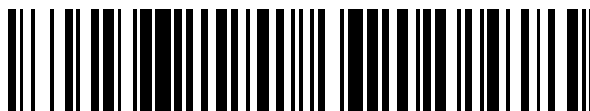


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 652**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2011 PCT/EP2011/059420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11154420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2011 E 11726380 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2580236**

54 Título: **Muteína de lipocalina lacrimal unidas a IL-4R alpha**

30 Prioridad:

**08.06.2010 US 352461 P**

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

**05.11.2019**

73 Titular/es:

**PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH (50.0%)**

**Lise-Meitner-Strasse 30**

**85354 Freising-Weihenstephan, DE y**

**ASTRAZENECA AB (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOHLBAUM, ANDREAS;**

**BAEHRE, ALEXANDRA;**

**MATSCHINER, GABRIELE;**

**TRENTMANN, STEFAN;**

**KIRCHFLED, KLAUS y**

**CHRISTIAN, HANS-JUERGEN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 729 652 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Muteína de lipocalina lacrimal unidas a IL-4R alpha

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a muteínas de lipocalina lacrimal humana que se unen al receptor alfa de IL-4. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico correspondientes que codifican tal muteína. Finalmente, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que incluye tal muteína de lipocalina.

Antecedentes

10 Las proteínas que se unen selectivamente a objetivos seleccionados por medio de una interacción no covalente desempeñan un papel crucial como reactivos en biotecnología, medicina, bioanalítica, así como en las ciencias biológicas y de la vida en general. Los anticuerpos, es decir, las inmunoglobulinas, son un ejemplo destacado de esta clase de proteínas. A pesar de las múltiples necesidades de tales proteínas junto con el reconocimiento, la unión y/o la separación de ligandos/objetivos, actualmente se usan casi exclusivamente inmunoglobulinas. La aplicación de otras proteínas con características definidas de unión a ligando, por ejemplo las lectinas, se ha restringido a casos especiales.

15 Las moléculas de unión proteica adicionales que tienen funciones similares a anticuerpos son los miembros de la familia de las lipocalinas, que han evolucionado de forma natural para unirse a ligandos. Las lipocalinas se encuentran en muchos organismos, incluidos vertebrados, insectos, plantas y bacterias. Los miembros de la familia de proteínas de lipocalina (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) FASEB J. 1, 209-214) son típicamente proteínas pequeñas secretadas y tienen una única cadena polipeptídica. Se caracterizan por un intervalo de diferentes propiedades de reconocimiento  
20 molecular: su capacidad para unirse a varias moléculas, principalmente hidrófobas (como retinoides, ácidos grasos, colesterol, prostaglandinas, biliverdinas, feromonas, saborizantes y odorantes), su unión a receptores específicos de la superficie de las células y su formación de complejos macromoleculares. Aunque en el pasado se clasificaron principalmente como proteínas de transporte, ahora está claro que las lipocalinas cumplen una variedad de funciones fisiológicas. Estas incluyen roles en el transporte de retinol, olfativas, señalización de feromonas y la síntesis de prostaglandinas. Las lipocalinas también se han relacionado con la regulación de la respuesta inmune y la mediación de la homeostasis celular (revisada, por ejemplo, en Flower, DR (1996) Biochem. J. 318, 1-14 y Flower, DR et al. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 9-24).

30 Las lipocalinas comparten niveles inusualmente bajos de conservación de secuencia global, a menudo con identidades de secuencia de menos del 20%. En fuerte contraste, su patrón de plegado general es altamente conservado. La parte central de la estructura de la lipocalina consiste en una única lámina  $\beta$  antiparalela de ocho cadenas sencillas que se cierra sobre sí misma para formar un barril  $\beta$  continuamente unido por hidrógeno. Este barril  $\beta$  forma una cavidad central. Un extremo del barril está bloqueado estéricamente por el segmento peptídico del extremo terminal N que recorre su parte inferior, así como tres bucles peptídicos que conectan las cadenas  $\beta$ . El otro extremo del barril  $\beta$  está abierto al disolvente y abarca un sitio de unión al objetivo, que está formado por cuatro bucles de péptidos flexibles.  
35 Es esta diversidad de bucles en el andamio rígido de lipocalina lo que da lugar a una variedad de diferentes modos de unión, cada uno capaz de acomodar objetivos de diferente tamaño, forma y carácter químico (revisado, por ejemplo, en Flower, DR (1996), citado más arriba; Flower, DR et al. (2000), citado más arriba, o Skerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350).

40 La solicitud internacional de patente WO 99/16873 describe polipéptidos de la familia de las lipocalinas con posiciones de aminoácidos mutados en la región de los cuatro bucles peptídicos, que están dispuestos al final de la estructura cilíndrica del barril  $\beta$  que abarca el bolsillo de unión, y que corresponden a aquellos segmentos en la secuencia polipeptídica lineal que incluye las posiciones de aminoácidos 28 a 45, 58 a 69, 86 a 99 y 114 a 129 de la proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae*. Se ha informado que los miembros de la familia de las lipocalinas se modifican postraduccionalmente, por ejemplo fosforilación y glicosilación de la lipocalina lacrimal (por ejemplo, You, J., et al. (2010) Electrophoresis 31, 1853-1861). Sin embargo, no se requieren modificaciones postraduccionales para sus propiedades de reconocimiento molecular.

50 La solicitud internacional de patente WO 00/75308 describe muteínas de la proteína de unión a bilina, que se unen específicamente a digoxigenina, mientras que las solicitudes internacionales de patente WO 03/029463 y WO 03/029471 se relacionan con muteínas de la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humanos (hNGAL) y apolipoproteína D, respectivamente. Con el fin de mejorar y afinar aún más la afinidad de los ligandos, la especificidad y la estabilidad de plegamiento de una variante de lipocalina, se han propuesto varios enfoques que utilizan diferentes miembros de la familia de las lipocalinas (Skerra, A. (2001) Rev. Mol. Biotechnol. 74, 257-275; Schlehuber, S., y Skerra, A. (2002) Biophys. Chem. 96, 213-228), tal como la sustitución de residuos de aminoácidos adicionales. La publicación PCT WO 2006/56464 describe muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humanos con afinidad de  
55 unión a CTLA-4 en el intervalo nanomolar bajo.

La solicitud internacional de patente WO 2005/19256 describe muteínas de lipocalina lacrimal con al menos un sitio de unión para un ligando objetivo diferente o el mismo y proporciona un método para la generación de tales muteínas de lipocalina lacrimal humana. De acuerdo con esta solicitud PCT, ciertos aminoácidos se extienden dentro de la

secuencia primaria de la lipocalina lacrimal, en particular las regiones del bucle que incluyen los aminoácidos 7-14, 24-36, 41-49, 53-66, 69-77, 79-84, 87-98, y 103-110 de lipocalina lacrimal humana madura, se someten a mutagénesis para generar muteínas con afinidades de unión. Las muteínas resultantes tienen afinidades de unión para el ligando seleccionado ( $K_D$ ) en el intervalo nanomolar, en la mayoría de los casos  $> 100$  nM. La solicitud internacional de patente WO 2008/015239 describe muteínas de la lipocalina lacrimal que se unen a un ligando no natural dado, que incluye el receptor alfa de IL-4. Las afinidades de unión se encuentran en el intervalo nanomolar, alcanzando valores tan bajos como casi  $1 \times 10^{-10}$  M en los experimentos de resonancia de plasmón de superficie.

La lipocalina lacrimal humana (TLPC o Tic), también denominada lipocalina 1, pre-albúmina lacrimal o proteína de la glándula de von Ebner, se describió originalmente como una proteína principal del fluido lacrimal humano (aproximadamente un tercio del contenido total de proteínas) pero también se ha identificado en varios otros tejidos secretores, tal como la próstata, glándula adrenal, timo, glándula mamaria, testículo, mucosa nasal y mucosa traqueal, así como corticotrofos de la glándula pituitaria. Se han encontrado proteínas homólogas en monos rhesus, chimpancés, ratas, ratones, cerdos, hámsteres, vacas, perros y caballos. La lipocalina lacrimal es un miembro inusual de la lipocalina, ya que presenta una especificidad de ligando inusualmente amplia, cuando se compara con otras lipocalinas, y en su alta promiscuidad para los lípidos insolubles relativos (véase, Redl, B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 241-248). Esta característica de la lipocalina lacrimal se ha atribuido a la función de la proteína para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos en la córnea. Un número notable de compuestos lipófilos de diferentes clases químicas, tales como ácidos grasos, alcoholes grasos, fosfolípidos, glicolípidos y colesterol, son ligandos endógenos de esta proteína. Curiosamente, a diferencia de otras lipocalinas, la fuerza de la unión del ligando (objetivo) se correlaciona con la longitud de la cola de hidrocarburo tanto para las amidas de alquilo como para los ácidos grasos. Por lo tanto, la lipocalina lacrimal se une con mayor fuerza a los lípidos menos solubles (Glasgow, BJ et al. (1995) *Curr. Eye Res.* 14, 363-372; Gasymov, OK et al. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 307-320). La estructura cristalina de 1,8 Å de la lipocalina lacrimal reveló una cavidad inusualmente grande dentro de su barril  $\beta$  (Breustedt, D.A. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 1, 484-493). El documento WO 2008/015239 describe mutantes de lipocalina lacrimal humana que se unen al receptor alfa de IL-4, incluyendo el mutante S191.4 B24, así como métodos para generar y seleccionar dichos mutantes.

A pesar de este progreso, todavía sería deseable tener una muteína de lipocalina lacrimal humana que tenga propiedades de unión mejoradas para el receptor alfa de IL-4, en particular de mayor afinidad de unión, simplemente por la razón de mejorar aún más la idoneidad de las muteínas de lipocalina lacrimal humana en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

#### Sumario de la invención

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar una muteína de lipocalina lacrimal humana adicional con una alta afinidad de unión por el receptor alfa de IL 4.

Este objeto se logra mediante una muteína de lipocalina lacrimal humana con las características expuestas en las reivindicaciones, en particular en la reivindicación 1.

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona una muteína de lipocalina lacrimal humana. La muteína se une al receptor alfa de IL 4. La muteína incluye un residuo de aminoácido mutado en una o más de las posiciones de secuencia 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. La muteína incluye además un residuo de aminoácido mutado en cualquiera de dos o más de las posiciones de secuencia 26, 32, 34, 55, 56, 58 y 63 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. La secuencia de aminoácidos de la muteína de la lipocalina lacrimal humana incluye uno de los siguientes conjuntos de combinaciones de aminoácidos: (1) Ser 26, Glu 34, Leu 55, Lys 58, (2) Ser 26, Asn 34, Ala 55, Lys 58, (3) Ser 26, Val 34, (4) Pro 26, Ser 34 (5) Pro 26, Ala 55, (6) Leu 26, Trp 34, Ala 55, (7) Leu 26, Trp 34, Ile 58, (8) Asn 26, Asp 34, (9) Asn 26, Ala 55, (10) Tyr 26, His 34, Ala 55, (11) Tyr 26, His 34, Ala 58, (12) Lys 26, Arg 34, Ala 55, (13) Lys 26, Arg 34, Asn 58, (14) Glu 26, Gly 34, Ala 55 y (15) Glu 26, Gly 34, Leu 58.

El término "posición" cuando se usa de acuerdo con la invención significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en este documento o la posición de un nucleótido dentro de una secuencia de ácido nucleico representada en este documento. El término "correspondiente" tal como se usa en el presente documento también incluye que una posición no solo está determinada por el número de los nucleótidos/aminoácidos anteriores. Por consiguiente, la posición de un aminoácido dado de acuerdo con la invención que puede estar sustituida puede variar debido a la eliminación o adición de aminoácidos en cualquier otra parte de una lipocalina (mutante o de tipo silvestre). De manera similar, la posición de un nucleótido dado de acuerdo con la presente invención que puede estar sustituida puede variar debido a eliminaciones o nucleótidos adicionales en otra parte de una región no traducida 5' (UTR) de muteína o lipocalina de tipo silvestre, incluido el promotor y/o cualquier otra secuencia reguladora o gen (incluyendo exones e intrones).

Por lo tanto, bajo una "posición correspondiente" de acuerdo con la invención, se debe entender preferiblemente que los nucleótidos/aminoácidos pueden diferir en el número indicado pero todavía pueden tener nucleótidos/aminoácidos vecinos similares. Dichos nucleótidos/aminoácidos que pueden intercambiarse, eliminarse o añadirse también están comprendidos por el término "posición correspondiente".

Específicamente, para determinar si un residuo de nucleótido o de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de una muteína de lipocalina Tlc de la divulgación corresponde a una posición determinada en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina Tlc como se describe, en particular cualquiera de las SEQ ID NOs: 2-11 o la que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de Tlc (SEQ ID NO: 20), un experto en la técnica puede utilizar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, alineaciones, ya sea manualmente o utilizando programas informáticos como BLAST2.0, que significa Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que sea adecuado para generar alineaciones de secuencias. Por consiguiente, una muteína de lipocalina de cualquiera de las SEQ ID Nos: 2-11 o que tenga una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de Tlc (SEQ ID NO: 20) pueden servir como "secuencia sujeto", mientras que la secuencia de aminoácidos de una lipocalina diferente de Tlc sirve como "secuencia de consulta".

La divulgación en este documento es un método para generar una muteína de lipocalina lacrimal humana. La muteína se une al receptor alfa de IL-4. El método incluye someter una molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana madura. Además, el método incluye someter la molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana a mutagénesis en cualquiera de las dos o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26, 32, 34, 55, 56, 58 y 63 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. Al menos una de las dos o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26, 32, 34, 55, 56, 58 y 63 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. Como resultado, se obtienen uno o más ácidos nucleicos que codifican una muteína de la lipocalina lacrimal humana. La secuencia de aminoácidos de la muteína codificada incluye uno de los siguientes conjuntos de combinaciones de aminoácidos: (1) Ser 26, Glu 34, Leu 55, Lys 58, (2) Ser 26, Asn 34, Ala 55, Lys 58, (3) Ser 26, Val 34, (4) Pro 26, Ser 34, (5) Pro 26, Ala 55, (6) Leu 26, Trp 34, Ala 55, (7) Leu 26, Trp 34, mentira 58, (8) Asn 26, Asp 34, (9) Asn 26, Ala 55, (10) Tyr 26, His 34, Ala 55, (11) Tyr 26, His 34, Ala 58, (12) Lys 26, Arg 34, Ala 55, (13) Lys 26, Arg 34, Asn 58, (14) Glu 26, Gly 34, Ala 55 y (15) Glu 26, Gly 34, Leu 58. El método también incluye la expresión de una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la muteína así obtenidas en un sistema de expresión. Por lo tanto, el método incluye obtener una o más muteínas. Además, el método incluye el enriquecimiento de una o más muteínas obtenidas de este modo que se unen al receptor alfa de IL 4 mediante selección y/o aislamiento.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6. La molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una muteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4.

La presente invención proporciona una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 7. La célula huésped contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8. La composición farmacéutica incluye una muteína de lipocalina lacrimal humana de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4. La composición farmacéutica incluye además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considere junto con los ejemplos no limitantes y los dibujos que se acompañan.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia polipeptídica de S191.4-B24, una muteína de lipocalina lacrimal humana que posee afinidad de unión por el receptor alfa de IL-4.

La Figura 2 muestra las secuencias polipeptídicas de ejemplos de muteínas con alta afinidad por el receptor alfa de IL-4 (SEQ ID NOs: 2-11).

La Figura 3 muestra la inhibición de la proliferación de células TF-1 por cantidades aumentadas de muteínas de la invención en presencia de IL-4 (A) e IL-13 (B).

La Figura 4 muestra los valores de  $CI_{50}$  de la Fig. 3 y los datos de las mediciones de Biacore de la unión de las muteínas de lipocalina lacrimal humana de la invención al receptor alfa de IL-4, tal como el receptor alfa de IL-4 humano.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona muteínas de lipocalina lacrimal humana que tienen una afinidad particularmente alta por el receptor alfa de IL-4. El receptor alfa de IL-4 como objetivo de una muteína de la presente invención es típicamente una proteína de mamífero, tal como una proteína humana. El receptor alfa de IL-4 *in vivo* puede unirse a la interleucina 4 y la interleucina 13 para regular la producción de anticuerpos IgE en las células B.

Las afinidades de unión de las muteínas de acuerdo con la invención tienen un  $K_D$  inferior a 0,1 nM y en algunas realizaciones aproximadamente 1 picomolar (pM) (véase la Figura 4). Por consiguiente, las muteínas de lipocalina de la invención pueden unirse al receptor alfa de IL-4 con afinidad detectable, es decir, con una constante de disociación de al menos aproximadamente 0,1 nM, aproximadamente 10 pM o incluso menos. La afinidad de unión de una muteína a un objetivo seleccionado, en el presente caso el receptor alfa de IL-4, se puede medir y, por lo tanto, los valores de  $K_D$  de un complejo de muteína-ligando pueden determinarse mediante una multitud de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, titulaciones de fluorescencia, ELISA de competición, métodos calorimétricos, como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y la resonancia de plasmón de superficie (BIAcore). Los ejemplos de tales métodos se detallan a continuación (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2).

La cadena alfa del receptor de interleucina-4 humana puede tener la secuencia de aminoácidos del banco de datos SWISS PROT acceso No. P24394 (SEQ ID NO: 18) o de sus fragmentos. Un ejemplo ilustrativo de un fragmento de la cadena alfa del receptor de interleucina-4 humana incluye los aminoácidos 26 a 232 del receptor alfa de IL-4. La secuencia de aminoácidos del receptor alfa 1 de IL-13 humano se muestra en la SEQ ID NO: 19.

En general, el término "fragmento", como se usa en este documento con respecto a los ligandos de proteínas de las muteínas de lipocalina lacrimal de la invención, se refiere a ligandos de proteínas o péptidos acortados en el extremo terminal N y/o en el extremo terminal C, que conservan la capacidad del ligando de longitud completa para ser reconocido y/o unido por una muteína de acuerdo con la invención.

Un receptor alfa de IL-4 que se une a muteína de lipocalina lacrimal humana puede actuar como antagonista de IL-4 y/o antagonista de IL-13 o como un agonista de IL-4 inverso y/o agonista de IL-13 inverso. Un agonista inverso se une al mismo sitio de unión que un agonista para un receptor particular e invierte la actividad constitutiva del receptor respectivo. Hasta ahora, no se ha informado que los receptores de IL-4 posean actividad quinasa intrínseca, de modo que una muteína de la invención puede actuar típicamente como un antagonista de IL-4 y/o antagonista de IL-13. En una realización, las muteínas de lipocalina lacrimal humana actúan como antagonistas de IL-4 humana y/o IL-13 humana. En algunas realizaciones, la muteína tiene reactividad cruzada con el receptor alfa de IL-4 de IL-4 de cynomolgus y, como tal, actúa como un antagonista de los ligandos de cynomolgus como IL-4 y/o IL-13. En algunas realizaciones, la muteína tiene reactividad cruzada con el receptor alfa IL-4 de IL-4 de mono tití y, como tal, actúa como un antagonista de los ligandos de mono tití tales como IL-4 y/o IL-13.

El receptor alfa de IL-4 puede tomarse para definir un ligando no natural de la lipocalina lacrimal humana. El término "ligando no natural" se refiere a un compuesto, que no se une a la lipocalina lacrimal humana madura nativa bajo condiciones fisiológicas. El término "lipocalina lacrimal humana", como se usa en el presente documento, se refiere a la lipocalina lacrimal humana madura correspondiente a la proteína del Banco de Datos SWISS-PROT Acceso No. P31025. La lipocalina lacrimal humana madura no incluye el péptido señal del extremo terminal N que se incluye en la secuencia del SWISS-PROT acceso No. P31025 (véase la Figura 2).

La secuencia de aminoácidos de una muteína de la invención tiene una alta identidad de secuencia con la lipocalina lacrimal humana madura cuando se compara con identidades de secuencia con otras lipocalinas (citadas más arriba). En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de la invención es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimal humana madura. Una secuencia respectiva de una muteína de la invención, que es sustancialmente similar a las secuencias de la lipocalina lacrimal humana madura, tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 82%, al menos un 85%, al menos un 87%, al menos un 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad con la secuencia de la lipocalina lacrimal humana madura, con la condición de que la posición o secuencia alterada se mantenga en la que la secuencia de la lipocalina lacrimal humana madura es

HHLLASDEEIQDVSQWYKAMTVDFPEMNLSEVTPMTLTTLEGGNLEAKVMTLISGRCQEVKA  
VLEKTDEPGKYTADGGKHVAYIIRSHVKDHYIFYCEGELHKGKPVGRGVKLVGRDPKNNLEALEDFEK  
AAGARGLSTESILIPRQSETCSPGSD.

Por "identidad" se entiende una propiedad de secuencias que mide su similitud o relación. La identidad se mide dividiendo el número de residuos idénticos por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100.

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

El término "mutado" o "mutante" en referencia a un ácido nucleico o un polipéptido se refiere al intercambio, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en comparación con el ácido nucleico o polipéptido de origen natural.

En algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la divulgación incluye una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo en las posiciones 61 y/o 153 por un residuo de serina. En este contexto, se observa que se ha encontrado que la eliminación del enlace disulfuro estructural (a nivel de una biblioteca de ácido nucleico no modificada respectiva) de la lipocalina lacrimonasal de tipo silvestre que está formada por los residuos de cisteína 61 y 153 (véase Breustedt, et al., 2005, citado más arriba) proporciona muteínas de lipocalina lacrimonasal que no solo están plegadas de manera estable sino que además también pueden unirse a un ligando no natural dado con una afinidad alta. Sin querer limitarse a la teoría, también se cree que la eliminación del enlace disulfuro estructural proporciona la ventaja adicional de permitir la generación (espontánea) o la introducción deliberada de enlaces disulfuro artificiales no naturales en las muteínas de la invención (véanse los Ejemplos), aumentando así la estabilidad de las muteínas, por ejemplo. En algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la divulgación incluye una sustitución de aminoácido de un residuo de cisteína nativo en la posición 101 por un residuo de serina. Además, en algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la divulgación incluye una sustitución de aminoácido de un residuo de arginina nativo en la posición 111 por un residuo de prolina. En algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la divulgación incluye una sustitución de aminoácido de un residuo de lisina nativa en la posición 114 por un residuo de triptófano.

Una muteína de la lipocalina lacrimonasal humana de acuerdo con la invención tiene típicamente una asparagina, un ácido glutámico, una prolina, una lisina, una serina y una tirosina en la posición que corresponde a la posición 26 del aminoácido de la lipocalina lacrimonasal humana madura.

En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Pro y Glu 34 → Ser. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Pro y Met 55 → Ala. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Ser y Glu 34 → Val. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Ser, Glu 34 → Asn, Met 55 → Ala y Ser 58 → Lys. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Asn y Glu 34 → Asp. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Asn y Met 55 → Ala. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Tyr, Glu 34 → His y Met 55 → Ala. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Tyr, Glu 34 → His y Ser 58 → Ala. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Lys, Glu 34 → Arg y Met 55 → Ala. En algunas realizaciones, una muteína de la invención tiene una secuencia que incluye las sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Lys, Glu 34 → Arg y Ser 58 → Asn.

En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 26 que es uno de asparagina, prolina, lisina, serina y tirosina. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 32 que es uno de histidina, lisina, tirosina y valina. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 34 que es uno de arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, serina y valina. La muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 55 que es alanina. La muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 56 que es uno de alanina, glutamina, histidina, metionina y lisina. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 58 que es uno de alanina, arginina, asparagina, isoleucina y lisina. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina de la invención tiene un residuo de aminoácido mutado en la posición 63 que es uno de glutamina, lisina, prolina y serina.

En algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la invención incluye todas las sustituciones Met 31 → Ala, Leu 33 → Tyr, Cys 61 → Trp, Asp 80 → Ser, Glu 104 → Leu, His 106 → Pro y Lys 108 → Gln. En algunas realizaciones, una muteína de acuerdo con la invención incluye una sustitución Val 53 → Phe. El residuo de aminoácido mutado también puede incluir una sustitución Val 64 → Tyr. También puede incluir una sustitución Ala 66 → Leu o Ala 66 → Asp.

En el presente documento también se describe una muteína de lipocalina lacrimonasal humana que incluye un aminoácido sustituido de al menos el residuo de cisteína que se produce en la posición 61 y 153 por otro aminoácido y la mutación del residuo de aminoácido en las posiciones de secuencia 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimonasal humana madura. Las posiciones 26-28 y 30-34 están incluidas en el bucle AB, las posiciones 53 y 55 están ubicadas al final de una lámina beta y las siguientes posiciones 56-58 están incluidas en el bucle CD. Sorprendentemente, las posiciones 63, 64 y 66, están incluidas dentro de una lámina beta (βD), y la posición 80 está ubicada en una región α-helicoidal. La posición 83 es un aminoácido que define un solo bucle entre esta región α-helicoidal y una lámina beta (βF). Las posiciones 104-106 y 108 están incluidas en el bucle GH en el sitio de unión en el extremo abierto de la estructura de barril β de la lipocalina lacrimonasal. La definición de estas regiones se utiliza en el presente documento de acuerdo con Flower (Flower, 1996, citado más arriba, Flower, et al., 2000, citado más arriba) y Breustedt et al., (2005, citado más arriba). En algunas realizaciones, la muteína incluye las sustituciones de aminoácidos Cys 61 → Trp y Cys 153 → Ser o Ala. Dicha sustitución ha demostrado ser útil para prevenir la formación del puente disulfuro natural que une Cys 61 y Cys 153 y, por lo tanto, para facilitar el manejo de la muteína.

En algunas realizaciones, la muteína incluye al menos una sustitución de aminoácido adicional, seleccionada de Arg 111 → Pro y Lys 114 → Trp. Una muteína de la invención puede incluir además la cisteína en la posición 101 de la secuencia de lipocalina lacrimal humana madura nativa sustituida por otro aminoácido. Esta sustitución puede ser, por ejemplo, la mutación Cys 101 → Ser o Cys 101 → Thr. En algunas realizaciones, la muteína tiene un residuo de aminoácido mutado en cada una de las posiciones de secuencia 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura.

En la región residual, es decir, la región que difiere de las posiciones de secuencia 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108, una muteína de lipocalina de la invención puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina de acuerdo con la invención también puede transportar una o más mutaciones de aminoácidos en una posición/posiciones de secuencia siempre y cuando tal mutación sí lo haga, al menos esencialmente no obstaculice o no interfiera con la actividad de unión y el plegamiento de la muteína. Dichas mutaciones pueden lograrse muy fácilmente a nivel de ADN usando métodos estándar establecidos. Ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o eliminaciones, así como sustituciones de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido de propiedades químicamente similares, en particular con respecto a la polaridad así como al tamaño. Ejemplos de sustituciones conservadoras son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptófano. Por otro lado, también es posible introducir alteraciones no conservadoras en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar los residuos de aminoácidos individuales, también es posible insertar o eliminar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina lacrimal siempre que estas eliminaciones o inserciones resulten en una muteína plegada/funcional estable (véase por ejemplo, la sección experimental en la que se generan las muteínas con los extremos terminales N y C truncados).

Dichas modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen mutagénesis dirigida de posiciones de aminoácidos individuales con el fin de simplificar la subclonación del gen de lipocalina mutado o sus partes incorporando sitios de escisión para ciertas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar aún más la afinidad de una muteína de lipocalina para un objetivo determinado. Además, se pueden introducir mutaciones para modular ciertas características de la muteína, tales como mejorar la estabilidad de plegamiento, la estabilidad en suero, la resistencia de la proteína o la solubilidad en agua o reducir la tendencia de agregación, si es necesario. Por ejemplo, los residuos de cisteína naturales pueden mutarse a otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro. También es posible mutar deliberadamente la posición de otra secuencia de aminoácidos a la cisteína para introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo, para la conjugación con otros compuestos, como polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de enlaces disulfuro no naturales. Los ejemplos de posibilidades de tal mutación para introducir un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de una muteína de lipocalina lacrimal humana incluyen las sustituciones Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys y Glu 131 → Cys. La fracción tiol generado en el lado de cualquiera de las posiciones de aminoácidos 40, 73, 90, 95 y/o 131 se puede usar para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, con el fin de aumentar la semivida en suero de una muteína de lipocalina lacrimal respectiva.

La presente invención también abarca muteínas como se definió anteriormente, en las que los primeros cuatro residuos de aminoácidos del extremo terminal N de la secuencia de lipocalina lacrimal humana madura (His-His-Leu-Leu; posiciones 1-4) y/o los dos últimos residuos de aminoácidos del extremo terminal C (Ser-Asp; posiciones 157-158) de la secuencia de lipocalina lacrimal humana madura se han eliminado (véase también los ejemplos y los listados de secuencias adjuntos). Otra posible mutación de la secuencia de tipo silvestre es cambiar la secuencia de aminoácidos en las posiciones de secuencia 5 a 7 (Ala Ser Asp) por Gly Gly Asp como se describe en la solicitud PCT WO 2005/019256.

Una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la lipocalina lacrimal humana madura: Glu 27 → Arg; Phe 28 → Cys; Glu 30 → Arg; Met 31 → Ala; Leu 33 → Tyr; Ile 57 → Arg; Cys 61 → Trp; Asp 80 → Ser; Lys 83 → Arg; Glu 104 → Leu; Leu 105 → Cys; His 106 → Pro; Lys 108 → Gln.

En algunas realizaciones, la muteína incluye además el conjunto de sustituciones de aminoácidos Val 53 → Phe, Val 64 → Tyr, Ala 66 → Leu.

En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Pro; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Ser; Met 55 → Ala; Leu 56 → Gln; Glu 63 → Lys en comparación con lipocalina lacrimal humana madura. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Ser; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Val; Met 55 → Ala; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Ile; Glu 63 → Ser en comparación con lipocalina lacrimal humana madura. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Ser; Asn 32 → Val; Glu 34 → Asn; Met 55 → Ala; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Lys; Glu 63 → Lys en comparación con lipocalina lacrimal humana madura. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos

Arg 26 → Tyr; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → His; Met 55 → Ala; Leu 56 → His; Ser 58 → Ala; Glu 63 → Lys en comparación con lipocalina lacrimal humana madura. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Lys; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Arg; Met 55 → Ala; Leu 56 → Lys; Ser 58 → Asn; Glu 63 → Pro en comparación con lipocalina lacrimal humana madura. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina lacrimal de acuerdo con la invención incluye la combinación de sustituciones de aminoácidos Arg 26 → Glu; Asn 32 → His; Glu 34 → Gly; Met 55 → Ala; Leu 56 → Met; Ser 58 → Leu; Glu 63 → Lys en comparación con lipocalina lacrimal humana madura.

La muteína de lipocalina lacrimal humana de la invención puede incluir, consistir esencialmente en o consistir en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 4 y 6-11 o un fragmento o variante de las mismas. El término "fragmento" como se usa en este documento en relación con las muteínas de la invención se refiere a proteínas o péptidos derivados de lipocalina lacrimal humana madura de longitud completa que se acortan en el extremo terminal N y/o del extremo terminal C, es decir, carecen de al menos uno de los aminoácidos del extremo terminal N y/o del extremo terminal C. Dichos fragmentos pueden incluir al menos 10, más como 20 o 30 o más aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la lipocalina lacrimal humana madura y generalmente son detectables en un inmunoensayo de la lipocalina lacrimal humana madura.

El término "variante", como se usa en la presente invención, se refiere a derivados de una proteína o péptido que incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por sustitución, eliminación, inserción o modificación química. Dichas modificaciones en algunas realizaciones no reducen la funcionalidad de la proteína o el péptido. Dichas variantes incluyen proteínas, en las que uno o más aminoácidos han sido reemplazados por sus respectivos estereoisómeros D o por aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos naturales, como por ejemplo, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserina, hidroxilisina, norvalina. Sin embargo, tales sustituciones también pueden ser conservadoras, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido químicamente similar. Ejemplos de sustituciones conservadoras son los reemplazos entre los miembros de los siguientes grupos: 1) alanina, serina y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina y valina; y 6) fenilalanina, tirosina y triptófano.

Una muteína de lipocalina lacrimal de la invención puede existir como una proteína monomérica. En algunas realizaciones, una muteína de lipocalina de acuerdo con la invención puede dimerizarse u oligomerizarse espontáneamente. El uso de muteínas de lipocalina que forman monómeros estables puede ser ventajoso en algunas aplicaciones, por ejemplo, debido a una difusión más rápida y una mejor penetración en los tejidos. En otras realizaciones, el uso de una muteína de lipocalina que forma espontáneamente homodímeros o multímeros estables puede ser ventajoso, ya que tales multímeros pueden proporcionar (además) mayor afinidad y/o avidéz por un objetivo dado. Además, las formas oligoméricas de la muteína de lipocalina pueden tener velocidades de disociación más lentas o una semivida en suero prolongada. Si se desea la dimerización o multimerización de las muteínas que forman monómeros estables, esto puede lograrse, por ejemplo, fusionando los dominios de oligomerización respectivos, como los dominios jun-fos o las cremalleras de leucina, a las muteínas de la invención o mediante el uso de "Duocalinas" (véase también más adelante).

Se puede obtener una muteína de lipocalina de acuerdo con la presente invención mediante mutagénesis de una forma natural de lipocalina lacrimal humana. El término "mutagénesis" como se usa en este documento significa que las condiciones experimentales se eligen de tal manera que el aminoácido que se produce naturalmente en una posición de secuencia dada de la lipocalina lacrimal humana (banco de datos Swiss-Prot entrada P31025) puede ser sustituido por al menos un aminoácido que no está presente en esta posición específica en la secuencia polipeptídica natural respectiva. El término "mutagénesis" también incluye la modificación (adicional) de la longitud de los segmentos de secuencia mediante la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención que, por ejemplo, un aminoácido en una posición de secuencia elegida se reemplace por un tramo de tres mutaciones aleatorias, lo que lleva a una inserción de dos residuos de aminoácidos en comparación con la longitud del segmento respectivo de la proteína de tipo silvestre. Dicha inserción de supresión puede introducirse independientemente una de otra en cualquiera de los segmentos peptídicos que pueden someterse a mutagénesis en la invención. En un ejemplo de realización de la invención, se puede introducir una inserción de varias mutaciones en el bucle AB del andamio de lipocalina elegido (véase la solicitud internacional de patente WO 2005/019256). El término "mutagénesis aleatoria" significa que no está presente un único aminoácido predeterminado (mutación) en una determinada posición de secuencia, sino que al menos dos aminoácidos pueden incorporarse con cierta probabilidad en una posición de secuencia predefinida durante la mutagénesis.

La secuencia codificante de la lipocalina lacrimal humana (Redl, B. et al., (1992) J. Biol. Chem. 267, 20282-20287) se usa como punto de partida para la mutagénesis de los segmentos peptídicos seleccionados en la presente invención. Para la mutagénesis de las posiciones de aminoácidos citadas, el experto en la técnica tiene a su disposición los diversos métodos estándar establecidos para la mutagénesis dirigida al sitio. Una técnica comúnmente utilizada es la introducción de mutaciones mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando mezclas de oligonucleótidos sintéticos, que portan una composición base degenerada en las posiciones de secuencia deseadas. Por ejemplo, el uso del codón NNK o NNS (en donde N = adenina, guanina o citosina o timina; K = guanina o timina; S = adenina o citosina) permite la incorporación de los 20 aminoácidos más el codón ámbar de parada durante la mutagénesis, mientras que el codón WS limita el número de aminoácidos posiblemente incorporados a 12, ya que excluye que los aminoácidos Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val se incorporen en la posición seleccionada de la



5 secuencia polipeptídica; el uso del codón NMS (en donde M = adenina o citosina), por ejemplo, restringe el número de posibles aminoácidos a 11 en una posición de secuencia seleccionada, ya que excluye los aminoácidos Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val se incorporen en una posición de secuencia seleccionada. A este respecto, se observa que los codones para otros aminoácidos (que los 20 aminoácidos normales que ocurren naturalmente), tal como la selenocisteína o la pirrolisina, también puedan incorporarse en un ácido nucleico de una muteína. También es posible, de acuerdo con lo descrito por Wang, L., et al., (2001) *Science* 292, 498-500, o Wang, L., y Schultz, P.G. (2002) *Chem. Com.* 1, 1-11, usen codones "artificiales" tales como UAG que generalmente se reconocen como codones de parada para insertar otros aminoácidos inusuales, por ejemplo o-metil-L-tirosina o p-aminofenilalanina.

10 El uso de bloques de construcción de nucleótidos con una reducida especificidad de pares de bases, como por ejemplo inosina, 8-oxo-2'-desoxiguanosina o 6(2-desoxi- $\alpha$ -D-ribofuranosil)-3,4-dihidro-8H-pirrimido-1,2-oxazin-7-ona (Zaccolo et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 255, 589-603), es otra opción para la introducción de mutaciones en un segmento de secuencia elegido.

15 Una posibilidad adicional es la denominada mutagénesis de triplete. Este método utiliza mezclas de diferentes tripletes de nucleótidos, cada uno de los cuales codifica un aminoácido, para su incorporación en la secuencia de codificación (Virnekås B, et al., 1994 *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607).

20 Una posible estrategia para introducir mutaciones en las regiones seleccionadas de los respectivos polipéptidos se basa en el uso de cuatro oligonucleótidos, cada uno de los cuales se deriva parcialmente de uno de los segmentos de secuencia correspondientes que se van a mutar. Al sintetizar estos oligonucleótidos, una persona experta en la técnica puede emplear mezclas de bloques de construcción de ácido nucleico para la síntesis de esos tripletes de nucleótidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos que deben mutarse, de modo que surjan codones que codifican todos los aminoácidos naturales al azar, que al menos resulta en la generación de una biblioteca de péptidos de lipocalina. Por ejemplo, el primer oligonucleótido corresponde en su secuencia, aparte de las posiciones mutadas, a la cadena codificante del segmento peptídico que se va a mutar como máximo en la posición del extremo terminal N del polipéptido de lipocalina. Por consiguiente, el segundo oligonucleótido corresponde a la cadena no codificante para el segundo segmento de secuencia que sigue en la secuencia polipeptídica. El tercer oligonucleótido corresponde a su vez a la cadena de codificación para el tercer segmento de secuencia correspondiente. Finalmente, el cuarto oligonucleótido corresponde a la cadena no codificante para el cuarto segmento de secuencia. Se puede realizar una reacción en cadena de la polimerasa con el primer y segundo oligonucleótido respectivos y por separado, si es necesario, con el tercer y cuarto oligonucleótido respectivos.

30 Los productos de amplificación de estas dos reacciones se pueden combinar mediante varios métodos conocidos en un solo ácido nucleico que incluye la secuencia de los segmentos de secuencia primero a cuarto, en los que se han introducido mutaciones en las posiciones seleccionadas. Para este fin, ambos productos pueden, por ejemplo, someterse a una nueva reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos flanqueantes, así como una o más moléculas mediadoras de ácido nucleico, que contribuyen a la secuencia entre el segundo y el tercer segmento de secuencia. En la elección del número y la disposición dentro de la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis, el experto en la técnica tiene numerosas alternativas a su disposición.

40 Las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente se pueden conectar mediante ligación con las secuencias 5' y 3' faltantes de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de lipocalina y/o el vector, y se pueden clonar en un organismo huésped conocido. Una multitud de procedimientos establecidos están disponibles para la ligación y la clonación. Por ejemplo, las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción también presentes en la secuencia del vector de clonación se pueden diseñar en la secuencia de los oligonucleótidos sintéticos. Por lo tanto, después de la amplificación del producto de PCR respectivo y la escisión enzimática, el fragmento resultante se puede clonar fácilmente usando las secuencias de reconocimiento correspondientes.

45 Los segmentos de secuencia más largos dentro del gen que codifica la proteína seleccionada para mutagénesis también pueden someterse a mutagénesis aleatoria a través de métodos conocidos, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa en condiciones de mayor tasa de error, por mutagénesis química o utilizando cepas mutadoras bacterianas. Dichos métodos también pueden usarse para una optimización adicional de la afinidad o especificidad objetivo de una muteína de lipocalina. Las mutaciones que posiblemente se producen fuera de los segmentos de mutagénesis experimental a menudo se toleran o incluso pueden resultar ventajosas, por ejemplo, si contribuyen a una mejor eficiencia de plegamiento o estabilidad de plegamiento de la muteína de lipocalina.

55 En un método de acuerdo con la divulgación, una molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana se somete primero a mutagénesis en una o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 27, 28, 30, 31, 33, 53, 57, 61, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. En segundo lugar, la molécula de ácido nucleico que codifica una lipocalina lacrimal humana también se somete a mutagénesis en dos o más de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26, 32, 34, 55, 56, 58 y 63 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. De estas últimas posiciones de secuencia de aminoácidos, al menos una posición a mutar se selecciona de la posición de secuencia de aminoácidos 58 y la posición de secuencia de aminoácidos 63.

En una realización de la divulgación, el método para la generación de una muteína de lipocalina lacrimal humana incluye mutar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16 o 17 de los codones de cualquiera de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. En una realización, los 22 codones de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 53, 55, 56, 57, 58, 63, 64, 66, 80, 83, 104, 105, 106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana madura están mutados.

En una realización del método mencionado anteriormente, adicionalmente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 o 15 de los codones de cualquiera de las posiciones de secuencia de aminoácidos 26-28, 30-34, 53, 55-58, 63, 64, 66, 80, 83, 104-106 y 108 de la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana madura están mutados.

En una realización adicional de la divulgación, los métodos incluyen la mutación de ambos codones que codifican la cisteína en las posiciones 61 y 153 en la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura. En una realización, la posición 61 está mutada para codificar un residuo de alanina, fenilalanina, lisina, arginina, treonina, asparagina, tirosina, metionina, serina, prolina o triptófano, por nombrar solo algunas posibilidades. En realizaciones en las que la posición 153 está mutada, puede introducirse un aminoácido tal como una serina o alanina en la posición 153.

En otra realización de la divulgación como se describe en el presente documento, los codones que codifican las posiciones de secuencia de aminoácidos 111 y/o 114 de la secuencia polipeptídica lineal de lipocalina lacrimal humana madura se mutan para codificar, por ejemplo, una arginina en la posición 111 y un triptófano en posición 114.

Otra realización de los métodos de la divulgación implica la mutagénesis del codón que codifica la cisteína en la posición 101 de la secuencia polipeptídica lineal de la lipocalina lacrimal humana madura, de modo que este codón codifica cualquier otro aminoácido. En una realización, el codón mutado que codifica la posición 101 codifica una serina. Por consiguiente, en algunas realizaciones, dos o los tres codones de cisteína en la posición 61, 101 y 153 se reemplazan por un codón de otro aminoácido.

De acuerdo con el método, se obtiene una muteína a partir de un ácido nucleico que codifica la lipocalina lacrimal humana. Dicho ácido nucleico se somete a mutagénesis y se introduce en un organismo huésped bacteriano o eucariota mediante tecnología de ADN recombinante. La obtención de una biblioteca de ácidos nucleicos de lipocalina lacrimal puede llevarse a cabo utilizando cualquier técnica adecuada que sea conocida en la técnica para generar muteínas de lipocalina con propiedades similares a los anticuerpos, es decir, muteínas que tienen afinidad hacia un objetivo dado. Ejemplos de tales métodos combinatorios se describen en detalle en las solicitudes internacionales de patente WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256, o WO 2006/56464 por ejemplo. Después de la expresión de las secuencias de ácido nucleico que se sometieron a mutagénesis en un huésped apropiado, los clones que portan la información genética para la pluralidad de muteínas de lipocalina respectivas, que se unen a un objetivo dado, pueden seleccionarse de la biblioteca obtenida. Se pueden emplear técnicas bien conocidas para la selección de estos clones, tal como la presentación en fagos (revisada en Kay, BK et al., (1996) citado más arriba; Lowman, HB (1997) citado más arriba o Rodi, DJ y Makowski, L. (1999) citado más arriba), cribado de colonias (revisado en Pini, A. et al., (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5, 503-510), presentación de ribosomas (revisado en Amstutz, P. et al., (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405) o presentación de ARNm como se informa en Wilson, DS et al. (2001) Proc. Natl Acad Sci. USA 98, 3750-3755 o los métodos descritos específicamente en los documentos WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256, o WO 2006/56464.

La molécula de ácido nucleico que codifica la muteína se expresa utilizando cualquier sistema de expresión adecuado. La muteína o muteínas obtenidas se enriquecen mediante selección y/o aislamiento. La selección puede realizarse, por ejemplo, bajo condiciones de competencia. Las condiciones competitivas como se usan en este documento significan que la selección de muteínas abarca al menos una etapa en el que las muteínas y el ligando no natural dado de la lipocalina lacrimal humana, es decir el receptor alfa de IL 4, se ponen en contacto en presencia de un ligando adicional, que compite con la unión de las muteínas al receptor alfa de IL 4. Este ligando adicional puede ser un ligando fisiológico del objetivo, por ejemplo, IL 4, un exceso del objetivo en sí mismo o cualquier otro ligando no fisiológico del objetivo que se une al menos a un epítipo superpuesto al epítipo reconocido por las muteínas de la invención y, por lo tanto, interfiere con la unión al objetivo de las muteínas. Alternativamente, el ligando adicional compite con la unión de las muteínas al complejar un epítipo distinto del sitio de unión de las muteínas al objetivo por efectos alostéricos.

Una realización de la técnica de presentación en fagos (revisada en Kay, BK et al. (1996), citado más arriba; Lowman, HB (1997) citado más arriba o Rodi, DJ, y Makowski, L. (1999), citado más arriba) que utilizan el fago M-13 temperante se proporciona como un ejemplo de un método de selección que puede emplearse en la presente divulgación. Otra realización de la tecnología de presentación en fagos que se puede usar para la selección de muteínas de la divulgación es la tecnología de fagos hiperfagos descrita por Broders et al., (Broders et al. (2003) "Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display". Methods Mol. Biol. 205: 295-302). También se pueden emplear otros fagos temperantes tales como f1 o fagos líticos tales como T7. Para el ejemplo del método de selección, se producen fagémidos M13 que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico de lipocalina mutada como una proteína de fusión con una secuencia señal en el extremo terminal N, tal como la secuencia señal de OmpA, y con la

píldora de proteína de la cápside del fago M13 o sus fragmentos capaces de incorporarse en la cápside del fago en el extremo terminal C. El fragmento del extremo terminal C  $\Delta$ pIII de la proteína de la cápside del fago que incluye los aminoácidos 217 a 406 de la secuencia de tipo silvestre puede usarse para producir las proteínas de fusión. En una realización, se usa un fragmento de píldora del extremo terminal C, en el que falta el residuo de cisteína en la posición 201 o se reemplaza por otro aminoácido.

Por consiguiente, una realización adicional de los métodos de la divulgación implica fusionar operativamente un ácido nucleico que codifica la una o más muteínas de la lipocalina lacrimal humana y que resulta de la mutagénesis en el extremo 3' con un gen que codifica la píldora de proteína de la cubierta de un bacteriófago filamentosos de la familia M13 o para un fragmento de esta proteína de la cubierta, con el fin de seleccionar al menos una muteína para la unión de un ligando dado.

La proteína de fusión puede incluir componentes adicionales tales como una etiqueta de afinidad, que permite la inmovilización, detección y/o purificación de la proteína de fusión o sus partes. Además, un codón de parada puede ubicarse entre las regiones de secuencia que codifican la lipocalina o sus muteínas y el gen de la cápside del fago o sus fragmentos, en donde el codón de parada, tal como un codón de parada ámbar, se traduce al menos parcialmente en un aminoácido durante la traducción en una cepa supresora adecuada.

Por ejemplo, el vector fásmico pTLPC27, ahora también llamado pTlc27 que se describe en este documento, se puede usar para la preparación de una biblioteca de fagémidos que codifica muteínas de lipocalina lacrimal humana. Las moléculas de ácido nucleico de la invención que codifican las muteínas de lipocalina lacrimal se insertan en el vector utilizando los dos sitios de restricción *Bst*XI. Después de la ligación, una cepa huésped adecuada, tal como XL1-Blue de *E. coli*, se transforma con la mezcla de ácido nucleico resultante para producir un gran número de clones independientes. Se puede generar un vector respectivo para la preparación de una biblioteca de hiperfagémidos, si se desea.

La biblioteca resultante se súperinfecta posteriormente en cultivo líquido con un fago o hiperfago auxiliar apropiado de M13 para producir fagémidos funcionales. El fagémido recombinante muestra la muteína de lipocalina en su superficie como una fusión con la píldora de la proteína de la cubierta o un fragmento de la misma, mientras que la secuencia señal del extremo terminal N de la proteína de fusión normalmente se escinde. Por otro lado, también contiene una o más copias de la proteína de la cápside nativa pIII suministrada por el fago auxiliar y, por lo tanto, es capaz de infectar a un receptor, en general una cepa bacteriana que porta un plásmido F o F'. En el caso de la presentación en hiperfagos, los hiperfagémidos muestran las muteínas de lipocalina en su superficie como una fusión con la proteína de cubierta infectiva pIII pero no con la proteína de la cápside nativa. Durante o después de la infección con un fago o hiperfago auxiliar, se puede inducir la expresión génica de la proteína de fusión entre la muteína de lipocalina y la píldora de la proteína de la cápside, por ejemplo mediante la adición de tetraciclina anhidra. Las condiciones de inducción se eligen de modo que una fracción sustancial de los fagémidos obtenidos muestre al menos una muteína de lipocalina en su superficie. En el caso de la presentación en hiperfagos, las condiciones de inducción dan lugar a una población de hiperfagémidos que portan entre tres y cinco proteínas de fusión que consisten en la muteína de lipocalina y la píldora de proteína de la cápside. Se conocen varios métodos para aislar los fagémidos, tales como la precipitación con polietilenglicol. El aislamiento ocurre típicamente después de un período de incubación de 6-8 horas.

Los fásmidos aislados pueden luego someterse a selección por incubación con el objetivo deseado, en donde el objetivo se presenta en una forma que permite al menos la inmovilización temporal de aquellos fagémidos que transportan muteínas con la actividad de unión deseada como proteínas de fusión en su envoltura. Entre las diversas realizaciones conocidas por los expertos en la técnica, el objetivo puede, por ejemplo, conjugarse con una proteína transportadora tal como la albúmina de suero y unirse a través de esta proteína transportadora a una superficie de unión a la proteína, por ejemplo, poliestireno. Las placas de microtitulación adecuadas para las técnicas de ELISA o los llamados "inmuno adhesivos" pueden utilizarse, por ejemplo, para dicha inmovilización del objetivo. Alternativamente, se pueden usar conjugados del objetivo con otros grupos de unión, tales como biotina. El objetivo puede inmovilizarse luego sobre una superficie que se une selectivamente a este grupo, por ejemplo, placas de microtitulación o partículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina, neutravidina o avidina. Si el objetivo se fusiona con una porción Fc de una inmunoglobulina, la inmovilización también se puede lograr con superficies, por ejemplo, placas de microtitulación o partículas paramagnéticas, que están recubiertas con proteína A o proteína G.

Los sitios de unión a fagémidos no específicos presentes en las superficies pueden saturarse con soluciones de bloqueo como se conocen por los métodos ELISA. Los fagémidos se ponen entonces típicamente en contacto con el objetivo inmovilizado en la superficie en presencia de un regulador fisiológico. Los fagémidos no unidos se eliminan mediante múltiples lavados. Las partículas de fagémido que quedan en la superficie se eluyen. Para la elución, varios métodos son posibles. Por ejemplo, los fagémidos se pueden eluir mediante la adición de proteasas o en presencia de ácidos, bases, detergentes o sales caotrópicas o en condiciones de desnaturalización moderada. Uno de estos métodos es la elución usando reguladores de pH 2,2, en donde el eluato se neutraliza posteriormente. Alternativamente, se puede agregar una solución del objetivo libre para competir con el objetivo inmovilizado para la unión a los fagémidos o los fagémidos específicos del objetivo se pueden eluir mediante la competencia con inmunoglobulinas o proteínas ligantes naturales que se unen específicamente al objetivo de interés.

Posteriormente, las células de *E. coli* se infectan con los fagémidos eluidos. Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden extraer de los fagémidos eluidos y se usan para el análisis de secuencia, amplificación o transformación de células de otra manera. A partir de los clones de *E. coli* obtenidos de esta manera, los fagémidos o hiperfagémidos frescos se producen nuevamente mediante la superinfección con fagos o hiperfagos auxiliares M13 de acuerdo con el método descrito anteriormente y los fagémidos amplificados de esta manera se someten una vez más a una selección en el objetivo inmovilizado. A menudo son necesarios múltiples ciclos de selección para obtener los fagémidos con las muteínas de la invención en forma suficientemente enriquecida. El número de ciclos de selección se elige en algunas realizaciones de tal manera que en el análisis funcional posterior, al menos el 0,1% de los clones estudiados producen muteínas con afinidad detectable para el objetivo dado. Dependiendo del tamaño, es decir, la complejidad de la biblioteca empleada, normalmente se requieren de 2 a 8 ciclos para este fin.

Para el análisis funcional de las muteínas seleccionadas, una cepa de *E. coli* se infecta con los fagémidos obtenidos a partir de los ciclos de selección y se aísla el ADN del fásmidico bicatenario correspondiente. Partiendo de este ADN de fásmidico, o también del ADN monocatenario extraído de los fagémidos, las secuencias de ácido nucleico de las muteínas seleccionadas de la invención se pueden determinar mediante los métodos conocidos en la técnica y la secuencia de aminoácidos se puede deducir de ellos. La región mutada o la secuencia de la muteína de lipocalina lacrimonal completa puede subclonarse en otro vector de expresión y expresarse en un organismo huésped adecuado. Por ejemplo, el vector pTLPC26 ahora también llamado pTlc26 se puede usar para la expresión en cepas de *E. coli* tales como *E. coli* TG1. Las muteínas de la lipocalina lacrimonal producidas de este modo se pueden purificar mediante diversos métodos bioquímicos. Una muteína de lipocalina lacrimonal producida, por ejemplo, con pTlc26, puede portar un péptido de afinidad, denominado marcador de afinidad, por ejemplo en su extremo terminal C y, por lo tanto, puede purificarse mediante cromatografía de afinidad. Los ejemplos de una etiqueta de afinidad incluyen, pero no se limitan a, biotina, Strep-tag, Strep-tag II (Schmidt et al., citado más arriba), oligohistidina, polihistidina, un dominio de inmunoglobulina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa (GST) o péptido de unión a la calmodulina (CBP).

Algunas etiquetas de afinidad son haptenos, por ejemplo, pero no se limitan a, dinitrofenol y digoxigenina. Algunas etiquetas de afinidad son etiquetas de epítipo, tales como el péptido FLAG® (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-Gly), el epítipo T7 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly), la proteína de unión a la maltosa (MBP), el epítipo del HSV de la secuencia Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp de la glicoproteína D del virus del herpes simple, el epítipo hemaglutinina (HA) de la secuencia Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala, el epítipo de VSV-G de la glicoproteína viral de estomatitis vesicular (Cys-Tyr-The-Asp-Ile-Glu -Met-Asn-Arg-Leu-Lys), la etiqueta del epítipo E de la secuencia Gly-Ala-Pro-Val-Pro-Tyr-Pro-Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Arg, la etiqueta del epítipo E2 de la secuencia Gly-Val-Ser-Ser-Thr-Ser-Ser-Asp-Phe-Arg-Asp-Arg, la etiqueta del epítipo Tag-100 de los extremos terminales C de las MAPK/ERK quinasas de mamíferos de la secuencia Glu-Glu-Thr -Ala-Arg-Phe-Gln-Pro-Gly-Tyr-Arg-Ser, la etiqueta S de la secuencia Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His Met-Asp-Ser, el epítipo "myc" del factor de transcripción c-myc de la secuencia Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu y el epítipo V5 pequeño presente en las proteínas P y V del paramixovirus del Virus 5 de Simio (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr). Además, pero generalmente no como una etiqueta única, se puede usar una etiqueta que mejora la solubilidad tal como NusA, tiorredoxina (TRX), modificador pequeño similar a la ubiquitina (SUMO) y ubiquitina (Ub). Las etiquetas de haptenos y epítipos se pueden usar en combinación con un anticuerpo correspondiente o una molécula proteica similar a un anticuerpo como compañero de unión. El epítipo del péptido S de la secuencia Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser se puede usar como una etiqueta del epítipo en relación con un anticuerpo respectivo o en combinación con la proteína S como compañero de unión (Hackbarth, JS, et al., BioTechniques (2004) 37, 5, 835-839).

La selección también se puede llevar a cabo mediante otros métodos. Muchas realizaciones correspondientes son conocidas por los expertos en la técnica o están descritas en la bibliografía. Además, se puede aplicar una combinación de métodos. Por ejemplo, los clones seleccionados o al menos enriquecidos por "presentación en fagos" pueden someterse adicionalmente a "cribado de colonias". Este procedimiento tiene la ventaja de que los clones individuales se pueden aislar directamente con respecto a la producción de una muteína de lipocalina lacrimonal con una afinidad de unión detectable para un objetivo.

Además del uso *E. coli* como organismo huésped en la técnica de "presentación en fagos" o en el método de "cribado de colonias", se pueden utilizar para este fin otras cepas bacterianas, levaduras o también células de insectos o células de mamíferos. Además de la selección de una muteína de lipocalina lacrimonal de una biblioteca aleatoria como se describió anteriormente, también se pueden aplicar métodos evolutivos que incluyen mutagénesis limitada para optimizar una muteína que ya posee alguna actividad de unión para el objetivo con respecto a la afinidad o especificidad para el objetivo después de repetidos ciclos de cribado.

Para el experto en la materia es evidente que la formación de complejos depende de muchos factores, como la concentración de los compañeros de unión, la presencia de competidores, la fuerza iónica del sistema regulador, etc. La selección y el enriquecimiento se realizan generalmente en condiciones que permiten el aislamiento de muteínas de lipocalina que tienen, en complejo con el objetivo deseado, una constante de disociación de al menos 200 nM. Sin embargo, las etapas de lavado y elución pueden llevarse a cabo bajo rigurosidad variable. También es posible una selección con respecto a las características cinéticas. Por ejemplo, la selección se puede realizar bajo condiciones, que favorecen la formación del complejo del objetivo con muteínas que muestran una disociación lenta del objetivo, o

en otras palabras, un baja velocidad de disociación  $k_{\text{disociación}}$ . Alternativamente, la selección se puede realizar en condiciones, que favorecen la formación rápida del complejo entre la muteína y el objetivo, o en otras palabras, una alta velocidad de asociación  $k_{\text{asociación}}$ . Como una alternativa ilustrativa adicional, la selección puede realizarse en condiciones que seleccionan la termoestabilidad mejorada de las muteínas (en comparación con la lipocalina lacrimonal de tipo natural o una muteína que ya tiene afinidad hacia un objetivo preseleccionado).

Una vez que se ha seleccionado una muteína con afinidad por un objetivo dado, es posible además someter dicha muteína a otra mutagénesis para seleccionar posteriormente variantes de afinidad aún mayor o variantes con propiedades mejoradas, tales como mayor termoestabilidad, mayor estabilidad en suero, estabilidad termodinámica, solubilidad mejorada, comportamiento monomérico mejorado, resistencia mejorada contra la desnaturalización térmica, desnaturalización química, proteólisis o detergentes, etc. Esta mutagénesis adicional, que en caso de apuntar a una afinidad más alta, puede considerarse como "maduración por afinidad" *in vitro*, se puede lograr mediante una mutación específica del sitio basada en un diseño racional o una mutación aleatoria. Otro posible enfoque para obtener una afinidad más alta o propiedades mejoradas es el uso de PCR propensa a errores, que resulta en mutaciones puntuales en un intervalo seleccionado de posiciones de secuencia de la muteína de lipocalina. La PCR propensa a errores se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier protocolo conocido, como el descrito por Zacco et al., J. Mol. Biol. 255, 589-603. Otros métodos de mutagénesis aleatoria que son adecuados para tales propósitos incluyen la mutagénesis de inserción/eliminación aleatoria (RID), tal como se describe por Murakami, H et al., (2002) Nat. Biotechnol. 20, 76-81 o recombinación aleatoria no homóloga (NRR) de acuerdo con lo descrito por Bittker, J. A et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20, 1024-1029. Si se desea, la maduración de afinidad también se puede llevar a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 00/75308 o Schlehuber, S. et al., (2000) J. Mol. Biol. 297, 1105-1120, en donde se obtuvieron muteínas de la proteína de unión a bilina que tienen alta afinidad por la digoxigenina.

Se puede usar una muteína de lipocalina lacrimonal de la invención para la formación de complejos con el receptor alfa de IL-4. La muteína también puede unirse a un fragmento inmunogénico del receptor alfa de IL-4. Un fragmento inmunogénico del receptor alfa de IL-4 es un fragmento que tiene uno o más epítomos, mimótopos u otros determinantes antigénicos, y por lo tanto es capaz de inducir una respuesta inmune o contra la cual se puede producir un anticuerpo. El fragmento inmunogénico puede incluir un único epítomo o puede tener una pluralidad de epítomos. Desde un sistema de presentación de antígeno, por ejemplo, una proteína portadora, se puede usar para proporcionar el tamaño requerido para el reconocimiento por un sistema inmunológico, no se aplica ninguna limitación de tamaño particular al fragmento inmunogénico. Por lo tanto, el fragmento inmunogénico también puede ser un "hapteno", es decir, un fragmento que no necesita ser antigénico por sí mismo o puede tener baja inmunogenicidad, en particular debido a su pequeño peso molecular y, por consiguiente, su tamaño. Típicamente, un fragmento inmunogénico puede, solo o cuando se presenta en un portador, estar unido por una inmunoglobulina o por un receptor de células T (TCR) si es presentado por moléculas del MHC. Un fragmento inmunogénico es típicamente, solo o cuando se presenta en forma de sistema de presentación de antígeno, capaz de inducir una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce, por ejemplo, a la activación de linfocitos B y/o T.

El objetivo de una muteína de la invención es la cadena alfa del receptor de interleuquina 4, una proteína transmembrana, que contiene un dominio extracelular de 207 aminoácidos. Existe una forma secretada del dominio extracelular, sIL-4R alfa, que también se conoce como CD124 y es capaz de bloquear las actividades de IL-4. Una muteína de la invención puede ser capaz de unirse al receptor alfa de sIL-4 así como a cualquier porción del dominio extracelular del receptor alfa de IL-4.

En este contexto, también se señala que la formación de complejos entre la muteína respectiva y su ligando está influenciada por muchos factores diferentes, tales como las concentraciones de las respectivas parejas de unión, la presencia de competidores, el pH y la fuerza iónica del sistema regulador utilizado, y el método experimental utilizado para la determinación de la constante de disociación  $K_D$  (por ejemplo, titulación de fluorescencia, ELISA de competición o resonancia de plasmón de superficie, solo para nombrar algunos) o incluso el algoritmo matemático que se utiliza para evaluar los datos experimentales.

Por lo tanto, también está claro para los expertos que los valores de  $K_D$  (constante de disociación del complejo formado entre la muteína respectiva y su ligando) aquí presentados pueden variar dentro de un cierto intervalo experimental, dependiendo del método y la configuración experimental que se utiliza para determinar la afinidad de una muteína de lipocalina particular para un ligando dado. Esto significa que puede haber una ligera desviación en los valores de  $K_D$  medidos o un intervalo de tolerancia que depende, por ejemplo, de si el valor de  $K_D$  se determinó por resonancia de plasmón de superficie (Biacore) o por ELISA de competición.

También se incluyen en el alcance de la presente invención las formas de las muteínas anteriores, en las que la muteína respectiva se ha alterado o modificado con respecto a su inmunogenicidad potencial.

Las células T citotóxicas reconocen antígenos peptídicos en la superficie celular de una célula presentadora de antígeno en asociación con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I. La capacidad de los péptidos para unirse a las moléculas del MHC es específica del alelo y se correlaciona con su inmunogenicidad. Para reducir la inmunogenicidad de una proteína dada, la capacidad de predecir qué péptidos en una proteína tienen el potencial de unirse a una molécula de MHC dada es de gran valor. Los enfoques que emplean un enfoque de

subprocesamiento computacional para identificar posibles epítomos de células T se han descrito previamente para predecir la unión de una secuencia peptídica dada a moléculas del MHC clase I (Altuvia et al. (1995) J. Mol. Biol. 249, 244-250).

Un enfoque de este tipo también se puede utilizar para identificar posibles epítomos de células T en las muteínas de la invención y para hacer, dependiendo de su uso previsto, una selección de una muteína específica sobre la base de su inmunogenicidad predicha. Además, puede ser posible someter a regiones peptídicas que se ha predicho que contienen epítomos de células T a mutagénesis adicional para reducir o eliminar estos epítomos de células T y, por lo tanto, minimizar la inmunogenicidad. La eliminación de epítomos anfipáticos de anticuerpos modificados genéticamente se ha descrito (Mateo et al. (2000) Hybridoma 19, 6, 463-471) y puede adaptarse a las muteínas de la presente invención.

Las muteínas así obtenidas pueden poseer una inmunogenicidad minimizada, que es deseable para su uso en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, tales como las que se describen a continuación.

Para algunas aplicaciones, también es útil emplear las muteínas de la invención en una forma marcada. Por consiguiente, la invención también se dirige a las muteínas de lipocalina que se conjugan con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores de colores, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, y oro coloidal. La muteína también puede conjugarse con un compuesto orgánico de bajo peso molecular. El término "compuesto orgánico de bajo peso molecular" como se usa en este documento denota un compuesto monomérico basado en carbono, que puede tener fracciones alifáticos, alicíclicos y/o aromáticos. En realizaciones típicas, el compuesto orgánico de bajo peso molecular es un compuesto orgánico que tiene una cadena principal de al menos dos átomos de carbono, y en algunas realizaciones no más de 7 o 12 enlaces de carbono giratorios. Dicho compuesto tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Dalton, tal como de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 Dalton. Opcionalmente puede incluir uno o dos átomos de metal.

En general, es posible marcar la muteína de lipocalina con cualquier sustancia o enzima química apropiada, que directa o indirectamente genere un compuesto o señal detectable en una reacción química, física, óptica o enzimática. Un ejemplo de reacción física y, al mismo tiempo, reacción/marcador óptico es la emisión de fluorescencia tras la irradiación o la emisión de rayos X cuando se utiliza una etiqueta radioactiva. La fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante o la  $\beta$ -galactosidasa son ejemplos de marcadores enzimáticos (y al mismo tiempo marcadores ópticos) que catalizan la formación de productos de reacción cromogénica. En general, todos los marcadores utilizados comúnmente para anticuerpos (excepto los utilizados exclusivamente con la fracción de azúcar en la parte Fc de las inmunoglobulinas) también se pueden usar para la conjugación con las muteínas de la presente invención. Las muteínas de la invención también pueden conjugarse con cualquier agente terapéuticamente activo adecuado, por ejemplo, para la administración dirigida de dichos agentes a una célula, tejido u órgano dado o para la selección selectiva de células, por ejemplo, de células tumorales sin afectar los alrededores de las células normales. Los ejemplos de tales agentes terapéuticamente activos incluyen radionúclidos, toxinas, moléculas orgánicas pequeñas y péptidos terapéuticos (tales como péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de superficie celular o péptidos que compiten por un sitio de unión de proteínas en un objetivo celular determinado). Sin embargo, las muteínas de lipocalina de la invención también pueden conjugarse con ácidos nucleicos terapéuticamente activos, tales como moléculas de ácido nucleico antisentido, pequeños ARN interferentes, micro ARN o ribozimas. Dichos conjugados pueden producirse por métodos bien conocidos en la técnica.

En una realización, las muteínas de la invención también pueden acoplarse a una fracción de direccionamiento que se dirige a una región específica del cuerpo para suministrar las muteínas de la invención a una región o área deseada dentro del cuerpo. Un ejemplo en el que dicha modificación puede ser deseable es el cruce de la barrera hematoencefálica. Para cruzar la barrera hematoencefálica, las muteínas de la invención se pueden acoplar a fracciones que facilitan el transporte activo a través de esta barrera (véase Gaillard PJ, et al., Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. International Congress Series, 2005, 1277, 185-198 o Gaillard PJ, et al. Targeted delivery across the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv. 2005, 2, 2, 299-309. Tales fracciones están por ejemplo, disponibles, bajo el nombre comercial 2B-Trans<sup>MR</sup>, (de BBB Technologies BV, Leiden, NL)).

Como se indicó anteriormente, una muteína de la invención se puede conjugar en algunas realizaciones con una fracción que extiende la semivida en suero de la muteína (en este sentido, véase también la publicación PCT WO 2006/56464 donde se describen tales estrategias de conjugación con referencias a muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo humano con afinidad de unión por CTLA-4). La fracción que prolonga la semivida en suero puede ser una molécula de polialquilenglicol, hidroxietil almidón, moléculas de ácido graso, tales como ácido palmítico (Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, albúmina o un fragmento de los mismos, un péptido de unión a albúmina, o una proteína de unión a albúmina, transferrina para nombrar sólo algunos pocos. La proteína de unión a albúmina puede ser una proteína bacteriana de unión a albúmina, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la patente estadounidense No. 6.696.245, por ejemplo), o una muteína de lipocalina con actividad de unión por albúmina. Por consiguiente, los compañeros de conjugación adecuados para prolongar la semivida de una muteína de lipocalina de la invención incluyen albúmina (Osborn, BL et al., 2002, J.

Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), o una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, un dominio bacteriano de unión a albúmina, tal como el de la proteína G de estreptococo (König, T., y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como compañeros de conjugación son, por ejemplo, aquellos que tienen una secuencia de consenso Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys, en la que Xaa<sub>1</sub> es Asp, Asn, Ser, Thr o Trp; Xaa<sub>2</sub> es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa<sub>3</sub> es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa<sub>4</sub> es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2003/0069395 o Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. y Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043).

En otras realizaciones, la albúmina en sí misma o un fragmento biológicamente activo de albúmina se pueden usar como compañero de conjugación de una muteína de lipocalina de la invención. El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamíferos, tales como la albúmina de suero humano o la albúmina de suero bovino o la albúmina de rata. La albúmina o fragmento de la misma puede producirse de forma recombinante como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.728.553 o en las solicitudes de patente europea EP 0 330 451 y EP 0 361 991. La albúmina humana recombinante (Recombunin®) Novozymes Delta Ltda. (Nottingham, Reino Unido) puede conjugarse o fusionarse con una muteína de lipocalina para prolongar la semivida de la muteína.

Si la proteína de unión a la albúmina es un fragmento de anticuerpo, puede ser un anticuerpo de dominio. Los anticuerpos de dominio (dAb) están diseñados para permitir un control preciso sobre las propiedades biofísicas y la semivida *in vivo* para crear un perfil de producto de seguridad y eficacia óptimo. Los anticuerpos de dominio, por ejemplo, están disponibles comercialmente a través de Domantis Ltda. (Cambridge, RU y MA, USA).

Utilizando la transferrina como una fracción para prolongar la semivida en suero de las muteínas de la invención, las muteínas pueden fusionarse genéticamente a los extremos terminales N o C, o ambos, de la transferrina no glicosilada. La transferrina no glicosilada tiene una semivida de 14 a 17 días, y una proteína de fusión de transferrina también tendrá una semivida prolongada. El portador de transferrina también proporciona una alta biodisponibilidad, biodistribución y estabilidad en circulación. Esta tecnología está disponible comercialmente a través de BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA). La transferrina humana recombinante (DeltaFerrin<sup>MR</sup>) para uso como un estabilizador de proteínas/compañero de extensión de semivida también está disponible comercialmente a través de Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, RU).

Si se utiliza una parte Fc de una inmunoglobulina con el fin de prolongar la semivida en suero de las muteínas de la invención, se puede usar la tecnología SynFusion<sup>MR</sup>, disponible comercialmente a través de Syntonix Pharmaceuticals, Inc. (MA, USA). El uso de esta tecnología de fusión de Fc permite la creación de productos biofarmacéuticos de acción prolongada y puede consistir, por ejemplo, en dos copias de la muteína unida a la región Fc de un anticuerpo para mejorar la farmacocinética, la solubilidad y la eficiencia de producción.

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

Si se utiliza polialquilenglicol como compañero de conjugación, el polialquilenglicol puede estar sustituido, no sustituido, lineal o ramificado. También puede ser un derivado de polialquileno activado. Los ejemplos de compuestos adecuados son las moléculas de polietilenglicol (PEG) como se describe en el documento WO 99/64016, en la patente de Estados Unidos No. 6.177.074 o en la patente de Estados Unidos No. 6.403.564 en relación con el interferón, o como se describe para otras proteínas tal como la asparaginasa modificada con PEG, PEG adenosina desaminasa (PEG-ADA) o PEG-superóxido dismutasa (véase, por ejemplo, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148). El peso molecular de dicho polímero, tal como el polietilenglicol, puede oscilar entre aproximadamente 300 a aproximadamente 70.000 Dalton, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 10.000, de aproximadamente 20.000, de aproximadamente 30.000 o de aproximadamente 40.000 Dalton. Además, como por ejemplo, como se describe, en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.500.930 o 6.620.413, los oligos y polímeros de carbohidratos como el almidón o el hidroxietil almidón (HES) se pueden conjugar con una muteína de la invención con el propósito de prolongar la semivida en suero.

Si una de las fracciones anteriores se conjuga con la muteína de lipocalina lacrimon humana de la invención, la conjugación con una cadena lateral de aminoácido puede ser ventajosa. Las cadenas laterales adecuadas de aminoácidos pueden ser de origen natural en la secuencia de aminoácidos de la lipocalina lacrimon humana o pueden introducirse por mutagénesis. En caso de que se introduzca un sitio de unión adecuado a través de mutagénesis, una posibilidad es la sustitución de un aminoácido en la posición apropiada por un residuo de cisteína. En una realización, dicha mutación incluye al menos una sustitución de Thr 40 → Cys, Glu 73 → Cys, Arg 90 → Cys, Asp 95 → Cys o Glu 131 → Cys. El residuo de cisteína recién creado en cualquiera de estas posiciones se puede utilizar a continuación para conjugar la muteína con una fracción que prolonga la semivida en suero de la muteína, tal como PEG o un derivado activado del mismo.

En otra realización, con el fin de proporcionar cadenas laterales adecuadas de aminoácidos para conjugar una de las fracciones anteriores con las muteínas de la invención, pueden introducirse aminoácidos artificiales mediante mutagénesis. En general, tales aminoácidos artificiales están diseñados para ser más reactivos y, por lo tanto, para facilitar la conjugación con la fracción deseada. Un ejemplo de un aminoácido artificial de este tipo que puede introducirse a través de un ARNt artificial es para-acetil-fenilalanina.

Para varias aplicaciones de las muteínas descritas en el presente documento, puede ser ventajoso usarlas en forma de proteínas de fusión. En algunas realizaciones, la muteína de lipocalina lacrimal humana de la invención se fusiona en su extremo terminal N o su extremo terminal C con una proteína, un dominio de proteína o un péptido tal como una secuencia señal y/o una etiqueta de afinidad.

Para aplicaciones farmacéuticas, una muteína de la invención se puede fusionar con un compañero de fusión que prolonga la semivida en suero *in vivo* de la muteína (véase nuevamente la publicación PCT WO 2006/56464 en la que se describen compañeros de fusión adecuada con referencias a muteínas de lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos humanos con afinidad de unión por CTLA-4). Similar a los conjugados descritos anteriormente, el compañero de fusión puede ser una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, albúmina, un péptido de unión a albúmina o una proteína de unión a albúmina, por nombrar sólo algunos pocos. De nuevo, la proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana o una muteína de lipocalina con actividad de unión a albúmina. Por consiguiente, los compañeros de fusión adecuados para prolongar la semivida de una muteína de lipocalina de la invención incluyen albúmina (Osborn, BL et al. (2002) citado más arriba, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), o una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, un dominio de unión a albúmina bacteriana, tal como la proteína G de estreptococos (Konig, T. y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Los péptidos de unión a albúmina descritos en Dennis et al., citado más arriba (2002) o la solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0069395 que tienen una secuencia de consenso Cys-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Cys, en la que Xaa1 es Asp, Asn, Ser, Thr o Trp; Xaa2 es Asn, Gln, His, Ile, Leu o Lys; Xaa3 es Ala, Asp, Phe, Trp o Tyr; y Xaa4 es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser o Thr también pueden usarse como compañero de fusión. También es posible usar albúmina misma o un fragmento biológico activo de albúmina como compañero de fusión de una muteína de lipocalina de la invención. El término "albúmina" incluye todas las albúminas de mamíferos, como la albúmina de suero humana o la albúmina de suero bovina o la albúmina de suero de rata. La producción recombinante de albúmina o fragmentos de la misma es bien conocida en la técnica y, por ejemplo, se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.728.553, la solicitud de patente europea EP 0 330 451 o EP 0 361 991.

El compañero de fusión puede conferir nuevas características a la muteína de lipocalina de la invención, tal como actividad enzimática o afinidad de unión por otras moléculas. Ejemplos de proteínas de fusión adecuadas son fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la glutatión-S-transferasa, el dominio de unión a albúmina de la proteína G, proteína A, fragmentos de anticuerpos, dominios de oligomerización, muteínas de lipocalina de especificidad de unión igual o diferente (lo que resulta en la formación de "Duocalinas", véase, Schlehuber, S., y Skerra, A. (2001), Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. Biol. Chem. 382, 1335-1342) o toxinas.

En particular, puede ser posible fusionar una muteína de lipocalina de la invención con un sitio activo de enzima separado de tal manera que ambos "componentes" de la proteína de fusión resultante actúen juntos en un objetivo terapéutico dado. El dominio de unión de la muteína de lipocalina se adhiere al objetivo causante de la enfermedad, lo que permite que el dominio de la enzima elimine la función biológica del objetivo.

Las etiquetas de afinidad tales como Strep-tag® o Strep-tag® II (Schmidt, TGM et al., J. Mol. Biol. 255, 753-766), la etiqueta myc, la etiqueta FLAG, la etiqueta His<sub>6</sub> o la etiqueta o proteínas de HA tales como la glutatión-S-transferasa también permiten una fácil detección y/o purificación de las proteínas recombinantes, son ejemplos adicionales de compañeros de fusión adecuados. Finalmente, también las proteínas con propiedades cromogénicas o fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína fluorescente amarilla (YFP) también son compañeros de fusión adecuados para una muteína de lipocalina de la invención.

El término "proteína de fusión" como se usa en el presente documento también incluye muteínas de lipocalina de acuerdo con la invención que contienen una secuencia señal. Las secuencias señal en el extremo terminal N de un polipéptido dirige este polipéptido a un compartimento celular específico, por ejemplo, el periplasma de *E. coli* o el retículo endoplasmático de células eucariotas. Un gran número de secuencias señal es conocido en la técnica. Una secuencia señal ilustrativa para la secreción de un polipéptido en el periplasma de *E. coli* es la secuencia señal de OmpA.

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico (ADN y ARN) que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican muteínas como se describe en el presente documento. Dado que la degeneración del código genético permite sustituciones de ciertos codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido, la invención no se limita a una molécula de ácido nucleico específica que codifica una muteína de la invención sino que abarca todas las moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una muteína funcional.



Por lo tanto, la presente invención también incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una muteína de acuerdo con la invención.

5 La invención como se describe en el presente documento también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican muteínas de lipocalina lacrimonasal, que incluyen mutaciones adicionales fuera de las posiciones de secuencia indicadas de mutagénesis experimental. Dichas mutaciones a menudo son toleradas o incluso pueden resultar ventajosas, por ejemplo, si contribuyen a una eficacia de plegamiento mejorada, estabilidad en suero, estabilidad térmica o afinidad de unión a ligando de la muteína.

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

10 Una molécula de ácido nucleico, como el ADN, se denomina "capaz de expresar una molécula de ácido nucleico" o "capaz de permitir la expresión de una secuencia de nucleótidos" si incluye elementos de secuencia que contienen información con respecto a la regulación transcripcional y/o translacional, y tales secuencias están "unidas operativamente" a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Un enlace operable es un enlace en el que los elementos de la secuencia reguladora y la secuencia que se va a expresar están conectados de una manera que permite la expresión génica. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre las especies, pero en general estas regiones incluyen un promotor que, en procariotas, contiene tanto el promotor mismo, es decir, elementos de ADN que dirigen el inicio de la transcripción, así como elementos de ADN que, cuando se transcriben en ARN, señalarán el inicio de la traducción. Dichas regiones promotoras normalmente incluyen secuencias no codificantes 5' involucradas en el inicio de la transcripción y la traducción, tales como las cajas -35/-10 y el elemento Shine-Dalgarno en procariotas o la caja TATA, secuencias CAAT y los elementos de protección de 5' en eucariotas. Estas regiones también pueden incluir elementos potenciadores o represores, así como secuencias de señal y líder traducidas para dirigir el polipéptido nativo a un compartimento específico de una célula huésped.

25 Además, las secuencias 3' no codificantes pueden contener elementos reguladores implicados en la terminación de la transcripción, la poliadenilación o similares. Sin embargo, si estas secuencias de terminación no son funcionales satisfactorias en una célula huésped particular, entonces pueden sustituirse con señales funcionales en esa célula.

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

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden formar parte de un vector o de cualquier otro tipo de vehículo de clonación, tal como un plásmido, un fagémido, un fago, un baculovirus, un cósmido o un cromosoma artificial.

35 En una realización, la molécula de ácido nucleico está incluida en un fasmido. Un vector fasmido denota un vector que codifica la región intergénica de un fago temperante, tal como M13 o f1, o una parte funcional de la misma fusionada al ADNc de interés. Después de la superinfección de las células huésped bacterianas con dicho vector fagémido y un fago auxiliar apropiado (por ejemplo, M13K07, VCS-M13 o R408) se producen partículas de fagos intactas, lo que permite el acoplamiento físico del ADNc heterólogo codificado por su correspondiente polipéptido mostrado en la superficie del fago (véase, por ejemplo, Lowman, HB (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424, o Rodi, DJ, y Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93).

40 Dichos vehículos de clonación pueden incluir, aparte de las secuencias reguladoras descritas anteriormente y una secuencia de ácido nucleico que codifica una muteína de lipocalina de la invención, secuencias de replicación y control derivadas de una especie compatible con la célula huésped que se utiliza para la expresión, así como marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable en células transformadas o transfectadas. En la técnica se conocen grandes cantidades de vectores de clonación adecuados, y están disponibles comercialmente.

45 La molécula de ADN que codifica las muteínas de lipocalina de la invención, y en particular un vector de clonación que contiene la secuencia codificadora de tal muteína de lipocalina, se puede transformar en una célula huésped capaz de expresar el gen. La transformación se puede realizar utilizando técnicas estándar. Por lo tanto, la invención también se dirige a una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento.

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

La divulgación también se refiere a un método para la producción de una muteína de la invención, en el que la muteína, un fragmento de la muteína o una proteína de fusión de la muteína y otro polipéptido se producen a partir del ácido nucleico que codifica la muteína mediante métodos de ingeniería genética. El método puede llevarse a cabo *in vivo*, la muteína puede producirse, por ejemplo, en un organismo huésped bacteriano o eucariótico y luego aislarse de este organismo huésped o su cultivo. También es posible producir una proteína *in vitro*, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de traducción *in vitro*.

Cuando se produce la muteína *in vivo*, el ácido nucleico que codifica una muteína de la invención se introduce en un organismo huésped bacteriano o eucariótico adecuado por medio de tecnología de ADN recombinante (como ya se describió anteriormente). Para este propósito, la célula huésped primero se transforma con un vector de clonación que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una muteína de la invención utilizando métodos estándar establecidos. La célula huésped se cultiva luego en condiciones que permiten la expresión del ADN heterólogo y, por lo tanto, la síntesis del polipéptido correspondiente. Posteriormente, el polipéptido se recupera de la célula o del medio de cultivo.

En las muteínas de lipocalina lacrimonasal de la invención, se elimina el enlace disulfuro que se produce naturalmente entre Cys 61 y Cys 153. Por consiguiente, tales muteínas (o cualquier otra muteína de lipocalina lacrimonasal que no incluya un enlace disulfuro intramolecular) se pueden producir en un compartimento celular que tiene un medio redox reductor, por ejemplo, en el citoplasma de bacterias Gram negativas. En caso de que la muteína de lipocalina de la invención incluya enlaces disulfuro intramoleculares, puede desearse dirigir el polipéptido naciente a un compartimento celular que tiene un medio redox oxidante usando una secuencia señal apropiada. Dicho entorno oxidante puede ser proporcionado por el periplasma de bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*, en el medio extracelular de las bacterias Gram positivas o en el lumen del retículo endoplasmático de las células eucariotas y generalmente favorece la formación de enlaces disulfuro estructurales. Sin embargo, también es posible producir una muteína de la invención en el citosol de una célula huésped, tal como *E. coli*. En este caso, el polipéptido puede obtenerse directamente en un estado soluble y plegado o recuperarse en forma de cuerpos de inclusión, seguido de renaturalización *in vitro*. Una opción adicional es el uso de cepas huésped específicas que tienen un medio intracelular oxidante, lo que puede permitir la formación de enlaces disulfuro en el citosol (Venturi M, et al. (2002) J. Mol Biol. 315, 1-8).

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

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

La invención también se refiere a una composición farmacéutica, que incluye al menos una muteína de la invención de lipocalina lacrimonasal humana o una proteína de fusión o un conjugado de la misma y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las muteínas de lipocalina de acuerdo con la invención pueden administrarse por cualquier vía parenteral o no parenteral (enteral) que sea terapéuticamente eficaz para fármacos proteínicos. Las muteínas de la invención pueden administrarse sistémicamente o tópicamente en formulaciones que contienen excipientes o portadores, aditivos y vehículos convencionales, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables según se desee.

En una realización de la presente invención, el producto farmacéutico se administra por parenteralmente a un mamífero, y en particular a seres humanos. La composición farmacéutica puede ser una solución acuosa, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

En este sentido, se observa que las tecnologías de administración transdérmica, por ejemplo, iontoforesis, sonoforesis o administración mejorada con microagujas, como se describe en Meidan VM y Michniak BB (2004) Am. J. Ther. 11, 4, 312-316, también se pueden usar para administración transdérmica de las muteínas descritas en este documento. Las muteínas de la invención pueden administrarse por sistémica o tópicamente en formulaciones que contienen una variedad de excipientes o portadores, aditivos y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

La dosificación de la muteína aplicada puede variar dentro de amplios límites para lograr el efecto preventivo deseado o la respuesta terapéutica. Dependerá, por ejemplo, de la afinidad del compuesto por un ligando elegido, así como de la semivida del complejo entre la muteína y el ligando *in vivo*. Además, la dosis óptima dependerá de la biodistribución de la muteína o su proteína de fusión o su conjugado, el modo de administración, la gravedad de la enfermedad/trastorno que se está tratando, así como la condición médica del paciente. Por ejemplo, cuando se usa en un ungüento para aplicaciones tópicas, se puede usar una alta concentración de la muteína de lipocalina lacrimonasal. Sin embargo, si se desea, la muteína también se puede administrar en una formulación de liberación sostenida, por ejemplo, dispersiones liposómicas o microesferas poliméricas basadas en hidrogel, tales como PolyActive<sup>MR</sup> u

OctoDEX<sup>MR</sup> (véase Bos et al., Business Briefing: Pharmatech 2003, 1-6). Otras formulaciones de liberación sostenida disponibles son, por ejemplo, polímeros basados en PLGA (PR Pharmaceuticals), hidrogeles basados en PLA-PEG (Medincell) y polímeros basados en PEA (Medivas).

5 De acuerdo con esto, las muteínas de la presente invención se pueden formular en composiciones que usan ingredientes farmacéuticamente aceptables, así como métodos establecidos de preparación. La composición farmacéutica también puede contener aditivos, tales como, por ejemplo, rellenos, aglutinantes, agentes humectantes, deslizantes, estabilizantes, conservantes, emulsionantes y, además, disolventes o solubilizantes o agentes para lograr un efecto de depósito. Lo último es que las proteínas de fusión pueden incorporarse en sistemas de liberación lenta o sostenida o de administración dirigida, tales como liposomas y microcápsulas.

10 Las formulaciones pueden esterilizarse por numerosos medios, incluida la filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio estéril justo antes de su uso.

15 Una muteína de lipocalina descrita en el presente documento puede administrarse a un organismo, incluido un paciente humano mismo, o en una composición farmacéutica en la que puede incluir o mezclarse con ingredientes farmacéuticamente activos o vehículos o excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de una composición de muteína de lipocalina respectiva se parecen o son idénticas a las de los compuestos de bajo peso molecular bien establecidos en la técnica. Los ejemplos de rutas incluyen, entre otras, la administración oral, transdérmica y parenteral.

20 Una composición que incluye una muteína de lipocalina de la invención puede aplicarse, por ejemplo, sobre la piel o sobre una herida. En algunas realizaciones, se puede administrar una muteína de lipocalina o una composición respectiva de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección.

25 Las composiciones farmacéuticas que incluyen una muteína de lipocalina de la presente invención se pueden fabricar de una manera que es en sí misma conocida, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención puede formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que incluyen excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento del hidrogel y/o péptido/peptidoide en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

30 Para inyección, la muteína de lipocalina o una composición respectiva puede formularse en soluciones acuosas, por ejemplo en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o regulador de solución salina fisiológico. Para la administración transmucosa, los penetrantes apropiados para la barrera a permear se utilizan en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

35 Para la administración oral, la muteína de lipocalina o una composición respectiva se puede formular fácilmente combinándolas con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten que la muteína de lipocalina o una composición respectiva, así como un compuesto farmacéuticamente activo donde esté presente, se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, compuestos acuosos, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener agregando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tal como la polivinilpirrolidona entrecruzada, el agar o el ácido algínico o una sal de los mismos, como el alginato de sodio.

45 Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

50 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de inserción por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con un relleno como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como el talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los péptidos/peptoides se pueden suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

La muteína de lipocalina puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyecciones intramusculares o inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante agregado. Las composiciones respectivas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

El sujeto que necesita un tratamiento de este tipo puede ser un mamífero, tal como un ser humano, un perro, un ratón, una rata, un cerdo, un mono tal como un cynomolgus para nombrar solo algunos ejemplos ilustrativos. Una muteína de la presente invención puede usarse para tratar cualquier enfermedad o trastorno que implique el receptor alfa de IL-4, en el desarrollo de tal enfermedad o trastorno, puede ser presentado al producto de expresión de una biblioteca de ácidos nucleicos de la presente divulgación o presentarse a muteínas obtenidas de lipocalina lacrimal.

En este contexto, se observa que una variedad de células tumorales expresan un número mayor de receptores de IL-4 de alta afinidad que las células normales. Estas células incluyen tumores humanos sólidos tales como melanoma, cáncer de mama, carcinoma de ovario, mesotelioma, glioblastoma, astrocitoma, carcinoma de células renales, carcinoma de cabeza y cuello, sarcoma de Kaposi asociado al SIDA = SIDA KS, células de carcinomas de próstata dependientes e independientes de hormonas, y cultivos primarios de tumores de próstata, por ejemplo, (véase Garland, L, et al., (2005) *Journal of Immunotherapy* 28, 4, 376-381, Rand, RW, et al. *Clinical Cancer Research*. (2000) 6, 2157-2165 Husain SR, et al. (1999) *Nature Medicine* 5, 817-822; Puri RK, et al. *Cancer Research* (1996) 56, 5631-5637; Debinski W, et al., o Husain SR, et al. *Cancer Research* (1998) 58, 3649-3653, Kawakami K, et al. (2000) *Cancer Research*, 60, 2981-2987; o Strome SE, et al., *Clinical Cancer Research* (2002) 8, 281-286, por ejemplo). Los ejemplos específicos de células que documentan la sobreexpresión de los receptores de IL-4 incluyen, entre otros, la línea celular Jijoye de linfoma de Burkitt, (linfoma de células B), carcinoma de próstata (LNCaP, DU145), carcinoma de cabeza y cuello (SCC, KCCT873), Cáncer de páncreas (línea celular PANC-1), SCC-25: 13.000 (+/- 500H) línea celular de cáncer de cabeza y cuello (ATCC). La cadena alfa IL4R desempeña un papel importante en la internalización de IL4. Por consiguiente, cuando se fusionan o se conjugan con una toxina, las muteínas de lipocalina lacrimal que se unen a la cadena alfa del Receptor de IL-4 también se pueden usar para el tratamiento de tumores (cáncer). Entre los ejemplos de toxinas adecuadas se incluyen la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina pertussis, la toxina de la difteria, la ricina, la saporina, la exotoxina de *Pseudomonas*, la caliqueamicina o un derivado de la misma, un toxoide, un maitansinoide, una tubulisina y un análogo de dolastatina. Los ejemplos de análogos de la dolastatina incluyen, entre otros, auristatina E, monometilauristatina E, auristatina PYE y auristatina PHE.

Para el tratamiento del cáncer, también es posible conjugar las muteínas que se unen a la cadena alfa del receptor de IL-4 con un agente citostático. Los ejemplos de dichos agentes citostáticos incluyen compuestos relacionados con Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo, Taxotere (Docetaxel), Paclitaxel, Antraciclina (Doxorrubicina), Metotrexato, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, Dacarbazina, Ciclofosfamida, Etopósido, Adriamicina, Camptotecina, Combretastatina A-4, Sulfonamidas, Oxadiazolinas, benzo[b]tiofenos, piranos espirocetales sintéticos, compuestos de monotetrahidrofurano, curacina y derivados de curacina, derivados de metoxiestradiol y Leucovorina.

Como es evidente a partir de la descripción anterior, una muteína de la presente invención o una proteína de fusión o un conjugado de la misma se puede emplear en muchas aplicaciones. En general, tal muteína se puede usar en todas las aplicaciones en que se usan los anticuerpos, excepto aquellos que se basan específicamente en la glicosilación de la parte Fc.

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, las muteínas de la invención de lipocalina lacrimal humana se utilizan para la detección de un ligando no natural dado de la lipocalina lacrimal humana. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto la muteína con una muestra sospechosa de contener el ligando dado en condiciones adecuadas, permitiendo así la formación de un complejo entre la muteína y el ligando dado, y detectar la muteína complejada por una señal adecuada.

La señal detectable puede ser causada por una etiqueta, como se explicó anteriormente, o por un cambio de las propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo en sí. Un ejemplo es la resonancia de la superficie del plasmón, cuyo valor se modifica durante la unión de las parejas de unión, de las cuales una está inmovilizada en una superficie, tal como una lámina de oro.

Las muteínas de la lipocalina lacrimal humana descritas en el presente documento también se pueden usar para la separación de un ligando no natural dado de la lipocalina lacrimal humana. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto la muteína con una muestra que se supone que contiene dicho ligando en condiciones adecuadas, permitiendo así la formación de un complejo entre la muteína y el ligando dado, y separando el complejo de muteína/ligando de la muestra.

Tanto en el uso de la muteína para la detección de un ligando no natural dado como en la separación de un ligando dado, la muteína y/o el objetivo pueden inmovilizarse en una fase sólida adecuada.

Las muteínas de lipocalina lacrimal humanas de la invención también se pueden usar para dirigir un compuesto a un sitio preseleccionado. Para tal fin, la muteína se pone en contacto con el compuesto de interés para permitir la

formación del complejo. Luego, el complejo que incluye la muteína y el compuesto de interés se envían al sitio preseleccionado. Este uso es particularmente adecuado, pero no se limita a, para administrar un medicamento (selectivamente) a un sitio preseleccionado en un organismo, tal como una parte del cuerpo, tejido u órgano infectado que se supone que se trata con el medicamento. Además de la formación de un complejo entre la muteína y el compuesto de interés, la muteína también puede hacerse reaccionar con el compuesto dado para producir un conjugado de muteína y compuesto. Similar al complejo anterior, tal conjugado puede ser adecuado para administrar el compuesto al sitio objetivo preseleccionado. Dicho conjugado de muteína y compuesto también puede incluir un enlazador que une covalentemente la muteína y el compuesto entre sí. Opcionalmente, dicho enlazador es estable en el torrente sanguíneo pero se puede escindir en un entorno celular.

Las muteínas descritas en el presente documento y sus derivados se pueden usar así en muchos campos similares a los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Además de su uso para unirse a un soporte, permitiendo que el objetivo de una muteína o un conjugado o una proteína de fusión de este objetivo se inmovilice o separe, las muteínas se pueden usar para marcar con una enzima, un anticuerpo una sustancia radioactiva, o cualquier otro grupo que tenga actividad bioquímica o características de unión definidas. De este modo, sus objetivos o conjugados respectivos o proteínas de fusión de los mismos pueden detectarse o ponerse en contacto con ellos. Por ejemplo, las muteínas de la invención pueden servir para detectar estructuras químicas por medio de métodos analíticos establecidos (por ejemplo, ELISA o transferencia Western) o por microscopía o inmunosensores. En este caso, la señal de detección puede generarse directamente mediante el uso de un conjugado de muteína o una proteína de fusión adecuados o indirectamente mediante la detección inmunológica de la muteína unida a través de un anticuerpo.

También existen numerosas aplicaciones posibles para las muteínas de la invención en medicina. Además de su uso en diagnósticos y administración de fármacos, se puede generar un polipéptido mutante de la invención, que se une, por ejemplo, a moléculas de superficie celular específicas de tejido o tumor. Dicha muteína se puede emplear, por ejemplo, en forma conjugada o como una proteína de fusión para formación de "imágenes de tumores" o directamente para la terapia del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición de diagnóstico que comprende una muteína de la invención y medios para el diagnóstico tales como excipientes, reguladores, etiquetas (que se pueden usar para marcar las muteínas).

Por lo tanto, la presente invención también implica el uso de las muteínas de lipocalina lacrimal humanas de la invención para la formación de complejos con un ligando no natural dado.

Otro uso relacionado de una muteína descrita en este documento es la validación de objetivos, es decir, el análisis de si un polipéptido que se supone está involucrado en el desarrollo o progreso de una enfermedad o trastorno es de alguna manera causante de esa enfermedad o trastorno. Este uso para validar una proteína como un objetivo farmacológico aprovecha la capacidad de una muteína de la presente invención para reconocer específicamente un área superficial de una proteína en su conformación nativa, es decir, para unirse a un epítipo nativo. A este respecto, debe notarse que esta capacidad se ha informado solo para un número limitado de anticuerpos recombinantes. Sin embargo, el uso de una muteína inventiva para la validación de un objetivo farmacológico no se limita a la detección de proteínas como objetivos, sino que también incluye la detección de dominios de proteínas, péptidos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgánicas o complejos metálicos.

Ejemplo de realización de la invención

La Figura 1 muestra la estructura primaria de una muteína de lipocalina lacrimal humana previamente descrita (S191.4-B24) que muestra afinidad de unión por el receptor alfa de IL-4. Los primeros 21 residuos (subrayados) constituyen la secuencia señal, que se escinde tras la expresión periplasmática. La etiqueta T7 del extremo terminal N (cursiva) y el Strep-tag-II del extremo terminal C (negrita) son parte de la proteína caracterizada. La Figura 1 también muestra que 4 residuos de aminoácidos del extremo terminal N (His1 His2 Leu3 Ala4) así como los dos últimos residuos de aminoácidos del extremo terminal C (Ser157 y Asp158) de la lipocalina lacrimal de tipo silvestre se eliminan en esta muteína.

La Figura 2 muestra las secuencias polipeptídicas de los ejemplos de muteínas con alta afinidad por el receptor alfa de IL-4 (SEQ ID NOs: 2-11). Los números indicados por 'SwissProt P31025' muestran la correspondiente numeración de la posición del aminoácido de la secuencia precursora no procesada de la entrada de la base de datos SwissProt. TLc26 de tipo silvestre esencialmente corresponde a la secuencia de lipocalina lacrimal de tipo silvestre en el vector pTLc26. Sin embargo, TLc26 de tipo silvestre no incluye un enlace disulfuro, ya que los residuos de cisteína en las posiciones 61 y 153 de la proteína madura se reemplazan por residuos de serina. Asimismo, un residuo de serina en las posiciones 101 de la proteína madura se reemplaza por un residuo de serina. Además, en la posición 111 de la proteína madura, un residuo de arginina ha sido reemplazado por una prolina y en la posición 114 de la proteína madura, un residuo de lisina ha sido reemplazado por un triptófano. Además, los dos aminoácidos del extremo terminal C incluidos en la secuencia de SwissProt entrada P31025 no están incluidos en la secuencia. AB4004 es una biblioteca de aleatorización descrita en la solicitud internacional de patente WO 2008/015239, en la que las posiciones mutadas se indican en negrita. Las secuencias aleatorias son idénticas para J14 con la excepción de las posiciones 53 y 55. M3-B24 (PSM) indica puntos calientes de PSM B24.

La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de proliferación de células TF-1. Las células TF-1 se incubaron durante 1 hora a 37°C con las muteínas indicadas de la invención (S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20, S308.3 O10, S191.4 B24 [SEQ ID NOs: 2-11]) en una serie de dilución antes de la adición de 0.8 ng/mL de IL-4 (A) o 12 ng/mL de IL-13 (B) durante 72 h. La proliferación se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina.

La Figura 4 muestra los valores de CI<sub>50</sub> de la Figura 3 y los resultados de las mediciones de Biacore de las muteínas de lipocalina lacrimal humana con afinidad por el receptor alfa de IL-4. Aproximadamente 400 RU del receptor alfa de IL-4-Fc se capturaron en un chip CM-5, que se había recubierto previamente con un anticuerpo monoclonal anti-Fc humano. Posteriormente, la muteína en una concentración única de 25 nM se pasó sobre la celda de flujo y se registraron los cambios en unidades de resonancia. Se restaron las señales de referencia de una celda de flujo que se trató por igual, además de no tener ningún receptor alfa de IL-4-Fc y los datos resultantes se ajustaron a un modelo 1:1 de Langmuir utilizando el software BIAevaluation. Debido a la lenta disociación, se usó la cinética de doble referencia al sustraer las señales de una celda de flujo que se trató por igual, además de no tener ningún receptor alfa de IL-4-Fc y se restó la señal de un experimento donde solo se inyectó regulador de la muestra. Los datos resultantes se ajustaron a un modelo Langmuir 1:1 con limitación de transporte masivo utilizando el software BIAevaluation.

A menos que se indique lo contrario, se utilizaron los métodos establecidos en la técnica de la tecnología de genes recombinantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Maduración por afinidad de la muteína S191.4-B24 utilizando un enfoque aleatorio dirigido al sitio

Una biblioteca de variantes basada en la muteína S191.4-B24 (SEQ ID NO: 2) que se describe en la solicitud PCT WO 2008/015239 se diseñó mediante aleatorización de las posiciones 26, 32, 34, 55, 56, 58 y 63 para permitir los 20 aminoácidos en estas posiciones. La biblioteca se construyó esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 2008/015239.

La selección de fagémidos se realizó como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 2008/015239 utilizando una concentración objetivo limitada (0,5 nM y 0,1 nM del receptor alfa de IL-4, PeproTech) combinada con tiempos de lavado prolongados junto con un anticuerpo monoclonal competitivo contra el receptor alfa de IL-4 (MAB230, R&D Systems; 1 hora de lavado) o tiempos de incubación cortos (10 minutos), respectivamente. Se realizaron tres o cuatro rondas de selección.

La producción preparativa de muteínas específicas del receptor alfa de IL-4 se llevó a cabo utilizando la cepa JM83 de *E. coli* K12 que alberga la muteína respectiva codificada en el vector de expresión pTLPC10 (SEQ ID No: 1) o, cuando se necesitaban mayores cantidades de proteína, cepa W3110 de *E. coli* que alberga el vector de expresión respectivo como se describe en el documento WO 2008/015239.

#### Ejemplo 2: Medición de afinidad usando Biacore

Las mediciones de afinidad se realizaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 9 del documento WO 2006/56464 con las modificaciones de que se inmovilizaron aproximadamente 400 RU del receptor alfa de IL-4-Fc (R&D Systems) (en lugar de 2000 RU de CTLA-4 humano o CTLA-4-Fc murino usado como objetivo en el documento WO 2006/56464) y se inyectaron 100 µL de muteína a una concentración de 25 nM (en lugar de 40 µL de muestra de muteínas de lipocalina purificadas a concentraciones de 5 – 0,3 µM como se usa en el documento WO 2006/56464).

#### Ejemplo 3: Ensayos de proliferación de células TF-1

Los ensayos de proliferación de células TF-1 estimuladas con IL-4 e IL-13 se realizaron esencialmente como se describe en Lefort et al. (Lefort S., et al., (1995) FEBS Lett. 366, 2-3, 122-126) y como se describe en el Ejemplo 10 de la solicitud PCT WO 2008/015239. Las células TF-1 se incubaron durante 1 hora a 37 ° C con las muteínas indicadas de la invención (S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20, S308.3 O10, S191.4 B24 [SEQ ID NOs: 3-11]) en una serie de dilución antes de la adición de 0,8 ng/mL de IL-4 (a) o 12 ng/mL de IL-13 (b) durante 72 h. La proliferación se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Los resultados de un ensayo de proliferación de TF-1 se muestran en la Figura y muestran que las variantes de alta afinidad S276.2 K04, S308.5 F08, S308.5 N01, S308.5 L20, S308.5 L04, S308.5 N20, y S308.3 O10 son potentes antagonistas de IL-4 así como de IL-13 inducidos

La invención se ha descrito de manera amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies más estrechas y las agrupaciones subgenéricas que forman parte de la divulgación genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimina cualquier tema del género, independientemente de si el material extirpado se menciona específicamente en el presente documento.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Listado de secuencias

- 5 <110> Pieris AG  
<120> Muteínas de lipocalina lacrimonal que se unen a IL-4 R alfa  
<130> PIE14083PCT  
<150> US 61/352 461  
<151> 2010-06-08
- 10 <160> 20  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 3700  
<212> ADN
- 15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Vector de expresión pTLPC10  
<400> 1

ES 2 729 652 T3

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttggtga cactctatca ttgatagagt 60  
 tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttcg acaaaaatct 120  
 agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcga ttgcagtggc actggctggt 180  
 ttcgctaccg tagcgcaggc cgacgcatcg atgaccggtg gtcagcagat ggggtgcctca 240  
 gacgaggaga ttcaggatgt gtcagggacg tggatatctga aggccatgac ggtggacagg 300  
 gagttccctg agatgaatct ggaatcgggtg acacccatga ccctcacgac cctggaaggg 360  
 ggcaacctgg aagccaaggt caccatgctg ataagtggcc ggagccagga ggtgaaggcc 420  
 gtcctggaga aaactgacga gccgggaaaa tacacggccg acgggggcaa gcacgtggca 480  
 tacatcatca ggtcgcacgt gaaggaccac tacatctttt actctgaggg cgagctccac 540  
 gggagccgg tcccaggggt gtggctcgtg ggcagagacc ccaagaacaa cctggaagcc 600  
 ttggaggact ttgagaaagc cgcaggagcc cgcggactca gcacggagag catcctcatc 660  
 cccaggcaga gcgaaaccag ctctccaggg agcgcttgggt ctcaaccgca gttcgaaaaa 720  
 taataagctt gacctgtgaa gtgaaaaatg gcgcacattg tgcgacattt tttttgtctg 780  
 ccgtttaccg ctactgcgtc acggatctcc acgcgcctcg tagcggcgca ttaagcgcgg 840  
 cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcctta gcgcccgctc 900  
 ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcccg ctttccccgt caagctctaa 960  
 atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctogac cccaaaaaac 1020  
 ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt tttcgccctt 1080  
 tgacgttga gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca 1140  
 accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt 1200



ES 2 729 652 T3

taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaatth taacaaaata ttaacgctta 1260  
 caatttcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 1320  
 aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 1380  
 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cggccttatt cccttttttg 1440  
 cggcattttg ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 1500  
 aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 1560  
 ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat 1620  
 gtggcgcggg attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact 1680  
 attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 1740  
 tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 1800  
 tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 1860  
 atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 1920  
 agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg 1980  
 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat tgatagactg gatggaggcg gataaagttg 2040  
 caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 2100  
 ccggtgagcg tggctctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 2160  
 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 2220  
 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtagga attaatgatg tctcgtttag 2280  
 ataaaagtaa agtgattaac agcgcattag agctgcttaa tgaggctgga atcgaagggt 2340  
 taacaacccg taaactcgcc cagaagctag gtgtagagca gcctacattg tattggcatg 2400  
 taaaaaataa gcgggctttg ctcgacgcct tagccattga gatgtagat aggcaccata 2460  
 ctcacttttg cccttagaa ggggaaagct ggcaagattt tttacgtaat aacgctaaaa 2520  
 gtttttagatg tgctttacta agtcatcgcg atggagcaaa agtacattta ggtacacggc 2580  
 ctacagaaaa acagtatgaa actctcgaaa atcaattagc ctttttatgc caacaagggt 2640  
 tttcactaga gaatgcatta tatgcaactca gcgcagtggg gcattttact ttaggttgcg 2700  
 tattggaaga tcaagagcat caagtcgcta aagaagaaag ggaaacacct actactgata 2760  
 gtatgccgcc attattacga caagctatcg aattatttga tcaccaaggt gcagagccag 2820  
 ccttcttatt cggccttgaa ttgatcatat gcggattaga aaaacaactt aatgtgaaa 2880  
 gtgggtctta aaagcagcat aacctttttc cgtgatggta acttcactag tttaaaagga 2940  
 tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 3000  
 tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 3060  
 tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccacgct accagcgggtg gtttgtttgc 3120

ES 2 729 652 T3

cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 3180  
caaataactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 3240  
cgcctacata cctcgcctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 3300  
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgagc cggtcgggct 3360  
gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 3420  
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 3480  
atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 3540  
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatTTTTgt 3600  
gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 3660  
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgacccgaca 3700

<210> 2

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S191.4-B24 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 2

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína S351.5-M21 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 3

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S276.2-K04 de lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 4

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-K12 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 5

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-F08 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 6

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-L4 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 7

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-L20 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 8



ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-N1 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 9

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

ES 2 729 652 T3

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

<210> 10

<211> 154

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-O10 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 10

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 154

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Muteína S308.5-N20 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 11

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 456

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S276.2-K04 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

10 <400> 12

ES 2 729 652 T3

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60  
gacccccgct gcccgcgggc gtactacagc tcggtgacac ccatgaccct cacgaccctg 120  
gaagggggca acctggaagc caagttcacc ggcagcggg cgggccggtg gcagaagtac 180  
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaatata ctgcctccgg gggcaggcac 240  
gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg 300  
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360  
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420  
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg 456

<210> 13

<211> 459

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S308.5-F08 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 13

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg 60  
gacagtcgct gcccgcgggc ggtgtacaat tcggtgacac ccatgaccct cacgaccctg 120  
gaagggggca acctggaagc caagttcacc gctcagcggg agggccggtg gcagaagtac 180  
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaatata ctgcctccgg gggcaggcac 240  
gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg 300  
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg 360  
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc 420  
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccagggagc 459

10

<210> 14

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S308.5-L4 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 14

ES 2 729 652 T3

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gactcgcgct gcccgcgggc gtattacgtg tcggtgacac ccatgaccct cacgaccctg      120
gaagggggca acctggaagc caagttcacc gggcgcgga ttggccggtg gcagagttac      180
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaataca ctgcctccgg gggcaggcac      240
gtggcataca ttatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                     456

```

<210> 15

<211> 456

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S308.5-L20 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 15

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacaatcgct gcccgcgggc gaagtacgat tcggtgacac ccatgaccct cacgaccctg      120
gaagggggca acctggaagc caagttcacc ggcacatcggc ggggcccgtg gcagcagtac      180
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaataca ctgcctccgg gggcaggcac      240
gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctctgtgggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                     456

```

10

<210> 16

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S308.5-N1 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 16

ES 2 729 652 T3

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gactatcgct gcccgcgggc gtattacat  tgggtgacac ccatgaccct cagcacctg      120
gaagggggca acctggaagc caagttcacc gctcatcggg ctggccggtg gcagaagtac      180
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaatata ctgcctccgg gggcaggcac      240
gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456

```

<210> 17

<211> 456

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la muteína S308.5-N20 de la lipocalina lacrimal humana con afinidad de unión por IL-4R alfa

<400> 17

```

gcctcagacg aggagattca ggatgtgtca gggacgtggt atctgaaggc catgacggtg      60
gacgagcgct gcccgcgggc gcattacggg tgggtgacac ccatgaccct cagcacctg      120
gaagggggca acctggaagc caagttcacc gctatgcggg tgggcccggg gcagaagtac      180
aagttggtcc tggagaaaac tgatgagccg ggaaaatata ctgcctccgg gggcaggcac      240
gtggcataca tcatcaggtc gcacgtgaag gaccactaca tctttcactc tgagggcctg      300
tgccccgggc agccggtccc aggggtgtgg ctcgtgggca gagaccccaa gaacaacctg      360
gaagccttgg aggactttga gaaagccgca ggagcccgcg gactcagcac ggagagcatc      420
ctcatcccca ggcagagcga aaccagctct ccaggg                                456

```

10

<210> 18

<211> 825

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> receptor de IL-4 humano

<400> 18

```

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

```

```

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

```

ES 2 729 652 T3

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met  
 35 40 45

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu  
 50 55 60

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly  
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala  
 85 90 95

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys  
 100 105 110

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn  
 115 120 125

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser  
 130 135 140

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn  
 165 170 175

Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys  
 180 185 190

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr  
 195 200 205

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser  
 210 215 220

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser  
 225 230 235 240

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr  
 245 250 255

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser  
 260 265 270

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu  
 275 280 285



ES 2 729 652 T3

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

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 729 652 T3

805

810

815

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser  
820 825

<210> 19

<211> 427

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> receptor alfa 1 de IL-13 humana

<400> 19

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 729 652 T3

Lys Asp Ser Ser Phe Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp  
 195 200 205

Asn Ala Gly Lys Ile Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser  
 210 215 220

Arg Val Lys Pro Asp Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn  
 225 230 235 240

Asp Asp Leu Tyr Val Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg  
 245 250 255

Cys Leu Phe Tyr Glu Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His  
 260 265 270

Asn Val Phe Tyr Val Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu  
 275 280 285

Arg Asn Val Glu Asn Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro  
 290 295 300

Asp Thr Leu Asn Thr Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys  
 305 310 315 320

Tyr Glu Asp Asp Lys Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile  
 325 330 335

Gly Lys Lys Arg Asn Ser Thr Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val  
 340 345 350

Pro Val Ile Val Ala Gly Ala Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu Lys  
 355 360 365

Arg Leu Lys Ile Ile Ile Phe Pro Pro Ile Pro Asp Pro Gly Lys Ile  
 370 375 380

Phe Lys Glu Met Phe Gly Asp Gln Asn Asp Asp Thr Leu His Trp Lys  
 385 390 395 400

Lys Tyr Asp Ile Tyr Glu Lys Gln Thr Lys Glu Glu Thr Asp Ser Val  
 405 410 415

Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln  
 420 425

<210> 20

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<223> lipocalina lacrimal humana (Tlc)

<400> 20

ES 2 729 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1

**REIVINDICACIONES**

1. Una muteína de la lipocalina lacrimonal humana, en la que la muteína comprende:

(i) las siguientes sustituciones de aminoácidos Glu 27 → Arg, Phe 28 → Cys, Glu 30 → Arg, Met 31 → Ala, Leu 33 → Tyr, Ile 57 → Arg, Cys 61 → Trp, Asp 80 → Ser, Lys 83 → Arg, Glu 104 → Leu, Leu 105 → Cys, His 106 → Pro, Lys 108 → Gin; y

(ii) uno de los siguientes conjuntos de sustituciones de aminoácidos

(1) Arg 26 → Pro, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Ser, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gin, Glu 63 → Lys;

(2) Arg 26 → Ser, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Val, Met 55 → Ala, Leu 56 → Ala, Ser 58 → Ile, Glu 63 → Ser;

(3) Arg 26 → Ser, Asn 32 → Val, Glu 34 → Asn, Met 55 → Ala, Leu 56 → Gln, Ser 58 → Lys, Glu 63 → Lys;

(4) Arg 26 → Asn, Asn 32 → Lys, Glu 34 → Asp, Met 55 → Ala, Leu 56 → His, Ser 58 → Arg, Glu 63 → Gln;

(5) Arg 26 → Tyr, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → His, Met 55 → Ala, Leu 56 → His, Ser 58 → Ala, Glu 63 → Lys;

(6) Arg 26 → Lys, Asn 32 → Tyr, Glu 34 → Arg, Met 55 → Ala, Leu 56 → Lys, Ser 58 → Asn, Glu 63 → Pro; o

(7) Arg 26 → Glu, Asn 32 → His, Glu 34 → Gly, Met 55 → Ala, Leu 56 → Met, Ser 58 → Leu, Glu 63 → Lys; y

(iii) al menos 75% de identidad con la secuencia de la lipocalina lacrimonal humana madura, en donde la secuencia de la lipocalina lacrimonal humana madura es

HLLASDEEIQDVSGTWYLKAMTVDREFPEMNLESVTPMTLTTLEGGNLEAKVTMLIS  
 GRCQEVKAVLEKTDEPGKYTADGGKHVAYIIRSHVKDHYIFYCEGELHGKPVGRVVKL  
 VGRDPKNNLEA LEDFEKAAGARGLSTESILIPRQSETCSPGSD;

y en el que la muteína se une al receptor alfa de IL-4 humana con una constante de disociación ( $K_D$ ) inferior a 0,1 nM.

2. La muteína de la reivindicación 1, que comprende además el siguiente conjunto de sustituciones de aminoácidos:

(1) Val 53 → Phe, Val 64 → Tyr, Ala 66 → Leu.

3. La muteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los primeros cuatro residuos de aminoácidos del extremo terminal N de la secuencia de la lipocalina lacrimonal humana madura y/o los dos últimos residuos de aminoácidos del extremo terminal C de la secuencia de la lipocalina lacrimonal humana madura se han eliminado.

4. La muteína de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la muteína tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID No: 4, y 6-11.

5. Una proteína de fusión que comprende la muteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la muteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de fusión de la reivindicación 5.

7. Una célula huésped que contiene la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.

8. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende la muteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la proteína de fusión de la reivindicación 5.



MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AASDEEIQDV SGTWYLKAMT VDSRCPRAYY  
 SSVTPMTLTT LEGGNLEAKF TAQRSGRWQE YKLVLEKTDE PGKYTASGGR  
 HVAYIIRSHV KDHYIFHSEG LCPGQPVPVGV WLVGRDPKNN LEALEDFEKA  
 AGARGLSTES ILIPRQSETS SPGS**AWSHPO FEK**

Fig. 1

SwissProt P31025	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<b>AB4004</b>	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
TLc26 de ts	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
S191.4-B24	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S351.5-M21	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S276.2-K04	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-K12	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-F08	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-L4	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-L20	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-N1	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.3-O10	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L
S308.5-N20	A	S	D	E	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L

SwissProt P31025	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
<b>AB4004</b>	20	21	22	23	24	25	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>
TLc26 de ts	K	A	M	T	V	D	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>E</b>
<b>M3-B24(PSM)</b>	20	21	22	23	24	25	<b>26</b>	27	28	29	30	31	<b>32</b>	33	<b>34</b>
S191.4-B24	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	S
S351.5-M21	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	E
S276.2-K04	K	A	M	T	V	D	P	R	C	P	R	A	Y	Y	S
S308.5-K12	K	A	M	T	V	D	L	R	C	P	R	A	F	Y	W
S308.5-F08	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	V	Y	N
S308.5-L4	K	A	M	T	V	D	S	R	C	P	R	A	Y	Y	V
S308.5-L20	K	A	M	T	V	D	N	R	C	P	R	A	K	Y	D
S308.5-N1	K	A	M	T	V	D	Y	R	C	P	R	A	Y	Y	H
S308.3-O10	K	A	M	T	V	D	K	R	C	P	R	A	Y	Y	R
S308.5-N20	K	A	M	T	V	D	E	R	C	P	R	A	H	Y	G

Fig. 2 (continúa en la página siguiente)

<b>SwissProt P31025</b>	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
<b>AB4004</b>	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Tlc26 de ts	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
S191.4-B24	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S351.5-M21	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S276.2-K04	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-K12	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-F08	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L4	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-L20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N1	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.3-O10	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L
S308.5-N20	S	V	T	P	M	T	L	T	T	L	E	G	G	N	L

<b>SwissProt P31025</b>	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
<b>AB4004</b>	50	51	52	53	54	55	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	59	60	61	62	63	64
Tlc26 de ts	E	A	K	<b>V</b>	T	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	G	R	<b>S</b>	Q	<b>E</b>	<b>V</b>
<b>M3-B24(PSM)</b>	50	51	52	53	54	<b>55</b>	<b>56</b>	57	<b>58</b>	59	60	61	62	<b>63</b>	64
S191.4-B24	E	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	E	Y
S351.5-M21	E	A	K	L	T	L	Q	R	K	G	R	W	Q	E	M
S276.2-K04	E	A	K	F	T	A	Q	R	S	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-K12	E	A	K	F	T	A	L	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-F08	E	A	K	F	T	A	Q	R	K	G	R	W	Q	K	Y
S308.5-L4	E	A	K	F	T	A	A	R	I	G	R	W	Q	S	Y
S308.5-L20	E	A	K	F	T	A	H	R	R	G	R	W	Q	Q	Y
S308.5-N1	E	A	K	F	T	A	H	R	A	G	R	W	Q	K	Y
S308.3-O10	E	A	K	F	T	A	K	R	N	G	R	W	Q	P	Y
S308.5-N20	E	A	K	F	T	A	M	R	L	G	R	W	Q	K	Y

Fig. 2 (continúa en la página siguiente)

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

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

Fig. 2 (continúa en la página siguiente)

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

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

Fig. 2 (continúa en la página siguiente)

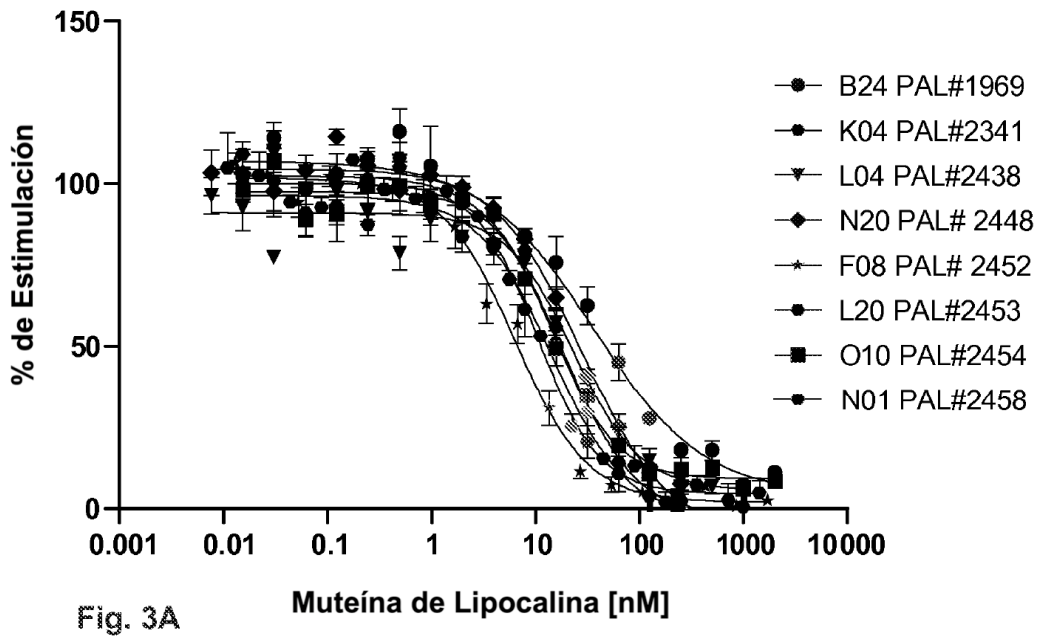
<b>SwissProtP31025</b>	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
<b>AB4004</b>	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
TlC26 de ts	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
<b>M3-B24(PSM)</b>	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
S191.4-B24	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S351.5-M21	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S276.2-K04	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-K12	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-F08	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-L4	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-L20	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-N1	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.3-O10	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L
S308.5-N20	E	A	L	E	D	F	E	K	A	A	G	A	R	G	L

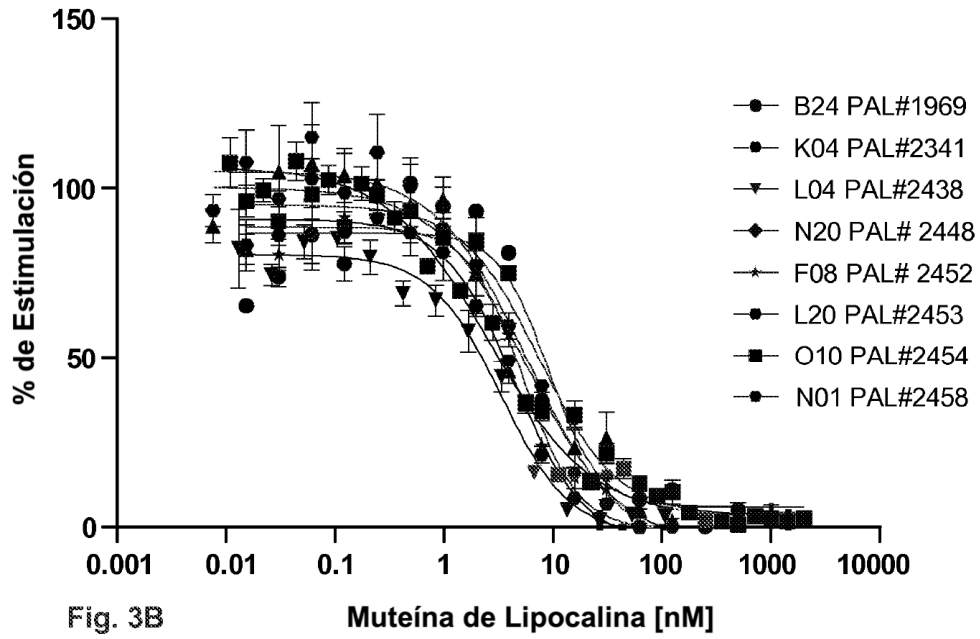
<b>SwissProtP31025</b>	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
<b>AB4004</b>	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
TlC26 de ts	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
<b>M3-B24(PSM)</b>	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
S191.4-B24	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S351.5-M21	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S276.2-K04	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-K12	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-F08	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-L4	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-L20	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-N1	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.3-O10	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S
S308.5-N20	S	T	E	S	I	L	I	P	R	Q	S	E	T	S	S

Fig. 2 (continúa en la página siguiente)

<b>SwissProt P31025</b>	173	174
<b>AB4004</b>	155	156
TLc26 de ts	P	G
<b>M3-B24(PSM)</b>	155	156
S191.4-B24	P	G
S351.5-M21	P	G
S276.2-K04	P	G
S308.5-K12	P	G
S308.5-F08	P	G
S308.5-L4	P	G
S308.5-L20	P	G
S308.5-N1	P	G
S308.3-O10	P	G
S308.5-N20	P	G

Fig. 2 (continuación de la página anterior)





	CI50 Ensayo de Proliferación de TF1 IL-13 (nM)	CI50 Ensayo de Proliferación de TF1 IL-4 (nM)	Afinidad Biacore KD (M)
S276.2 K04	14.8	3.6	2.30E-11
S308.5 F08	7.4	3.8	2.01E-11
S308.5 N01	17.7	4.4	2.41E-11
S308.5 L20	14.4	5.3	2.49E-11
S308.5 L04	22.9	5.7	7.24E-11
S308.5 N20	27.6	5.9	3.48E-11
S308.3 O10	15.1	7.5	1.32E-12
S191.4 B24	35.9	9.1	1.10E-10

Fig. 4