108] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Trp;
- [0109] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0110] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Phe; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- [0111] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- [0112] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0113] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0114] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- [0115] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79

→ Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

- [0116] Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp; 또는
- [0117] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp.
- [0118] 나머지 영역, 즉, 서열 위치 28, 36, 40 내지 41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134와 상이한 영역에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0119] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO:19 내지 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0120] 본 발명의 개시의 Pvd-타입-II-결합 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:19 내지 37로 구성된 군으로부터 선택되는 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다.
- [0121] 본 발명의 개시는 또한 SEQ ID NO:19 내지 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 hNGAL 뮤테인의 구조적 동족체를 포함하며, 상기 구조적 동족체는 상기 hNGAL 뮤테인과 관련하여 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과와 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다.
- [0122] 본 개시에 따른 Pvd-타입-II-결합 hNGAL 뮤테인은 인간 리포칼린 2의 천연 발생 형태의 돌연변이유발에 의해 획득될 수 있다. 돌연변이유발의 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)은 보존성 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Pvd 타입 I에 결합하는 이의 능력을 보유하고/하거나 성숙 인간 리포칼린 2(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188)의 아미노산 서열과 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 이보다 높은 동일성의 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는 한 비보존성 치환 또는 하기의 예시적인 치환 중 하나 이상을 포함하는 임의의 치환이 예견된다.
- [0123] 또 다른 양태에서, 본 발명의 개시는, 예를 들어, 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하, 예를 들어, 10 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 Pvd 타입 III에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 제공한다.
- [0124] 일부 또 다른 추가 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 III 숙시닐, Pvd 타입 III 숙신아미드 및 Pvd 타입 II a-케토글루타릴에 결합할 수 있다.
- [0125] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 III에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.
- [0126] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd III 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0127] 이와 관련하여, 본 발명의 개시는 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 hNGAL 뮤테인을 포함하고, 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 상기 hNGAL은 서열 위치 28, 36, 40 내지 42, 45 내지 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105 내지 106, 125, 127, 132, 134 및 145에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 또는 심지어 그 초과와 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 Pvd 타입 III에 결합한다.

- [0128] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 Pvd-타입-III-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 36, 40 내지 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134 중 어느 하나 이상에서 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다: Leu 36 → Phe 또는 Glu; Ala 40 → Trp, Leu 또는 Arg; Ile 41 → Met, Arg, Ala, Leu 또는 Trp; Gln 49 → His, Ile, Arg, Lys, Met 또는 Pro; Tyr 52 → Asn, Tyr, Arg, Ser 또는 Met; Ser 68 → Asp, Asn, Glu 또는 Gln; Leu 70 → Lys, Asn 또는 Arg; Arg 72 → Leu, Arg, Gln 또는 Tyr; Lys 73 → His, Leu, Ala, Pro, Gln 또는 Tyr; Asp 77 → Ala, Ile, Lys, Gln 또는 Arg; Trp 79 → Ser 또는 Asp; Arg 81 → His, Ala, Ser 또는 Val; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Gly, Leu 또는 Val; Tyr 100 → Ala, Ile, Asn, Pro 또는 Asp; Leu 103 → Gln, Gly, Phe 또는 Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp 또는 Thr; Ser 127 → Val, His, Ile, Phe 또는 Ala; Tyr 132 → Phe; 및 Lys 134 → Trp, Gln 또는 Glu. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 이들 서열 위치에서 2개 이상, 예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 심지어 그 초과 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0129] 또한, 본 발명의 개시에 따른 Pvd-타입-III-결합 hNGAL 뮤테인은 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함할 수 있다: Gln 28 → His; Leu 42 → Arg; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Asp 47 → Asn; Asn 65 → Asp; Cys 87 → Ser; Ser 105 → Pro 및 Thr 145 → Pro.
- [0130] 일부 추가의 구현예에서, Pvd 타입 III에 결합하는 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 아미노산 대체를 포함한다:
- [0131] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Met; Gln 49 → His; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Gln; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → His; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Gln;
- [0132] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Arg; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Tyr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Asn; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Ile; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- [0133] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Arg; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ala; Leu 103 → Phe; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Ala; Lys 134 → Glu;
- [0134] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- [0135] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0136] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0137] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Val; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0138] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 →

Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0139] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → -; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0140] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0141] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;

[0142] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0143] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0144] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;

[0145] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; 또는

[0146] Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp.

[0147] 나머지 영역, 즉, 서열 위치 28, 36, 40 내지 42, 45 내지 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105 내지 106, 125, 127, 132, 134 및 145와 상이한 영역에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0148] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO:38 내지 53으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0149] 본 발명의 개시의 Pvd-타입-III-결합 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:38 내지 53으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다.

[0150] 본 발명의 개시는 또한 SEQ ID NO:38 내지 53으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 hNGAL 뮤테인의 구조적 동족체를 포함하며, 상기 구조적 동족체는 상기 hNGAL 뮤테인과 관련하여 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과

아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다.

- [0151] 본 개시에 따른 Pvd-타입-III-결합 hNGAL 뮤테인은 인간 리포칼린 2의 천연 발생 형태의 돌연변이유발에 의해 획득될 수 있다. 돌연변이유발의 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)은 보존성 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Pvd 타입 I에 결합하는 이의 능력을 보유하고/하거나 성숙 인간 리포칼린 2(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188)의 아미노산 서열과 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 이보다 높은 동일성의 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는 한 비보존성 치환 또는 하기의 예시적인 치환 중 하나 이상을 포함하는 임의의 치환이 예견된다.
- [0152] 피오베르딘에 특이적인 뮤테인의 적용
- [0153] 피오베르딘은 P. 에어루지노사와 같은 슈도모나드(pseudomonads)의 주요 시데로포어이다. 시험관내 실험은 페리 트랜스페린(ferritransferrin)으로부터의 철 방출에서 P. 에어루지노사 피오베르딘의 잠재적 역할을 나타내었으나, 생체내에서 철과 경쟁하는 피오베르딘의 능력은 단지 최근에 입증되었다(Meyer et al., 1996, Infection and Immunity, 64, p.518-523). 독성이 있는 모 균주로부터 발생된 돌연변이체에서의 피오베르딘 생성의 부재가 이들 돌연변이체의 독성의 상실과 관련이 있고, 야생형 균주에서 유래한 상동성 피오베르딘이 보충된 경우에 독성이 회복된 것이 화상을 입은 마우스를 이용하여 관찰되었다. 또한, 이중성 피오베르딘을 이용한 보충은 후자의 돌연변이체의 독성을 회복시키지 않았다. 따라서, 감염 동안 제공된 P. 에어루지노사 분리물에 의해 이용된 피오베르딘-매개 철 흡수 시스템의 정확한 지식이, 예를 들어, 피오베르딘 생합성 또는 피오베르딘-매개 철 수송을 차단함으로써 박테리아 철 대사를 통한 P. 에어루지노사 감염의 새로운 방식의 치료를 개발하는데 있어서의 필요조건으로 보인다.
- [0154] 따라서, 본 발명의 개시의 피오베르딘-결합 뮤테인에 대한 수많은 가능한 적용이 의학에서 가능하다. 추가의 일 양태에서, 본 발명의 개시는 샘플에서 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)을 검출하기 위한 본원에 개시된 피오베르딘-결합 뮤테인의 용도뿐만 아니라 각각의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0155] 본 개시는 또한 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)과의 복합체 형성을 위한 기재된 바와 같은 1종 이상의 피오베르딘-결합 뮤테인의 용도를 포함한다.
- [0156] 따라서, 본 발명의 개시의 또 다른 양태에서, 개시된 뮤테인은 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)의 검출에 사용된다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인과 피오베르딘을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인과 피오베르딘(타입 I, II 또는 III) 사이에 복합체를 형성시키는 단계, 및 적합한 신호에 의해 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0157] 검출 가능한 신호는 상기 설명한 바와 같이 표지, 또는 결합, 즉, 복합체 형성 자체로 인한 물리적 특성의 변화에 의해 야기될 수 있다. 일례는 표면 플라즈몬 공명이며, 이의 값은 금박과 같은 표면에 고정되어 있는 결합 파트너의 결합 동안 변화된다.
- [0158] 본원에 개시된 피오베르딘-결합 뮤테인은 또한 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)의 분리에 사용될 수 있다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인과 피오베르딘(타입 I, II 및/또는 III)을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인과 피오베르딘(타입 I, II 및/또는 III) 사이에 복합체를 형성시키는 단계, 및 샘플로부터 복합체를 분리시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0159] 피오베르딘의 검출뿐만 아니라 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)의 분리를 위한 개시된 뮤테인의 용도에서, 뮤테인 및/또는 피오베르딘 또는 이들의 도메인 또는 단편은 적합한 고체상에 고정될 수 있다.
- [0160] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본 개시에 따른 피오베르딘-결합 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트를 특징으로 한다.
- [0161] 또 다른 양태에서, 진단에서의 용도에 더하여, 본 개시는 대상체에서 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)의 결합 및/또는 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 본 발명의 개시의 피오베르딘-결합 뮤테인 또는 상기 뮤테인을 포함하는 조성물의 용도를 포함한다.
- [0162] 또 다른 양태에서, 본 개시는 유효량의 본 발명의 개시의 1종 이상의 피오베르딘-결합 뮤테인 또는 상기 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)을 결합시키는 방법을 특징으로 한다.
- [0163] 또 다른 양태에서, 본 개시는 유효량의 본 발명의 개시의 1종 이상의 피오베르딘-결합 뮤테인 또는 상기 뮤테인

을 포함하는 하나 이상의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 방법을 포함한다.

- [0164] 피오켈린에 특이적인 뮤테인
- [0165] 또한, 본 개시는 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 제공함으로써 피오켈린의 대안적 억제제 및 이에 대한 유용한 적용에 대한 필요성을 충족시킨다. 따라서, 본 발명의 개시는 또한 본원에 기재된 피오켈린-결합 뮤테인을 제조하고 이용하는 방법뿐만 아니라 샘플에서 피오켈린을 검출하는 방법 또는 대상체에서의 피오켈린의 결합 방법에서 사용될 수 있는 조성물을 제공한다. 본 발명의 개시에 의해 제공된 용도에 수반하는 이들 특징을 갖는 상기 hNGAL 뮤테인은 이전에 기재된 적이 없다.
- [0166] 피오켈린에 특이적인 예시적 뮤테인
- [0167] 일 양태에서, 본 개시는, 예를 들어, 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하, 예를 들어, 1 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인에 관한 것이다.
- [0168] 일부 또 다른 추가의 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 500 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0169] 일부 또 다른 추가의 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖지 않는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0170] 일부 또 다른 추가의 구현예에서, 본 발명의 개시의 1종 이상의 hNGAL 뮤테인은, 예를 들어, 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0171] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오켈린에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.
- [0172] 일부 구현예에서, 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd I 핵-아웃 ( $\Delta$ pvdA)의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0173] 이와 관련하여, 본 발명의 개시는 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 hNGAL 뮤테인을 포함하고, 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 상기 hNGAL은 서열 위치 28, 34, 36, 40 내지 41, 44 내지 46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 및 141에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 또는 심지어 그 초과와 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 피오켈린에 결합한다.
- [0174] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 피오켈린-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 36, 40 내지 41, 49, 52, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134 중 어느 하나 이상에서 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함한다: Leu 36 → His, Met 또는 Val; Ala 40 → Ile, Gln, Tyr 또는 Phe; Ile 41 → Leu, His 또는 Trp; Gln 49 → His, Arg, Ser 또는 Ala; Tyr 52 → Leu, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp 또는 His; Leu 70 → Arg 또는 Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser 또는 Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln 또는 Arg; Asp 77 → Arg, Thr, Pro 또는 Asp; Trp 79 → Ala, Arg, Lys 또는 Asp; Arg 81 → Thr, Ile 또는 Trp; Asn 96 → Met, Asn, Pro 또는 Ala; Tyr 100 → Gly, His 또는 Glu; Leu 103 → Gly, Met, His 또는 Gln; Tyr 106 → Met, Gly, Arg 또는 Trp; Lys 125 → Trp, Phe, Gly 또는 Leu; Ser 127 → Arg, Trp, Asp 또는 Ile; Tyr 132 → Ala, Glu 또는 Thr; 및 Lys 134 → Leu, Val, Asn 또는 Phe. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 이들 서열 위치에서 2개 이상, 예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 또는 심지어 그 초과 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0175] 또한, 본 발명의 개시에 따른 피오켈린-결합 hNGAL 뮤테인은 또한 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함할 수 있다: Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg 또는 Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser

및 Thr 141 → Ala.

- [0176] 일부 추가의 구현예에서, 피오켈린에 결합하는 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 아미노산 대체를 포함한다:
- [0177] Gln 28 → His; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Leu; Ser 68 → His; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Lys; Lys 73 → Trp; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Leu;
- [0178] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- [0179] Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;
- [0180] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ala; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Arg; Lys 125 → Leu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Asn;
- [0181] Gln 28 → His; Vla 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;
- [0182] Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;
- [0183] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- [0184] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; 또는
- [0185] Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.
- [0186] 나머지 영역, 즉, 서열 위치 28, 34, 36, 40 내지 41, 44 내지 46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 및 141과 상이한 영역에서, 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이된 아미노산 서열 위치 외부에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0187] 추가의 특정 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 뮤테인은 SEQ ID NO:54 내지 63으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0188] 본 발명의 개시의 피오켈린-결합 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:54 내지 63으로 구성된 군으로부터

선택되는 서열과 높은 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성을 가질 수 있다.

- [0189] 본 발명의 개시는 또한 SEQ ID NO:54 내지 63으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 hNGAL 뮤테인의 구조적 동족체를 포함하며, 상기 구조적 동족체는 상기 hNGAL 뮤테인과 관련하여 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과인 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다.
- [0190] 본 개시에 따른 피오켈린-결합 hNGAL 뮤테인은 인간 리포칼린 2의 천연 발생 형태의 돌연변이유발에 의해 획득될 수 있다. 돌연변이유발의 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)은 보존성 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 Pvd 타입 I에 결합하는 이의 능력을 보유하고/하거나 성숙 인간 리포칼린 2(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188)의 아미노산 서열과 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 이보다 높은 동일성의 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는 한 비보존성 치환 또는 하기의 예시적인 치환 중 하나 이상을 포함하는 임의의 치환이 예견된다.
- [0191] 2. 피오켈린에 특이적인 뮤테인의 적용
- [0192] 피오켈린(Pch)은 철을 흡수하기 위해 슈도모나스 에어루지노사에 의해 생성되고 분비되는 2종의 주요 시테로포어 중 1종이다. 이는 세포외 배지에서 철을 킬레이트화시키고, 이를 특이적 외막 수송체인 FptA를 통해 세포 내로 수송한다. Pch는 Zn(II)(p[H] 7.4에서 pZn = 11.8) 및 Cu(II)(p[H] 7.4에서 pCu = 14.9)와 같은 2가 금속을 강하게 킬레이트화시키고, 주로 1:2(M<sup>2+</sup>/Pch) 복합체를 형성시킨다. 시테로포어는 철(III) 서플링에 전념할 뿐만 아니라 미생물의 미세한 금속 항상성에서 다른 특이적인 생물학적 역할을 나타낼 가능성이 크다.
- [0193] 따라서, 본 발명의 개시의 피오켈린에 대해 결합-친화성을 갖는 뮤테인에 대한 수많은 가능한 용도가 의학에서 가능하다. 추가의 일 양태에서, 본 발명의 개시는 샘플에서 피오켈린을 검출하기 위한 본원에 개시된 상기 뮤테인의 용도뿐만 아니라 각각의 진단 방법에 관한 것이다.
- [0194] 본 개시는 또한 피오켈린과의 복합체 형성을 위한 기재된 바와 같은 피오켈린에 대한 결합-친화성을 갖는 1종 이상의 뮤테인의 용도를 포함한다.
- [0195] 따라서, 본 발명의 개시의 또 다른 양태에서, 개시된 뮤테인은 피오켈린의 검출에 사용된다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인과 피오켈린을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인과 피오켈린 사이에 복합체를 형성시키는 단계, 및 적합한 신호에 의해 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0196] 검출 가능한 신호는 상기 설명한 바와 같이 표지, 또는 결합, 즉, 복합체 형성 자체로 인한 물리적 특성의 변화에 의해 야기될 수 있다. 일례는 표면 플라즈몬 공명이며, 이의 값은 금박과 같은 표면에 고정되어 있는 결합 파트너의 결합 동안 변화된다.
- [0197] 본원에 개시된 뮤테인은 또한 피오켈린의 분리에 사용될 수 있다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인과 피오켈린을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인과 피오켈린 사이에 복합체를 형성시키는 단계, 및 샘플로부터 복합체를 분리시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0198] 피오켈린의 검출뿐만 아니라 피오켈린의 분리를 위한 개시된 뮤테인의 용도에서, 뮤테인 및/또는 피오켈린 또는 이들의 도메인 또는 단편은 적합한 고체상에 고정될 수 있다.
- [0199] 따라서, 예를 들어, 샘플에서의 피오켈린과 같은 분자의 존재 또는 부재뿐만 아니라 이의 농도 또는 수준이 결정될 수 있다.
- [0200] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본 발명의 개시에 따른 피오켈린에 대한 결합-친화성을 갖는 뮤테인을 포함하는 진단 또는 분석 키트를 특징으로 한다.
- [0201] 또 다른 양태에서, 진단에서의 용도에 더하여, 본 개시는 대상체에서 피오켈린의 결합 및/또는 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 본 발명의 개시의 상기 뮤테인 또는 상기 뮤테인을 포함하는 조성물의 용도를 포함한다.
- [0202] 또 다른 양태에서, 본 개시는 유효량의 본 발명의 개시의 피오켈린에 대한 결합-친화성을 갖는 1종 이상의 뮤테인 또는 상기 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서 피

오켈린을 결합시키는 방법을 특징으로 한다.

- [0203] 또 다른 양태에서, 본 개시는 유효량의 본 발명의 개시의 피오켈린에 대한 결합-친화성을 갖는 1종 이상의 뮤테인 또는 상기 뮤테인을 포함하는 하나 이상의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 방법을 포함한다.
- [0204] C. 피오베르딘-결합 뮤테인 및/또는 피오켈린-결합 뮤테인 및 뮤테인의 조합물을 포함하는 조성물
- [0205] P. 에어루지노사는 환경에 널리 분포되어 있으며, 낭성섬유증과 같은 걸리기 쉬운 질환을 갖는 환자에서 매우 심각한 감염을 야기시킬 수 있는 박테리아의 한 종이다. P. 에어루지노사는 철(III)의 필요를 충족하기 위해 2종의 주요 시데로포어인 피오베르딘(Pvd) 및 피오켈린(Pch)을 합성한다. 균막 성장 방식은 지속적인 P. 에어루지노사 감염에 중요한 것으로 생각되며(Costerton et al., 1999; Singh et al., 2000), Pvd 및 Pch 유전자의 이중 발현은 정상적인 균막 발달에 필수적이다(Banin et al., 2005).
- [0206] P. 에어루지노사가 이의 병원성에서 모두 일정한 역할을 하는 인상적인 배열의 독성 인자들을 생성하는 것을 감안할 때, P. 에어루지노사 독성을 효율적으로 억제하기 위한 바람직한 전략은 여러 독성 인자를 표적화하는 것이다.
- [0207] 이를 위해, 본 개시는 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린의 결합을 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 용도를 포함한다. 상기 용도는 유효량의 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시는 또한 대상체에서 피오켈린 및/또는 피오베르딘을 통한 P. 에어루지노사에 의한 철-흡수를 방지하거나 감소시키기 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 용도를 고려한다. 유사하게, 본 개시는 대상체에서 P. 에어루지노사 감염 및/또는 균막 형성의 치료 또는 경감을 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 용도를 개시한다. 일부 추가의 구현예에서, P. 에어루지노사 감염은 급성 또는 만성 감염일 수 있다.
- [0208] 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 뮤테인 또는 이들의 폴리펩티드는 조합하여, 예를 들어, 동시적, 동반적 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 뮤테인 또는 이들의 폴리펩티드는 투여될 수 있는 조성물에 포함될 수 있다. 조성물은 적어도 1종의 약학적으로 허용되는 애주버트, 희석제 또는 담체와 함께 활성 성분으로서 유효량의 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 뮤테인 또는 이들의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 뮤테인 또는 이들의 폴리펩티드는 또한 독립적 시점에서 개별적 간격을 포함하여 서로 독립적으로 투여될 수 있다.
- [0209] 일부 구현예에서, 본 발명의 개시에서 사용되는 바와 같은 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)에 특이적인 뮤테인은 검출 가능한 친화성, 즉, 적어도 200 nM, 예를 들어, 약 100 nM, 약 50 nM, 약 25 nM 또는 약 15 nM의 해리 상수로 피오베르딘(타입 I, II 또는 III 각각)에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시에서 사용되는 바와 같은 피오켈린에 특이적인 뮤테인은 검출 가능한 친화성, 즉, 적어도 200 nM, 예를 들어, 약 100 nM, 약 50 nM, 약 25 nM 또는 약 15 nM의 해리 상수로 피오켈린에 결합할 수 있다. 일부 추가의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 조합물의 뮤테인은 적어도 약 10 nM, 약 1 nM, 약 0.1 nM, 약 10 pM, 또는 심지어 더 낮은 피오베르딘(타입 I, II 또는 III 각각) 또는 피오켈린에 대한 해리 상수로 피오베르딘(타입 I, II 또는 III) 또는 피오켈린에 각각 결합한다. 따라서, 본 개시는 (i) 피오베르딘 타입 I(Pvd I s, sa, aKG +/-Fe)에 대해 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL의 뮤테인, (ii) 피오베르딘 타입 II(Pvd II s, sa, aKG +/-Fe)에 대해 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL의 뮤테인, (iii) 피오베르딘 타입 III(Pvd III s, sa, aKG +/-Fe)에 대해 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL의 뮤테인 및/또는 (iv) 피오켈린(Pch +/- Fe)에 대해 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL의 뮤테인의 조합물을 제공한다.

- [0210] 피오베르딘에 대한 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL 뮤테인에 대한 추가의 세부사항은 본 발명의 개시의 섹션 A에서 발견될 수 있다.
- [0211] 특히 바람직한 구현예에서, 피오베르딘 타입 I에 특이적인 뮤테인은 SEQ ID NO:2 내지 18 중 어느 하나에 제시된다. 특히 바람직한 구현예에서, 피오베르딘 타입 II에 특이적인 뮤테인은 SEQ ID NO:19 내지 37 중 어느 하나에 제시된다. 특히 바람직한 구현예에서, 피오베르딘 타입 III에 특이적인 뮤테인은 SEQ ID NO:38 내지 53 중 어느 하나에 제시된다.
- [0212] 피오켈린에 대한 검출 가능한 친화성을 갖는 hNGAL 뮤테인의 추가의 세부사항은 본 발명의 개시의 섹션 B에 개시되어 있다.
- [0213] 특히 바람직한 구현예에서, 피오켈린에 특이적인 뮤테인은 SEQ ID NO:54 내지 63 중 어느 하나에 제시된다.
- [0214] 본 개시는 또한 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 중 적어도 1종을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린의 결합 방법에서 사용될 수 있다.
- [0215] 본 개시는 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 또는 조성물, 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 또는 조성물, 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 또는 조성물, 및/또는 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 또는 조성물의 조합물에 관한 것이다. 이들 뮤테인 중 하나는 검출 가능한 친화성으로 제공된 비-천연 표적으로서 피오베르딘(타입 I, II 또는 III)에 결합할 수 있다. 이들 뮤테인 중 하나는 검출 가능한 친화성으로 제공된 비-천연 표적으로서 피오켈린에 결합할 수 있다. 따라서, 각각의 뮤테인은 제공된 비-천연 표적으로서 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 각각 결합한다. 용어 "비-천연 표적"은 생리학적 조건하에서 해당 리포칼린(야생형 hNGAL)에 결합하지 않는 화합물을 나타낸다. 예를 들어, 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 또는 조성물은 피오베르딘 중 한 타입(타입 I, II 또는 III) 또는 피오켈린에 결합할 수 있고, 제2, 제3 또는 제4 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이들의 조성물은 피오켈린 또는 피오베르딘의 또 다른 타입에 각각 결합할 수 있거나, 그 반대도 마찬가지이다. 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 뮤테인 또는 이들의 폴리펩티드 또는 조성물의 조합물은 다양한 형태 및 배향으로 제공될 수 있다.
- [0216] 또 다른 양태에서, 본 개시는 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 중 적어도 1종을 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린을 결합시키는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 (i) 내지 (iv) 중 2종 이상, 예를 들어, 3종 또는 심지어 모두를 포함한다.
- [0217] 또 다른 양태에서, 본 개시는 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 중 적어도 1종을 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 (i) 내지 (iv) 중 2종 이상, 예를 들어, 3종 또는 심지어 모두를 포함한다.
- [0218] 본 개시는 또한 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린과의 복합체 형성을 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드, 및/또는 (iv) 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 용도를 포함한다.
- [0219] 따라서, 본 발명의 개시의 또 다른 양태에서, 개시된 뮤테인 또는 폴리펩티드는 피오베르딘 및 피오켈린의 검출에 사용될 수 있다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인 또는 폴리펩티드와 피오베르딘 및/또는 피오켈린을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인 또는 폴리펩티드와 피오베르딘 사이 및/또는 뮤테인과 피오켈린 사이에 각각 복합체를 형성시키는 단계, 및 적합한 신호에 의해 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0220] 검출 가능한 신호는 상기 설명한 바와 같이 표지, 또는 결합, 즉, 복합체 형성 자체로 인한 물리적 특성의 변화

에 의해 야기될 수 있다. 일례는 표면 플라즈몬 공명이며, 이의 값은 금박과 같은 표면에 고정되어 있는 결합 파트너의 결합 동안 변화된다.

[0221] 본원에 개시된 뮤테인 또는 폴리펩티드는 또한 피오베르딘 및/또는 피오켈린의 분리에 사용될 수 있다. 상기 용도는 적합한 조건하에서 1종 이상의 상기 뮤테인과, 피오베르딘 및/또는 피오켈린을 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 접촉시킴으로써 뮤테인과 피오베르딘 사이 및/또는 뮤테인과 피오켈린 사이에 각각 복합체를 형성시키는 단계, 및 샘플로부터 복합체를 분리시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0222] 피오베르딘 및/또는 피오켈린의 검출뿐만 아니라 피오베르딘 및/또는 피오켈린의 분리를 위한 개시된 뮤테인 또는 폴리펩티드의 용도에서, 뮤테인 및/또는 피오베르딘 및 피오켈린 또는 이들의 도메인 또는 단편은 적합한 고체상에 고정될 수 있다.

[0223] 따라서, 예를 들어, 샘플에서 피오베르딘 및/또는 피오켈린의 존재 또는 부재뿐만 아니라 이의 농도 또는 수준이 결정될 수 있다.

[0224] 또 다른 양태에서, 본 발명의 개시는 부품 키트(kit of parts)를 제공한다. 키트는 1개 이상의 용기 내에 피오베르딘 타입 I에 특이적인 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물, 피오베르딘 타입 II에 특이적인 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물, 피오베르딘 타입 III에 특이적인 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물, 및/또는 피오켈린에 특이적인 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물을 별개로 또는 혼합하여 포함한다. 일부 추가의 바람직한 구현예에서, 키트는 피오베르딘 타입 I에 특이적인 제1 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물을 포함하는 제1 용기, 피오베르딘 타입 II에 특이적인 제2 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물을 포함하는 제2 용기, 피오베르딘 타입 III에 특이적인 제3 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물을 포함하는 제3 용기, 및/또는 피오켈린에 특이적인 제4 뮤테인 또는 폴리펩티드 또는 이의 조성물을 포함하는 제4 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 내용물 또는 키트 및 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 용도에 관한 정보를 키트에 일체로 또는 하나 이상의 개별 문서로 추가로 포함한다. 키트는 일부 구현예에서 희석제 중에 재구성하기 위해 계층화된 하나 이상의 조성물을 포함할 수 있다. 상기 희석제, 예를 들어, 멸균 희석제가 또한 키트 내에, 예를 들어, 용기 내에 포함될 수 있다.

[0225] D. 본 발명의 개시의 뮤테인

[0226] 피오베르딘 또는 피오켈린에 결합하는 본 개시의 뮤테인의 상황에서 본원에서 사용되는 경우, 용어 "특이적인"은 뮤테인이 피오베르딘 또는 피오켈린에 대해 각각 특이적이거나, 이들에 결합하거나, 이들과 반응하는 것을 포함한다. 따라서, 특이적이 되거나, 결합하거나, 반응하는 것은 뮤테인이 피오베르딘 또는 피오켈린에 각각 특이적으로 결합하는 것을 포함한다. 이러한 상황에서의 용어 "특이적으로"는 뮤테인이 본원에 기재된 바와 같이 피오베르딘 단백질 또는 피오켈린 단백질과 반응하나, 본질적으로는 또 다른 단백질과는 반응하지 않는 것을 의미한다. 용어 "또 다른 단백질"은 본원에 개시된 뮤테인이 특이적인 피오베르딘 또는 피오켈린과 밀접하게 관련되거나 이들과 상동성인 단백질을 포함하는 임의의 비-피오베르딘 또는 비-피오켈린 단백질을 각각 포함한다. 그러나, "대상체" 정의의 상황에서 기재되는 것과 같은 인간이 아닌 종으로부터의 피오베르딘 또는 피오켈린 단백질, 단편 및/또는 변이체가 용어 "또 다른 단백질"에 의해 배제되지 않는다. 용어 "본질적으로 결합하지 않는"은 본 개시의 뮤테인이 또 다른 단백질에 결합하지 않고, 즉, 30% 미만, 바람직하게는 20% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만, 특히 바람직하게는 9%, 8%, 7%, 6% 또는 5% 미만의 교차반응성을 나타내는 것을 의미한다. 뮤테인이 상기 본원에 정의된 바와 같이 특이적으로 반응하는지의 여부는, 특히, 본 개시의 리포칼린 뮤테인과 피오베르딘 또는 피오켈린의 반응을 상기 뮤테인과 다른 단백질(들)과의 반응과 비교함으로써 용이하게 시험될 수 있다. "특이적 결합"은 또한, 예를 들어, 웨스턴 블롯, ELISA-검정, RIA-검정, ECL-검정, IRMA-검정, FACS, IHC 및 펩티드 스캔에 따라 결정될 수 있다.

[0227] 본 발명의 개시에 따른 뮤테인의 아미노산 서열은 또 다른 리포칼린과의 서열 동일성과 비교하는 경우 인간 리포칼린 2에 대해 높은 서열 동일성을 갖는다(또한 상기 참조). 이러한 일반적인 상황에서, 본 발명의 개시에 따른 조합물의 뮤테인의 아미노산 서열은 해당 리포칼린(야생형 hNGAL)의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 유사하다. 본 발명의 개시에 따른 조합물의 뮤테인의 각각의 서열은 성숙 hNGAL의 서열과 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%의 동일성, 예를 들어, 적어도 95%의 동일성과 같이 성숙 hNGAL의 서열과 실질적으로 유사하다. 이와 관련하여, 본 발명의 개시의 뮤테인은 물론 비교시 본원에 기재된 바와 같은 치환을 함유할 수 있으며, 이는 뮤테인이 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 각각 결합할 수 있도록 한다. 통상적으로, hNGAL의 뮤테인은 hNGAL의 리간드 결합 부위의 개방 말단의 4개의 루프에서 hNGAL의 천연 서열에 비해 아미노산의 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 상기 설명한 바와

같이, 이들 영역은 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 대한 뮤테인의 결합 특이성을 결정하는데 필수적이다. 뮤테인 유래 hNGAL 또는 이의 동족체는 N-말단 영역 및/또는 천연 결합 포켓의 반대쪽에 위치한 β-배럴 구조의 말단에 배열된 3개의 펩티드 루프 BC, DE, 및 FG 내의 임의의 서열 위치에서 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과와 돌연변이된 아미노산 잔기를 가질 수 있다.

[0228] 본 발명의 개시에 따른 뮤테인은 해당 천연 hNGAL a1in과 비교하여 1개 이상, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 심지어 20개의 치환을 포함하나, 단, 상기 뮤테인은 피오베르딘 또는 피오켈린 각각에 결합할 수 있어야 한다. 예를 들어, 뮤테인은 hNGAL의 별개의 위치에 해당하는 위치(즉, 해당 위치)에 치환을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시에 따른 조합물의 뮤테인은 아르기닌 잔기에 의한 천연 아미노산의 적어도 2개의 아미노산 치환, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 심지어 그 초과와 아미노산 치환을 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 단백질 '참조' 스캐폴드의 핵산은 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린 각각에 결합할 수 있는 뮤테인을 생성하기 위한 목적으로 돌연변이유발에 적용된다.

[0229] 또한, 본 개시의 뮤테인은 뮤테인의 생물학적 활성(이의 표적, 예를 들어, 피오베르딘 또는 피오켈린 각각에 대한 결합)에 영향을 미치지 않고 이의 N-말단 또는 C-말단, 바람직하게는 C-말단에 이중성 아미노산 서열, 예를 들어, Strep-태그, 예를 들어, Strep II 태그를 포함할 수 있다.

[0230] 구체적으로, 야생형 hNGAL과 상이한 뮤테인의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 hNGAL의 아미노산 서열 내의 특정 위치에 해당하는지의 여부를 결정하기 위해, 당업자는 당 분야에 널리 공지된 수단 및 방법, 예를 들어, 수작업에 의하거나 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 또는 ClustalW를 의미하는 BLAST2.0과 같은 컴퓨터 프로그램 또는 서열 정렬을 발생시키기에 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램을 이용한 정렬을 이용할 수 있다. 따라서, 야생형 hNGAL은 "대상 서열" 또는 "참조 서열"로 작용할 수 있는 반면, 본원에 기재된 야생형 hNGAL과 상이한 뮤테인의 아미노산 서열은 "질의 서열"로 작용할 수 있다. 용어 "참조 서열" 및 "야생형 서열"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0231] 일부 구현예에서, 치환(또는 대체)는 보존성 치환이다. 그럼에도 불구하고, 뮤테인이 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 각각 결합하는 이의 능력을 보유하고/하거나 "본래의" 서열과 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 또는 이보다 높은 동일성의 치환된 서열에 대한 동일성을 갖는 한 비보존성 치환 또는 하기에 나열된 예시적인 치환 중 하나 이상을 포함하는 임의의 치환이 예견된다.

[0232] 보존성 치환은 일반적으로 돌연변이되는 아미노산에 따라 열거된 하기의 치환이며, 하기 치환 각각은 보존적인 것으로 간주될 수 있는 하나 이상의 대체(들)이 뒤따른다: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. 다른 치환이 또한 허용 가능하며, 이는 경험적으로 또는 다른 공지된 보존성 또는 비-보존성 치환에 따라 결정될 수 있다. 추가 배향으로서, 하기 8개의 그룹 각각은 서로에 대해 보존성 치환을 규정하는 것으로 통상적으로 간주될 수 있는 아미노산을 함유한다:

[0233] 알라닌(Ala), 글리신(Gly);

[0234] 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu);

[0235] 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln);

[0236] 아르기닌(Arg), 리신(Lys);

[0237] 이소류신(Ile), 류신(Leu), 메티오닌(Met), 발린(Val);

[0238] 페닐알라닌(Phe), 티로신(Tyr), 트립토판(Trp);

[0239] 세린(Ser), 트레오닌(Thr); 및

[0240] 시스테인(Cys), 메티오닌(Met)

[0241] 상기 치환이 생물학적 활성에서 변화를 발생시키는 경우, 하기 또는 아미노산 부류와 관련하여 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물은 원하는 특성에 대해 스크리닝될 수 있다. 상기 더욱 실질적인 변화의 예는 Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys

→ Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, 노르류신; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala이다.

- [0242] hNGAL의 생물학적 특성에서의 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서의 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어, 시트 또는 나선형 입체형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대한 치환의 효과에서 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 (1) 소수성: 노르류신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신; (2) 중성 친수성: 시스테인, 세린, 트레오닌; (3) 산성: 아스파르트산, 글루탐산; (4) 염기성: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: 글리신, 프롤린; 및 (6) 방향족: 트립토판, 티로신, 페닐알라닌의 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 그룹으로 나누어진다.
- [0243] 비-보존성 치환은 이들 부류 중 하나의 일원의 또 다른 부류로의 교환을 수반할 것이다. hNGAL의 적절한 입체형태를 유지시키는 것과 관련되지 않은 임의의 시스테인 잔기는 또한 분자의 산화 안정성을 개선시키고, 이상 교를 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은 이의 안정성을 개선시키기 위해 첨가될 수 있다.
- [0244] 상기 논의된 바와 같은 삽입을 포함하는 임의의 돌연변이는, 예를 들어, 확립된 표준 방법을 이용하여 DNA 수준에서 핵산에 대해 매우 용이하게 달성될 수 있다. 아미노산 서열의 변경의 예시적 예는 삽입 또는 결실뿐만 아니라 아미노산 치환이다. 상기 치환은 보존성일 수 있고, 즉, 아미노산 잔기는 특히 극성뿐만 아니라 크기와 관련하여 화학적으로 유사한 특성의 아미노산 잔기로 대체된다. 보존성 치환의 예는 1) 알라닌, 세린, 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 리신; 5) 이소류신, 류신, 메티오닌, 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판의 그룹의 일원 사이에서의 대체이다. 다른 한편으로, 아미노산 서열에 비-보존성 변경을 도입시키는 것이 또한 가능하다. 또한, 단일 아미노산 잔기를 대체하는 것 대신에, 결실 또는 삽입이 안정적인 폴딩된/기능성 뮤테인을 발생시키는 한 hNGAL의 일차 구조의 하나 이상의 연속적 아미노산을 삽입하거나 결실시키는 것이 또한 가능하다.
- [0245] 아미노산 서열의 변형은 특정 제한 효소에 대한 절단 부위를 통합시킴으로써 돌연변이된 hNGAL 유전자 또는 이의 일부의 서브클로닝을 용이하게 만들기 위해 단일 아미노산 위치의 직접적인 돌연변이유발을 포함한다. 또한, 이들 돌연변이는 또한 제공된 표적, 예를 들어, 피오베르딘 또는 피오켈린에 대한 뮤테인의 친화성을 추가로 개선시키기 위해 통합될 수 있다. 또한, 폴딩 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 수용성을 개선시키는 것과 같이 뮤테인의 특정한 특징을 조절하거나, 필요한 경우 응집 경향을 감소시키기 위해 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 천연 발생 시스테인 잔기는 디설파이드 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 다른 화합물, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 스타치(HES), 비오틴, 펩티드 또는 단백질에 대한 컨주게이션, 또는 비-천연 발생 디설파이드 결합의 형성을 위해 새로운 반응기를 도입시키기 위해 다른 아미노산 서열 위치를 시스테인으로 의도적으로 돌연변이시키는 것이 또한 가능하다. 생성된 티올 모이어티는, 예를 들어, 각각의 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 뮤테인을 PEG 화시키거나 HES화시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0246] 예를 들어, 다른 화합물, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 하이드록시에틸 스타치(HES), 비오틴, 펩티드 또는 단백질에 대한 컨주게이션, 또는 비-천연 발생 디설파이드 결합의 형성을 위해 새로운 반응기를 도입시키기 위해 다른 아미노산 서열 위치를 시스테인으로 돌연변이시키는 것이 또한 가능하다.
- [0247] 일부 구현예에서, 상기 모이어티 중 하나가 본 발명의 개시의 뮤테인에 컨주게이션되는 경우, 아미노산 측쇄에 대한 컨주게이션이 유리할 수 있다. 적합한 아미노산 측쇄는 hNGAL의 아미노산 서열에서 천연 발생할 수 있거나, 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 적합한 결합 부위가 돌연변이유발을 통해 도입되는 경우에서, 하나의 가능성은 적절한 위치의 아미노산의 시스테인 잔기에 의한 대체이다.
- [0248] 인간 리포칼린 2의 뮤테인과 관련하여, 인간 리포칼린 2를 포함하는 리포칼린의 아미노산 서열로 시스테인 잔기를 도입시키기 위한 상기 돌연변이의 예시적 가능성은 인간 NGAL의 야생형 서열의 서열 위치 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 또는 158에 해당하는 서열 위치 중 적어도 하나에서 시스테인(Cys) 잔기의 도입을 포함하도록 돌연변이시키는 것이다. 본 발명의 개시의 인간 리포칼린 2 뮤테인이 SWISS-PROT/UniProt 데이터뱅크 접근 번호(Data Bank Accession Number) P80188의 서열과 비교하여 시스테인이 또 다른 아미노산 잔기로 대체된 서열을 갖는 일부 구현예에서, 해당 시스테인은 서열로 재도입될 수 있다. 예시적 예로서, 아미노산 위치 87의 시스테인 잔기는 그러한 경우에 SWISS-PROT 접근 번호(Accession No) P80188의 서열에 본래 존재하는 바와 같은 시스테인으로 복귀시킴으로써 도입될 수 있다. 아미노산 위치 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145,

143, 146 및/또는 158 중 임의의 위치의 측면에서 생성된 티올 모이어티는, 예를 들어, 각각의 인간 리포칼린 2 뮤테인의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 뮤테인을 PEG화시키거나 HES화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0249] 또 다른 구현예에서, 본 개시에 따른 뮤테인에 상기 화합물 중 하나를 컨쥬게이션시키기에 적합한 아미노산 측쇄를 제공하기 위해, 인공 아미노산이 돌연변이유발에 의해 도입될 수 있다. 일반적으로, 상기 인공 아미노산은 더욱 반응성이 되고, 이에 따라 원하는 화합물에 대한 컨쥬게이션을 촉진하도록 설계된다. 인공 tRNA를 통해 도입될 수 있는 상기 인공 아미노산의 일례는 파라-아세틸-페닐알라닌이다.

[0250] 본원에 개시된 뮤테인의 여러 적용을 위해, 융합 단백질의 형태로 이들을 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 뮤테인은 이의 N-말단 또는 이의 C-말단에서 단백질, 단백질 도메인 또는 펩티드, 예를 들어, 신호 서열 및/또는 친화성 태그에 융합된다.

[0251] 친화성 태그, 예를 들어, Strep-tag<sup>®</sup> 또는 Strep-tag<sup>®</sup> II(Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), myc-태그, FLAG-태그, His<sub>6</sub>-태그 또는 HA-태그 또는 재조합 단백질의 용이한 검출 및/또는 정제를 또한 가능하도록 하는 글루타티온-S-트랜스퍼라제와 같은 단백질이 적합한 융합 파트너의 추가 예이다. 최종적으로, 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 황색 형광 단백질(YFP)과 같은 발색 또는 형광 특성을 갖는 단백질이 또한 본 발명의 개시의 뮤테인에 대한 적합한 융합 파트너이다.

[0252] 일반적으로, 화학적, 물리적, 광학적, 또는 효소적 반응에서 검출 가능한 화합물 또는 신호를 직접적 또는 간접적으로 발생시키는 임의의 적절한 화학 물질 또는 효소로 본 발명의 개시의 뮤테인을 표시시키는 것이 가능하다. 물리적 반응 및 동시에 광학적 반응/마커에 대한 예는 방사선 조사시 형광의 방출 또는 방사성 표지를 사용하는 경우 X-선의 방출이다. 알칼리성 포스파타제, 호스라디쉬 과옥시다제(horseradish peroxidase) 및 β-갈락토시다제가 발색 반응 생성물의 형성을 촉매작용하는 효소 표지(및 동시에 광학 표지)의 예이다. 일반적으로, 항체에 일반적으로 사용되는 모든 표지(면역글로불린의 Fc 부분 내의 당 모이어티에만 사용되는 것 제외)가 또한 본 발명의 개시의 뮤테인에 대한 컨쥬게이션에 사용될 수 있다. 본 발명의 개시의 뮤테인은 또한, 예를 들어, 제공된 세포, 조직 또는 기관으로의 임의의 적합한 치료적 활성 제제의 표적화된 전달을 위해 또는 주위 정상 세포에 영향을 미치지 않고 세포, 예를 들어, 종양 세포의 선택적 표적화를 위해 상기 제제와 컨쥬게이션될 수 있다. 상기 치료적 활성 제제의 예는 방사성핵종, 독소, 작은 유기 분자, 및 치료 펩티드(예를 들어, 세포 표면 수용체의 효능제/길항제로 작용하는 펩티드 또는 제공된 세포 표적 상의 단백질 결합 부위와 경쟁하는 펩티드)를 포함한다. 그러나, 본 발명의 개시의 뮤테인은 또한 치료적 활성 핵산, 예를 들어, 안티센스 핵산 분자, 작은 간접 RNA, 마이크로 RNA 또는 리보자임과 컨쥬게이션될 수 있다. 상기 컨쥬게이트는 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0253] 상기 기재한 바와 같이, 본 발명의 개시의 뮤테인은 일부 구현예에서 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티에 컨쥬게이션될 수 있다(이와 관련하여, 상기 컨쥬게이션 전략이 CTLA-4에 대한 결합 친화성을 갖는 인간 호중구 젤라틴분해효소-관련 리포칼린의 뮤테인을 참조로 하여 기재되는 PCT 공보 WO 2006/56464호를 또한 참조). 혈청 반감기를 연장시키는 모이어티는 몇 가지 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드록시에틸 스타치, 지방산 분자, 예를 들어, 팔미트산(Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, , 알부민 결합 펩티드, 또는 알부민 결합 단백질, 트랜스페린일 수 있다. 알부민 결합 단백질은 박테리아 알부민 결합 단백질, 항체, 항체 단편, 예를 들어, 도메인 항체(예를 들어, 미국 특허 6,696,245호 참조), 또는 알부민에 대한 결합 활성을 갖는 뮤테인일 수 있다. 따라서, 본 발명의 개시의 뮤테인의 반감기를 연장시키기 위한 적합한 컨쥬게이션 파트너는 알부민 결합 단백질, 예를 들어, 박테리아 알부민 결합 도메인, 예를 들어, 스트렙토코커스 단백질 G 중 하나를 포함한다 (König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). 컨쥬게이션 파트너로 사용될 수 있는 알부민 결합 펩티드의 다른 예는, 예를 들어, 미국 특허 출원 2003/0069395호 또는 데니스 등(Dennis et al.)의 문헌(SEQ ID NO: 131; Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043)에 기재된 바와 같은 Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys 컨센서스 서열을 갖는 것이며, 여기서 Xaa<sub>1</sub>은 Asp, Asn, Ser, Thr, 또는 Trp이고; Xaa<sub>2</sub>는 Asn, Gln, His, Ile, Leu, 또는 Lys이고; Xaa<sub>3</sub>는 Ala, Asp, Phe, Trp, 또는 Tyr이고; Xaa<sub>4</sub>는 Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, 또는 Thr이다.

[0254] 다른 구현예에서, 알부민 자체(Osborn, B.L. et al., 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), 또는 알부민의 생물학적 활성 단편이 본 발명의 개시의 뮤테인의 컨쥬게이션 파트너로 사용될 수 있다. 용어 "알부민"은 모든 포유동물 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민 또는 소 혈청 알부민 또는 래트 알부민을 포함한다. 알

부민 또는 이의 단편은 미국 특허 5,728,553호 또는 유럽 특허 출원 EP 0 330 451호 및 EP 0 361 991호에 기재된 바와 같이 재조합적으로 생성될 수 있다. 재조합 인간 알부민(Recombunin®) Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)가 뮤테인의 반감기를 연장시키기 위해 본 발명의 개시의 뮤테인에 컨주게이션되거나 융합될 수 있다.

- [0255] 알부민-결합 단백질이 항체 단편인 경우, 이는 도메인 항체일 수 있다. 도메인 항체(dAbs)는 생물리학적 특성 및 생체내 반감기를 정밀하게 제어하여 최적의 안전성 및 효능 제품 프로파일을 발생시키도록 공학처리된다. 도메인 항체는, 예를 들어, Domantis Ltd.(Cambridge, UK and MA, USA)로부터 상업적으로 이용 가능하다.
- [0256] 본 발명의 개시의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키기 위한 모이어티로서 트랜스페린을 이용하여, 뮤테인은 당화되지 않은 트랜스페린의 N 또는 C 말단, 또는 둘 모두의 말단에 유전학적으로 융합될 수 있다. 당화되지 않은 트랜스페린은 14 내지 17일의 반감기를 가지며, 트랜스페린 융합 단백질은 유사하게 연장된 반감기를 가질 것이다. 트랜스페린 단백질은 또한 높은 생체이용률, 생체분포 및 순환 안정성을 제공한다. 이러한 기술은 BioRexis(BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA)로부터 상업적으로 이용 가능하다. 단백질 안정화제/반감기 연장 파트너로 사용하기 위한 재조합 인간 트랜스페린(DeltaFerrin™)은 또한 Novozymes Delta Ltd.(Nottingham, UK)로부터 상업적으로 이용 가능하다.
- [0257] 면역글로불린의 Fc 부분이 본 발명의 개시의 뮤테인의 혈청 반감기를 연장시키는 목적으로 사용되는 경우, Syntonix Pharmaceuticals, Inc(MA, USA)로부터 상업적으로 이용 가능한 SynFusion™ 기술이 사용될 수 있다. 이러한 Fc-융합 기술의 사용은 더 오래 지속되는 생물의약품의 생성을 가능하도록 하며, 이는, 예를 들어, 약동학, 용해도 및 생산 효율을 개선시키기 위해 항체의 Fc 영역에 연결된 2개 카피의 뮤테인으로 구성될 수 있다.
- [0258] 본 발명의 개시의 뮤테인의 반감기를 연장시키는 또 다른 대안은 뮤테인의 N-말단 또는 C-말단에 긴 구조화되지 않은 가요성의 글리신-풍부 서열(예를 들어, 약 20 내지 80개의 연속 글리신 잔기를 갖는 폴리-글리신)을 융합시키는 것이다. WO2007/038619호에 개시된 이러한 접근법은, 예를 들어, "rPEG"(재조합 PEG)로도 언급되었다.
- [0259] 폴리알킬렌 글리콜이 컨주게이션 파트너로 사용되는 경우, 폴리알킬렌 글리콜은 치환되거나, 비치환되거나, 선형이거나, 분지형일 수 있다. 이는 또한 활성화된 폴리알킬렌 유도체일 수 있다. 적합한 화합물의 예는 인터페론과 관련하여 WO 99/64016호, 미국 특허 6,177,074호 또는 미국 특허 6,403,564호에 기재되었거나, 다른 단백질, 예를 들어, PEG-변형된 아스파라기나제, PEG-아데노신 데아미나제(PEG-ADA) 또는 PEG-초과산화물 디스무타제에 대해 기재된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자이다(예를 들어, 문헌[Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148] 참조). 상기 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은, 예를 들어, 약 10,000, 약 20,000, 약 30,000 또는 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 포함하여 약 300 내지 약 70,000 달톤의 범위일 수 있다. 또한, 예를 들어, 미국 특허 6,500,930호 또는 6,620,413호에 기재된 바와 같이, 탄수화물 올리고- 및 중합체, 예를 들어, 스타치 또는 하이드록시에틸 스타치(HES)가 혈청 반감기 연장의 목적을 위해 본 발명의 개시의 뮤테인에 컨주게이션될 수 있다.
- [0260] 또한, 본원에 개시된 뮤테인은 모이어티에 융합되어 본 발명의 개시의 뮤테인에 효소 활성 또는 다른 분자에 대한 결합 친화성과 같은 새로운 특징을 제공할 수 있다. 적합한 융합 파트너의 예는 알칼리성 포스파타제, 호스라디쉬 퍼옥시다제, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 단백질 G의 알부민-결합 도메인, 단백질 A, 항체 단편, 올리고머화 도메인 또는 독소이다.
- [0261] 특허, 본원에 개시된 뮤테인과 별개의 효소 활성 부위를 생성된 융합 단백질의 둘 모두의 "성분"이 제공된 치료 표적에 대해 함께 작용하도록 융합시키는 것이 가능할 수 있다. 뮤테인의 결합 도메인은 질병을 발생시키는 표적에 부착되어, 효소 도메인이 표적의 생물학적 기능을 폐기하도록 할 수 있다.
- [0262] 본 개시는 또한 본 발명의 개시의 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자(DNA 및 RNA)에 관한 것이다. 유전 부호의 축퇴성은 특정 코돈의 동일한 아미노산을 지정하는 다른 코돈에 의한 치환을 허용하므로, 본 발명의 개시는 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인을 인코딩하는 특정 핵산 분자에 제한되지 않고, 기능적 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 모든 핵산 분자를 포함한다. 이와 관련하여, 본 개시는 SEQ ID NO:65 내지 126에 제시된 바와 같은 본 발명의 개시의 일부 뮤테인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0263] 본 발명의 개시의 일 구현예에서, 상기 방법은 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:2)의 서열 위치 28, 34, 36, 39 내지 42, 44 내지 47, 49, 52, 54 내지 55, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87,

96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 및 145에 해당하는 서열 위치 중 적어도 하나 또는 심지어 그 초과를 코딩하는 뉴클레오티드 트리플렛에서 핵산 분자를 돌연변이유발에 적용시키는 단계를 포함한다.

- [0264] 본 발명의 개시는 또한 실험 돌연변이유발의 지시된 서열 위치 외부에 추가 돌연변이를 포함하는 본 발명의 개시의 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 상기 돌연변이는 종종 용인되거나, 심지어, 예를 들어, 이들이 뮤테인의 개선된 폴딩 효율, 혈청 안정성, 열 안정성 또는 리간드 결합 친화성에 기여하는 경우 유리한 것으로 증명될 수 있다.
- [0265] 본 출원에 개시된 핵산 분자는 조절 서열(또는 조절 서열들)에 "작동 가능하게 연결"되어 상기 핵산 분자를 발현시킬 수 있다.
- [0266] 핵산 분자, 예를 들어, DNA는 전사 및/또는 번역 조절에 관한 정보를 함유하는 서열 요소를 포함하는 경우 "핵산 분자를 발현시킬 수 있는" 또는 "뉴클레오티드 서열의 발현을 가능하도록 할 수 있는"으로 언급되며, 상기 서열은 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 "작동 가능하게 연결"된다. 작동 가능한 연결은 조절 서열 요소 및 발현되는 서열이 유전자 발현을 가능하도록 하는 방식으로 연결되는 연결이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 종에 따라 가변적일 수 있으나, 일반적으로 이들 영역은 원핵생물에서 프로모터 자체, 즉, 전사의 개시를 유도하는 DNA 요소 및 RNA로 전사되는 경우 번역의 개시를 신호하게 될 DNA 요소 둘 모두를 함유하는 프로모터를 포함한다. 상기 프로모터 영역은 일반적으로 전사 및 번역의 개시와 관련된 5' 비-코딩 서열, 예를 들어, 원핵생물에서 -35/-10 박스 및 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 요소 또는 진핵생물에서 TATA 박스, CAAT 서열 및 5'-캡핑 요소를 포함한다. 이들 영역은 또한 인핸서 또는 억제인자 요소뿐만 아니라 번역 신호 및 천연 폴리펩티드를 숙주 세포의 특정 구획에 표적화시키기 위한 선도 서열을 포함할 수 있다.
- [0267] 또한, 3' 비-코딩 서열은 전사 종료, 아데닐중합체형성 등과 관련된 조절 요소를 함유할 수 있다. 그러나, 이들 종료 서열이 특정 숙주 세포에서 만족스럽게 기능하지 않는 경우, 이들은 상기 세포에서 기능적인 신호로 치환될 수 있다.
- [0268] 따라서, 본 발명의 개시의 핵산 분자는 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 개시의 핵산 분자는 프로모터 서열 및 전사 종료 서열을 포함한다. 적합한 원핵생물 프로모터는, 예를 들어, tet 프로모터, lacUV5 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 진핵생물 세포에서의 발현에 유용한 프로모터의 예는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.
- [0269] 본 발명의 개시의 핵산 분자는 또한 벡터 또는 임의의 다른 종류의 클로닝 비히클, 예를 들어, 플라스미드, 파지미드, 파지, 배칼로바이러스, 코스미드 또는 인공 염색체의 일부일 수 있다.
- [0270] 일 구현예에서, 핵산 분자는 파스미드(phasmid)에 포함된다. 파스미드 벡터는 관심 cDNA에 융합된 M13 또는 f1 과 같은 온순 파지의 유전자 간 영역 또는 이의 기능성 부분을 인코딩하는 벡터를 나타낸다. 상기 파지미드 벡터 및 적절한 헬퍼 파지(예를 들어, M13K07, VCS-M13 또는 R408)로 박테리아 숙주 세포를 중복감염시킨 후, 온전한 파지 입자가 생성됨으로써 인코딩된 이중성 cDNA의 파지 표면 상에 제시된 이의 해당 폴리펩티드로의 물리적 커플링을 가능하도록 한다(예를 들어, 문헌[Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424], 또는 문헌[Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93] 참조).
- [0271] 이러한 클로닝 비히클은 상기 기재된 조절 서열 및 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인을 인코딩하는 핵산 서열을 제외하고 발현에 사용되는 숙주 세포와 양립되는 종으로부터 유래된 복제 및 조절 서열뿐만 아니라 형질전환되거나 형질감염된 세포에 선택 가능한 표현형을 제공하는 선택 마커를 포함할 수 있다. 많은 수의 적합한 클로닝 벡터가 당 분야에 공지되어 있으며, 상업적으로 이용 가능하다.
- [0272] 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인을 인코딩하는 DNA 분자, 특히 상기 뮤테인의 코딩 서열을 함유하는 클로닝 벡터는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포로 형질전환될 수 있다. 형질전환은 표준 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 본 발명의 개시는 또한 본원에 개시된 바와 같은 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0273] 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 개시의 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현에 적합한 조건 하에서 배양된다. 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 예를 들어, 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)(E. 콜리) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 또는 진핵생물, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), SF9 또는 High5 곤충 세포, 무한증식 포유동물 세포주(예를 들어, HeLa 세포 또는 CHO 세포) 또는 일차 포유동물 세포일 수 있다.

- [0274] 본 발명의 개시는 또한 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드의 생성을 위한 방법에 관한 것으로, 뮤테인 또는 폴리펩티드, 뮤테인 또는 폴리펩티드의 단편 또는 뮤테인 또는 폴리펩티드 및 또 다른 폴리펩티드의 융합 단백질은 유전 공학 방법에 의해 뮤테인 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로부터 시작하여 생성된다. 상기 방법은 생체내에서 수행될 수 있고, 뮤테인 또는 폴리펩티드는, 예를 들어, 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체에서 생성된 후, 이러한 숙주 유기체 또는 이의 배양물로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 번역 시스템의 사용에 의해 시험관 내에서 단백질을 생성시키는 것이 또한 가능하다.
- [0275] 생체 내에서 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드를 생성시키는 경우, 상기 뮤테인 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산은 재조합 DNA 기술(상기 이미 설명한 바와 같음)에 의해 적합한 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체로 도입된다. 이러한 목적을 위해, 숙주 세포는 먼저 확립된 표준 방법을 이용하여 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 벡터로 형질전환된다. 이후, 숙주 세포는 이종성 DNA의 발현 및 이에 따른 해당 폴리펩티드의 합성을 가능하도록 하는 조건하에서 배양된다. 이후, 폴리펩티드는 세포 또는 배양 배지로부터 회수된다.
- [0276] 일부 구현예에서, 본 출원에 개시된 핵산 분자, 예를 들어, DNA는 본 발명의 개시의 융합 단백질의 발현을 가능하도록 하기 위해 본 발명의 개시의 또 다른 핵산 분자에 "작동 가능하게 연결"될 수 있다. 이와 관련하여, 작동 가능한 연결은 제1 핵산 분자의 서열 요소 및 제2 핵산 분자의 서열 요소가 단일 폴리펩티드로서 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 연결이다.
- [0277] 또한, 일부 구현예에서, Cys 76과 Cys 175 사이의 천연 발생 디설파이드 결합은 본 발명의 개시의 hNGAL 뮤테인에서 제거될 수 있다. 따라서, 상기 뮤테인은 환원적 산화환원 환경을 갖는 세포 구획, 예를 들어, 그람-음성 박테리아의 세포질에서 생성될 수 있다.
- [0278] 본 발명의 개시의 뮤테인이 분자내 디설파이드 결합을 포함하는 경우, 적절한 신호 서열을 이용하여 산화적 산화환원 환경을 갖는 세포 구획으로 초기 폴리펩티드를 유도하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 산화 환경은 E. 콜리와 같은 그람-음성 박테리아의 원형질막 주위공간에 의해, 그람-양성 박테리아의 세포외 환경 내에서 또는 진핵생물 세포의 소포체의 내강 내에서 제공될 수 있으며, 일반적으로 구조적 디설파이드 결합의 형성을 촉진한다.
- [0279] 그러나, 숙주 세포, 바람직하게는 E. 콜리의 세포질에서 본 발명의 개시의 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드를 생성시키는 것이 또한 가능하다. 이러한 경우, 뮤테인 또는 폴리펩티드는 가용성 또는 폴딩된 상태로 직접 획득될 수 있거나, 봉입체 형태로 회수된 후, 시험관 내에서 원형회복될 수 있다. 추가 옵션은 산화적 세포내 환경을 갖는 특정 숙주 균주의 사용으로, 이는 세포질 내에서 디설파이드 결합의 형성을 가능하도록 할 수 있다 (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.).
- [0280] 그러나, 본원에 기재된 바와 같은 뮤테인 또는 폴리펩티드는 반드시 유전 공학의 이용에 의해서만 발생되거나 생성될 필요는 없다. 오히려, 상기 뮤테인 또는 폴리펩티드는 또한 화학적 합성, 예를 들어, 메리필드 (Merrifield) 고체상 폴리펩티드 합성 또는 시험관내 전사 및 번역에 의해 획득될 수 있다. 예를 들어, 유망한 돌연변이가 분자 모델링을 이용하여 확인된 후, 시험관 내에서 원하는(설계된) 폴리펩티드를 합성하고, 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 대한 결합 활성을 연구하는 것이 가능하다. 단백질의 고체상 및/또는 용액상 합성을 위한 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43] 참조).
- [0281] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시의 뮤테인 또는 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 잘 확립된 방법을 이용하는 시험관내 전사/번역에 의해 생성될 수 있다.
- [0282] 당업자는 본 개시에 의해 고려되는 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드를 제조하는데 유용한 방법을 인지할 것이나, 이의 단백질 또는 핵산 서열은 본원에 명백히 개시되어 있지는 않다. 개요로서, 아미노산 서열의 상기 변형은, 예를 들어, 특정 제한 효소에 대한 절단 부위를 통합시킴으로써 돌연변이된 hNGAL 유전자 또는 이의 일부의 서브클로닝을 용이하게 만들기 위해 단일 아미노산 위치의 유도된 돌연변이유발을 포함한다. 또한, 이들 돌연변이는 뮤테인의 이의 표적(예를 들어, 피오베르딘 또는 피오켈린 각각)에 대한 친화성을 추가로 개선시키기 위해 통합될 수 있다. 또한, 돌연변이는 폴딩 안정성, 열정 안정성, 단백질 내성 또는 수용성을 개선시키거나, 필요한 경우 응집 경향을 감소시키는 것과 같은 뮤테인의 특정 특징을 조절하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, 천연 발생 시스테인 잔기는 디설파이드 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다.
- [0283] 본원에 개시된 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드 및 이들의 유도체는 항체 또는 이의 단편과 유사한 많은 분야에서

사용될 수 있다. 예를 들어, 뮤테인은 효소, 항체, 방사성 물질 또는 생화학 활성 또는 규정된 결합 특징을 갖는 임의의 다른 기로 표지하기 위해 사용될 수 있다. 이렇게 함으로써, 이들 각각의 표적 또는 이들의 컨쥬게이트 또는 융합 단백질은 검출될 수 있거나, 이들과 접촉될 수 있다. 또한, 본 발명의 개시의 뮤테인 또는 이의 폴리펩티드는 확립된 분석 방법(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯) 또는 현미경검사 또는 이뮤노센서릭(immunosensoric)에 의해 화학 구조를 검출하는 역할을 할 수 있다. 이와 관련하여, 검출 신호는 적합한 뮤테인 컨쥬게이트 또는 융합 단백질의 사용에 의해 직접 생성될 수 있거나, 항체를 통한 결합된 뮤테인의 면역화학 검출에 의해 간접적으로 생성될 수 있다.

[0284] 본 발명의 개시의 추가 목적, 장점, 및 특징은 제한하고자 하는 것이 아닌 하기 실시예 및 이의 첨부된 도면의 검토시 당업자에게 명백해질 것이다. 따라서, 본 개시가 예시적 구현에 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되었으나, 본원에 개시된 본원에서 구체화된 개시의 변형 및 변화가 당업자에 의해 이용될 수 있고, 이러한 변형 및 변화가 본 발명의 개시의 범위 내에 속하는 것으로 간주되는 것이 이해되어야 한다.

[0285] V. 실시예

[0286] 실시예 1: 슈도모나스 에어루지노사 시테로포어의 정제 및 비오틴화

[0287] P. 에어루지노사는 3개 그룹의 피오베르딘, 즉, 피오베르딘 타입 I, 피오베르딘 타입 II 및 피오베르딘 타입 III를 생성한다. 각각의 그룹은 측쇄에서 상이한 3개 형태를 가지며, 이는 숙시닐, 숙신아미드 또는 α-케토글루타릴이다. 또한, P. 에어루지노사는 피오켈린을 생성한다. 10개 모두의 시테로포어는 철을 Fe<sup>3+</sup>로 복합체화시킬 수 있다.

[0288] 관심 뮤테인의 선택 및 스크리닝을 위해, 시테로포어는 비오틴화될 수 있다. 비오틴화를 피오베르딘 I 숙시닐 변이체에 대해 숙시닐 측쇄에서, 피오베르딘 II 숙시닐 변이체에 대해 L-오르니틴 측쇄에서 및 피오베르딘 III 숙시닐 변이체에 대해 주로 글리신 측쇄에서 수행하였다. 피오켈린을 페놀 고리에서 비오틴화시켰다.

[0289] 실시예 2: P. 에어루지노사 시테로포어에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선택

[0290] 성숙 hNGAL의 무작위 돌연변이유발에 의해 생성된 hNGAL-기반 라이브러리를 P. 에어루지노사의 상이한 시테로포어에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 선택에 사용하였다. 비오틴화되고, 철 로딩된 Pvd I 숙시닐, Pvd II 숙시닐, 및 Pvd III 숙시닐뿐만 아니라 비오틴화된 철 로딩되지 않은 피오켈린을 독립적인 파지 디스플레이 및 선택 과정에 사용하였다.

[0291] 이들 라이브러리부터의 2x10<sup>12</sup> 개의 파지미드를 200 nM 또는 500 nM 또는 1 μM의 비오틴화된 표적과 인큐베이션하였다. 뉴트라비딘(neutravidin) 또는 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅된 상자성 비드를 사용하여 표적/파지미드 복합체를 포획하였고, 이를 이후 자석을 이용하여 분리시켰다. 비드를 PBST 또는 PBS로 세척하여 결합되지 않은 파지미드를 제거하였다. 결합된 파지미드를 먼저 10분 동안 300 μl의 70 mM 트리에틸아민으로 용리시킨 후, 100 μl의 1 M 트리스-Cl(pH 6.0)로 상층액을 즉시 중화시켰다. 1회의 중간 세척 주기 후, 잔여 파지미드를 10분 동안 100 mM 글리신(pH 2.2)으로 용리시킨 후, 50 μl의 0.5 M 트리스-염기로 즉시 중화시켰다. 둘 모두의 용리 분획을 모으고, 재증폭을 위해 4 ml의 E. 콜리 XL1-blue 배양물(OD<sub>550</sub> 0.45 내지 0.6)을 감염시키는데 사용하였다. 교반 하에 30분 동안 인큐베이션 후, 박테리아를 2분 동안 5000xg에서의 원심분리에 의해 수거하고, 1 ml의 2xYT 배지에 재현탁시키고, 3개의 큰 LB/Amp 아가 플레이트(10 g/l 박토 트립톤, 5 g/l 효모 추출물, 5 g/l NaCl(pH 7.5), 15 g/l 아가, 100 μg/ml 앰피실린)에 플레이팅하였다. 플레이트를 32°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 감염된 세포를 100 μg/ml 앰피실린이 보충된 50 ml 2xYT(2xYT/Amp)를 이용하여 아가 플레이트로부터 긁어 내었다. 50 ml 2xYT/Amp 배지를 적절한 부피의 박테리아 현탁액으로 접종시켜 0.08의 OD<sub>550</sub>에 도달시켰다. 배양물을 0.5의 OD<sub>550</sub>에 도달할 때까지 진탕기(160 rpm)에서 37°C에서 인큐베이션시킨 후, 가벼운 교반과 함께 15분 동안 및 37°C에서 진탕기에서 45분 동안 인큐베이션하여 헬퍼 파지(1.5x10<sup>11</sup> pfu)로 감염시켰다. 이후, 카나마이신을 70 μg/ml의 최종 농도로 첨가하여 헬퍼 파지에 의해 감염된 박테리아를 선택하였다. 최종적으로, 25 ng/ml의 언하이드로테트라사이클린의 첨가에 의해 pIII-hNGAL 뮤테인의 발현을 유도하였다.

[0292] 24°C에서 15시간 인큐베이션 후, 배양 상층액을 원심분리(20분 동안 5000xg)에 의해 투명화시켰다. 이후, 20 ml의 상층액을 0.22 μm의 포어 크기를 갖는 폴리에테르설폰 막을 통과시켰다. 여과액에 물 중 20%(w/v) PEG-8000 및 15%(w/v) NaCl을 함유하는 5 ml의 용액을 첨가하고, 가볍게 혼합하였다. 용액을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 4°C 및 5000xg에서 20분 동안 원심분리시켰다. 파지미드를 함유하는 펠렛을 200 mM 붕산, 160

mM NaCl 및 1 mM EDTA를 함유하는 1 ml 완충액에 용해시켰다. 불용성 입자를 원심분리(5분 동안 5000xg)에 의해 제거하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 물 중 20%(w/v) PEG-8000 및 15%(w/v) NaCl을 함유하는 200 μl의 용액과 혼합하였다. 용액을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 침전된 파지미드를 이후 원심분리(5분 동안 5000xg)에 의해 수거하였다. 파지미드를 50 mM 벤즈아미딘이 보충된 PBS에 재현탁시키고, 다음 라운드의 파지미드 선택에 사용하였다.

[0293] 4회의 연속적 라운드의 선택을 수행하였다. i) 4회 모두의 선택 라운드에서 각각의 세척 단계에 대해 1 ml PBS/T 5분 인큐베이션으로 8회, ii) 라운드 1로부터 라운드 4까지 증가되는 세척 주기의 수, iii) 5분의 인큐베이션 세척 단계로 변경된 신속한 세척 단계 및 라운드마다 증가된 세척 단계의 수와 같은 상이한 세척 조건을 적용시켰다.

[0294] 파지미드 DNA를 네 번째 선택 라운드의 결과로 감염된 E. 콜리 세포로부터 제조하고, hNGAL 뮤테인 카세트를 BstXI를 이용한 DNA의 절단 및 표준 방법을 이용한 아가로스 젤 전기영동을 통한 이후의 정제에 의해 분리시켰다(Sambrook et al., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual). hNGAL 뮤테인 카세트를 테트라사이클린 프로모터의 조절 하에서 hNGAL 뮤테인의 박테리아 생성을 가능하도록 하는 마찬가지로 절단된 벡터에 삽입하였다. CaCl<sub>2</sub>-적격 TG1-F' 세포를 라이게이션 혼합물로 형질전환시키고, LB/Amp 플레이트에 플레이트하였다.

[0295] Pvd I, Pvd II, Pvd III 및 Pch-특이적 뮤테인의 최적화를 위해, 추가 라이브러리를 뮤테인 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 및 이후 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12 및 SEQ ID NO:45를 기초로 하여 생성시켰다. 라이브러리를 선택 위치의 편향적 무작위화 또는 오류가 발생하기 쉬운 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기반 방법을 이용하여 생성시켰다. 뮤테인의 선택을 기재된 바와 같으나, 증가된 엄격성으로 수행하였다.

[0296] 진핵생물 세포에서의 발현을 촉진하기 위해, 잠재적 N-당화 부위(Asn-X-Ser/Thr)를 제거하였다.

[0297] 또한, 안정성을 추가로 최적화시키기 위해 돌연변이를 도입시켰다.

[0298] 실시예 3: 고-처리량 ELISA 스크리닝을 이용한 각각의 P. 에어루지노사 시테로포어에 특이적으로 결합하는 뮤테인의 확인

[0299] 개별 콜로니를 사용하여 2xYT/Amp 배지에 접종하고, 제자리 성장기까지 밤새(14 내지 18시간) 성장시켰다. 이후, 50 μl의 2xYT/Amp를 제자리 성장기 배양물로부터 접종시키고, 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션시킨 후, 0.6 내지 0.8의 OD<sub>595</sub>에 도달할 때까지 22°C까지 전환시켰다. 1.2 μg/ml의 언하이드로테트라사이클린이 보충된 10 μl의 2xYT/Amp의 첨가에 의해 뮤테인의 생성을 유도하였다. 배양물을 다음날까지 22°C에서 인큐베이션하였다. 40 μl의 PBS/T 중 5%(w/v) BSA의 첨가 및 25°C에서 1시간 동안의 인큐베이션 후, 배양물은 스크리닝 검정에 사용 준비가 되었다.

[0300] 각각의 시테로포어 표적에 대한 분리된 뮤테인의 특정 결합을 4°C에서 밤새 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘의 1:1 혼합물(PBS 중 5 μg/ml)을 미세역가 플레이트 상에 코팅함으로써 시험하였다. PBST 중 2% BSA로 1시간 동안 플레이트를 블로킹시킨 후, 선택에 사용된 각각의 비오틴화된 시테로포어 표적은 PBS/T 중 1.5 내지 2.5 μg/ml의 농도로 코팅된 미세역가 플레이트 상에 포획되었다. 비오틴화된 알도스테론으로 동일 방식으로 코팅된 플레이트를 스크리닝에서 음성 대조군 표적으로 사용하였다. 이후, 20 μl의 BSA-블로킹된 배양물을 포획된 표적 또는 알도스테론을 함유하는 코팅된 미세역가 플레이트에 첨가하고, 25°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 결합된 뮤테인을 호스라디쉬 퍼옥시다제와 컨쥬게이션된 항-T7 항체(Merck KgaA, Darmstadt) 또는 호스라디쉬 퍼옥시다제와 컨쥬게이션된 항-Streptag 항체(IBA, Boettingen)와의 1시간의 인큐베이션 후에 검출하였다. 정량을 위해, 20 μl의 QuantaBlu 형광성 퍼옥시다제 기질을 첨가하고, 320 nm의 여기 파장 및 430 nm의 방출 파장에서 형광을 결정하였다. 각각의 시테로포어 표적에 특이적으로 결합하는 뮤테인을 이후 시퀀싱하였다.

[0301] 증가된 친화성 및 안정성을 갖는 뮤테인을 선택하기 위해, 스크리닝을 i) 감소된 항원 농도 및/또는 ii) 비오틴화되지 않은 표적과의 경쟁 및/또는 iii) 표적 플레이트로의 첨가 전 65°C 또는 70°C에서의 스크리닝 상층액의 인큐베이션 및/또는 iv) 역 스크리닝 포맷의 이용으로 수행하였고, 뮤테인은 항-Streptag 항체로 코팅된 미세역가 플레이트 상에서 Streptag를 통해 포획되었고, 상이한 농도의 비오틴화된 표적을 첨가하였고, 엑스트라비딘(extravidin)-HRP(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)를 통해 검출하였다.

[0302] 실시예 4: 뮤테인의 발현

[0303] SA 링커 및 Strep-tag® II, WSHQPFEK(SEQ ID NO:128)를 포함하는 C-말단 서열 SAWSHQPFEK(SEQ ID NO:127);를

갖는 독특한 뮤테인을 2YT-Amp 배지 중의 E. 콜리에서 발현시켰고, Streptactin 친화성 크로마토그래피를 이용하여 발현 후에 뮤테인을 정제시켰고, 분취용 크기 배제 크로마토그래피가 적용 가능하였다.

- [0304] 실시예 5: ELISA 기반 설정에서 결정된 가용성 P. 에어루지노사 시데로포어에 대한 뮤테인의 친화성
- [0305] 뮤테인의 용해 결합을 "용해 결합 ELISA"에 의해 분석하였으며, 이의 원리는 다음과 같았다: 일정한 농도의 시험되는 뮤테인을 1시간 동안 다양한 농도의 리간드(Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe)와 인큐베이션하였다. 용액 중에서의 이러한 예비-인큐베이션 후, 뮤테인/리간드 혼합물의 분취량을 뉴트라비딘을 통해 고정된 비오틴화된 Pvd I s (+Fe), Pvd II s (+Fe), Pvd III s (+Fe) 또는 Pch를 갖는 ELISA 플레이트로 옮겨 자유 뮤테인의 잔여 농도를 측정하였다. 자유(리간드 결합되지 않은) 뮤테인의 농도를 정량 ELISA 장치를 통해 결정하였다.
- [0306] 상세하게는, 형광 측정에 적합한 384-웰 플레이트(Greiner FLUOTRAC™ 600, 흑색의 편평한 바닥, 고-결합)를 4 °C에서 밤새 PBS 중 5 µg/ml의 농도의 20 µl의 뉴트라비딘으로 코팅시켰다. 세척 후, 뉴트라비딘-코팅된 웰을 실온에서 1시간 동안 0.1% Tween 20 및 2% BSA(PBS-T/BSA)를 함유하는 100 µl의 블로킹 완충액으로 블로킹시켰다. 다시 세척 후, 1 µg/ml 농도의 20 µl의 블로킹 완충액 중 비오틴화된 피오베르딘 또는 피오켈린을 실온에서 1시간 동안 첨가하고, 과량의 시약을 제거하였다.
- [0307] 고정된 농도의 뮤테인을 PBS-T/BSA 중에서 피코몰 범위까지 1:3의 비로 연속적으로 희석되는 적합한 시작 농도를 이용하여 다양한 농도의 리간드(Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe)와 함께 용액 중에서 인큐베이션하였다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후, 20 µl의 반응 혼합물을 비오틴화 피오베르딘 또는 피오켈린이 고정된 384-웰 플레이트로 옮겨 실온에서 20분 동안 결합되지 않은(자유) 뮤테인을 포획하였다. ELISA 판독 결과를 절대 유리 뮤테인 농도로 전환시키기 위해, 다양한 농도의 뮤테인을 함유하는 표준 곡선을 PBS-T/BSA에서 제조하고, 또한 동일한 ELISA 플레이트에서 20분 동안 인큐베이션하였다.
- [0308] 잔여 상층액을 폐기하고, 20 µl의 HRP-표지된 항-hNGAL 항체를 PBS-T/BSA에 소정의 최적 농도로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 항-hNGAL 항체를 뮤테인의 혼합물을 이용한 토끼의 면역화에 의해 획득한 후, 제조업체의 설명서에 따라 키트(EZ-링크 플러스 활성화된 페록시다제(EZ-link Plus Activated Peroxidase), Thermo Scientific)를 이용하여 HRP에 커플링시켜 항체-HRP 컨주게이트를 획득하였다. 세척 후, 20 µl의 형광성 HRP 기질(QuantaBlu, Thermo)을 각각의 웰에 첨가하고, 반응을 15 내지 60분 동안 진행시켰다. 플레이트 상의 모든 웰의 형광 강도를 형광 마이크로플레이트 판독기(Tecan 또는 Molecular Devices)를 이용하여 판독하였다. 데이터를 평가하기 위해, 자유 뮤테인 농도  $c(\text{뮤테인})_{\text{free}}$ 를 표준 곡선 결과를 기초로 하여 계산하고, 리간드 농도  $c(\text{리간드})$ 에 대해 플로팅하였다. 리간드/뮤테인 복합체 형성이 50%만큼 차단되는 리간드 농도(IC50)를 획득하기 위해, 곡선을 자유 파라미터로서 전체 추적자 농도  $c(\text{뮤테인})_{\text{tot}}$  및 IC50 값과 함께  $c(\text{뮤테인})_{\text{free}} = c(\text{뮤테인})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{리간드}) / \text{IC50})$ 에 따른 단일-부위 결합 모델을 이용한 비선형 회귀에 의해 적합화시켰다. 곡선 적합화를 GraphPad Prism 4 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.
- [0309] 생성된 IC<sub>50</sub> 값은 표 1A 내지 표 1D에 요약되어 있다. 각각의 Pvd 그룹의 모든 서브타입에 각각 결합된 비오틴화되고 철 로딩된 Pvd I 숙시닐, Pvd II 숙시닐 및 Pvd III 숙시닐에 대해 선택된 뮤테인, 즉, 복합체화된 철 이온을 갖거나 복합체화된 철 이온을 갖지 않는 Pvd I 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴에 대해 유사한 친화성으로 결합된 비오틴화되고 철 로딩된 Pvd I 숙시닐에 대해 선택된 뮤테인, 복합체화된 철 이온을 갖거나 복합체화된 철 이온을 갖지 않는 Pvd II 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴에 대해 유사한 친화성으로 결합된 비오틴화되고 철 로딩된 Pvd II 숙시닐에 대해 선택된 뮤테인 및 복합체화된 철 이온을 갖거나 복합체화된 철 이온을 갖지 않는 Pvd III 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴에 대해 유사한 친화성으로 결합된 비오틴화되고 철 로딩된 Pvd III 숙시닐에 대해 선택된 뮤테인. 선택된 뮤테인 대부분은 복합체화된 철 이온을 갖거나 복합체화된 철 이온을 갖지 않는 각각의 그룹의 모든 서브타입에 동등한 친화성으로 결합하였다.
- [0310] 비오틴화되지 않은 철 로딩되지 않은 피오켈린에 대한 선택은 바람직하게는 철 로딩되지 않은 피오켈린에 결합하는 리포칼린 뮤테인, 예를 들어, 철 로딩된 Pch에 2 내지 3 자릿수 nM의 친화성으로 결합하고, 철 로딩되지 않은 Pch에는 약한 친화성으로 결합하거나 전혀 결합하지 않는 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:56 및 57, 및 바람직하게는 철 로딩된 피오켈린에 결합하는 SEQ ID NO:55와 같은 리포칼린 뮤테인을 발생시켰다.
- [0311] SEQ ID NO:56의 친화성 최적화는 철 로딩되지 않은 Pch에 개선된 친화성으로 결합하고, 여전히 철 로딩된 Pch에

는 결합하지 않거나, 약한 친화성으로 결합하는 리포칼린 뮤테인을 발생시킨 반면, SEQ ID NO:55의 친화성 최적화는 철 로딩되지 않은 Pch에 75배 초과 개선된 친화성으로 결합하나, 철 로딩된 Pch에는 한자릿수 nM의 친화성으로 또한 결합하는 리포칼린 뮤테인을 발생시켰다.

[0312] 따라서, 리포칼린 뮤테인 선택 및 최적화로, 복합체화된 철 이온을 갖는 및 복합체화된 철 이온을 갖지 않는 P. 에어루지노사 시테로포어의 10개 모두의 서브타입(Pvd I s, sa, αKG +/- Fe; Pvd II s, sa, αKG +/- Fe; Pvd III s, sa, αKG +/- Fe; Pch +/- Fe)에 결합시키기에 단지 4종의 상이한 뮤테인이 충분하다는 것이 달성되었다.

[0313] [표 1A]

[0314] 용해 상태의 P. 에어루지노사 시테로포어 피오베르딘 I 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴 +/- Fe<sup>3+</sup>에 대한 뮤테인의 결합

용해 결합 ELISA						
IC50 : nM						
	Pvd I s (+Fe)	Pvd I sa (+Fe)	Pvd I αKG (+Fe)	Pvd I s (-Fe)	Pvd I sa (-Fe)	Pvd I αKG (-Fe)
SEQ ID NO: 2	24	19	13	26	19	13
SEQ ID NO: 4	97	43	91	57	28	50
SEQ ID NO: 5	97	49	73	57	32	42
SEQ ID NO: 6	44	30	37	48	31	36
SEQ ID NO: 7	173	126	59	290	129	53
SEQ ID NO: 8	2.38	1.33	2.15	2.3	0.98	1.8
SEQ ID NO: 9	3.3	1.37	2.4	3.7	1.6	2.9
SEQ ID NO: 10	3.4	1.1	2.87	3.8	0.92	2.9
SEQ ID NO: 11	2.97	1.9	2.57	4	2	3.1
SEQ ID NO: 12	6.8	4.7	6.4	6.9	4.8	5.6
SEQ ID NO: 13	0.5	0.27	0.37	0.36	0.2	0.24
SEQ ID NO: 14	2.4	1.7	3.1	2.4	1.1	2.2
SEQ ID NO: 15	1.1	0.59	1.2	0.86	0.42	0.69
SEQ ID NO: 16	1.3	0.84	1.6	1	0.63	0.83
SEQ ID NO: 18	5.3	2.2	3.9	2.8	1.8	2.5

[0315]

[0316] [표 1B]

[0317] 용해 상태의 가용성 P. 에어루지노사 시테로포어 피오베르딘 II 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴 +/- Fe<sup>3+</sup>에 대한 뮤테인의 결합

용해 결합 ELISA						
IC50 : nM						
	Pvd II s (+ Fe)	Pvd II sa (+Fe)	Pvd II aKG (+Fe)	Pvd II s (- Fe)	Pvd II sa (-Fe)	Pvd II aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 19	30	36	21	23	42	34
SEQ ID NO: 20	48	40	85	63	40	89
SEQ ID NO: 26	0.34	0.39	1.3	0.45	0.45	0.75
SEQ ID NO: 27	0.78	1.53	1.97	1.02	1.12	1.4
SEQ ID NO: 28	0.91	1.75	2.25	1.14	1.5	1.65
SEQ ID NO: 29	0.68	1.5	1.9	0.95	1.2	1.6
SEQ ID NO: 30	0.29	0.53	3	0.4	0.3	2.85
SEQ ID NO: 31	0.29	0.29	1.1	0.38	0.35	0.64
SEQ ID NO: 32	0.27	0.32	1.25	0.42	0.37	0.72
SEQ ID NO: 33	0.28	0.32	1.3	0.4	0.32	0.7
SEQ ID NO: 34	0.29	0.32	1.6	0.27	0.32	1.2
SEQ ID NO: 35	0.33	0.39	0.76	0.34	0.42	0.99
SEQ ID NO: 36	0.33	0.39	0.76	0.34	0.42	0.99
SEQ ID NO: 37	0.19	0.28	2.1	0.2	0.3	1.4

[0318]

[0319]

[표 1C]

[0320]

용해 상태의 P. 에어루지노사 시테로포어 피오베르딘 III 숙시닐, -숙신아미드, -α-케토글루타릴 +/- Fe3+에 대한 뮤테인의 결합

용해 결합 ELISA						
IC50 : nM						
	Pvd III s (+ Fe)	Pvd III sa (+Fe)	Pvd III aKG (+Fe)	Pvd III s (- Fe)	Pvd III sa (-Fe)	Pvd III aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 39	146	147	23	95	94	23
SEQ ID NO: 42	35	15	78	25	7.2	69
SEQ ID NO: 43	0.31	0.25	1.4	0.6	0.46	1.90
SEQ ID NO: 44	0.35	0.26	0.93	0.35	0.21	1.10
SEQ ID NO: 45	0.75	0.43	1.50	0.41	0.46	1.70
SEQ ID NO: 46	0.69	0.30	1.02	0.44	0.30	1.20
SEQ ID NO: 47	0.37	0.30	0.82	0.17	0.28	0.58
SEQ ID NO: 48	0.28	0.22	0.95	0.29	0.24	0.64
SEQ ID NO: 49	0.32	0.27	0.79	0.21	0.27	0.62
SEQ ID NO: 50	0.29	0.35	0.95	0.29	0.37	0.82
SEQ ID NO: 51	0.37	0.37	0.97	0.35	0.34	1.1
SEQ ID NO: 52	0.32	0.31	1	0.31	0.31	1
SEQ ID NO: 53	0.21	0.25	0.54	0.19	0.63	0.33

[0321]

[0322]

[표 1D]

[0323] 용해 상태의 P. 에어루지노사 시테로포어 피오켈린 +/- Fe3+에 대한 뮤테인의 결합

	용해 결합 ELISA	
	IC50:nM	
	pch (+Fe)	pch (-Fe)
SEQ ID NO: 55	361	N/A
SEQ ID NO: 56	N/A	51
SEQ ID NO: 57	N/A	147
SEQ ID NO: 58	N/A	10
SEQ ID NO: 59	N/A	11
SEQ ID NO: 60	8.6	45
SEQ ID NO: 61	5.1	42
SEQ ID NO: 62	4.7	26
SEQ ID NO: 63	5.6	26

[0324]

[0325] 고 처리량 친화성 순위에 대해, 동일한 검정을 이용하였으나, 덜 상이한 농도의 리간드로 이용하였다.

[0326] 실시예 6: Biacore에서 결정된 P. 에어루지노사 시테로포어에 결합하는 뮤테인의 친화성

[0327] 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기반 검정에서, 복합체화된 철 이온을 갖는 피오베르딘 I 숙시닐, -숙신아미드, - $\alpha$ -케토글루타릴 또는 복합체화된 철 이온을 갖는 피오베르딘 II 숙시닐, -숙신아미드, - $\alpha$ -케토글루타릴 또는 복합체화된 철 이온을 갖는 피오베르딘 III 숙시닐, -숙신아미드, - $\alpha$ -케토글루타릴에 대한 뮤테인의 결합 친화성을 측정하기 위해 Biacore T200 기계(GE Healthcare)를 사용하였다. 피오베르딘 및 음성 대조군(SEQ ID NO:64)으로의 결합에 대해 선택된 뮤테인을 적절한 과량의 EZ-Link NHS-PEG4-Biotin(Thermo, Cat# 21329)을 적용하면서 실온에서 2시간 동안 비오틴닐화시킨 후, 제조업체의 설명서에 따라 지바 스피ن 디살팅 플레이트(Zeba Spin Desalting Plate)(Thermo, Cat# 21329)를 이용하여 반응되지 않은 비오틴을 분리시켰다.

[0328] SPR 친화성 검정에서, 비오틴닐화된 뮤테인 및 음성 대조군을 비오틴 캡처 키트(Biotin CAPture Kit)(GE Healthcare)를 이용하여 센서 칩 CAP에서 포획하였고, 센서 칩(Sensor Chip) CAP은 ssDNA 올리고로 사전에 고정되었다. 회석되지 않은 비오틴 캡처 리젠트(Biotin CAPture Reagent)(상보적 ss-DNA 올리고와 컨쥬게이션된 스트렙타비딘)을 300초 동안 2  $\mu$ l/분의 유량으로 적용시켰다. 이후, 1  $\mu$ g/ml 내지 100  $\mu$ g/ml의 비오틴닐화된 뮤테인 또는 음성 대조군을 5  $\mu$ l/분의 유량으로 300초 동안 적용시켰다. 이후, 참조 채널에 비오틴 캡처 리젠트(Biotin CAPture Reagent)만 로딩하였다.

[0329] 결합 친화성을 결정하기 위해, 5 내지 2000 nM 범위 내의 농도의 각각의 Pvd 대표(숙시닐, 숙신아미드, - $\alpha$ -케토글루타릴 +Fe를 포함하는 Pvd I, II, III)의 4 내지 5개의 회석액을 HBS-EP+ 완충액(GE Healthcare) 중에서 제조하고, 제조된 칩 표면에 적용시켰다. 30  $\mu$ l/분의 유량을 적용하는 경우, 120 내지 180초의 샘플 접촉 시간 및 900 내지 2400초의 해리 시간으로 단일 주기 또는 다수 주기 동역학 접근법을 이용하였다. 음성 대조군 SEQ ID NO:64로의 결합의 부재가 고농도(예를 들어, 1200 nM)의 각각의 Pvd를 이용하여 확인되었다. 리간드 고정 후, 단일 주기 동역학을 이용한 분석을 위해, Pvd의 4 내지 5개의 농도 모두를 해리가 모니터링되기 전에 오름차순으로 연속적으로 적용시켰다. 다수 주기 동역학을 이용한 분석을 위해, Pvd의 4개 회석액을 적용시켰고, 해리 단계가 각각 후속되었다. 모든 측정을 25°C에서 수행하였다. 센서 칩(Sensor Chip) CAP 표면의 재생을 6 M Gua-HCl과 0.25 M NaOH의 주입으로 달성하고, 전기영동용 완충액을 이용한 추가 세척 및 120초의 안정화 기간을 후속시켰다. 데이터를 비아코어 T200 이밸류에이션(Biacore T200 Evaluation) 소프트웨어(V 1.0)로 평가하였다. 이중 참조를 이용하였다. 미가공 데이터를 적합화시키기 위해 1:1 결합 모델을 이용하였다.

[0330] 리포칼린 뮤테인의 선택을 위한 생성된 반응속도 상수가 표 2A 내지 표 2C에 요약되어 있다. 각각의 Pvd 그룹의 모든 서브타입에 대해 서브nM(subnM) 내지 낮은 한자릿수의 nM 범위로 결합하는 리포칼린 뮤테인이 각각의 Pvd 그룹 결합에 대해 생성될 수 있었다. 그러나, 야생형 hNGAL Fe-엔테로박틴의 천연 리간드는 Pvd 특이적 리포칼

린 뮤테인에 의해 결합되지 않는다.

[0331] [표 2A]

[0332] Fe<sup>3+</sup> 와 복합체화된 Pvd I 숙시닐, - 숙신아미드, 및 -α-케토글루타릴에 대한 Pvd I 특이적 리포칼린 뮤테인의 반응속도 상수.

SEQ ID	Pvd I s (+Fe)			Pvd I sa (+Fe)			Pvd I k (+Fe)			Fe-엔테로박틴
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	K <sub>D</sub> [nM]
SEQ ID NO: 8	5,37E+04	1,79E-04	3,33	1,11E+05	1,20E-04	1,08	4,74E+04	2,35E-04	4,95	결합 없음
SEQ ID NO: 9	3,31E+04	3,30E-04	9,97	8,02E+04	2,57E-04	3,20	3,80E+04	5,32E-04	14,03	결합 없음
SEQ ID NO: 10	3,47E+04	4,78E-04	13,78	8,63E+04	3,04E-04	3,52	5,02E+04	6,31E-04	12,57	결합 없음
SEQ ID NO: 11	2,84E+04	4,04E-04	14,22	6,76E+04	2,97E-04	4,40	3,48E+04	5,86E-04	16,84	결합 없음
SEQ ID NO: 13	1,17E+05	6,15E-05	0,53	1,65E+05	4,24E-05	0,26	9,51E+04	8,37E-05	0,88	결합 없음
SEQ ID NO: 16	3,56E+04	1,88E-04	5,28	5,43E+04	1,56E-04	2,87	3,14E+04	2,54E-04	8,10	결합 없음

[0333]

[0334] [표 2B]

[0335] Fe<sup>3+</sup> 와 복합체화된 Pvd II 숙시닐, - 숙신아미드, 및 -α-케토글루타릴에 대한 Pvd II 특이적 리포칼린 뮤테인의 반응속도 상수.

SEQ ID	Pvd II s (+Fe)			Pvd II sa (+Fe)			Pvd II k (+Fe)			Fe-엔테로박틴
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	K <sub>D</sub> [nM]
SEQ ID NO: 32	1,15E+06	1,09E-03	0,94	1,37E+06	9,55E-04	0,7	1,09E+05	3,74E-04	3,44	결합 없음
SEQ ID NO: 33	1,23E+06	1,25E-03	1,02	1,41E+06	1,04E-03	0,74	9,93E+04	4,16E-04	4,19	결합 없음
SEQ ID NO: 35	1,31E+05	4,59E-05	0,35	2,48E+05	4,58E-05	0,18	4,35E+04	1,49E-04	3,42	결합 없음
SEQ ID NO: 36	1,10E+05	4,30E-05	0,39	1,38E+05	3,67E-05	0,27	2,86E+04	5,62E-05	1,97	결합 없음

[0336]

[0337] [표 2C]

[0338] Fe<sup>3+</sup> 와 복합체화된 Pvd III 숙시닐, - 숙신아미드, 및 -α-케토글루타릴에 대한 Pvd III 특이적 리포칼린 뮤테인의 반응속도 상수.

SEQ ID	Pvd III s (+Fe)			Pvd III sa (+Fe)			Pvd III k (+Fe)			Fe-엔테로박틴
	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [nM]	K <sub>D</sub> [nM]
SEQ ID NO: 43	7,05E+04	1,58E-04	2,24	3,52E+04	1,07E-04	3,04	5,73E+04	3,03E-04	5,29	n.d.
SEQ ID NO: 44	5,62E+04	1,42E-04	2,53	3,03E+04	8,90E-05	2,94	4,82E+04	2,71E-04	5,64	n.d.
SEQ ID NO: 45	5,90E+04	1,59E-04	2,70	3,27E+04	9,91E-05	3,03	4,73E+04	3,30E-04	6,99	n.d.
SEQ ID NO: 46	8,32E+04	1,66E-04	2,00	4,36E+04	6,90E-05	1,58	7,67E+04	2,41E-04	3,15	n.d.
SEQ ID NO: 47	7,89E+04	7,91E-05	1,00	1,28E+05	2,52E-05	0,20	2,92E+04	2,62E-04	8,97	n.d.
SEQ ID NO: 48	6,70E+04	1,06E-04	1,58	1,48E+05	9,51E-05	0,64	2,72E+04	1,58E-04	5,81	n.d.
SEQ ID NO: 49	6,88E+04	1,05E-04	1,52	1,34E+05	1,12E-04	0,84	2,81E+04	4,29E-05	1,53	n.d.
SEQ ID NO: 53	5,10E+04	4,19E-05	0,82	6,73E+04	3,90E-05	0,58	3,88E+04	1,40E-04	3,60	결합 없음

[0339]

[0340] 또한, 각각의 피오베르딘 하위그룹(I, II, III) 및 MMP-9에 속하지 않는 다양한 시테로포어에 대한 결합의 부재가 고정된 뮤테인에 고농도(≥ 1 μM)의 하기 분석물을 적용함으로써 상기 기재된 검정을 이용하여 확인되었다: Fe-엔테로박틴, 테스페록사민, 피오켈린, 각각의 다른 하위그룹으로부터의 피오베르딘, MMP-9 프로폼(proform) 및 활성화된 MMP-9. 이러한 분석의 개관이 표 3에 제공된다.

[0341] 뮤테인 SEQ ID NO:62와 Pch +Fe의 상호작용에 대한 반응속도 상수 및 생성된 KD의 결정을 위해, 뮤테인 또는 음성 대조군 SEQ ID NO:64를 표준 아민 화학을 이용하여 CM5 칩의 표면에 고정시켰다: 칩의 표면을 EDC 및 NHS를 이용하여 활성화시켰다. 이후, 10 mM 아세테이트(pH 4.0) 중 5 μg/ml의 뮤테인 또는 음성 대조군 용액을 약 2000 RU의 높은 고정 수준이 달성될 때까지 10 μl/분의 유량으로 적용시켰다. 잔여의 활성화된 그룹을 에탄올아민으로 쉐킷시켰다. 참조 채널을 에탄올아민 후에 EDC/NHS로 처리하였다(블랭크 고정).

[0342] 친화성을 결정하기 위해, 피오켈린(+Fe)의 5개의 희석액을 HBS-P+ 완충액에서 제조하고, 제조된 칩 표면에 적용시켰다. 결합 검정을 180초의 접촉 시간, 1200 내지 1800초의 해리 시간 및 30 μl/분의 유량 적용으로 수행하였

다. 측정을 25℃에서 수행하였다. 고정된 뮤테인 표면의 재생을 10 mM Gly-HCl(pH 1.5)(120초)의 3회의 연속 주입 후 전기영동용 완충액을 이용한 추가 세척 및 안정화 기간에 의해 달성하였다. 데이터를 비아코어 T200 이벨류에이션(Biacore T200 Evaluation) 소프트웨어(V 1.0)로 평가하였다. 이중 참조를 이용하였다. 미가공 데이터를 적합화시키기 위해 1:1 결합 모델을 이용하였다.

[0343] SEQ ID NO:62에 대해 발생된 반응속도 상수가 표 2D에 제시된다.

[0344] 동일 검정을 이용하여, 피오켈린과 상이한 시테로포어 및 MMP-9에 대한 결합의 부재가 고정된 뮤테인 SEQ ID NO:62에 고농도( $\geq 1 \mu\text{M}$ )의 하기 분석물을 적용함으로써 확인되었다: Fe-엔테로박틴, 데스페톡사민, 피오베르딘, MMP-9 프로폼 및 활성화된 MMP-9. 결과의 개관이 표 3에 제시된다.

[0345] [표 2D]

[0346]  $\text{Fe}^{3+}$  와 복합체화된 피오켈린에 대한 피오켈린 특이적 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:62의 반응속도 상수.

SEQ ID	pch (+Fe)		
	$k_{\text{on}}$ [1/Ms]	$k_{\text{off}}$ [1/s]	$K_D$ [nM]
SEQ ID NO: 62	2,25E+06	6,43E-04	0,29

[0347]

[0348] [표 3]

[0349] Pvd I, Pvd II, Pvd III 또는 피오켈린에 결합하는 리포칼린 뮤테인의 특이성.

	Pvd I s (+Fe)	Pvd II s (+Fe)	Pvd III s(+Fe)	pch (+Fe)	엔테로 박틴 (+Fe)	데스페 톡사민	프로폼 MMP-9	활성화 된 MMP-9
SEQ ID NO: 16	+	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 36	-	+	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 53	-	-	+	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 62	-	-	-	+	-	-	-	-
SEQ ID NO: 64	-	-	-	-	+	-	-	-

[0350]

[0351] 실시예 7: P. 에어루지노사 시테로포어에 결합하는 뮤테인의 기능 시험; 철 흡수의 억제

[0352] 살아 있는 박테리아에서 기능적 철 흡수 억제를 결정하기 위해, 투여 범위 농도의 P. 에어루지노사 시테로포어에 결합하는 리포칼린 뮤테인을 트리스.HCl 50 mM(pH 8.0) 완충액에서 100 nM의 방사성 철 로딩된 시테로포어와 함께 1시간 동안 인큐베이션한 후, 96 웰 플레이트에서 595 nm에서 OD=1의 최종 농도로 박테리아와 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후, 박테리아를 5% 폴리 에틸렌 이민 용액으로 예비 인큐베이션되고, 트리스 완충액으로 3회 세척된 96 웰 플레이트 GF/B 필터를 통해 세포 수거기로 여과시켰다. 여과 및 건조 후, 30  $\mu\text{l}$ 의 섬광 콕테일(scintillant cocktail)을 각각의 필터 웰에 첨가하고, 계수하였다. 피오베르딘에 철을 로딩하기 위해, 시테로포어를 200  $\mu\text{M}$  최종 용액에 4 대 1 비의 피오베르딘 및 철을 갖는 트리스 완충액에서 55Fe-C13과 함께 15분 동안 인큐베이션하였다. 피오켈린에 방사성 철을 로딩시키기 위해, HCl 0.5 N 중 0.25 mM의 55FeC13의 40  $\mu\text{l}$  용액을 1 mM의 피오켈린의 메탄올 용액에 첨가하였다. 15분의 인큐베이션 시간 후, 940  $\mu\text{l}$ 의 트리스 HCl 50 mM(pH 8.0)을 첨가하여, 피오켈린과 철 사이의 비가 2 대 1인 20  $\mu\text{M}$  55Fe-Pch 용액을 획득하였다. 박테리아를 다음과 같이 제조하였다: 분리된 클론이 접종된 10 ml의 밀러 힌톤 배지(Mueller Hinton Medium) 중 밤새 배양물을 원심분리시키고, 세척된 펠렛을 25 ml의 숙시네이트 배지에 재현탁시키고, 2시간 동안 진탕하에서 인큐베이션하였다. 동시에, 20 ml의 밀러 힌톤 배지(Mueller Hinton Medium)에 5 ml의 밤새 배양물을 접종시키고, 2시간 동안 진탕하에서 인큐베이션하여 백그라운드 철 흡수 수준으로 이용하였다. 이후, 25 ml의 박테리아 배양물을 원심분

리시키고, 해당 배지로 세척한 후, 펠렛을 트리스.HCL 50 mM(pH 8.0) 완충액에 재현탁시켰고, 595 nm에서의 OD 는 OD = 1의 검정에서의 최종 농도를 갖는 것으로 측정되었다.

[0353] 통합 백분율을 각각의 농도 포인트에 대해 계산하고, 억제를 사내(in-house) 소프트웨어로 계산하였다. 이러한 계산을 위해, 철 흡수의 최대 수준은 임의의 리포칼린 뮤테인이 없는 숙시네이트 최소 배지(Minimum Succinate Medium)에서 획득된 값을 기초로 하였고, 백그라운드 값은 시테로포어 수용체가 발현되지 않는 풍부한 밀러 힌톤 배지(Mueller Hinton Medium)에서 획득되었다.

[0354] [표 4]

[0355] 리포칼린 뮤테인 SEQ ID NO:16, 37, 53 및 62에 대해 예시적으로 제시된 P. 에어루지노사의 철 흡수를 방지하는 리포칼린 뮤테인.

SEQ ID	철 흡수 IC50 : nM			
	Pvd I s	Pvd I sa	Pvd I aKG	
SEQ ID NO : 16	121	123	183	
SEQ ID NO : 37	Pvd II s	Pvd II sa	Pvd II aKG	
	118	107	51	
SEQ ID NO : 53	Pvd III s	Pvd III sa	Pvd III aKG	
	74	32	8	
SEQ ID NO : 62				Pch
				54

[0356] 실시예 8: P. 에어루지노사 시테로포어에 결합하는 뮤테인의 기능 시험; 성장 억제

[0358] 박테리아 성장 억제는 투명한 바닥을 갖는 흑색 96 웰 플레이트에서 595 nm에서 0.05의 최종 OD로 희석된 MS 박테리아 배양물과 함께 미량 원소 용액(Trace Element Solution) 및 0.1 mg/ml BSA가 보충된 Chelex 처리 숙시네이트 배지(Succinate Medium)에서 P. 에어루지노사 시테로포어에 결합하는 뮤테인을 인큐베이션함으로써 결정하였다. 플레이트를 20분마다의 진탕 및 써모 랩시스템(Thermo Labsystem)으로부터의 IEMS 리더(Reader) MF에서 595 nm에서의 OD 판독과 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 도 4a에서 Pvd I 균주 및 Pvd I 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:16, 도 4b에서 Pvd II 균주 및 Pvd II 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:19, 및 SEQ ID NO:36, 도 4c에서 Pvd III 균주 및 Pvd III 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:53 및 도 4d에서 성장을 위한 철 흡수를 위해 피오켈린에 의존하는 Pvd I 닉-아웃( $\Delta$ pvdA) 균주 및 피오켈린 특이적 뮤테인 SEQ ID NO:62에 대해 성장 억제가 예시적으로 제시된다. 대조군은 리포칼린 뮤테인이 없는 박테리아 성장이다.

[0359] 실시예 9: 뮤테인의 안정성 평가

[0360] 전체 안정성에 대한 일반 지표로서의 용융 온도를 결정하기 위해, PBS(Gibco) 중 1 mg/ml의 단백질 농도의 시테로포어-특이적 뮤테인(SEQ ID NO:13 내지 18; 26, 31 내지 36; 47 내지 53; 58 내지 62)을 모세관 나노DSC 기계(CSC 6300, TA Instruments)를 이용하여 1°C/분으로 스캐닝(25 내지 100°C)하였다. 용융 온도(Tm)를 통합된 나노 애널리즈(Nano Analyze) 소프트웨어를 이용하여 표시된 써모그램(thermogram)으로부터 계산하였다.

[0361] 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO:13 내지 18; 26, 31 내지 36; 47 내지 53; 58 내지 62)에 대한 발생된 용융 온도뿐만 아니라 용융 개시는 하기 표 5A 내지 표 5D에 나열되어 있다. 70°C의 범위 내의 Tm을 갖는 모든 Pvd 그룹뿐만 아니라 pch 리포칼린 뮤테인에 대해, 분자의 우수한 안정성을 나타내는 68 내지 74°C 범위의 각 Pvd 타입 및 pch에 대한 최적 리포칼린 뮤테인이 선택될 수 있었다.

[0362] [표 5A]

[0363] Pvd I 특이적 리포칼린 뮤테인의 나노DSC에 의해 결정된 T<sub>m</sub> 및 용융 개시

	나노 DSC	
SEQ ID	T <sub>m</sub> °C	개시
SEQ ID NO: 13	59	51
SEQ ID NO: 14	61	51
SEQ ID NO: 15	68	59
SEQ ID NO: 16	69	60
SEQ ID NO: 17	61	53
SEQ ID NO: 18	61	54

[0364]

[0365] [표 5B]

[0366] Pvd II 특이적 리포칼린 뮤테인의 나노DSC에 의해 결정된 T<sub>m</sub> 및 용융 개시

	나노 DSC	
SEQ ID	T <sub>m</sub> °C	개시
SEQ ID NO: 26	65	58
SEQ ID NO: 31	67	60
SEQ ID NO: 32	64	56
SEQ ID NO: 33	67	61
SEQ ID NO: 34	67	56
SEQ ID NO: 35	71	63
SEQ ID NO: 36	70	61

[0367]

[0368] [표 5C]

[0369] Pvd III 특이적 리포칼린 뮤테인의 나노DSC에 의해 결정된 Tm 및 용융 개시

SEQ ID	나노 DSC	
	Tm °C	개시
SEQ ID NO: 47	62	53
SEQ ID NO: 48	64	55
SEQ ID NO: 49	59	50
SEQ ID NO: 50	61	52
SEQ ID NO: 51	62	53
SEQ ID NO: 52	59	49
SEQ ID NO: 53	68	59

[0370]

[0371] [표 5D]

[0372] pch 특이적 리포칼린 뮤테인의 나노DSC에 의해 결정된 Tm 및 용융 개시

SEQ ID	나노 DSC	
	Tm °C	개시
SEQ ID NO: 58	63	51
SEQ ID NO: 59	60	54
SEQ ID NO: 60	68	56
SEQ ID NO: 61	69	63
SEQ ID NO: 62	74	63

[0373]

[0374] 보관 및 동결/해동 안정성을 평가하기 위해, PBS 중 1 mg/ml 농도의 뮤테인을 37°C에서 1주 동안 인큐베이션하거나, 3회의 동결/해동 주기를 적용시켰다. 활성 뮤테인을 정량 ELISA 설정에서 측정하였다. 단량체 단백질을 분석 크기 배제 크로마토그래피에서 측정하였다. SEQ ID NO:16, 36, 53, 62에 대한 예시적 데이터가 표 6에 제시된다.

[0375] 단백질 활성을 검증하기 위해, 다음과 같은 ELISA를 적용시켰다: 형광 측정에 적합한 384-웰 플레이트(Greiner FLUOTRAC™ 600, 흑색의 편평한 바닥, 고-결합)를 4°C에서 밤새 PBS 중 5 µg/ml 농도의 20 µl의 Neutravidin(Thermo Scientific)으로 코팅시켰다. 세척 후, Neutravidin-코팅된 웰을 1시간 동안 100 µl의 블로킹 완충액(0.1% v/v Tween-20을 함유하는 PBS 중 2% w/v BSA)으로 블로킹시켰다. 다시 세척 후, 블로킹 완충액 중 1 µg/ml 농도의 20 µl의 비오틴화되고 철 로딩된 피오베르딘 I 숙시닐, 피오베르딘 II 숙시닐, 피오베르딘 III 숙시닐 또는 비오틴화된 피오켈린을 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 20 µl의 적절하게 희석된 단백질 표준, 스트레스를 가하지 않은 참조 샘플 또는 스트레스가 가해진 샘플을 ELISA 플레이트로 옮기고, 인큐베이션하였다. 플레이트 결합된 단백질을 정량하기 위해, ELISA 플레이트를 세척하고, 잔여 상층액을 폐기하고, 20 µl의 HRP-표지된 항-hNGAL 항체를 블로킹 완충액 중 소정의 최적 농도로 첨가하고, 인큐베이션하였다. 세척 후, 20 µl의 형광성 HRP 기질(QuantaBlu, Pierce)을 각각의 웰에 첨가하고, 반응을 20 내지 30분 동안 진행시켰다. 플레이트 상의 모든 웰의 형광 강도를 형광 마이크로플레이트 판독기(Tecan)를 이용하여 판독하였다.

[0376] 달리 언급하지 않는 한, 모든 인큐베이션 단계를 실온에서 1시간 동안 수행하였고, 각각의 인큐베이션 단계 후, 플레이트를 Biotek ELx405 셀렉트(select) CW 세척기를 이용하여 5회로 100 µl의 PBS-T 완충액(PBS, 0.05%

Tween 20)으로 세척하였다.

[0377] 상기 기재된 ELISA를 위해, 통상적으로 0.008 내지 500 ng/ml 범위의 11개의 희석액을 포함하는 교정 곡선을 작성하고, 교정 곡선의 선형 범위 내의 3개의 상이한 독립적 희석액을 각각의 샘플에 대해 제조하였다. 1% 인간 또는 뮤린 혈장이 선택적으로 보충된 블로킹 완충액을 희석에 사용하였다.

[0378] 교정 곡선을 4 모수 로지스틱(4 Parameter Logistic; 4PL) 비선형 회귀 모델을 이용하여 적합화시키고, 시험 샘플에 대한 활성 단백질 농도를 계산하기 위해 이용하였다. 결정된 활성 단백질 농도를 동일 매트릭스에서 동일 농도로 보관된 스트레스를 가하지 않은 샘플에 대해 참조하였다.

[0379] 분석 크기 배제 크로마토그래피를 0.3 ml/분의 유량으로 용리액으로서 PBS(Gibco)를 이용하여 연속된 2개의 Superdex 75 5/150 GL 컬럼(GE Healthcare)을 갖는 애질런트(Agilent) HPLC 시스템에서 수행하였다.

[0380] 혈장에서의 보관 안정성을 평가하기 위해, 0.5 mg/ml 농도의 뮤테인을 인간, 마우스 및 래트 혈장에서 37°C에서 1주 동안 인큐베이션하였다. 활성 뮤테인을 기재된 바와 같이 정량 ELISA 설정에서 측정하였다.

[0381] 모든 시험된 리포칼린 뮤테인은 모든 시험된 조건하에서 안정적인 것으로 입증되었다.

[0382] [표 6]

[0383] 3회의 동결/해동 주기(F/T) 후의 안정성; qELISA에서의 활성 회복 및 분석 SEC에서의 단량체 함량에 의해 평가된 37°C에서 PBS 중에서의 1주 보관 및 인간(hu), 마우스(mu) 또는 래트 혈장에서의 1주 보관: qELISA에서 안정적 = 100 +/- 15 %; aSEC에서 안정적 = 100 +/- 5%(스트레스를 가하지 않은 참조 샘플에 비한 단량체 피크 영역의 회복); 참조를 포함하는 모든 샘플에 대해, 100 면적 퍼센트의 단량체 함량이 검출되었다.

		3xF/T, -20°C 1mg/ml		1주 PBS, 37°C, 1mg/ml		1주 hu 혈장, 37°C	1주 mu 혈장, 37°C	1주 래트 혈장, 37°C
뮤테인	시데로- 포어	qELISA에서의 활성 회복 %	aSEC에서의 단량체 %	qELISA에서의 활성 회복 %	aSEC에서의 단량체 %	qELISA에서의 활성 회복 %		
SEQ ID NO:16	Pvd I	102	98	86	98	86	100	100
SEQ ID NO: 36	Pvd II	99	101	104	98	93	91	110
SEQ ID NO: 53	Pvd III	98	99	107	102	92	83	101
SEQ ID NO: 62	pch	107	100	95	104	97	102	95

[0384]

[0385] 실시예 10: 마우스 모델에서의 리포칼린 뮤테인의 생체내 효능

[0386] 마우스의 P. 에어루지노사 유발 폐 감염에서의 정맥내(i.v.) 투여 후의 SEQ ID NO:19의 예방 효과를 연구하였다.

[0387] SEQ ID NO:19를 감염 1시간 전 및 감염시에 투여하였다. 폐 박테리아 로드를 감염 24시간 후에 평가하였다.

[0388] 본 연구에서 사용된 균주는 P. 에어루지노사(ATCC27853)였다. PBS/15% 글리세롤 중에서 -80°C에서 보관된 P. 에어루지노사로부터 시작하여, 뮐러-힌톤(Mueller-Hinton) 브로쓰(broth) 중에서 진탕하에서 37°C에서 밤새 배양을 수행한 후, 대수 성장기의 종료때까지 추가로 계대배양(100 µl의 밤새 배양물 + 100 ml의 MHB)하였다. 배양물을 2회 세척하고, 인산염-완충 염수 중에 재현탁시킨 후, 1E+09 CFU/ml로 동결시켰다. 각각의 실험을 위해, 새로운 바이알을 해동시키고, 살아 있는 수에 의해 접종물을 확인하였다.

[0389] Janvier laboratories(Route des **chênes** secs, 53940 Le Genest Saint Ile, France)로부터 구입한 7 내지 8 주령의 수컷 스위스(Swiss) 마우스(5마리의 동물/그룹)를 사용 전에 적어도 5일간 순응시켰다. 동물을 40 내지 70%의 상대 습도 및 시간 당 12 내지 15회의 신선한 공기 교환과 함께 22±2°C의 온도에서 유지시켰다. 광 주기 12/12시간: 오전 7시부터 오후 7시까지 조명(일반 주기). 온도 및 상대 습도 유도를 연속적으로 기록하였다. 동물을 케이지 당 5마리를 수용하였고, 이들을 물 및 표준 식이(AO4 C 표준 식이(SAFE))에 자유롭게 접근하도록 허용하였다. 모든 실험을 사노피(Sanofi) R&D의 윤리위원회(CEPAL)의 승인을 받아 수행하였다.

[0390] 폐 감염을 50 µl의 NaCl 0.9% 중 1.E+07 CFU/마우스의 P. 에어루지노사를 이용한 수컷 Swiss 마우스의 비내 공격에 의해 유도하였다.

[0391] 200, 400, 1000 또는 2000 µg/마우스 농도의 SEQ ID NO:19를 i.v. 볼루스로 감염 1시간 전 및 감염시에 투여하였다.

[0392] 감염 24시간 후, 동물을 안락사시키고, 폐 균질액으로부터의 박테리아 수를 결정하고, 평균 ± sem으로 log10

CFU/ml로 표현하였다.

- [0393] 통계 분석을 SAS v9.2를 이용하여 수행하였다. 숫자 표시를 위해 Excel 소프트웨어 2003을 이용하였다. 비히클에 의한 SEQ ID NO:19 용량의 비교를 일원 분산 분석 후 던넛 검정(Dunnett's test)으로 평가하였다(ZAR J.H., 《Biostatistical Analysis》, Prentice Hall International Editions, 4ème édition, 1999.; C.W. Dunnett, "A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control", J. Amer. Statist. Assoc., 50 (1955), pp. 1096-1121, 1955).
- [0394] 마우스에서의 P. 에어루지노사 유발 폐 감염 모델에서, SEQ ID NO:19를 박테리아 공격 1시간 전 및 공격시에 투여하였고, SEQ ID NO:19는 용량-의존 방식으로 마우스에서 감염의 발달을 예방하였다. 200 µg/마우스에서 시작하여 SEQ ID NO:19에 대해 유의한 예방 효과가 관찰되었고, 2000 µg/마우스에서 최대 효과가 관찰되었다.
- [0395] 실시예 11: 결정화
- [0396] Pvd-Fe와 복합체를 이루는 SEQ ID NO:31 단백질의 3차원 구조를 결정하기 위해, 하기 절차를 적용하였다.
- [0397] 도 6에 도시된 단백질 서열을 pET-24a 플라스미드에 클로닝하고, N-말단 태그화된 6His-TEV 프로테아제 인지 부위 작제물로 발현시켰다.
- [0398] 플라스미드를 사용하여 BL21(DE3) Star E. 콜리 세포를 형질전환시켰고, 생성된 클론을 오버나이트 익스프레스 인스턴트(Overnight Express Instant) TB 배지(Novagen)에 접종시키고, 세포를 200 RPM 교반과 함께 18°C에서 47시간의 인큐베이션 후에 최종 OD600 4.7로 수거하였다. 세포 펠렛을 500 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 5% 글리세롤 및 20 mM 트리스(pH 7.4)를 함유하는 완충액 중에 재현탁시키고, 표준 초음파처리 절차에 의해 용해시켰다. 생성된 추출물을 저속 원심분리에 의해 투명화시키고, 상층액을 22 nm 막을 통해 여과시킨 후, 100 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 100 mM HEPES(pH 8) 완충액으로 사전 평형화된 Ni NTA(Qiagen) 5 ml 컬럼에 로딩하였다. 단백질을 이미다졸 10 mM로부터 300 mM로의 선형 구배에 의해 용리시키고, 100 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 100 mM HEPES(pH 8) 완충액으로 추가로 밤새 투석하였다. 단백질을 20 mg/ml로 농축시키고, 젤 여과 Superdex 75 컬럼(GE)에 로딩하였다. 생성된 단백질을 TEV 프로테아제(1/50 비)의 존재하에서 밤새 100 mM NaCl, 10 mM HEPES(pH 8) 완충액으로 투석하여 상기 기재된 바와 같은 음성 Ni NTA 정제 단계 후에 6His-N-말단 태그를 제거하여 절단된 단백질을 분리시켰다. 최종 단백질을 분취량의 100 mM NaCl, 50 mM HEPES(pH 7.5)에서 12 mg/ml로 농축시키고, 액체 질소 중에서 급속 동결시키고, 추가 사용을 위해 -80°C에서 보관하였다.
- [0399] 결정화를 위해, 단백질을 10배 더 높은 몰 농도의 Pvd-Fe와 함께 밤새 인큐베이션하고, 20°C 및 4°C에서의 증기 확산 시딩 드롭(vapor diffusion sitting drop) 포맷 실험에서 100 nL 단백질 점적이 100 nL의 결정화 스크리닝 용액과 혼합되는 SBS 포맷 플레이트에서 수행되는 결정화 스크리닝을 위해 플레이팅하였다. 다수의 결정화 히트(hit)가 검출되었고, 충분한 회절 x-선 품질의 결정을 획득하기 위해 결정화 조건을 추가로 최적화시켰다.
- [0400] 결정 회절 품질을 싱크로트론 x-선원을 이용하여 평가하였고, 최적 회절 결정을 20°C에서 20% PEG3350 및 0.2 M LiSO<sub>4</sub> 조건하에서 획득하였다. 최적 결정을 액체 질소에서의 급속 동결보다 PEG3350 농도를 35%만큼 증가시킴으로써 동결방지시켰고, 1.8Å 데이터 세트를 100K 온도에서 수집하였다.
- [0401] X-선 데이터를 MOSFLM에 의해 처리하고, 단백질 구조를 탐색 모델로서 pdb 1LKE를 이용한 분자 치환 방법에 의해 결정하였고, 구조 모델을 비대칭 유닛 당 2개의 삼원 단백질 복합체를 갖는 것으로 P41212에서 R<sub>free</sub>=0.233 - R=0.200 품질로 추가로 세분화시켰다.
- [0402] 단백질 구조는 비대칭 유닛에 존재하는 둘 모두의 뮤테인 단백질에 결합된 Pvd-Fe를 갖는 고전적인 리포칼린 스캐폴드를 나타낸다. 도 7. Pvd-Fe 결합과 관련된 아미노산 잔기를 분석하였고, 도 8에 제시되었다. Fe에 직접 결합하는 Pvd의 산소를 확인하였고, 도 9에 제시되었다.
- [0403] 본 발명은 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 대한 결합 특이성을 갖는 폴리펩티드에 관한 것으로, 상기 폴리펩티드는 검출 가능한 친화성으로 피오베르딘 타입 I, II, III 또는 피오켈린에 결합하는 hNGAL 뮤테인을 포함한다.
- [0404] 일 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 34, 36, 39 내지 42, 44 내지 47, 49, 52, 54 내지 55, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 및 145에 해당하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.

- [0405] 또 다른 구현예에서, 상기 뮤테인은 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있다.
- [0406] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 I 숙시닐, Pvd 타입 I 숙신아미드 및 Pvd 타입 I a-케토글루타릴에 결합할 수 있다.
- [0407] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 I에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.
- [0408] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd I 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0409] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 36, 39 내지 41, 46, 49, 52, 54 내지 55, 59, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 및 136에 해당하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0410] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함한다: Leu 36 → Asn, Thr, Val, Trp 또는 Phe; Ala 40 → Gly, Asn, Thr 또는 Phe; Ile 41 → Arg, Ala, Thr, Phe 또는 Trp; Gln 49 → Ile, Leu, Val, Ala 또는 Pro; Tyr 52 → Met, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp, Val 또는 Glu; Leu 70 → Gln, Trp, Asp 또는 Thr; Arg 72 → Trp, Ala, Ser, Leu, Pro 또는 Glu; Lys 73 → Asp, Leu, Ala, Glu 또는 Asn; Asp 77 → Arg, Leu, Tyr, Ser, Gln, Thr, Ile 또는 Asn; Trp 79 → Gln, Asp, Ser, Arg, Met 또는 Glu; Arg 81 → Gln, Gly, Ile, Glu, His 또는 Asp; Asn 96 → His, Ile, Gly, Tyr 또는 Asp; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe 또는 Tyr; Leu 103 → Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp 또는 Asn; Tyr 106 → His, Gln 또는 Phe; Lys 125 → Arg, Ser, Trp, Tyr, Val 또는 Gly; Ser 127 → Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr, His, Ile, Val 또는 Asp; Tyr 132 → Trp, Asn, Gly 또는 Lys; 및 Lys 134 → Asn, His, Trp, Gly, Gln 또는 Asp.
- [0411] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 치환을 포함한다: Gln 28 → His; Lys 46 → Glu; Thr 54 → Val 또는 Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp 또는 Gln; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser 또는 Asn; 및 Thr 136 → Ala.
- [0412] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 28, 36, 39 내지 41, 46, 49, 52, 54 내지 55, 59, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 및 136에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 21개의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0413] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 아미노산 치환의 하기 세트 중 하나를 포함한다:
- [0414] Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gln; Cys 87 → Ser; Asn 96 → His; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → His; Tyr 106 → His; Lys 125 → Arg; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Asp;
- [0415] Gln 28 → His; Leu 36 → Thr; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Trp; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Tyr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → His; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Gln;
- [0416] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Lys; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ala; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0417] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Ile; Cys 87

→ Ser; Asn 96 → Tyr; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Thr;  
Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Gly;

- [0418] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0419] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Phe; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Glu; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Leu 103 → Tyr; Tyr 106 → His; Lys 125 → Val; Ser 127 → His; Tyr 132 → Lys; Lys 134 → Trp;
- [0420] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0421] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0422] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0423] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asn; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0424] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0425] Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- [0426] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- [0427] Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;
- [0428] Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79

→ Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;

- [0429] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → sER; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His; 또는
- [0430] Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → sER; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His.
- [0431] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 SEQ ID NO:2 내지 18로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0432] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있다.
- [0433] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 ELISA 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 II 숙신닐, Pvd 타입 II 숙신아미드 및 Pvd 타입 II α-케토글루타릴에 결합할 수 있다.
- [0434] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 II에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.
- [0435] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd II 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0436] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 9에 본질적으로 기재된 검정에서 피오베르딘 타입 II를 발현하는 P. 에어루지노사 균주의 성장을 억제할 수 있다.
- [0437] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 36, 40 내지 41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134에 해당하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0438] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 돌연변이된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함한다: Leu 36 → Asn, Ile 또는 Val; Ala 40 → Glu, Gly, Asn, Thr 또는 His; Ile 41 → Arg, Val 또는 Thr; Gln 49 → Gly, Ala 또는 Pro; Tyr 52 → Asn, Gly, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp, Arg 또는 Glu; Leu 70 → Arg 또는 Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser 또는 Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln 또는 Arg; Asp 77 → His, Ile, Met, Lys, Gly 또는 Asn; Trp 79 → Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe 또는 Trp; Arg 81 → Glu, Ser, Tyr 또는 Asp; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn 또는 Ala; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe 또는 Tyr; Leu 103 → Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp 또는 Val; Tyr 106 → Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met 또는 Phe; Lys 125 → Ala, Ile 또는 Asn; Ser 127 → Lys, Arg, Ser, Met, Asp 또는 Asn; Tyr 132 → Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly 또는 Val; 및 Lys 134 → Trp 또는 Tyr.
- [0439] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기의 치환을 포함한다: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp 또는 Gln 및 Cys 87 → Ser.
- [0440] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 28, 36, 40 내지 41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 21개의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0441] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 천연 야생형 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 아미노산 치환의

하기 세트 중 하나를 포함한다:

- [0442] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0443] Gln 28 → His; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Met; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Met; Lys 134 → Trp;
- [0444] Gln 28 → His; Leu 36 → Ile; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Ala; Lys 125 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0445] Gln 28 → His; Ala 40 → Asn; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Ile; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0446] Gln 28 → His; Ala 40 → His; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ala; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Trp;
- [0447] Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Asn; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Thr; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Tyr;
- [0448] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Gly; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Ile; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0449] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0450] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- [0451] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Trp;
- [0452] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- [0453] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Phe; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87

→ Ser; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

[0454] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

[0455] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;

[0456] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;

[0457] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

[0458] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

[0459] Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp; 또는

[0460] Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp.

[0461] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 SEQ ID NO:19 내지 37로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0462] 또 다른 구현예에서, 상기 뮤테인은 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있다.

[0463] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 Pvd 타입 III 숙시닐, Pvd 타입 III 숙신아미드 및 Pvd 타입 III α-케토글루타릴에 결합할 수 있다.

[0464] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의 IC50 값으로 피오베르딘 타입 III에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.

[0465] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd III 균주의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.

[0466] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 36, 40 내지 42, 45 내지 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105 내지 106, 125, 127, 132, 134 및 145에 해당하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.

[0467] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 돌

연변이된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함한다: Leu 36 → Phe 또는 Glu; Ala 40 → Trp, Leu 또는 Arg; Ile 41 → Met, Arg, Ala, Leu 또는 Trp; Gln 49 → His, Ile, Arg, Lys, Met 또는 Pro; Tyr 52 → Asn, Tyr, Arg, Ser 또는 Met; Ser 68 → Asp, Asn, Glu 또는 Gln; Leu 70 → Lys, Asn 또는 Arg; Arg 72 → Leu, Arg, Gln 또는 Tyr; Lys 73 → His, Leu, Ala, Pro, Gln 또는 Tyr; Asp 77 → Ala, Ile, Lys, Gln 또는 Arg; Trp 79 → Ser 또는 Asp; Arg 81 → His, Ala, Ser 또는 Val; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Gly, Leu 또는 Val; Tyr 100 → Ala, Ile, Asn, Pro 또는 Asp; Leu 103 → Gln, Gly, Phe 또는 Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp 또는 Thr; Ser 127 → Val, His, Ile, Phe 또는 Ala; Tyr 132 → Phe; 및 Lys 134 → Trp, Gln 또는 Glu.

[0468] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함한다: Gln 28 → His; Leu 42 → Arg; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Asp 47 → Asn; Asn 65 → Asp; Cys 87 → Ser; Ser 105 → Pro 및 Thr 145 → Pro.

[0469] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 28, 36, 40 내지 42, 45 내지 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72 내지 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105 내지 106, 125, 127, 132, 134 및 145에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 21개의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.

[0470] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 아미노산 치환의 하기 세트 중 하나를 포함한다:

[0471] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Met; Gln 49 → His; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Gln; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → His; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Gln;

[0472] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Arg; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Tyr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Asn; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Ile; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

[0473] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Arg; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ala; Leu 103 → Phe; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Ala; Lys 134 → Glu;

[0474] Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

[0475] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0476] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0477] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Val; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

[0478] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96

→ Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

- [0479] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → -; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0480] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0481] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;
- [0482] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0483] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- [0484] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;
- [0485] Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; 또는
- [0486] Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp.
- [0487] 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:38 내지 53으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0488] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 6에 본질적으로 기재된 검정에서 Biacore T200 기계로 측정시 약 20 nM 이하의  $K_D$ 로 철과 복합체화된 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0489] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 검정에서 측정시 약 500 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0490] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖지 않는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0491] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 실시예 5에 본질적으로 기재된 검정에서 측정시 약 200 nM 이하의 IC50 값으로 측정된 친화성으로 복합체화된 철을 갖는 및 복합체화된 철을 갖지 않는 피오켈린에 결합할 수 있다.
- [0492] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 7에 본질적으로 기재된 경쟁 ELISA 포맷에서 약 150 nM 이하의

IC50 값으로 피오켈린에 의해 매개되는 철 흡수를 억제할 수 있다.

- [0493] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 실시예 8에 본질적으로 기재된 검정에서 Pvd I 넥-아웃( $\Delta$ pvdA)의 박테리아 성장을 억제할 수 있다.
- [0494] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 위치 28, 34, 36, 40 내지 41, 44 내지 46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 및 141에 상응하는 하나 이상의 위치에 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0495] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 돌연변이된 아미노산 잔기 중 적어도 하나를 포함한다: Leu 36 → His, Met 또는 Val; Ala 40 → Ile, Gln, Tyr 또는 Phe; Ile 41 → Leu, His 또는 Trp; Gln 49 → His, Arg, Ser 또는 Ala; Tyr 52 → Leu, Trp 또는 Pro; Ser 68 → Asp 또는 His; Leu 70 → Arg 또는 Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser 또는 Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln 또는 Arg; Asp 77 → Arg, Thr, Pro 또는 Asp; Trp 79 → Ala, Arg, Lys 또는 Asp; Arg 81 → Thr, Ile 또는 Trp; Asn 96 → Met, Asn, Pro 또는 Ala; Tyr 100 → Gly, His 또는 Glu; Leu 103 → Gly, Met, His 또는 Gln; Tyr 106 → Met, Gly, Arg 또는 Trp; Lys 125 → Trp, Phe, Gly 또는 Leu; Ser 127 → Arg, Trp, Asp 또는 Ile; Tyr 132 → Ala, Glu 또는 Thr; 및 Lys 134 → Leu, Val, Asn 또는 Phe.
- [0496] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 하기 치환을 포함한다: Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg 또는 Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser 및 Thr 141 → Ala.
- [0497] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 인간 NGAL의 선형 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:1)의 서열 위치 28, 34, 36, 40 내지 41, 44 내지 46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72 내지 74, 77, 79 내지 81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 및 141에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 21개의 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0498] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙 hNGAL의 선형 폴리펩티드 서열과 비교하여 아미노산 치환의 하기 세트 중 하나를 포함한다:
- [0499] Gln 28 → His; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Leu; Ser 68 → His; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Lys; Lys 73 → Trp; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Leu;
- [0500] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- [0501] Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;
- [0502] Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ala; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Arg; Lys 125 → Leu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Asn;
- [0503] Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;
- [0504] Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81

→ Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;

- [0505] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- [0506] Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; 또는
- [0507] Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.
- [0508] 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:54 내지 63으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0509] 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2 내지 63으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0510] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 야생형 hNGAL의 1개 이상의 아미노산을 치환하는 1개 이상의 비-천연 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0511] 또 다른 구현예에서, 상기 hNGAL 뮤테인은 또 다른 아미노산에 의한 천연 시스테인 잔기의 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0512] 또 다른 구현예에서, 상기 또 다른 아미노산은 세린 잔기이다.
- [0513] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 유기 분자, 효소 표지, 방사성 표지, 착색된 표지, 형광 표지, 발색 표지, 발광 표지, 합텐, 디곡시게닌, 비오틴, 세포증식 억제제, 독소, 금속 복합체, 금속, 및 콜로이드성 금속으로 구성된 군으로부터 선택된 화합물에 컨쥬게이션된다.
- [0514] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 이의 N-말단 및/또는 이의 C-말단에서 단백질, 또는 단백질 도메인 또는 펩티드인 융합 파트너에 융합된다.
- [0515] 또 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 폴리펩티드의 혈청 반감기를 연장시키는 화합물에 컨쥬게이션된다.
- [0516] 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 폴리알킬렌 글리콜 분자, 하이드로에틸스타치, 면역글로불린의 Fc 부분, 면역글로불린의 CH3 도메인, 면역글로불린의 CH4 도메인, 알부민 결합 펩티드, 및 알부민 결합 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 혈청 반감기를 연장시키는 화합물을 포함한다.
- [0517] 또 다른 구현예에서, 폴리알킬렌 글리콜은 폴리에틸렌(PEG) 또는 이의 활성화된 유도체이다.
- [0518] 또 다른 구현예에서, 본원에 언급된 폴리펩티드 중 임의의 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자가 포함된다.
- [0519] 또 다른 구현예에서, 핵산 분자는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되어 상기 핵산 분자의 발현을 가능하도록 한다.
- [0520] 또 다른 구현예에서, 핵산 분자는 벡터 또는 과지미드 벡터 내에 포함된다.
- [0521] 또 다른 구현예에서, 본원에 언급된 것 중 임의의 것의 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포가 포함된다.
- [0522] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 폴리펩티드 중 임의의 폴리펩티드를 생성시키는 방법이 포함되며, 상기 폴리펩티드는 유전 공학 방법에 의해 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로부터 시작하여 생성된다.
- [0523] 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 박테리아 또는 진핵생물 숙주 유기체에서 생성되며, 상기 숙주 유기체 또는 이의 배양물로부터 분리된다.

- [0524] 또 다른 구현예에서, (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 포함된다.
- [0525] 또 다른 구현예에서, 조성물은 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 2종 이상의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0526] 또 다른 구현예에서, 조성물은 (i) 피오베르딘 타입 I에 특이적인 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 특이적인 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 특이적인 폴리펩티드 및 (iv) 피오켈린에 특이적인 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 3종 또는 4종의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0527] 또 다른 구현예에서, 조성물은 피오베르딘 타입 I에 특이적인 폴리펩티드를 포함한다.
- [0528] 또 다른 구현예에서, 조성물은 피오베르딘 타입 II에 특이적인 폴리펩티드를 포함한다.
- [0529] 또 다른 구현예에서, 조성물은 피오베르딘 타입 III에 특이적인 폴리펩티드를 포함한다.
- [0530] 또 다른 구현예에서, 조성물은 피오켈린에 특이적인 폴리펩티드를 포함한다.
- [0531] 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 적어도 1종의 약학적으로 허용되는 애쥬번트, 희석제 또는 담체를 추가로 포함한다.
- [0532] 또 다른 구현예에서, 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린을 결합시키는 방법은 상기 대상체에 유효량의 본원에 언급된 조성물 중 임의의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0533] 또 다른 구현예에서, 대상체에 유효량의 본원에 언급된 것 중 임의의 것의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 P. 에어루지노사의 성장을 억제하거나 감소시키기 위한 방법이 포함된다.
- [0534] 또 다른 구현예에서, 개별적이거나 혼합된 1개 이상의 용기, 및 본원에 언급된 것 중 임의의 것의 조성물을 포함하는 키트가 포함된다.
- [0535] 또 다른 구현예에서, 대상체에서의 피오베르딘 타입 I, II, III 및/또는 피오켈린의 결합을 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드의 용도가 포함된다.
- [0536] 또 다른 구현예에서, 대상체에서 피오켈린 및/또는 피오베르딘을 통한 P. 에어루지노사에 의한 철-흡수를 방지하거나 감소시키기 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드의 용도가 포함된다.
- [0537] 또 다른 구현예에서, 대상체에서 P. 에어루지노사 균막 감염의 치료 또는 경감을 위한 (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드의 용도가 포함된다.
- [0538] 또 다른 구현예에서, P. 에어루지노사 균막 감염은 급성 또는 만성 감염이다.
- [0539] 또 다른 구현예에서, 상기 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 폴리펩티드는 조합하여, 예를 들어, 동시적, 동반적 또는 연속적으로 투여된다.
- [0540] 또 다른 구현예에서, 상기 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 폴리펩티드는 독립적 시점에서의 개별적 간격을 포함하여 서로 독립적으로 투여된다.
- [0541] 또 다른 구현예에서, 조합물은 (i) 피오베르딘 타입 I에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드, (ii) 피오베르딘 타입 II에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드

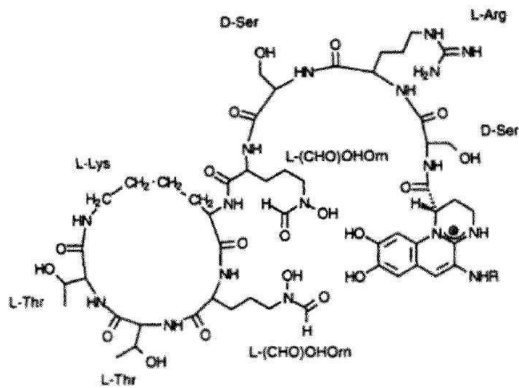
드, (iii) 피오베르딘 타입 III에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드 및/또는 (iv) 피오켈린에 결합할 수 있는 본원에 언급된 임의의 폴리펩티드에 따른 폴리펩티드를 포함한다.

[0542]

본원에 예시적으로 기재된 구현에는 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에서 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "함유하는" 등은 제한 없이 광범위하게 해석될 것이다. 또한, 본원에서 사용된 용어 및 표현은 제한이 아니라 설명의 용어로서 사용되었고, 상기 용어 및 표현의 사용에서 제시되고 기재된 특징 또는 이의 일부의 임의의 등가물을 배제하고자 하는 것은 아니었으며, 청구된 본 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능성이 인지된다. 따라서, 본 발명의 구현에는 바람직한 구현에 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되었으나, 이의 변형 및 변화가 당업자에 의해 이용될 수 있고, 이러한 변형 및 변화가 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주되는 것이 이해되어야 한다. 본원에 기재된 모든 특허, 특허 출원, 교과서 및 동료 심사 간행물은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 또한, 본원에 참조로서 포함되는 참조에서의 용어의 정의 또는 사용이 본원에 제공된 이러한 용어의 정의와 일치하지 않거나 반대되는 경우, 본원에 제공된 상기 용어의 정의가 적용되며, 참조에서의 상기 용어의 정의는 적용되지 않는다. 일반적인 개시 내에 속하는 더 협소한 중 및 하위개념 무리 각각이 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이는 삭제된 요소가 본원에서 구체적으로 열거되거나 그렇지 않은지의 여부와 상관없이 어떠한 주제를 군으로부터 배제하는 단서 또는 부정적 제한이 있는 본 발명의 일반적 설명을 포함한다. 또한, 특징이 마커시(Markush) 그룹으로 기재된 경우, 당업자는 상기 개시가 또한 마커시 그룹의 임의의 개별적 일원 또는 일원들의 하위그룹에 의해 기재되는 것으로 인지할 것이다. 추가의 구현예가 하기 청구항으로부터 명백해질 것이다.

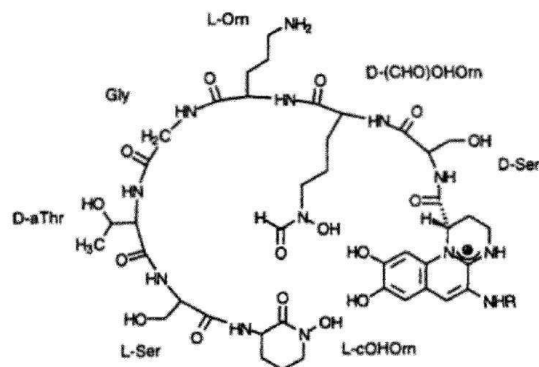
도면

도면1a



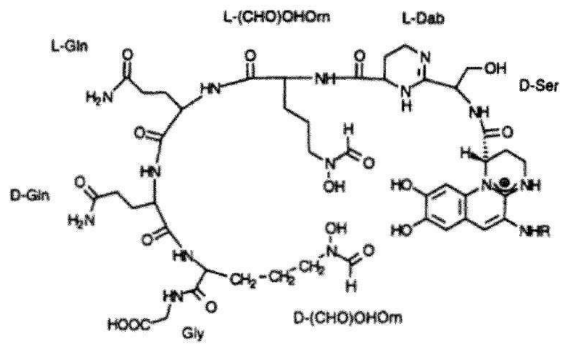
PVD 그룹 I  
P. 에어루지노사 ATCC 15692 (PAO1)

도면1b



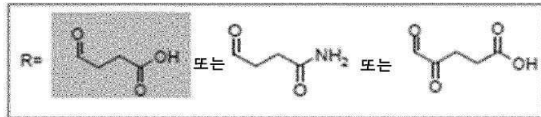
PVD 그룹 II  
P. 에어루지노사 ATCC 27853

도면1c

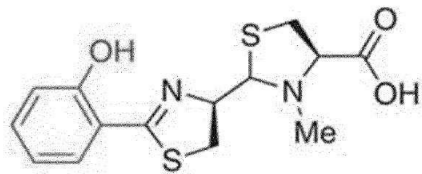


PVD 그룹 III  
P. 에어루지노사 R 및 Pa6

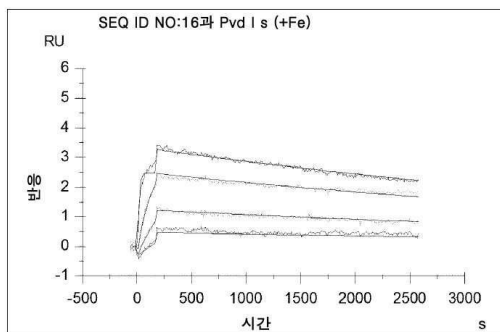
도면1d



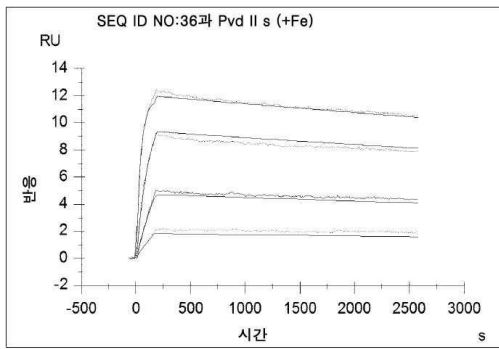
도면1e



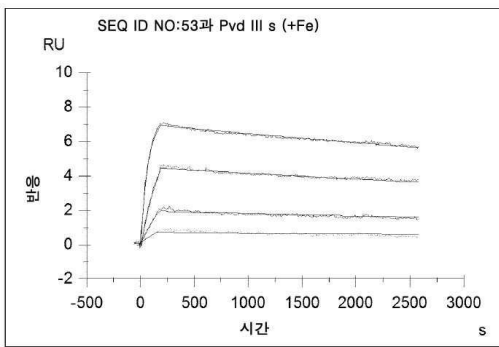
도면2a



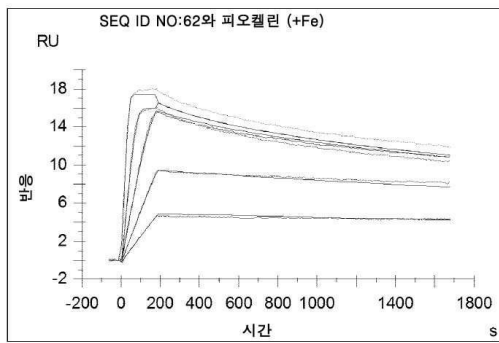
도면2b



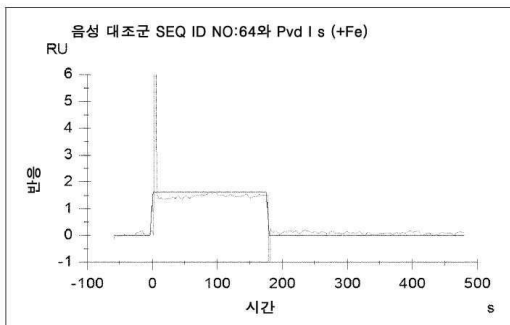
도면2c



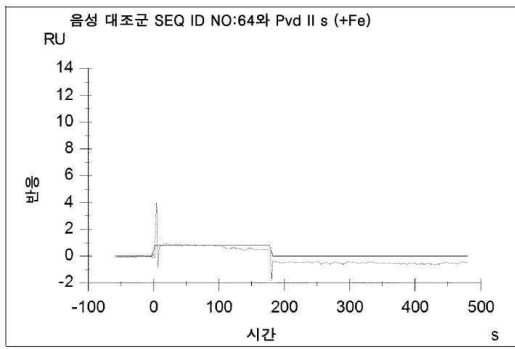
도면2d



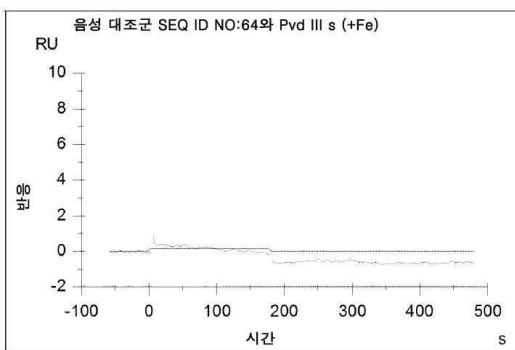
도면2e



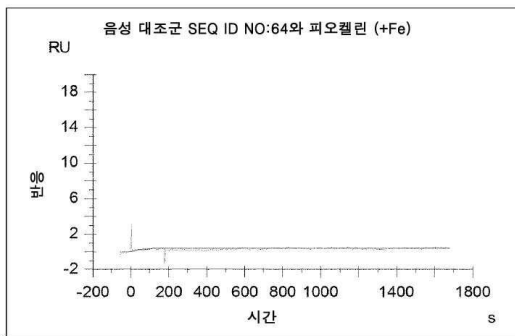
도면2f



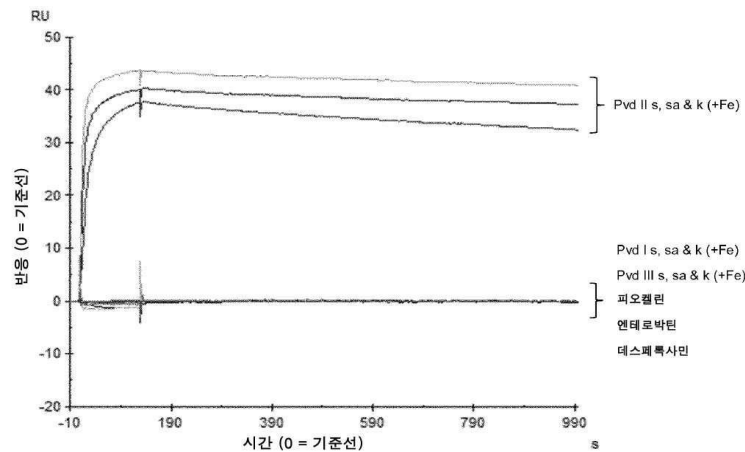
도면2g



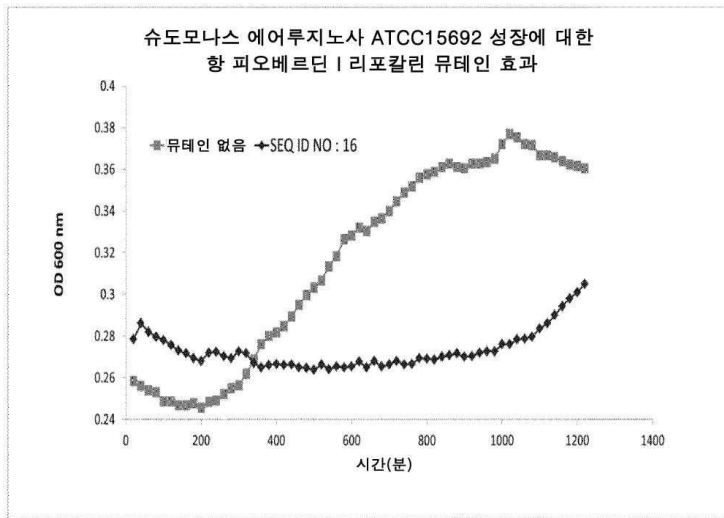
도면2h



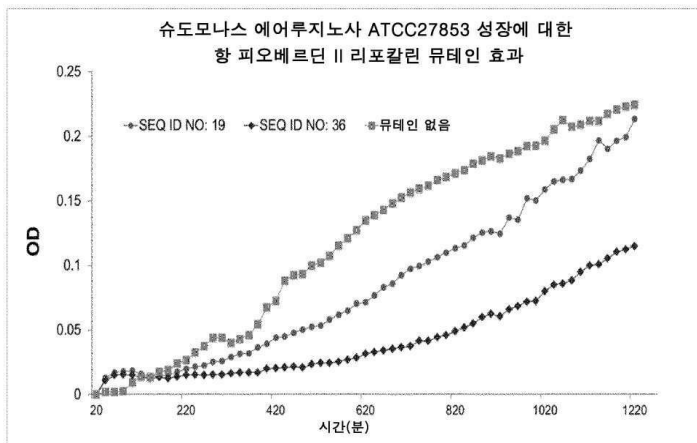
도면3



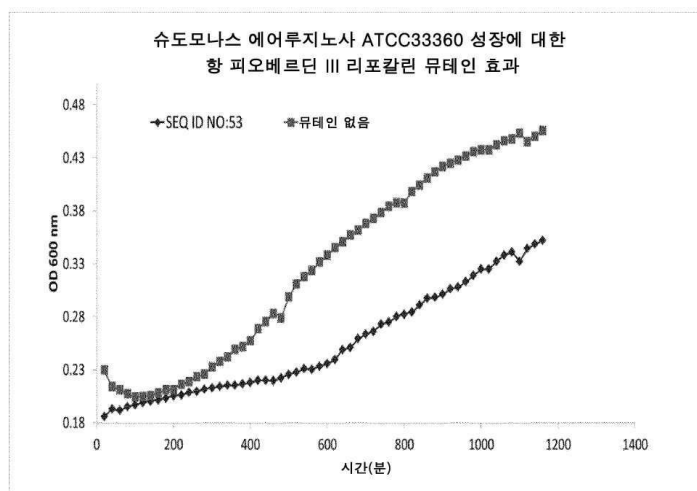
도면4a



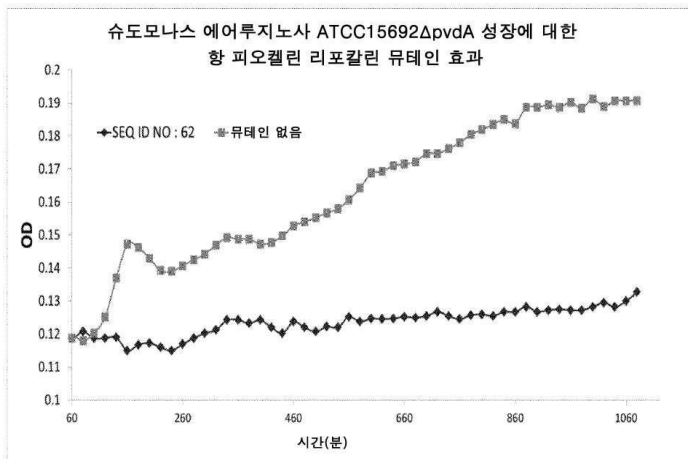
도면4b



도면4c

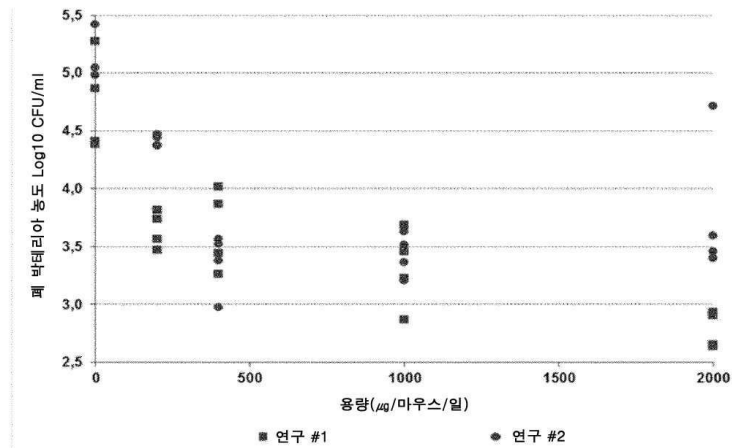


도면4d



도면5

마우스의 P. 에어루지노사 유발 폐 감염에서의 SEQ ID NO:19의 용량-효과



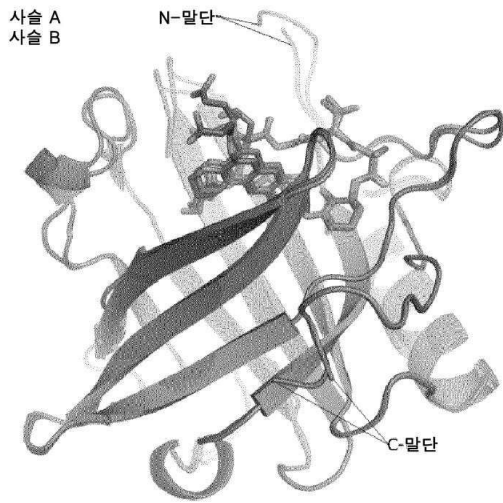
도면6

발현된 단백질 아미노산 서열(SEQ ID NO:129)

MKHHHHHDYDIPTTENLYFQGQDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHG  
 KWYVVGVAGNTILREDKDPGKMNATIYELKEDKSYNVTDVRFIRKKCHYIDT  
 FVPGSQPGEFTLGNIKSYPGTTSQVLVSTNYNQHAMVFFKIVRQNRIFW  
 ITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

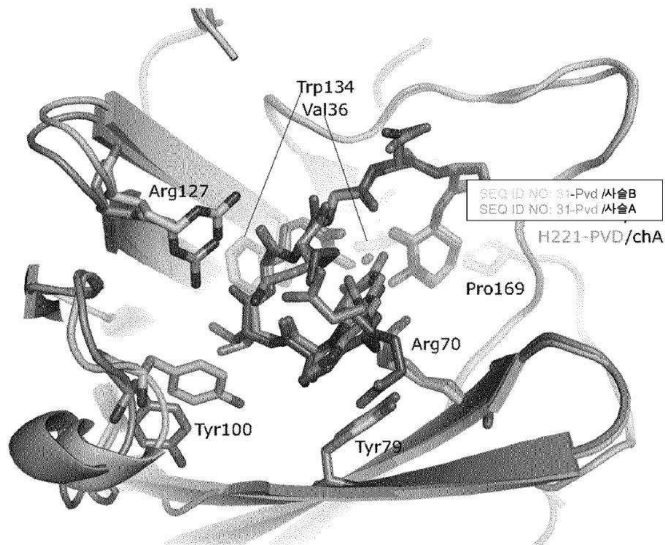
도면7

SEQ ID NO:31 - Pvd-Fe 복합체 구조, 2개의 SEQ ID NO:31 분자, 즉, 비대칭 유닛으로부터의 사슬 A 및 사슬 B가 중첩된다.



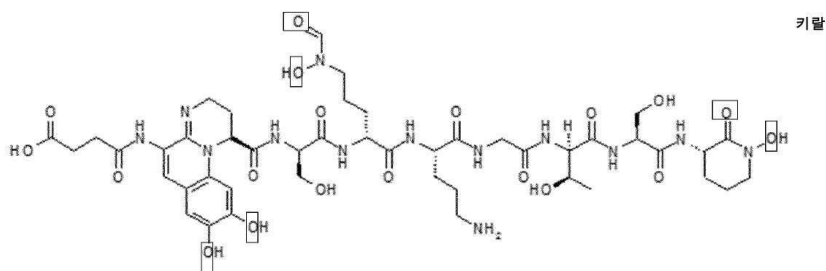
도면8

SEQ ID NO:31 및 Pvd-Fe 상호작용. 비대칭 유닛으로부터의 2개의 분자가 중첩된다. Pvd-Fe와 상호작용하는 측쇄가 도시된다



도면9

Pvd 조성, 철 결합과 관련된 산소 원자가 박스로 표시된다



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sanofi

<120> Novel proteins specific for pyoverdine and pyochelin

<130> DE2015/028 WOPCT

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NGAL wt

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

145                      150                      155                      160  
  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
  
                                  165                      170                      175  
 Asp Gly  
  
 <210> 2  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0466.12C05  
 <400> 2  
  
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1                      5                      10                      15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
                                  20                      25                      30  
  
  
 Val Val Gly Asn Ala Gly Asn Gly Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
                                  35                      40                      45  
 Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
                                  50                      55                      60  
 Asn Val Thr Val Val Gln Phe Trp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Gln Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly His  
                                  85                      90                      95  
  
  
 Ile Lys Ser Lys Pro Gly His Thr Ser His Leu Val Arg Val Val Ser  
                                  100                      105                      110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Arg Val Trp Gln  
                                  115                      120                      125  
 Asn Arg Glu Trp Phe Asp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
                                  130                      135                      140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145                      150                      155                      160

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

Asp Gly

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.02P05

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09A08

<400> 4

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Ser Glu Lys Lys Cys Ser Tyr Ser Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09M05

<400> 5

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09E05

<400> 6

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

Asn Val Thr Val Val Asp Phe Glu Leu Lys Lys Cys Arg Tyr Met Ile  
 65                    70                    75                    80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09E13

<400> 7

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17L07

<400> 8

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

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

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

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

Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Glu Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Thr  
 65                    70                    75                    80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17010

<400> 9

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

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

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

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

Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Asp Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.19M08

<400> 10

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

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

20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Pro Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Glu Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp  
 85 90 95

Ile Lys Ser Asn Pro Gly Glu Thr Ser His Leu Val Arg Val Met Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Asp Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17003

<400> 11

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Pro Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Asp Lys Lys Cys Val Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly  
 85 90 95

Ile Lys Ser Asn Pro Gly Asn Thr Ser His Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Val Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

Asp Gly

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.05H10

<400> 12

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

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

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

Ile Lys Ser Ser Pro Gly Trp Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

Asp Gly

<210> 13

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.06H10

<400> 13

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Trp Ala Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Pro Lys Met Pro Ala Val Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60



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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0544.01B06\_H28Q\_N65D

<400> 15

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

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

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

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

Asp Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Glu Lys Glu Cys Ile Tyr Ser Thr  
 65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0544.04C04\_H28Q\_N65D

<400> 16

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

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

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

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

Asp Val Thr Asp Val Gln Phe Pro Glu Lys Glu Cys Ile Tyr Ser Thr  
 65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Ser Pro Gly Gln Thr Ser His Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Tyr Val Thr Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Gly Phe Asn Ile Ala Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.04N16\_N65D

<400> 17

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Gly Trp Leu Arg Glu Asp Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Leu Lys Met Met Ala Ala Val Tyr Glu Leu Arg Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asp Val Thr Val Val Asp Phe Glu Leu Glu Glu Cys Arg Tyr Met Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Phe Val Pro Gly Asn Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp  
 85 90 95

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Trp Phe His Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

<210> 18

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.04N16\_N65Q

<400> 18

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Gly Trp Leu Arg Glu Asp Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Leu Lys Met Met Ala Ala Val Tyr Glu Leu Arg Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Gln Val Thr Val Val Asp Phe Glu Leu Glu Glu Cys Arg Tyr Met Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Phe Val Pro Gly Asn Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp  
 85 90 95

Ile Lys Ser Ser Pro Gly Trp Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Tyr Gln  
 115 120 125

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

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

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

Asp Gly

<210> 19  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S447.3 M1.1\_N4  
 <400> 19

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

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

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

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

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.1 M1.1\_M5

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Asp Gly

<210> 22

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.8 M1.1\_F3

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 23

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.5 M1.1\_E8

<400> 23

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Gly Arg Lys Lys Cys His Tyr Trp Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 24

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S437.1 M1.1\_P2

<400> 24

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Arg Val Trp Phe Asn Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 25

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.1 M1.1\_I7

<400> 25

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
                   20                    25                    30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Thr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
                   35                    40                    45  
 Gly Lys Met Gly Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
                   50                    55                    60  
 Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Gly Arg Lys Lys Cys Gly Tyr Trp Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala  
                   85                    90                    95

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Ile Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser  
                   100                    105                    110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Asn Gln  
                   115                    120                    125  
 Asn Arg Glu Val Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
                   130                    135                    140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145                    150                    155                    160

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

Asp Gly

<210> 26

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06L06

<400> 26

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.08G23

<400> 27

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

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

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

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

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Ser Ile  
 65                    70                    75                    80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06G17

<400> 28

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

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

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

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

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Lys Lys Lys Cys Asn Tyr Phe Ile  
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 29

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.03N20

<400> 29

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

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

20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Gln Val Leu Arg Asp Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Glu Val Arg Phe His Asn Lys Lys Cys Asn Tyr Trp Ile  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn  
 85 90 95

Ile Lys Ser Asn Pro Gly His Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Lys Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Gly Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

<210> 30

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.05F20

<400> 30

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Met Asn Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Phe Lys Lys Cys His Tyr Tyr Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn  
 85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Met Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

Asp Gly

<210> 31

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22

<400> 31

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

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

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

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

Asp Gly

<210> 32

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06L06\_N65D\_S79F

<400> 32

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Glu Val Leu Arg Asp Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60



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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 34

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_T54A\_N65D

<400> 34

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 35

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_T54A\_N65Q

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

<210> 36

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_H28Q\_T54A\_N65D

<400> 36

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Met Asn Ala Ala Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asp Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys Lys Cys His Tyr Tyr Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn  
 85 90 95

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Ile Val Arg Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160

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

Asp Gly

<210> 37

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_N65Q

<400> 37

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 38

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.14D07

<400> 38

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

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

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

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

Asn Val Thr Glu Val Lys Phe Gln Ala Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Ile  
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 39

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.05N20

<400> 39

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

1                      5                      10                      15

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

                         20                      25                      30

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

                         35                      40                      45

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

                         50                      55                      60

Asn Val Thr Gln Val Asn Phe Trp Leu Lys Lys Cys Ala Tyr Ser Ile

65                      70                      75                      80

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

                         85                      90                      95

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

                         100                      105                      110

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

                         115                      120                      125

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

                         130                      135                      140

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

145                      150                      155                      160  
  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
  
                                  165                      170                      175  
 Asp Gly  
  
 <210> 40  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0466.16B14  
 <400> 40  
  
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1                      5                      10                      15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
                                  20                      25                      30  
  
  
 Val Val Gly Phe Ala Gly Asn Leu Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
                                  35                      40                      45  
 Arg Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
                                  50                      55                      60  
 Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Leu Tyr Lys Lys Cys Ile Tyr Ser Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Ala Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly  
                                  85                      90                      95  
  
  
 Ile Lys Ser Ala Pro Gly Phe Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser  
                                  100                      105                      110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Trp Val Ala Gln  
                                  115                      120                      125  
 Asn Arg Glu Tyr Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
                                  130                      135                      140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145                      150                      155                      160

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

Asp Gly

<210> 41

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.15E20

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 42

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.13C10

<400> 42

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Gln Tyr Asp Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 43

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.11H24

<400> 43

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 44

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.01M12\_x103Q

<400> 44

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 45

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.01F10\_x103Q

<400> 45

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 46

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.10A04\_x103Q

<400> 46

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

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

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

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

Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg Tyr Lys Lys Cys Gln Tyr Asp Ile  
 65                    70                    75                    80

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

Pro Gly Gln Thr Ser Glu Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn  
                   100                    105                    110

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

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

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

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

<210> 47

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07G09

<400> 47

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

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

Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Arg Arg Glu Asp Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile  
 65 70 75 80  
 Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gln Thr Pro Glu Leu Val Arg Val Val Ser  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile  
 165 170 175  
 Asp Gly  
 <210> 48  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0530.07K20  
 <400> 48  
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30  
 Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asn Pro







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

165 170 175  
 Asp Gly

<210> 52

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07K21\_N65D

<400> 52

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30  
 Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Gly Arg Asp Pro

35 40 45  
 Met Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asp Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile  
 65 70 75 80  
 Val Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Leu  
 85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Gly

<210> 53

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07G09\_H28Q\_N65D

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Glu Val Arg Phe Arg His Lys Lys Cys Lys Tyr Asp Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Val Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Tyr Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175  
 Asp Gly

<210> 54

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04F12

<400> 54

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30  
 Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ile Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45  
 His Lys Met Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr His Val Thr Phe Lys Trp Lys Lys Cys Tyr Tyr Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Met  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Glu Pro Gly His Thr Ser Met Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Trp Val Asp Gln

115 120 125  
 Asn Arg Glu Glu Phe Leu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175  
 Asp Gly

<210> 55  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0455.04F23  
 <400> 55

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
 20 25 30  
 Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45  
 Arg Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr Asp Val Asp Phe Ala Ile Lys Lys Cys His Tyr Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser His Pro Gly Gly Thr Ser Gly Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Ile Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

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

165 170 175  
 Asp Gly

<210> 56

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04F09

<400> 56

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

35 40 45  
 Ser Lys Met Pro Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
 50 55 60  
 Asn Val Thr His Val Pro Phe Trp Ala Lys Lys Cys Ala Tyr Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Gly Pro Gly Met Thr Ser Trp Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Trp Gln  
 115 120 125  
 Asn Arg Glu Thr Phe Val Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145                    150                    155                    160  
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

                         165                    170                    175  
 Asp Gly

<210> 57

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04M08

<400> 57

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr  
                          20                    25                    30  
 Val Val Gly Val Ala Gly Asn Tyr Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

                         35                    40                    45  
 Ala Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr  
                          50                    55                    60  
 Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Trp Arg Lys Lys Cys Arg Tyr Asp Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Pro  
                          85                    90                    95  
 Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gln Thr Ser Arg Leu Val Arg Val Val Ser

                         100                    105                    110  
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Leu Val Arg Gln  
                          115                    120                    125  
 Asn Arg Glu Ala Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu  
                          130                    135                    140  
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly  
 145                    150                    155                    160

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

165 170 175

Asp Gly

<210> 58

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.15K24

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr His Val Pro Phe Trp Ala Lys Lys Cys Ala Tyr Lys Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Ser Lys Gly Val Trp Gln

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asp Gly

<210> 59

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0527.05N11

<400> 59

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

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

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

35 40 45

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

Asn Val Thr His Val Pro Phe Trp Ala Lys Lys Cys Ala Tyr Lys Thr  
 65 70 75 80

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

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

100 105 110

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

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

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

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

165 170 175

Asp Gly

<210> 60

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05A05

<400> 60

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Glu Gly Arg Asp Pro

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 61

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05M06

<400> 61

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Gly Asp Tyr Asp Pro

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 62

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05A05\_H28Q\_N65D

<400> 62

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Val Val Gly His Ala Gly Asn Gln Trp Leu Arg Glu Gly Arg Asp Pro

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asp Gly

<210> 63

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05M06\_N65D

<400> 63

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

<210> 64

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3004wt = NGAL98

<400> 64

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

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

                         165                    170                    175  
 Asp Gly

<210> 65

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.12C05

<400> 65

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag            60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtatgtcg tgggcaatgc cggaaatgga            120  
 tggctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa            180

gataaatcat ataacgtcac cgttgtgcaa ttttgggaca agaaatgcct gtaccaaatt 240  
 caaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccacat taaaagtaaa 300

ccgggccaca catcacactt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agcgtgtgtg gcagaaccgc gagtggtttg acatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 66  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0466.02P05  
 <400> 66

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcaccgc cggaaatgga 120

ttcctgcgtg aggataagga tccgctgaaa atgtgggcca ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cagcgtgtgg ttgcaactga agaaatgcta ctacgacatt 240  
 ggaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagttag 300  
 ccgggccaca catcacaatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agtgggtgaa tcagaaccgc gagaattttc aaatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 67  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0466.09A08  
 <400> 67

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatacc 120  
 accctgcgtg aggataagga tccgctaaa atgctgcca ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcaa tttagcgaga agaaatgcag ctacgacatt 240  
 atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggaat taaaagtaat 300

ccgggcaaaa catcacactt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agtacgtggc acagaaccgc gagggattta atalcacact gtacggggcg 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 68

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09M05

<400> 68

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggccttgc cggaaataat 120

cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgacgtgacc tttgaggcaa agaaatgccg ttaccgtatt 240

atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggctacat taaaagtaaa 300

ccgggcctca catcattctt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agacgtgac ccagaaccgc gagggtttg gaatcacact gtacggggcg 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 69

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09E05

<400> 69

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtc tgggccttgc cggaaatgga 120

tggctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgttgtggac tttgagctga agaaatgccg ttacatgatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taaaagtttc 300

ccgggctgga catcacaatt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agggagtgta ccagaaccgc gagggtttc acatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 70

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.09E13

<400> 70

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgttgc cggaaatttc 120

ttcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgtgg tttctgaata agaaatgcca atacgagatt 240

cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gaggttactt taggctacat taaaagttac 300

ccgggtctaca catcacactt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca aggttgtgca ccagaaccgc gataaatttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 71

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17L07

<400> 71

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgtggc cggaaatcgc 120

acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcctgaga agaaatgcat ttactctact 240

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gaggttactt taggcggtat taaaagtagt 300

ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agtatgtgat tcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 72

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17010

<400> 72

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatcgc 120

acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttccggata agaaatgcat ttactcgatt 240

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtaat 300

ccgggcgata catcacattt ggtcccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agtatgtggt gcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 73

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.19M08

<400> 73

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatcgc 120

acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcctgaga agaaatgcac gtactcgatt 240

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtaat 300

ccgggcgaga catcacattt ggtcccgctc atgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agtatgtgga tcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 74

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.17003

<400> 74

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatact 120  
 acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttccggata agaaatgcgt gtactcgatt 240  
 attaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtaat 300  
 ccgggcaata catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca agtatgtggt gcagaaccgc gaggggttta atatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 75

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.05H10

<400> 75

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggccttgc cggaaatggt 120  
 tggctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgtggtggat tttagactta agaaatgcag gtacatgatt 240  
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagtctt 300  
 ccgggctgga catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agggggtgta tcagaaccgc gagtggtttc atatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 76

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.06H10

<400> 76

caggactcca cctcagacct gateccagcc ccacctctga gcaaggtccc tetgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatcg 120  
 acgctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240  
 attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300  
 ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgtttctca agiatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcacgct gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 77

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.04N16

<400> 77

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggccttgc cggaaatggt 120  
 tggctgcgtg aggatgagga tccgcctaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240

gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300  
 ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgtttctca aggggtgta tcagaaccgc gagtggtttc atatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 78

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0544.01B06\_H28Q\_N65D

<400> 78

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggagatacg 120

acgtcgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgatgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300

ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agtatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcgctct gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 79

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0544.04C04\_H28Q\_N65D

<400> 79

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tgggctgggc cggaaatcag 120

gctctcgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgcctgcgg tcatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgatgtcac cgatgtgcag tttcccgaga aggaatgcat ttactctact 240

attacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtagt 300

ccgggccaga catcacattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agtatgtgac tcagaaccgc gaggggttta atatcgctct gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 80

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.04N16\_N65D

<400> 80  
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120  
  
 tggctgcgtg aggatgagga tccgcttaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240  
 gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300  
 ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agggggtgta tcagaaccgc gagggtttc atatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 81

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.04N16\_N65Q

<400> 81

caggactcca cctcagacct gateccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccttgc cggaaatggt 120  
 tggctgcgtg aggatgagga tccgcttaaa atgatggcgg ccgtttacga gttgagagaa 180  
 gataaatcat atcaggtcac cgtggtggat tttgagcttg aggaatgcag gtacatgact 240  
 gagacctttg tgccggggaa ccagccgggc gagtttactt taggcgatat taaaagttct 300  
 ccgggctgga catcacagct ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
  
 gtgttcttca agggggtgta tcagaaccgc gagggtttc atatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 82

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S447.3 M1.1\_N4

<400> 82

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgttgc cggaaatgag 120  
 gttctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt tttcacaata agaaatgcaa ttacagcatt 240  
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtaat 300  
 ccgggccaaa catcaatggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agaaagtgaa acagaaccgc gagggatfff ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatffffatcc gctffffcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 83

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.1 M1.1\_M5

<400> 83

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccttgc cggaaatacc 120  
 atcctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcgt tttatcatga agaaatgcca ctactacatt 240  
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagtaat 300  
 ccgggcacca catcacaatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agatcgtcgc tcagaaccgc gagatgtfff ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatffffatcc gctffffcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 84

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.5 M1.1\_L10

<400> 84

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcatcgc cggaaatacc 120  
 gttctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgctg tttgaccta agaaatgcat ctacagcatt 240

agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagtagc 300

ccgggcggaa catcagcatt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca agaaagtgag ccagaaccgc gaggtttttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgctc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 85

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.8 M1.1\_F3

<400> 85

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcctggc cggaaataat 120

atcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgctg tttagccaaa agaaatgcat gtacgcaatt 240

tacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgtat taaaagtctt 300

ccgggcacca catcaatctt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgttcttca agaaagtgat gcagaaccgc gagttctttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgctc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 86

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.5 M1.1\_E8

<400> 86

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcctggc cggaaatcac 120

atcctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgctg tttggacgta agaaatgcca ctactggatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgtat taaaagtac 300

ccgggcatga catcattctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca aggcagtgga ccagaaccgc gagaattttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 87

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S437.1 M1.1\_P2

<400> 87

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcaatgc cggaaatgga 120

cgctcgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac ccgtgtgtgg tttaatcaaa agaaatgcaa atacgacatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgat taaaagtacc 300

ccgggctgga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaatgtgat gcagaaccgc gagatctttt acatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 88

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S449.1 M1.1\_I7

<400> 88

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgttgc cggaaatacc 120

accctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgggagcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt ttggacgta agaaatgcgg atactggatt 240

gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgaat taaaagtgg 300

ccgggcatca catcaggatt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gigtcttca agaaagtga tcaaacgc gaggttttt ggatcacact gtacgggccc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 89

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06L06

<400> 89

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatgag 120

gtgctgcgtg atgataagga tccgggaaa atgcctcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttactcgatt 240

gagaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300

ccgggctga catcaatgtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gigtcttca agaatgtga gcgaaccgc gagggtttt ggatcacact gtacgggccc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 90

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.08G23

<400> 90

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatgag 120

gtgctgcgtg atgataagga tccgggaaa atgcctcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttactctatt 240

gagaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtat 300

ccgggccaga catcaatgtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaaggtgaa gcagaaccgc gaggtgtttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534  
 <210> 91  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0475.06G17  
 <400> 91  
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgttgc cggaaatcag 120  
 gtgctgcgtg acgataagga tccgggtaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgg tttcataaga agaaatgcaa ttactttatt 240  
  
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtcac 300  
 ccgggccaga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agaaggtgaa gcagaaccgc gaggcgtttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534  
 <210> 92  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0475.03N20  
 <400> 92  
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgttgc cggaaatcag 120  
 gtgctgcgtg atgataagga tccgggtaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcataata agaaatgcaa ttactggatt 240  
 gagacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtaat 300  
 ccgggccata catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agaaggtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 93

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.05F20

<400> 93

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgttgc cggaaatcg 120

attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgagg tttattttta agaaatgcca ttactatatt 240

gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtat 300

ccgggcatga catcacagtt ggtcccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 94

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22

<400> 94

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgttgc cggaaatcact 120

attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcaa ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgatgtgagg tttatttagga agaaatgcca ttactatatt 240

gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtat 300

ccgggcacta catcacagtt ggtcccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 95

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06L06\_N65D\_S79F

<400> 95

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatgag 120  
 gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgatgtcac cgaggtgagg ttccataata agaaatgcaa ttacttcatt 240  
 gagaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300  
 ccgggcgtga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaatgtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 96

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0475.06L06\_N65Q\_S79F

<400> 96

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatgag 120  
 gtgctgcgtg atgataagga tccggggaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atcaggtcac cgaggtgagg ttccataata agaaatgcaa ttacttcatt 240  
 gagaccttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaagat taaaagtaat 300  
 ccgggcgtga catcaatgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agaatgtgaa gcagaaccgc gaggggtttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 97

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_T54A\_N65D

<400> 97

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tetgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatact 120  
 attctgcgtg aggataagga tccgggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgatgtcac cgatgtgagg ttatttagga agaaatgcca ttactatatt 240  
 gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttat 300  
 ccgggcacta catcacagtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatTTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 98

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_T54A\_N65Q

<400> 98

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgtggc cggaaatact 120  
 attctgcgtg aggataagga tccgggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atcaggtcac cgatgtgagg ttatttagga agaaatgcca ttactatatt 240

gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttat 300  
 ccgggcacta catcacagtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatTTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 99

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_H28Q\_T54A\_N65D

<400> 99

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tgggcgtggc cggaaatact 120

attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcag ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgatgtcac cgatgtgagg tttattagga agaaatgcca ttactatatt 240

gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300

ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 100

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0474.01H22\_N65Q

<400> 100

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgtggc cggaaatact 120

attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgaatgcaa ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atcaggtcac cgatgtgagg tttattagga agaaatgcca ttactatatt 240

gatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtatt 300

ccgggcacta catcacagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agattgtgag gcagaaccgc gagatttttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 101

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.14D07

<400> 101

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaattgg 120  
  
 atgctgcgtg aggataagga tccgcacaaa atgaatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgaaa tttcaagcaa agaaatgcat ctacagcatt 240  
 cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatcat taaaagtaat 300  
 ccgggcggaa catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agtgggtgca ccagaaccgc gagttctttc aatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 102

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.05N20

<400> 102

caggactcca cctcagacct gateccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaatcgt 120  
 tggctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgtacgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac ccaagtgaat ttttggctga agaaatgcgc atacagcatt 240  
 agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccgtat taaaagtatc 300  
 ccgggcctta catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
  
 gtgttcttca agaccgtgat ccagaaccgc gagttctttg agatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 103

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.16B14

<400> 103

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcttcgc cggaaatctg 120  
 ctgctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgcgtgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgacgtgcgt tttctgtaca agaaatgcat ctacagcatt 240  
 gcaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggaat taaaagtga 300  
 ccgggcttca catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agtgggtggc acagaaccgc gagtactttg agatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 104

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.15E20

<400> 104

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcttcgc cggaaattgg 120  
 cgtctgcgtg aggataagga tccgcctaaa atgagcgcca ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac caatgtgcgt ttttggccta agaaatgccg ttacagcatt 240  
 agcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagtctt 300  
 ccgggcggaa catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agtgggtggt ccagaaccgc gagttctttg agatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 105

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0466.13C10

<400> 105

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctg 120  
 gcactgcgtg aggataagga tccgaaaaaa atgatgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgctg tttcgtcaca agaaatgcca atacgacatt 240

gcaacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctgat taaaagtac 300

ccgggccaaa catcagagtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agaaagtgtt tcagaaccgc gagttctttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 106

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.11H24

<400> 106

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgcgagc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcaga agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtac 300

ccgggccaga catcagagtt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agaaggtgtt tcagaaccgc gattatcttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 107

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.01M12\_X103Q

<400> 107

caggactcca cctcagacct gatccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcgcgagc cggaaatctt 120

actctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcgta agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgtgat taaaagtgat 300

ccgggccaga catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaaggtggt tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacggggcg 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 108

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0512.01F10\_X103Q

<400> 108

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga catcagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaaggtggt tcagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacggggcg 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 109

<211> 522

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0510.10A04\_X103Q

<400> 109

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagga tccgaagaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttcggata agaaatgcca gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taagtgagcc gggccagaca 300

tcagattgg tccgcgtcgt gagcaccaac tacaaccagc atgcatggt gttcttcaag 360

aagtggtgc agaaccgca gttttttgg atcacactgt acgggcgcac gaaagaactg 420

acaagcgagc tgaaggaaaa ttttatccgc ttttccaaat ctctgggcct cctgaaaac 480

cacatcgtct tcctgtccc aatcgaccag tgtatcgacg gc 522

<210> 110

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07G09

<400> 110

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttttca agaaggtggt ccagaaccgc gattatttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 111

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07K20

<400> 111

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagaa tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttaccttcg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga cgccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
  
 acgaaagaac tgccaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534  
 <210> 112  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0530.07K21  
 <400> 112  
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgaggc cggaaatctt 120  
 gctctgcgtg agggtaggga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240  
  
 gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300  
 ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agaaggtggt tcagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534  
 <210> 113  
 <211> 534  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S0530.07G09\_N65D  
 <400> 113  
 caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
  
 aacttcagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcgc tgggcgaggc cggaaatctt 120  
 gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240  
 gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300  
 ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttcttca agaaggtggt ccagaaccgc gagtattttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 114

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07K20\_N65D

<400> 114

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgagc cggaaatctt 120

gctctgcgtg aggataagaa tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttaccttcg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga cgccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agaaggtggt tcagaaccgc gattatttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgccaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 115

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07K21\_N65D

<400> 115

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgagc cggaaatctt 120

gctctgcgtg agggtaggga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240

gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300

ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgtttctca agaaggtggt tcagaaccgc gattatttt ggatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 116

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0530.07G09\_H28Q\_N65D

<400> 116

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tgggcgaggc cggaaatctt 120  
 gctcggcgtg aggataagga tccgatgaaa atgatggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgaggtgagg tttaggcata agaaatgcaa gtacgatatt 240  
 gttacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccttat taaaagtgat 300  
 ccgggccaga caccagagtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360

gtgtttctca agaaggtggt ccagaaccgc gagtatTTTT ggatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 117

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04F12

<400> 117

caggactcca ctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tggcctggc cggaaatc 120  
 ctgctgcgtg aggataagga tccgcacaaa atgctggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac ccacgtgacc tttaaatgga agaaatgcta ctacgcaatt 240  
 cgtacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcatgat taaaagtgag 300  
 ccgggccaca catcaatggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agtgggtgga ccagaaccgc gaggagtTtc tgatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aatTTTatcc gctTTTcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 118

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04F23

<400> 118

caggactcca cctcagacct gateccagcc ccacctctga gcaaggtccc tetgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120  
 tggctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac ttgcaatca agaaatgcca ctaccgtatt 240  
 accacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300  
 ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 119

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04F09

<400> 119

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcatggc cggaaatttc 120  
 cacctgcgtg aggataagga tccgagcaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaatt 240

atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtgga 300  
 ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgttcttca agggagtgtg gcagaaccgc gagacctttg ttatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 120

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0455.04M08

<400> 120

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggcgttgc cggaaattac 120

tggctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgtacgca ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgacgtgctg ttttggcgta agaaatgccg ttacgacatt 240

tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctat taaaagtgag 300

ccgggccaaa catcacggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agctggtgcg tcagaaccgc gaggcattta atatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 121

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.15K24

<400> 121

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcc tgggcatggc cggaaatttc 120

cacctgcgtg aggataagga tccgagcaag atgcctgca ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaact 240

atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgaat taaaagtgga 300

ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360

gtgttcttca agggagtgtg gcagaaccgc gagacctttg ttatcacact gtacgggcgc 420

gcgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttcaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 122

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0527.05N11

<400> 122

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcatggc cggaaatttc 120  
  
 cacctgcgtg aggataagga tccgagcaaa atgcctgcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac ccacgtgcct ttttgggcaa agaaatgcgc atacaaaact 240  
 atcacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtgga 300  
 ccgggcatga catcatggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgttctcca agggagtgtg gcagaaccgt gagacctttg ttatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 123

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05A05

<400> 123

caggactcca cctcagacct gateccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120  
 tggctgcgtg agggtaggga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac tttgcaatca agaaatgcct ctaccgtatt 240  
 accacctttg tgccagggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300  
 ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
  
 gtgttcttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 124

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05M06

<400> 124

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120  
 tggctgcgtg gggattacga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat ataacgtcac cgacgtggac tttgcaatcg agaaatgcca ctaccgtatt 240  
 accacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaatat aaaaagtcac 300  
 ccgggcggaa catcaggatt ggcccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 125

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05A05\_H28Q\_N65D

<400> 125

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120  
 tggctgcgtg agggtaggga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180  
 gataaatcat atgacgtcac cgacgtggac tttgcaatca agaaatgcct ctaccgtatt 240  
 accacctttg tgccaggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagtcac 300  
 ccgggcggaa catcaggatt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360  
 gtgtttctca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 126

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> S0522.05M06\_N65D

<400> 126

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60  
 aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatgtcg tgggccacgc cggaaatcaa 120  
 tggctgcgtg gggattacga tccgcgtaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cgacgtggac ttgcaatcg agaaatgcca ctaccgtatt 240  
 accacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt ttggcaatat aaaaagtcac 300  
 ccgggcggaa catcaggatt ggcccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgcatg 360  
 gtgttttca agttcgtgat ccagaaccgc gaggcatttt tcatcacact gtacgggcgc 420  
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480  
 ctccctgaaa accacatcgt ctteectgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-terminal sequence of muteins

<400> 127

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SA linker and the Strep Tag II

<400> 128

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 129

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Expressed protein amino acid sequence

<400> 129

Met Lys His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu

1 5 10 15

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala

20

25

30

Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln  
 35 40 45  
 Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Val Ala Gly Asn Thr Ile Leu  
 50 55 60  
 Arg Glu Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met Asn Ala Thr Ile Tyr Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Asp Val Arg Phe Ile Arg Lys  
 85 90 95  
 Lys Cys His Tyr Tyr Ile Asp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly  
 100 105 110  
 Glu Phe Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Thr Ser Gln  
 115 120 125  
 Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe  
 130 135 140  
 Phe Lys Ile Val Arg Gln Asn Arg Glu Ile Phe Trp Ile Thr Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg  
 165 170 175  
 Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val  
 180 185 190  
 Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly  
 195 200  
 <210> 130  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> positions 95-98  
 <400> 130  
 Gly Asn Ile Lys

1  
 <210> 131  
 <211> 6

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> examples of albumin binding peptides  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa can be any of Asp, Asn, Ser, Thr, or Trp  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa can be any of Asn, Gln, His, Ile, Leu, or Lys  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa can be any of Ala, Asp, Phe, Trp, or Tyr  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa can be any of Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, or Thr

<400> 131  
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 132

Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 133

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5