



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/47 (2020.02); C07K 14/515 (2020.02); A61K 38/1709 (2020.02); G01N 33/6893 (2020.02); C07K 2319/00 (2020.02); G01N 2333/515 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017128105, 27.01.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.01.2016

Дата регистрации:
12.05.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
28.01.2015 EP 15152826.2

(43) Дата публикации заявки: 05.03.2019 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 12.05.2020 Бюл. № 14

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.08.2017

(86) Заявка РСТ:
EP 2016/051657 (27.01.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/120307 (04.08.2016)

Адрес для переписки:
123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры -
патентные поверенные"

(72) Автор(ы):

БЕЛ АЙБА, Рачида Сихам (DE),
АЛЛЕРСДОРФЕР, Андреа (DE),
ВИДЕНМАН, Александер (DE),
РОТЕ, Кристине (DE),
ОЛЬВИЛЛЬ, Шейн (DE),
ГИЛЛЕ, Хендрик (DE),
ОДОЛИ, Лоран (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ПИЕРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС ГмбХ
(DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2013316962 A1, 28.11.2013. WO
2014076321 A1, 22.05.2014. US 2010/159587 A1,
24.06.2010. RU 2515063 C2, 10.05.2014. RU
2012128586 A, 20.01.2014.

(54) НОВЫЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ В ОТНОШЕНИИ АНГИОГЕНЕЗА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии, а именно к новым соединениям, которые специфически распознают и связывают Ang-2. Предложен мутеин человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL), способный связывать Ang-2. Аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере шестнадцать мутированных аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125,

127, 132 и 134 по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16) и обладает по меньшей мере 85% идентичностью по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-14. Также предложены способ получения hNGAL, слитый белок, композиция и комбинация, содержащие hNGAL, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая hNGAL, и клетка-хозяин для генной экспрессии hNGAL. Мутеин hNGAL может быть использован в различных

применениях, включая фармацевтические применения для ингибирования или снижения

интенсивности ангиогенеза. 23 н. и 32 з.п. ф-лы, 5 ил., 8 табл., 10 пр.

R U 2 7 2 0 6 8 8 C 2

R U 2 7 2 0 6 8 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)*C07K 14/515* (2006.01)*A61K 38/17* (2006.01)*C12N 15/10* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*G01N 33/68* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/47 (2020.02); *C07K 14/515* (2020.02); *A61K 38/1709* (2020.02); *G01N 33/6893* (2020.02); *C07K 2319/00* (2020.02); *G01N 2333/515* (2020.02)

(21)(22) Application: **2017128105, 27.01.2016**

(24) Effective date for property rights:
27.01.2016

Registration date:
12.05.2020

Priority:

(30) Convention priority:
28.01.2015 EP 15152826.2

(43) Application published: **05.03.2019 Bull. № 7**(45) Date of publication: **12.05.2020 Bull. № 14**(85) Commencement of national phase: **28.08.2017**

(86) PCT application:
EP 2016/051657 (27.01.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/120307 (04.08.2016)

Mail address:
**123242, Moskva, pl. Kudrinskaya, d. 1, a/ya 35,
"Mikhajlyuk, Sorokolat i partnery - patentnye
poverennye"**

(72) Inventor(s):

**BEL AIBA Rachida (DE),
ALLERSDORFER Andrea (DE),
WIEDENMANN Alexander (DE),
ROTHER Christine (DE),
OLWILL Shane (DE),
GILE Hendrik (DE),
AUDOLY Laurent (FR)**

(73) Proprietor(s):

PIERIS PHARMACEUTICALS GmbH (DE)

(54) **NOVEL PROTEINS SPECIFIC FOR ANGIOGENESIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to novel compounds which specifically recognize and bind Ang-2. Disclosed is a human lipocalum mutein associated with neutrophil gelatinase (hNGAL) capable of binding Ang-2. Amino acid sequence of mutein hNGAL contains at least sixteen mutated amino acid residues at sequence positions 28, 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 and 134 as compared to the mature polypeptide sequence of the mature hNGAL SEQ ID NO: 16 and has at least

85 % identity with respect to a sequence selected from SEQ ID NO: 1–14. Also disclosed are a method of producing hNGAL, a fusion protein, a composition and a combination containing hNGAL, a nucleic acid molecule encoding hNGAL, and a host cell for hNGAL gene expression.

EFFECT: mutein hNGAL can be used in various applications, including pharmaceutical applications for angiogenesis inhibition or reduction.

55 cl, 5 dwg, 8 tbl, 10 ex

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[1] Ангиогенез или образование новых кровеносных сосудов из существующих важен для многих физиологических и патологических процессов. Обычно ангиогенез жестко регулируется про- и антиангиогенными факторами, но в случае заболеваний, таких как рак, неоваскулярные заболевания глаз, артрит и псориаз, это процесс может пойти неправильно. Folkman, J., *Nat. Med.*, 1:27-31 (1995). Известно большое количество заболеваний, связанных с дерегулированным или нежелательным ангиогенезом. Такие заболевания включают, но не ограничиваются этим, неоваскуляризацию глаз, такую как ретинопатии (включая диабетическую ретинопатию), возрастную макулярную дегенерацию, псориаз, гемангиобластому, гемангиому, артериосклероз, воспалительные заболевания, такие как ревматоидные или ревматические воспалительные заболевания, в особенности артрит (включая ревматоидный артрит), или другие хронические воспалительные нарушения, такие как хроническая астма, артериальный или посттрансплантационный атеросклероз, эндометриоз, и неопластические заболевания, например, так называемые солидных опухоли и жидкие (или гемопоэтические) опухоли (такие как лейкозы и лимфомы). Другие заболевания, связанные с нежелательным ангиогенезом, очевидны для специалистов в данной области техники.

[2] Хотя в регуляцию ангиогенеза вовлечено много систем сигнальной трансдукции, одна из наиболее изученных и наиболее избирательных в отношении эндотелиальных клеток систем включает рецепторную тирозинкиназу Tie-2, которая избирательно экспрессируется в сосудистом эндотелии (и называется «Tie-2» или «Tie-2R» (также называется «ORK»); мышинная Tie-2 также называется «tek»), и ее лиганды, ангиопоэтины (Yancopoulos, G. D., et al., *Nature* 407 [2000] 242-48; Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D., *Genes Dev.* 13:1055- 1066 [1999]).

[3] Известно 4 ангиопоэтина; от ангиопоэтина-1 («Ang-1», альтернативная аббревиатура ANGPT1 или Ang1) до ангиопоэтина-4 («Ang-4»). Эти ангиопоэтины также называются «лигандами Tie-2» (Davis, S., et al., *Cell*, 87:1161-1169 [1996]; Grosios, K., et al., *Cytogenet Cell Genet*, 84:118-120 [1999]; Holash, J., et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42:1611-1625 [1999]; Koblizek, T. I., et al., *Current Biology*, 8:529-532 [1998]; Lin, P., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8829-8834 [1998]; Maisonpierre, P. C., et al., *Science*, 277:55- 60 [1997]; Papapetropoulos, A., et al., *Lab Invest*, 79:213-223 [1999]; Sato, T. N., et al., *Nature*, 375:70-74 [1998]; Shyu, K. G., et al., *Circulation*, 95:2081-2087 [1998]; Suri, C., et al., *Cell*, 87:1171-1180 [1996]; Suri, C., et al., *Science*, 252:468-471 [1998]; Valenzuela, D. M., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96:1904-1909 [1999]; Witzenbichler, B., et al., *J Biol Chem*, 273:18514-18521 [1998]).

[4] Как Ang-1, так и -2 связываются с Tie-2 с аффинностью 3 нМ (Кд) (Maisonpierre, P. C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60). В то время как связывание Ang-1 с Tie-2 стимулирует фосфорилирование рецептора в культивируемых эндотелиальных клетках, Ang-2, согласно наблюдениям, как агонизирует, так и антагонизирует фосфорилирование рецептора Tie-2 (Davis, S., et al., [1996], выше; Maisonpierre, P.C., et al., [1997], выше; Kim, I. J.H. Kim, et al., *Oncogene* 19(39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al., *Cardiovascular Research* 49(3): 659-70 (2001)). Фенотипы мышинных нокауты Tie-2 и Ang-1 сходны между собой, что дает основание предположить, что Ang-1-стимулированное фосфорилирование Tie-2 опосредует ремоделирование и стабилизацию внутриутробного развития сосудов посредством поддержания адгезии опорных эндотелиальных клеток (Dumont, D. J., et al., *Genes & Development*, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., et al., *Nature*, 376:10-14 [1995]; Suri, C., et al., [1996], выше). Считается, что роль Ang-1 в стабилизации сосудов сохраняется во взрослом организме, где он

широко и постоянно экспрессируется (Hanahan, D., Science, 277:48-50 [1997]; Zagzag, D., et al., Experimental Neurology, 59:391-400 [1999]). В противоположность этому, экспрессия Ang-2 ограничена в основном участками ремоделирования сосудов, где он, как считается, блокирует функцию Ang-1, тем самым индуцируя состояние пластичности сосудов, способствующее ангиогенезу (Hanahan, D., [1997], выше; Holash, J., et al., Science, 284: 1994-1998 [1999]; Maisonpierre, P. C., et al., [1997], выше).

[5] Человеческий ангиопоэтин-2 (Ang-2) (альтернативная аббревиатура ANGPT2 или Ang2) описан в Maisonpierre, P. C., et al., Science 277 (1997) 55-60 и Cheung, A. H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. В большом количестве опубликованных исследований было предположительно продемонстрировано наличие избирательной в отношении сосудов экспрессии Ang-2 при болезненных состояниях, связанных с дерегуляцией ангиогенеза (Bunone, G., et al., American Journal of Pathology, 155:1961-1916; Etoh, T., et al., Cancer Research, 67:2145-2153 [2001]; Hangai, M., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:1611-1625 [2001]; Holash, J., et al., [1999] выше; Kuroda, K., et al., Journal of Investigative Dermatology, 116:113-120 [2001]; Otani₁A., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 [1999]; Stratmann, A., et al., American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 [1998]; Tanaka, S., et al., J Clin Invest, 203:34-345 [1999]; Yoshida, Y., et al., International Journal of Oncology, 25:1221-1225 [1999]; Yuan, K., et al., Journal of Periodontal Research, 35: 165-171 [2000]; Zagzag, D., et al., [1999] выше). Эффективная анти-Ang-2 терапия будет полезной для огромной популяции пациентов со связанными с ангиогенезом заболеваниями, такими как рак, ретинопатии, артрит и псориаз.

[6] Следовательно, существует большая необходимость в выявлении новых соединений, которые специфически распознают и связывают Ang-2. Такие соединения будут полезны для проведения диагностического исследования и терапевтического вмешательства при болезненных состояниях, которые связаны с активностью Ang-2. Соответственно, целью настоящего изобретения является обеспечение специфических связывающих Ang-2 соединений для модуляции активности Ang-2. Такие соединения, раскрытые в данном документе, представлены в виде мутеинов, полученных из человеческого липокалина 2 (также известного как липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов, «hNGAL»).

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[7] В нижеследующем перечне приведены определения терминов, выражений и сокращений, употребляемых в тексте настоящей заявки. Подразумевается, что все перечисленные и определенные в данном документе термины включают все грамматические формы.

[8] В контексте данного документа «Ang-1», если не указано его происхождение от отличных от человека видов (например, «мышинный Ang-1», «обезьяний Ang-1» и т.д.), означает человеческий Ang-1, полноразмерный белок согласно определению Swiss Prot Q15389 или его биологически активный фрагмент (например, фрагмент белка Ang-1, который способен индуцировать ангиогенез in vitro или in vivo).

[9] В контексте данного документа «Ang-2», если не указано его происхождение от отличных от человека видов (например, «мышинный Ang-2», «обезьяний Ang-2» и т.д.), означает человеческий Ang-2, полноразмерный белок согласно определению Swiss Prot 015123, (также смотрите Фиг. 6 патента США № 6166185; в полном объеме включенного в данный документ посредством ссылки) или его биологически активный фрагмент (например, фрагмент белка Ang-2, который способен индуцировать ангиогенез in vitro или in vivo).

[10] Термин «Tie-2» (также называемая в данной области техники «tek»), если не

указано ее происхождение от отличных от человека видов (например, «мышьяная Tie-2», «обезьянья Tie-2» и т.д.), относится к человеческой Tie-2 или ее биологически активному фрагменту. Человеческая Tie-2 имеет аминокислотную последовательность, приведенную в базе данных белковых последовательностей NCBI под номером доступа № AAA61130.

[11] В контексте данного документа «выявляемая аффинность» означает способность связываться с выбранной мишенью с константой аффинности, составляющей по меньшей мере около 10^{-5} М или меньше. Более низкие значения аффинности в общем случае невозможно измерить обычными способами, такими как ELISA, и, следовательно, они представляют собой второстепенную важность.

[12] В контексте данного документа «аффинность связывания» белка согласно изобретению (например, мутеина человеческого липокалина 2) с выбранной мишенью (в настоящем случае Ang-1 или Ang-2) можно измерять (и таким образом определять значения K_d комплекса мутеин-лиганд) множеством способов, известных специалистам в данной области техники. Такие способы включают, но не ограничиваются этим, флуоресцентное титрование, прямой ELISA-анализ, конкурентный ELISA-анализ, калориметрические способы, такие как изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), и поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore). Такие способы являются общепринятыми в данной области техники и также подробно описаны ниже.

[13] Также следует отметить, что на образование комплекса между соответствующей связывающей молекулой и ее лигандом влияет много разных факторов, таких как концентрации соответствующих партнеров по связыванию, наличие конкурирующих молекул, pH и ионная сила применяемой буферной системы, а также применяемый экспериментальный способ для определения константы диссоциации K_d (например, помимо прочего, флуоресцентное титрование, прямой ELISA-анализ, конкурентный ELISA-анализ или поверхностный плазмонный резонанс) или даже математический алгоритм, который применяют для оценки экспериментальных данных.

[14] Следовательно, специалисту также понятно, что значения K_d (константы диссоциации комплекса, образуемого между соответствующей связывающей молекулой и ее мишенью/лигандом) могут варьироваться в пределах некоторого экспериментального диапазона в зависимости от способа и экспериментальной установки, применяемой для определения аффинности конкретного мутеина в отношении данного лиганда. Это означает, что для измеряемых значений K_d может существовать небольшое отклонение или допустимый диапазон значений в зависимости, например, от того, измеряли значение K_d с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore), конкурентного ELISA-анализа или «прямого ELISA-анализа».

[15] В контексте данного документа соединение, такое как мутеин согласно изобретению, «специфически связывает» мишень (например, Ang-1 или Ang-2) или обладает «специфичностью связывания» в отношении мишени, если оно способно к распознаванию этой мишени среди одной или более стандартных мишеней, так как специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. «Специфическое связывание» можно определить, например, в соответствии с методами вестерн-блоттинга, анализом ELISA, РИА, ЭХЛ, ИРМА, ИГХ и сканированием пептидов.

[16] В контексте данного документа термин «человеческий липокаин 2» или «человеческий Lcn 2», или «человеческий NGAL», или «hNGAL» относится к зрелому человеческому липокаину, ассоциированному с желатиной нейтрофилов (NGAL),

имеющему номер доступа P80188 в банке данных SWISS-PROT/UniProt. Мутеин человеческого липокаина 2 согласно изобретению также может называться в данном документе «мутеином hNGAL». Аминокислотную последовательность, приведенную под номером доступа P80188 в банке данных SWISS-PROT/UniProt, можно использовать
5 в качестве предпочтительной «стандартной последовательности», более предпочтительно в качестве стандартной последовательности применяют аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

[17] В контексте данного документа «мутеин», «мутированный» компонент (белок или нуклеиновая кислота) или «мутант» относится к замене, удалению или вставке
10 одного или более нуклеотидов или одной или более аминокислот по сравнению со «стандартной» структурой нуклеиновой кислоты или белка природного происхождения (дикого типа). В контексте данного документа термин «мутеин» также включает его функциональные фрагменты или варианты. Фрагменты или варианты конкретных мутеинов, описанных в настоящем изобретении, предпочтительно сохраняют функцию
15 связывания с Ang-1 или Ang-2, например, с выявляемой или даже более высокой аффинностью, а такие фрагменты или варианты представляют собой «функциональные фрагменты или варианты» раскрытых в данном документе стандартных мутеинов.

[18] В контексте данного документа термин «фрагмент», применяемый в связи с мутеинами согласно изобретению, относится к белкам или пептидам, полученным из
20 полноразмерного зрелого человеческого липокаина 2, которые были укорочены в N-конце и/или C-конце, т.е. в которых отсутствует по меньшей мере одна из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут содержать по меньшей мере 10, чаще 20 или 30, или более последовательных аминокислот первичной
25 последовательности зрелого человеческого липокаина 2 и обычно выявляются при иммуноанализе зрелого человеческого липокаина 2.

[19] В общем случае термин «фрагмент», употребляемый в отношении соответствующего белкового лиганда мутеина согласно изобретению или комбинации в соответствии с изобретением, относится к укороченным в N-конце и/или C-конце
30 белкам или пептидным лигандам, которые сохраняют способность полноразмерного лиганда распознаваться и/или связываться мутеином согласно изобретению.

[20] В контексте данного документа термин «мутагенез» означает, что экспериментальные условия выбраны так, что аминокислота, в природном состоянии находящаяся в заданном положении последовательности зрелого человеческого
липокаина 2, может быть замещена по меньшей мере одной аминокислотой, которая
35 не присутствует в этом конкретном положении в соответствующей природной полипептидной последовательности. Термин «мутагенез» также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности путем удаления или вставки одной или более аминокислот. Таким образом, в объем настоящего изобретения входит, например, то, что одна аминокислота в выбранном положении
40 последовательности замещена участком из трех случайных мутаций, что приводит к вставке двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента белка дикого типа. Такие вставки или удаления можно вносить независимо друг от друга в любой из пептидных сегментов, которые можно подвергать мутагенезу в данном изобретении.

[21] Термин «случайный мутагенез» означает, что в определенном положении последовательности присутствует не одна предопределенная аминокислота (мутация), а что по меньшей мере две аминокислоты могут быть с некоторой вероятностью внесены в заданное положение последовательности во время мутагенеза.

[22] «Идентичность» – это свойство последовательностей, которое определяет их сходство или взаимосвязь. В контексте данного изобретения термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» означает процентное содержание попарно сравниваемых идентичных остатков, после (гомологичного) выравнивания последовательности полипептида согласно изобретению с рассматриваемой последовательностью, по отношению к числу остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей определяют, деля число идентичных аминокислотных остатков на общее число остатков и умножая результат на 100.

[23] Термин «гомология» употребляется в данном документе в своем обычном значении и включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые считаются консервативными заменами (например, замена остатка глутамата остатком аспартата) в эквивалентных положениях в линейной аминокислотной последовательности полипептида согласно изобретению (например, любого мутеина согласно изобретению).

[24] Согласно данному документу гомологию последовательностей или идентичность последовательностей можно определить, например, используя программу BLASTP, версии blastp 2.2.5 (16 ноября 2002 г.; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). В этом варианте реализации изобретения процент гомологии основан на выравнивании целых полипептидных последовательностей (матрица: BLOSUM 62; штраф за гэл: 11,1; предельное значение установлено на 10^{-3}), включая пропептидные последовательности, предпочтительно с использованием для попарного сравнения белковой структуры дикого типа. Его рассчитывают как процентное содержание количества «положительных» (гомологичных) аминокислот, получаемого на выходе с помощью программы BLASTP, деленное на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

[25] В частности, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, отличного от человеческого липокалина 2 дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности человеческого липокалина 2 дикого типа, специалист в данной области техники использует средства и способы, хорошо известные в данной области, например, выравнивание, как вручную, так и с помощью компьютерных программ, таких как BLAST2.0, что расшифровывается как Basic Local Alignment Search Tool (основное средство поиска локального выравнивания), или ClustalW или любой другой подходящей программы, которая подходит для выполнения выравнивания последовательностей. Соответственно, человеческий липокалин 2 дикого типа может служить в качестве «эталонной последовательности» или «стандартной последовательности», тогда как аминокислотная последовательность мутеина, отличного от описанного в данном документе человеческого липокалина 2 дикого типа, служит в качестве «запрашиваемой последовательности». Термины «стандартная последовательность» и «последовательность дикого типа» взаимозаменяемо употребляются в данном документе.

[26] «Гэпы» представляют собой промежутки в выравнивании, которые являются результатом добавлений или удалений аминокислот. Таким образом, две копии одной единственной последовательности имеют 100% идентичности, но последовательности, являющиеся не настолько высококонсервативными и содержащие удаления, добавления или замещения, могут иметь меньшую степень идентичности последовательностей. Специалистам в данной области техники понятно, что для определения идентичности

последовательностей доступно несколько компьютерных программ, использующих стандартные параметры, например, Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), и Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197).

[27] В контексте данного изобретения термин «вариант» относится к производным белка или пептида, которые содержат модификации аминокислотной последовательности, например, путем замены, удаления, вставки или химической модификации. Такие модификации, в некоторых вариантах реализации изобретения, не снижают функциональность белка или пептида. Такие варианты включают белки, в которых одна или более аминокислот были замещены соответствующими им D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от 20 аминокислот природного происхождения, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. При этом такие замены также могут быть консервативными, т.е. когда аминокислотный остаток замещен химически сходным аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замещения среди представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан.

[28] Под «нативной последовательностью» человеческого липокалина 2 подразумевается человеческий липокалин 2, который имеет такую же аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид, полученный из природного источника. Следовательно, нативная последовательность человеческого липокалина 2 может иметь аминокислотную последовательность соответствующего человеческого липокалина 2 природного происхождения. Такой полипептид с нативной последовательностью можно выделять из природного источника или получать рекомбинантными или синтетическими способами. Термин полипептид с «нативной последовательностью» в частности включает усеченные или секретируемые формы человеческого липокалина 2 природного происхождения, варианты формы природного происхождения, такие как формы с альтернативным сплайсингом, и аллельные варианты человеческого липокалина 2 природного происхождения. Полипептидный «вариант» означает биологически активный полипептид, имеющий по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80% или по меньшей мере около 85% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью нативного полипептида. Такие варианты включают, например, полипептиды, в которых были добавлены или удалены один или более аминокислотных остатков в N- или C-конце полипептида. В общем случае вариант имеет по меньшей мере около 70%, включая по меньшей мере около 80%, например, по меньшей мере около 85% идентичности аминокислотной последовательности, включая по меньшей мере около 90% идентичности аминокислотной последовательности или по меньшей мере около 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью нативного полипептида.

[29] Термин «положение», употребляемый в соответствии с изобретением, означает положение любой аминокислоты в аминокислотной последовательности, проиллюстрированной в данном документе, или положение нуклеотида в нуклеотидной последовательности, проиллюстрированной в данном документе. Для понимания, в случае термина «соответствовать» или «соответствующий», употребляемого в данном документе в контексте положений аминокислотной последовательности одного или более мутантов, соответствующее положение определяется не только числом

предшествующих нуклеотидов/аминокислот. Соответственно, положение заданной аминокислоты согласно изобретению, которая может быть заменена, может варьироваться вследствие добавления или удаления аминокислот в любом месте человеческого липокалина 2 (мутантного или дикого типа). Аналогично, положение заданного нуклеотида согласно изобретению, который может быть заменен, может варьироваться вследствие добавления или удаления нуклеотидов в любом месте 5'-нетранслируемой области (НТО), включая промотор и/или любые другие регуляторные последовательности или гены (включая экзоны и интроны) человеческого липокалина 2, мутеина или дикого типа.

[30] Таким образом, в случае соответствующего положения согласно изобретению предпочтительно понимать, что положение нуклеотидов/аминокислот могут отличаться по указанному номеру от аналогичных соседних нуклеотидов/аминокислот, но указанные соседние нуклеотиды/аминокислоты, которые могут быть заменены, удалены или добавлены, также включены в одно или более соответствующих положений.

[31] Кроме того, в случае соответствующего положения в мутеине на основании стандартной структуры согласно изобретению предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот структурно соответствуют положениям в любом месте человеческого липокалина 2, мутеина или дикого типа, даже если они отличаются по указанному номеру.

[32] Термин «органическая молекула» или «небольшая органическая молекула», употребляемый в данном документе в отношении к неприродной мишени, означает органическую молекулу, содержащую по меньшей мере два атома углерода, но предпочтительно не более 7 или 12 вращающихся углеродных связей, имеющую молекулярную массу в диапазоне от 100 до 2000 Дальтон, предпочтительно от 100 до 1000 Дальтон, и необязательно содержащую один или два атома металла.

[33] В контексте данного документа слово «выявлять», «выявление» или «выявляемый» следует понимать как на количественном, так и на качественном уровне, а также в смысле их комбинации. Следовательно, это включает количественные, полуколичественные и качественные измерения, проводимые для представляющей интерес молекулы.

[34] «Субъект» представляет собой позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Термин «млекопитающее» употребляется в данном документе для обозначения любого животного, классифицируемого как млекопитающее, включая, без ограничений, людей, домашних и сельскохозяйственных животных, животных из зоопарков, животных для спорта или домашних любимцев, таких как овцы, собаки, лошади, кошки, коровы, крысы, свиньи, обезьяны, такие как яванские макаки и т.д., если называть только несколько иллюстративных примеров. Предпочтительно млекопитающее согласно данному документу представляет собой человека.

[35] «Эффективное количество» представляет количество, достаточное для достижения благоприятных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за один или более раз.

[36] «Образец» определяется как биологический образец, полученный от любого субъекта. Биологические образцы включают, но не ограничиваются этим, кровь, сыворотку крови, мочу, кал, сперму или ткань.

[37] Термин «метастаз» в соответствии с изобретением относится к переносу раковых клеток от первичной опухоли в один или более участков в другом месте организма субъекта, где развивается вторичная опухоль. Средства для определения того,

метастазировал ли рак, известны в данной области техники и включают остеосцинтиграфию, рентген грудной клетки, компьютерную аксиальную томографию (КАТ), магнито-резонансную томографию (МРТ) и тесты на опухолевые маркеры.

Термин «предотвращение метастазов» означает предотвращение, замедление или уменьшение количества метастазов первичной опухоли или рака и, следовательно, предотвращение, замедление или уменьшение развития вторичных опухолей.

Предпочтительно происходит предотвращение или уменьшение количества метастазов, т.е. вторичных опухолей, легкого, что означает, что происходит предотвращение или уменьшение метастатического переноса раковых клеток из первичной опухоли в легкое.

[38] В контексте данного документа термин «рак» относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфоцитарные лейкозы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), рак легкого из бронхоальвеолярных клеток, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожная или интраокулярная меланома, рак матки, рак яичника, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома вагины, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягких тканей, рак уретры, рак пениса, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак почки или уретры, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, гепатоцеллюлярный рак, рак желчных протоков, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли оси позвоночника, глиома из клеток ствола головного мозга, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шванномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, включая рефрактерные версии любого из вышеприведенных видов рака или комбинации одного или более вышеприведенных видов рака.

[39] Термин «сосудистые заболевания» включает рак, воспалительные заболевания, атеросклероз, ишемию, травму, сепсис, ХОБЛ, астму, диабет, ВМД, ретинопатию, инсульт, ожирение, острое повреждение легких, кровоизлияние, пропотевание сосудов, например, индуцированное цитокинами, аллергию, болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит Хашимото, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гигантоклеточный артериит, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, болезнь Крона, множественный склероз, язвенный колит, в особенности в отношении солидных опухолей, интраокулярные неоваскулярные синдромы (такие как пролиферативные ретинопатии или возрастная макулярная дегенерация (ВМД)), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931- 10934; Klagsbrun, M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; и Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710).

[40] Подразумевается, что в контексте данного документа термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в данном документе сокращаемую до HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой

цепи (в данном документе сокращаемую до LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_h и V_l могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разделенные областями, являющимися более консервативными и называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_h и V_l состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от 5 аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных вариантах реализации изобретения FR антитела к Ang-2 (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными с последовательностями 10 человеческой зародышевой линии, или могут быть модифицированы природным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить на основании параллельного анализа одной или более CDR.

[41] В контексте данного документа термин «антитело» также включает 15 антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. В контексте данного документа термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.д. включают любой природный, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном, образуя 20 комплекс. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полноразмерных молекул антител, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или технологии рекомбинантного генетического конструирования, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая 25 ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. Можно проводить секвенирование или химическую обработку ДНК или использовать методы молекулярной биологии, например, для упорядочения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для 30 внесения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые 35 имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и минитела, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте данного документа. Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере 40 один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и в общем случае содержит по меньшей мере одну CDR, которая соседствует или находится в рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_h , связанный с доменом V_l , домены V_h и V_l могут быть расположены по отношению друг к другу в любом 45 подходящем упорядочении. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_h - V_h , V_h - V_l или V_l - V_l . В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_h или

V₁.

III. ОПИСАНИЕ ФИГУР

[42] Фиг. 1: демонстрирует, что мутеины липокалина (SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9 и 11) способны блокировать взаимодействие между человеческим Ang-2 и его рецептором Tie-2 с IC50 в субнаномолярном диапазоне. Человеческий Ang-2 преинкубировали с разными концентрациями мутеинов липокалина, и проводили количественную оценку не нейтрализованного человеческого Ang-2 на планшете ELISA с иммобилизованным растворимым человеческим Tie-2Fc. Эталонное антитело (SEQ ID NO: 19/20) использовали в качестве положительного контроля. Отрицательный контроль (SEQ ID NO: 16) не обладал конкурентным действием. Данные аппроксимировали моделью связывания в одном участке.

[43] Фиг. 2: иллюстрирует профиль перекрестной реактивности и специфичности мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 7 и 8) согласно данным, полученным в конкурентном формате ELISA. Мутеины липокалина перекрестно реагируют с человеческим Ang-1, человеческим Ang-2 и мышинным Ang-2. Данные аппроксимировали с помощью модели связывания в одном участке.

[44] Фиг. 3: демонстрирует, что мутеины липокалина (SEQ ID NO: 1, 3, 6-14) способны блокировать взаимодействие между человеческим Ang-2 и его человеческим рецептором Tie-2, сверхэкспрессируемым в клетках НЕК. Человеческий Ang-2 преинкубировали с разными концентрациями SEQ ID NO: 1, 3, 6-14, не нейтрализованный Ang-2 выявляли с помощью антитела против HIS-метки. Эталонное антитело (SEQ ID NO: 19/20) использовали в качестве положительного контроля. Данные аппроксимировали моделью связывания в одном участке.

[45] Фиг. 4: демонстрирует, что мутеины липокалина (SEQ ID NO: 1, 3, 6-14) способны блокировать взаимодействие между мышинным Ang-2 и человеческим рецептором Tie-2, сверхэкспрессируемым в клетках НЕК. Мышинный Ang-2 преинкубировали с разными концентрациями SEQ ID NO: 1, 3, 6-14, а не нейтрализованный мышинный Ang-2 выявляли с помощью антитела против HIS-метки. Эталонное антитело (SEQ ID NO: 19/20) использовали в качестве положительного контроля. Данные аппроксимировали с помощью модели связывания в одном участке.

[46] Фиг. 5: демонстрирует, что мутеины липокалина SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 11 способны блокировать биологическую активность hAng-2 в анализе пролиферации клеток. В данном анализе SEQ ID NO: 7, 8, 9, 11 и 16, изотипический отрицательный контрольный IgG и два эталонных антитела добавляли к обедненным HLEC. Эксперимент показывает, что пролиферация LEC блокируется SEQ ID NO: 7, 8, 9, 11 и эталонными антителами 1 и 2 (эталонное антитело 1: SEQ ID NO: 17/18; эталонное антитело 2: SEQ ID NO: 19/20) со сходным диапазоном значений IC50. Изотипический контрольный IgG и отрицательный контроль SEQ ID NO: 16 не оказывали влияние на пролиферацию клеток. Данные аппроксимировали с помощью сигмоидальной модели доза-ответ.

IV. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[47] В настоящем изобретении предложен полипептид, обладающий специфичностью связывания в отношении Ang-2, причем полипептид содержит мутеин hNGAL, который связывает Ang-2 с выявляемой аффинностью.

[48] В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного цистеинового остатка другой аминокислотой, например, остатком серина. В некоторых других вариантах реализации изобретения мутеин, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может содержать один или

более ненативных остатков цистеина, замещающих одну или более аминокислот hNGAL дикого типа. В дополнительном конкретном варианте реализации изобретения мутеин hNGAL в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты цистеиновым остатком для

5 образования таким образом одного или более цистеиновых мостиков. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две петлевые области. Определение этих областей используется в данном документе в соответствии с Flower (Flower, 1996, выше, Flower, et al., 2000, выше) и Breustedt et al. (2005, выше).

10 [49] Мутеин или его композиция, обладающие специфичностью в отношении раскрытого в данном документе Ang-2, могут обладать антагонизирующей или нейтрализующей, или блокирующей активностью в отношении по меньшей мере одного вида биологической активности Ang-2.

[50] В одном аспекте настоящее изобретение включает различные мутеины hNGAL, которые связывают Ang-2 с по меньшей мере выявляемой аффинностью. В этом смысле Ang-2 считается неприродным лигандом стандартного hNGAL дикого типа, где «неприродный лиганд» относится к соединению, которое не связывается с человеческим

15 липокалином 2 дикого типа в физиологических условиях. Конструируя hNGAL дикого типа с одной или более мутациями в определенных положениях последовательности, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что возможна высокая

20 аффинность и высокая специфичность в отношении неприродного лиганда, Ang-2. В некоторых вариантах реализации изобретения при 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже более нуклеотидных триплетах, кодирующих определенные положения последовательности человеческого липокалина 2 дикого типа, можно проводить

25 случайный мутагенез путем проведения замещения в этих положениях подгруппой нуклеотидных триплетов.

[51] Кроме того, мутеины согласно изобретению могут содержать мутированный аминокислотный остаток в любой одной или более, в том числе по меньшей мере в

30 одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати положениях последовательности, соответствующих определенным положениям последовательности линейной полипептидной последовательности hNGAL, таких как положения последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности человеческого NGAL (SEQ ID NO: 16).

35 [52] Мутеин согласно изобретению может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) «родительской» белковой структуры (такой как hNGAL) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL в соответствии с изобретением также может нести одну или больше аминокислотных

40 мутаций в положении/положениях последовательности до тех пор, пока такая мутация не затрудняет или не мешает, по меньшей мере существенно, связывающей активности и сворачиванию мутеина. Такие мутации очень легко можно осуществить на уровне ДНК, используя общепринятые стандартные способы (Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

45 Harbor, NY). Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки и удаления, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т.е. когда аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с химически сходными свойствами, в частности, в отношении

полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения среди представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также возможно вносить в аминокислотную последовательность неконсервативные изменения. Кроме того, вместо замещения одиночных аминокислотных остатков также возможно вставлять или удалять одну или более смежных аминокислот первичной структуры человеческого липокалина 2, до тех пор, пока эти удаления или вставки приводят к получению стабильного свернутого/функционального мутеина (например, мутеинов hNGAL с усеченным N- и C-концом). В таком мутеине в N- или C-конце полипептида, например, добавлены или удалены один или более аминокислотных остатков. В общем случае такой мутеин может иметь по меньшей мере около 70%, включая по меньшей мере около 80%, например, по меньшей мере около 85% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL.

[53] Аминокислотная последовательность раскрытого в данном документе мутеина hNGAL обладает высокой идентичностью последовательностей со зрелым hNGAL (SEQ ID NO: 16) по сравнению с идентичностью последовательностей с другими липокалинами. В этом общем контексте аминокислотная последовательность мутеина согласно изобретению является по меньшей мере в значительной степени сходной с аминокислотной последовательностью природного hNGAL дикого типа, при условии возможности наличия в выравнивании гэпов (согласно определению ниже), которые являются результатом добавления или удаления аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина согласно изобретению, являясь в значительной степени сходной с последовательностями зрелого hNGAL, имеет, в некоторых вариантах реализации изобретения, по меньшей мере 70% идентичности или гомологии последовательности, по меньшей мере 75% идентичности или гомологии последовательности, по меньшей мере 80% идентичности или гомологии последовательности, по меньшей мере 82% идентичности или гомологии последовательности, по меньшей мере 85% идентичности или гомологии последовательности, по меньшей мере 87% идентичности или гомологии последовательности или по меньшей мере 90% идентичности или гомологии последовательности, включая по меньшей мере 95% идентичности или гомологии последовательности с последовательностью зрелого hNGAL, при условии сохранения измененного положения или последовательности и возможности наличия одного или более гэпов.

[54] В контексте данного документа мутеин согласно изобретению «специфически связывает» мишень (например, Ang-2), если он способен к распознаванию между этой мишенью и одной или более стандартными мишенями, так как специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. «Специфическое связывание» можно определить, например, в соответствии с методами вестерн-блоттинга, анализом ELISA, РИА, ЭХЛ, ИРМА, ИГХ и сканированием пептидов.

[55] В одном варианте реализации изобретения мутеины согласно изобретению слиты по N-концу и/или C-концу с партнером по слиянию, который, в некоторых вариантах реализации изобретения, представляет собой белок или белковый домен, или пептид. В некоторых вариантах реализации изобретения белковый домен может продлевать период полужизни мутеина в сыворотке крови. В дополнительных конкретных вариантах реализации изобретения белковый домен представляет собой Fc-часть иммуноглобулина,

СН3-домен иммуноглобулина, СН4-домен иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок.

[56] В другом варианте реализации изобретения мутеины согласно изобретению конъюгированы с соединением, которое продлевает период полужизни мутеина в сыворотке крови. Более предпочтительно мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроэтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, СН3-домена иммуноглобулина, СН4-домена иммуноглобулина, альбуминсвязывающего пептида или альбуминсвязывающего белка.

[57] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую раскрытый в данном документе мутеин. Изобретение включает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

А. Типовые мутеины, специфические в отношении Ang-2

[58] В одном аспекте настоящее изобретение относится к новым, характеризующимся специфическим связыванием мутеинам человеческого липокалина 2 (человеческого Lcn2 или hNGAL), специфическим в отношении Ang-2.

[59] Один вариант реализации настоящего изобретения относится к мутеину, который способен связывать Ang-2 с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, определяемая Кд около 200 нМ или меньше, например, около 150 нМ или меньше.

[60] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен мутеин hNGAL, который способен связывать Ang-2 с Кд около 5 нМ или меньше согласно измерениям на приборе Biacore T200 методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), по сути, описанным в Примере 6.

[61] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной посредством определения значения EC50, составляющего около 5 нМ или меньше, согласно измерениям в ELISA-анализе, по сути, описанном в Примере 4.

[62] В некоторых других вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной посредством определения значения EC50, составляющего около 5 нМ или меньше, согласно измерениям в конкурентном ELISA-анализе, по сути, описанном в Примере 5.

[63] В некоторых других вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению способны ингибировать или снижать пролиферацию эндотелиальных клеток лимфатических капилляров, опосредованную Ang-2, со значением IC50 около 5 нМ или меньше согласно анализу пролиферации клеток, по сути, описанному в Примере 9.

[64] В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения Ang-2-связывающий мутеин hNGAL способен связываться как с Ang-2, так и с Ang-1 с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, определяемая Кд около 200 нМ или меньше, например, около 150 нМ или меньше. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению перекрестно реагируют с человеческим Ang-1 и с человеческим Ang-2.

[65] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения мутеин способен связывать Ang-1 с аффинностью, измеренной посредством определения значения EC50, составляющего около 150 нМ или меньше, согласно измерениям в

ELISA-анализе, по сути, описанном в Примере 7.

[66] В некоторых других вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению перекрестно реагируют с человеческим Ang-2 и мышинным Ang-2. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более
5 таких мутеинов способны связывать как человеческий Ang-2, так и мышинный Ang-2 с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, определяемая Кд около 200 нМ или меньше, например, около 150 нМ или меньше.

[67] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения один или более таких мутеинов способны связывать мышинный Ang-2 с аффинностью, измеренной
10 посредством определения значения EC50, составляющего около 5 нМ или меньше, согласно измерениям в ELISA-анализе, по сути, описанном в Примере 7.

[68] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения один или более таких мутеинов способны блокировать связывание человеческого Ang-2 с hTie-2 и мышинного Ang-2 с hTie-2 со значением IC50 около 25 нМ или меньше, соответственно,
15 в конкурентном формате клеточного анализа ЭХЛ, по сути, описанного в Примере 8.

[69] В некоторых вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению не обладают перекрестной реактивностью с человеческим Ang-4. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению не обладают перекрестной
20 реактивностью с мышинным Ang-3. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более мутеинов hNGAL согласно данному изобретению не обладают перекрестной реактивностью с человеческим VEGF-A.

[70] В этом отношении изобретение относится к полипептиду, причем указанный полипептид содержит мутеин hNGAL, а указанный hNGAL, по сравнению с линейной
25 полипептидной последовательностью зрелого hNGAL, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или даже больше мутированных аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, и при этом указанный полипептид связывает Ang-2 с выявляемой аффинностью.

[71] В некоторых вариантах реализации изобретения Ang-2-связывающий мутеин hNGAL согласно изобретению содержит в любом одном или более положениях последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16) один или более из следующих мутированных аминокислотных остатков: Leu 36 →
35 Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr
40 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Aso, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu или Phe; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val; и Lys 134 → Ala, Glu или Trp. В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL согласно изобретению содержит два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или даже более, или все мутированные аминокислотные
45 остатки в этих положениях последовательности зрелого hNGAL.

[72] Кроме того, Ang-2-связывающий мутеин hNGAL согласно изобретению также может содержать следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln 28 → His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys

87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

[73] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL согласно изобретению, который связывается с Ang-2, содержит следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(k) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr;

Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

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

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

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

[74] В оставшейся области, т.е. области, отличной от положений последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, мутеин hNGAL согласно изобретению может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности.

[75] В дополнительных конкретных вариантах реализации изобретения мутеин согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14 или их функционального фрагмента или варианта. В некоторых вариантах реализации изобретения такой фрагмент или вариант является структурным гомологом мутеина, определяемого любой из SEQ ID NO: 1-14.

[76] Аминокислотная последовательность Ang-2-связывающего мутеина hNGAL согласно изобретению может иметь высокую идентичность последовательности, такую как по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичности, включая по меньшей мере 95% идентичности, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14.

[77] В некоторых других вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL в соответствии с изобретением, перекрестно реагирующий или связывающийся с человеческим Ang-1, человеческим Ang-2 и/или мышинным Ang-2, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14 и их функциональных фрагментов или вариантов.

[78] Также изобретение включает структурные гомологи мутеина hNGAL, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14, при этом структурные гомологи обладают гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющей более чем около 60%, предпочтительно более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 92% и наиболее предпочтительно более чем 95%, по отношению к указанному мутеину hNGAL.

[79] Ang-2-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим изобретением можно получить посредством мутагенеза формы природного происхождения человеческого липокалина 2. В некоторых вариантах реализации мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Не смотря на это,

предусмотрена любая замена, включая неконсервативную замену или одну или более из типовых замен, приведенных ниже, до тех пор, пока мутеин сохраняет свою способность связываться с Ang-2 и/или он имеет идентичность с замещенной последовательностью, в которой по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более идентичности с аминокислотной последовательностью зрелого человеческого липокалина 2 (номер доступа в банке данных SWISS-PROT P80188).

[80] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один раскрытый в данном документе Ang-2-связывающий мутеин hNGAL или его конъюгат, или продукт слияния, как описано в данном документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[81] Соответственно, Ang-2-связывающие мутеины hNGAL согласно изобретению можно получать в виде композиций, используя фармацевтически приемлемые ингредиенты, а также общепринятые способы приготовления (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для приготовления фармацевтических композиций можно использовать фармацевтически инертные неорганические или органические вспомогательные вещества.

В. Применения мутеинов, специфических в отношении Ang-2

[82] Недавно, используя мышиную модель с нокаутом ANG-2, группа Yancopoulos сообщила, что ANG-2 необходим для постнатального ангиогенеза (Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23). Они показали, что связанная с развитием запрограммированная регрессия гиалоидной сосудистой системы в глазу не происходит у мышей с нокаутом ANG-2, а кровеносные сосуды сетчатки не вырастают из центральной ретинальной артерии (Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23). Также они обнаружили, что удаление ANG-2 приводит к сильным дефектам формирования и функции лимфатической сосудистой системы (Gale, N. W., et al., Dev. Cell 3 (2002) 411-23). Кроме того, считается, что эффективная анти-Ang-2 терапия будет полезной для лечения заболеваний, таких как рак, прогрессирование которых зависит от aberrантного ангиогенеза, когда блокирование такого процесса может привести к предотвращению усугубления заболевания (Folkman, J., Nature Medicine. 1, (1995) 27-31). Более того, было показано, что экспрессия Ang-2 коррелирует с тяжестью различных воспалительных и/или инфекционных заболеваний (смотрите, например, Siner et al., 2009, Shock 31 :348-353; Yeo et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA): 105: 17097-17102).

[83] Следовательно, в медицине, например, в офтальмологии и онкологии, существует множество возможных применений мутеинов, обладающих аффинностью связывания в отношении Ang-2 согласно изобретению. В одном дополнительном аспекте изобретение относится к применению такого раскрытого в данном документе мутеина для выявления Ang-2 в образце, а также к соответствующему способу диагностики.

[84] Настоящее изобретение также включает применение одного или более мутеинов, обладающих аффинностью связывания в отношении описанного Ang-2, для образования комплекса с Ang-2.

[85] Следовательно, в другом аспекте изобретения раскрытые мутеины применяют для выявления Ang-2. Такое применение может включать этапы приведения в подходящих условиях одного или более указанных мутеинов в контакт с образцом, в котором подозревается наличие Ang-2, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между мутеинами и Ang-2, и выявление комплекса по

подходящему сигналу.

[86] Выявляемым сигналом может быть метка, как описано выше, или изменение физических свойств вследствие связывания, т.е. само по себе образование комплекса. Одним из примеров является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого
5 меняется во время связывания партнеров по связыванию, один из которых иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

[87] Раскрытые в данном документе мутеины также можно применять для отделения Ang-2. Такое применение может включать этапы приведения в подходящих условиях одного или более указанных мутеинов в контакт с образцом, в котором предполагается
10 наличие Ang-2, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между мутеинами и Ang-2, и отделение комплекса от образца.

[88] При применении раскрытых мутеинов для выявления Ang-2, а также для отделения Ang-2, мутеины и/или Ang-2, или их домен, или фрагмент могут быть иммобилизованы на подходящей твердой подложке.

[89] Соответственно, можно определить наличие или отсутствие молекулы, такой как Ang-2, например, в образце, а также ее концентрацию или уровень.

[90] Следовательно, мутеины согласно настоящему изобретению можно применять для выявления и/или измерения Ang-2 в образце, например, в диагностических целях. Например, мутеины можно применять для диагностики патологического состояния
20 или заболевания, характеризуемого aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией или отсутствием экспрессии и т.д.) Ang-2. Типовые диагностические методы анализа Ang-2 могут включать, например, приведение образца, полученного от пациента, в контакт с мутеинами, причем мутеины помечены выявляемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте
25 в диагностических применениях можно использовать немеченые мутеины в комбинации с вторичной молекулой, которая сама по себе выявляемо помечена. Выявляемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный компонент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная
30 фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные типовые методы анализа, которые можно применять для выявления или измерения Ang-2 в образце, включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[91] В другом аспекте настоящее изобретение относится к диагностическому или
35 аналитическому набору, содержащему мутеин, обладающий аффинностью связывания в отношении Ang-2 в соответствии с изобретением.

[92] В дополнительном аспекте изобретение также включает применение раскрытых Ang-2-связывающих мутеинов hNGAL или комбинаций, содержащих такие описанные в данном документе мутеины, для производства фармацевтической композиции.
40 Полученная таким образом фармацевтическая композиция может быть пригодна для лечения, предотвращения и/или уменьшения выраженности заболеваний или нарушений, связанных с дерегулированным ангиогенезом, таких как рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. Фармацевтическую композицию можно применять в качестве монотерапии или комбинированной терапии.
45 Соответственно, в изобретении также предложены Ang-2-связывающие мутеины hNGAL для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом, такого как рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз.

[93] Кроме применения в диагностике, в другом аспекте изобретение включает применение такого мутеина согласно изобретению или композиции или комбинации, содержащей такой мутеин, для связывания Ang-2 в организме субъекта и/или ингибирования, или снижения интенсивности ангиогенеза в организме субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения такой субъект может страдать от заболеваний или нарушений, связанных с дерегулированным ангиогенезом, таких как рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз.

[94] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу связывания Ang-2 в организме субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества одного или более мутеинов, обладающих аффинностью связывания в отношении Ang-2 согласно изобретению, или одной или более композиций или комбинаций, содержащих такой мутеин.

[95] В другом аспекте настоящее изобретение включает способ ингибирования или снижения интенсивности ангиогенеза в организме субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества одного или более мутеинов, обладающих аффинностью связывания в отношении Ang-2 согласно изобретению, или одной или более композиций или комбинаций, содержащих такой мутеин. В некоторых вариантах реализации изобретения такой субъект может страдать от заболеваний или нарушений, связанных с дерегулированным ангиогенезом, таких как рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз.

[96] Мутеины согласно изобретению или композиции, или комбинации, содержащие такие мутеины, применимы, помимо прочего, для лечения, предотвращения и/или уменьшения выраженности любого заболевания или нарушения, связанного с активностью Ang-2, включая заболевания или нарушения, связанные с дерегулированным ангиогенезом.

[97] Например, мутеины или композиции или комбинации, содержащие такие мутеины согласно изобретению, можно применять для ингибирования или снижения роста опухоли, характеризуемого нежелательным ангиогенезом, в организме субъекта, например, в отношении первичных и/или метастатических опухолей, растущих в головном мозге и оболочке головного мозга, ротовой части глотки, легких и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужском и женском репродуктивном тракте, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящем тракте, и специальных сенсорных органах, таких как глаз. В определенных вариантах реализации антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению применяют для лечения одного или более из следующих видов рака: почечно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака молочной железы, рака простаты, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы или меланомы.

[98] В некоторых других вариантах реализации изобретения мутеины или композиции или комбинации, содержащие такие мутеины согласно настоящему изобретению, также можно применять для лечения, предотвращения и/или уменьшения выраженности одного или более глазных нарушений, таких как ретинопатия. Типовые глазные нарушения, которые можно лечить, предотвращать и/или уменьшать выраженность с помощью или посредством мутеинов или композиций, содержащих такие мутеины, включают, например, возрастную макулярную дегенерацию, диабетическую

ретинопатию и другие глазные нарушения, связанные с хориоидальной неоваскуляризацией, пропотеванием сосудов, отеком сетчатки и воспалением. Кроме того, мутеины можно вводить в качестве вспомогательного средства вместе с хирургией глаукомы для предотвращения раннего гем- и лимфангиогенеза и накопления макрофагов в фильтрационной подушке после хирургии глаукомы и улучшения клинического результата.

[99] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения мутеины или композиции или комбинации, содержащие такие мутеины, применяют для лечения, предотвращения или уменьшения выраженности сосудистых заболеваний, таких как гипертензия, диабет (включая инсулинонезависимый сахарный диабет), псориаз, артрит (включая ревматоидный артрит), астма, сепсис, болезнь почек и отек. В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения эти заболевания или нарушения связаны с повреждением, инсультом или опухолью.

[100] Кроме того, мутеины или композиции, или комбинации, содержащие такие мутеины, раскрытые в данном документе, можно применять для лечения, предотвращения или уменьшения выраженности одного или более воспалительных или инфекционных заболеваний. Типовые инфекционные заболевания, которые можно лечить, предотвращать и/или уменьшать выраженность посредством введения анти-Ang-2 мутеинов согласно изобретению или композиций, содержащих такие мутеины, включают, но не ограничиваются этим, малярию (инфекцию *Plasmodium falciparum*), вирусные геморрагические лихорадки (например, лихорадку денге), риккетсиоз, токсический шок, сепсис, гепатит С, инфекцию *Bartonella bacilliformis*, лейшманиоз, микобактериальную инфекцию и инфекцию вирусом Эпштейна-Барр.

[101] Настоящее изобретение также предполагает применение раскрытых в данном документе мутеинов или композиций или комбинаций, содержащих такие мутеины, для приготовления медикамента для предотвращения появления метастазов или лечения рака или сосудистых заболеваний.

[102] Ang-2-связывающие мутеины hNGAL в соответствии с изобретением или композиции или комбинации, содержащие такие мутеины, можно вводить любым парентеральным или непарентеральным (например, энтеральным) путем, являющимся терапевтически эффективным. Терапевтически эффективный путь обеспечивает доставку агента в необходимый компартмент, систему или участок. Например, терапевтически эффективный путь – это такой путь, которым агент можно вводить так, чтобы обеспечить в желаемом участке действия количество агента, достаточное для достижения благоприятного или желаемого клинического результата.

С. Комбинирование Ang-2-связывающего мутеина с одним или более антиангиогенными агентами

[103] Для ангиогенеза требуется связывание сигнальных молекул, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), с рецепторами на поверхности нормальных эндотелиальных клеток. Когда VEGF и другие эндотелиальные факторы роста связываются со своими рецепторами на эндотелиальных клетках, в этих клетках инициируются сигналы, которые стимулируют рост и выживаемость новых кровеносных сосудов. Одним из подходов к разработке эффективных антиангиогенных методов лечения является комбинирование агентов, которые действуют на разные мишени, вовлеченные в ангиогенез, предпочтительно мишени, которые действуют на хорошо изолированные сигнальные пути.

[104] Следовательно, в настоящее изобретение включено применение мутеина hNGAL, специфического в отношении Ang-2, в комбинации с одним или более антиангиогенными

агентами. В контексте данного документа «антиангиогенный агент» означает любое вещество, способное ингибировать или препятствовать связыванию одной из таких сигнальных молекул со своим рецептором. В некоторых вариантах реализации изобретения антиангиогенный агент способен блокировать или принимает участие в
 5 блокировании одного из сигналов, который стимулирует рост и выживаемость новых кровеносных сосудов.

[105] В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения антиангиогенные агенты включают (i) антагонисты Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 и/или Tie-2; (ii) антагонисты Fltl, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF антагонисты EG-
 10 VEGF; (iii) антагонисты дельта-подобного лиганда 4 (DLL4, сосудисто-специфический лиганд Notch), (iv) антагонисты рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и (v) ингибиторы цитокинов.

[106] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения антагонист Ang-2 может представлять собой мутеин hNGAL согласно изобретению, антитело к
 15 Ang-2 (смотрите патент США № 8133979; в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки), пептитело (смотрите патент США № 8129331; в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки) или CovX-тело (такое как CVX-060, смотрите патент США № 7521425; в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки). В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения антагонист DLL4 может представлять собой антитело к DLL4 (например, антитело к DLL4, раскрытое в заявке на патент США № 2009/0142354, такое как REGN421 и т.д.). В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения антагонист EGFR может представлять собой антитело к EGFR или низкомолекулярный ингибитор активности EGFR. Другие антиангиогенные агенты, которые могут
 20 обеспечивать преимущество при введении в комбинации с анти-Ang-2 мутеинами hNGAL согласно изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов, и антитела, которые связываются с цитокинами, таким как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 и/или их соответствующими рецепторами.

[107] В связи с этим, настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любой из анти-Ang-2 мутеинов hNGAL, упоминаемых в данном документе, и антиангиогенный агент, такой как антагонист одного или более из VEGF, DLL4, EGFR или любого из вышеуказанных цитокинов, при этом антагонист может быть аптамером, антисмысловой молекулой, рибозимом, миРНК, пептителом,
 35 нанотелом, антителом, фрагментом антитела (например, фрагментом Fab; фрагментом F(ab')₂; фрагментом Fd; фрагментом Fv; scFv; фрагментом dAb; сконструированной молекулой (такой как диатело, триатело, тетратело, минитело и минимальная распознающая единица); противовирусным средством, антибиотиком, анальгетиком, кортикостероидом и/или нестероидным противовоспалительным лекарственным
 40 препаратом (NSAID).

[108] В некоторых вариантах реализации изобретения указанная сконструированная молекула может представлять собой EGF-подобный домен, крингл-домен, домен фибронектина типа I, домен фибронектина типа II, домен фибронектина типа III, домен PAN, домен G1a, домен SRCR, домен ингибитора трипсина Кунитца/трипсина
 45 поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора сериновых протеаз типа Kazal, домен трилистника (P-типа), домен фактора Виллебранда типа C, анафилотоксин-подобный домен, домен CUB, тироглобулиновый повтор типа I, домен рецептора ЛПНП класса A, домен Sushi, домен Link, домен тромбоспондина типа I, домен

иммуноглобулина или иммуноглобулин-подобный домен (например, доменные антитела или верблюжьи антитела, содержащие только тяжелые цепи), домен лектина С-типа, домен МАМ, домен фактора Виллебранда типа А, домен соматомедина В, коровый домен с четырьмя дисульфидными связями WAP-типа, домен F5/8 типа С, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен типа ламинина, домен C2, «каппатело» (III. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), «минитело» (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), «диатело» (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)), «янусин» (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)), нанотело, аднектин, тетранектин, микротело, аффилин, аффитело, анкирин, кристаллин, ноттин, убиквитин, цинк-пальцевый белок, автофлуоресцирующий белок, анкирин или белок с анкириновым повтором или белок с богатыми лейцином повторами, или авимер (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, *Nat Biotech*, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in *Nat Biotech*. 2005 Nov 20 edition).

[109] При комбинации с одним или более дополнительными агентами согласно изобретению анти-Ang-2 мутеины hNGAL можно вводить до, одновременно (например, в одном составе или в разных составах) или после введения другого(их) агента(ов). Мутеин hNGAL и антиангиогенный агент можно вводить в комбинации, включая одновременное, параллельное или последовательное введение. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинации согласно изобретению, мутеины hNGAL и антиангиогенные агенты могут быть включены в одну композицию, предназначенную для введения. Композиция может содержать эффективное количество мутеина hNGAL и антиангиогенного агента в качестве активных ингредиентов в сочетании по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным средством, разбавителем или носителем. В связи с этим, комбинации согласно изобретению можно получать в виде композиций, используя фармацевтически приемлемые ингредиенты, а также общепринятые способы приготовления (Gennaro and Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для приготовления фармацевтических композиций можно использовать фармацевтически инертные неорганические или органические вспомогательные вещества.

[110] Мутеин hNGAL и антиангиогенный агент также можно вводить независимо друг от друга, в том числе через индивидуальные интервалы времени в независимые моменты времени. Комбинации мутеина hNGAL и антиангиогенного агента можно обеспечивать в различных формах и в любой ориентации.

[111] Анти-Ang-2 мутеины hNGAL согласно изобретению и их комбинации также можно вводить в качестве части схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

[112] В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения антиангиогенный агент представляет собой антагонист любого компонента рецепторных систем VEGF/VEGF и рецепторной системы ангиопоэтин/Tie-2; то есть, одного из Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF, EG-VEGF, Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 или Tie-2. Путь VEGF-VEGFR и путь Tie-2 следует рассматривать как два независимых

медиатора, существенных для процесса *in vivo* ангиогенеза (Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91; Jendreyko, N., et al., Journal of Biological Chemistry, 278:47812-47819 (2003); Jendreyko, N., et al., PNAS, 102:8293-8298 (2005)).

[113] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения
 5 антиангиогенный агент представляет собой ингибитор VEGF. Семейство VEGF включает VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, плацентарный фактор роста (PlGF) и VEGF эндокринной железы (EG-VEGF). Известно, что представители семейства VEGF связываются с разной аффинностью с тремя родственными рецепторными тирозинкиназами; VEGFR1 (рецептор *fms*-подобной тирозинкиназы, Flt1), VEGFR2
 10 (рецептор, имеющий в составе домен, содержащий киназу, KDR) и VEGFR3 (рецептор другой *fms*-подобной тирозинкиназы, Flt4).

[114] В контексте данного документа «ингибитор VEGF» означает любое вещество, которое снижает сигнализацию через путь VEGF-VEGFR. Следовательно, ингибитор VEGF может ингибировать или создавать помехи для любого представителя семейства
 15 VEGF и/или любой из рецепторных тирозинкиназ. Ингибиторы VEGF могут представлять собой, если называть только некоторые примеры, небольшие молекулы, пептиды, полипептиды, белки, в частности, включая антитела, в том числе антитела к VEGF, антитела к VEGFR, интратела, макситела, минитела, диатела, Fc-слитые белки, такие как пептитела, рецептитела, растворимые белки и фрагменты рецептора VEGF и много
 20 других. Многие ингибиторы VEGF действуют путем связывания с VEGF или с рецептором VEGF. Другие действуют косвенным путем, связываясь с факторами, которые связываются с VEGF или с рецептором VEGF, или с другими компонентами сигнального пути VEGF. Другие ингибиторы VEGF действуют путем изменения регуляторных посттрансляционных модификаций, которые модулируют сигнализацию
 25 пути VEGF-VEGFR. Ингибиторы VEGF в соответствии с изобретением также могут действовать посредством не прямых механизмов. Вне зависимости от механизма, в контексте данного документа ингибитор VEGF снижает эффективную активность сигнального пути VEGF-VEGFR в заданных условиях, какие были бы в отсутствие ингибитора.

[115] В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения ингибитор VEGF может представлять собой VEGF-Трап (смотрите, например, патент США № 7087411; в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки), антитело к VEGF (например, бевацизумаб), низкомолекулярный киназный ингибитор рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб), анти-VEGF мутеин липокалина
 35 слезной жидкости человека (смотрите, например, заявку согласно РСТ РСТ/EP2007/057971, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки) или анти-VEGFR мутеин липокалина слезной жидкости человека (смотрите, например, заявку согласно РСТ РСТ/EP2007/057971, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки).

[116] В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор VEGF в качестве антиангиогенного агента выбран из группы, состоящей из VEGF-Трап (смотрите, например, патент США № 7087411; в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки), бевацизумаб (Avastin®), сорафениб (Nexavar®), сунитиниб (Sutent®) и пазопаниб (Votrient®).

[117] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения ингибитор VEGF может представлять собой антагонист VEGF-A, такой как антитело к VEGF-A (например, бевацизумаб). В некоторых других вариантах реализации изобретения антагонист VEGF-A может представлять собой мутеин липокалина, который обладает

специфичностью связывания в отношении VEGF-A (смотрите, например, заявку согласно РСТ РСТ/ЕР2007/057971; в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки).

[118] В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения ингибитор VEGF может представлять собой антагонист VEGF-C, такой как антитело к VEGF-C (смотрите, например, патенты США № 6403088 и 8486397; в полном объеме включенные в данный документ посредством ссылки). В некоторых других вариантах реализации изобретения антагонист VEGF-C может представлять собой мутеин липокалина, который обладает специфичностью связывания в отношении VEGF-C.

[119] В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин hNGAL согласно изобретению, специфический в отношении Ang-2, представлен в комбинации с более чем одним антиангиогенным агентом, например, двумя, причем один агент представляет собой антагонист VEGF-A, упоминаемый в данном документе, а второй агент представляет собой антагонист VEGF-C, упоминаемый в данном документе.

[120] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает применение (i) мутеина hNGAL согласно изобретению, специфического в отношении Ang-2, и (ii) одного или более антиангиогенных агентов для ингибирования дерегулированного ангиогенеза у субъекта. Такое применение включает этап введения субъекту эффективного количества (i) мутеина hNGAL согласно изобретению, специфического в отношении Ang-2, и (ii) одного или более антиангиогенных агентов.

[121] Аналогично, настоящее изобретение включает применение (i) мутеина hNGAL согласно изобретению, специфического в отношении Ang-2, и (ii) одного или более антиангиогенных агентов для лечения, предотвращения или уменьшения выраженности заболеваний или нарушений, связанных с дерегулированным ангиогенезом, у субъекта.

В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения заболевания или нарушения, связанные с дерегулированным ангиогенезом, включают рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах реализации изобретения один антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-A, упоминаемый в данном документе, а второй антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-C, упоминаемый в данном документе.

[122] Дополнительные подробности относительно мутеинов hNGAL с выявляемой аффинностью в отношении Ang-2 можно найти в Разделе А настоящего описания.

[123] В предпочтительном варианте реализации изобретения мутеин hNGAL, специфический в отношении Ang-2, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14 и их функциональных фрагментов или вариантов. В некоторых вариантах реализации изобретения такие фрагменты или варианты являются структурными гомологами мутеина, определяемого любой из SEQ ID NO: 1-14.

[124] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один из следующих компонентов: (i) мутеин hNGAL согласно изобретению, специфический в отношении Ang-2, и (ii) один или более антиангиогенных агентов, при этом композицию можно применять для ингибирования дерегулированного ангиогенеза. В некоторых вариантах реализации изобретения один антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-A, упоминаемый в данном документе, а второй антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-C, упоминаемый в данном документе.

[125] В связи с этим, комбинации согласно изобретению можно получать в виде композиций, используя фармацевтически приемлемые ингредиенты, а также

общепринятые способы приготовления (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для приготовления фармацевтических композиций можно использовать фармацевтически инертные неорганические или органические вспомогательные

5 вещества.

[126] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения, предотвращения или уменьшения выраженности заболеваний или нарушений, связанных с deregulated ангиогенезом, у субъекта, включающему введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере

10 следующее: (i) мутеин hNGAL, который обладает выявляемой аффинностью в отношении Ang-2, и (ii) один или более антиангиогенных агентов. В некоторых дополнительных вариантах реализации изобретения заболевания или нарушения, связанные с deregulated ангиогенезом, включают рак, неоваскулярные заболевания глаз (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах реализации

15 изобретения один антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-A, упоминаемый в данном документе, а второй антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-C, упоминаемый в данном документе.

[127] В другом аспекте настоящее изобретение включает способ ингибирования или снижения deregulated ангиогенеза, у субъекта, включающий введение указанному

20 субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере следующее: (i) мутеин hNGAL, который обладает выявляемой аффинностью в отношении Ang-2, и (ii) один или более антиангиогенных агентов. В некоторых вариантах реализации изобретения один антиангиогенный агент представляет собой антагонист VEGF-A, упоминаемый в данном документе, а второй антиангиогенный агент представляет

25 собой антагонист VEGF-C, упоминаемый в данном документе.

D. Мутеины согласно изобретению

[128] При употреблении в контексте данного документа мутеинов согласно настоящему изобретению, которые связываются с Ang-2, термин «специфический в отношении» включает то, что мутеин направлен против, связывается с или реагирует

30 с Ang-2. Таким образом, направленность на, связывание с или вступление в реакцию с включает то, что мутеин специфически связывается с Ang-2. В этом контексте термин «специфически» означает, что мутеин вступает в реакцию с Ang-2, как описано в данном документе, но преимущественно не с другой мишенью. Вступает ли мутеин специфическим образом в реакцию по вышеприведенному определению данного

35 документа, можно легко проверить, помимо прочего, путем сравнения реакции мутеина hNGAL согласно настоящему изобретению с Ang-2 и реакции указанного мутеина с другой(ими) мишенью(ями). «Специфическое связывание» также можно определить, например, в соответствии с методами вестерн-блоттинга, анализом ELISA, РИА, ЭХЛ, ИРМА, FACS, ИГХ и сканированием пептидов.

[129] Аминокислотная последовательность мутеина в соответствии с изобретением имеет высокую идентичность последовательности с человеческим липокалином 2 по сравнению с идентичностью последовательности с другим липокалином (также смотрите выше). В этом общем контексте аминокислотная последовательность мутеина в комбинации в соответствии с изобретением является по меньшей мере в значительной

40 степени сходной с аминокислотной последовательностью соответствующего липокалина (hNGAL дикого типа). Соответствующая последовательность мутеина в комбинации в соответствии с изобретением является в значительной степени сходной с последовательностью зрелого hNGAL, например, имеет по меньшей мере 65%, по

меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичности, включая по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью зрелого hNGAL. В связи с этим, мутеин согласно изобретению, конечно, может содержать описанные в
 5 данном документе замены, которые придают мутеину способность связываться с Ang-2. Как правило, мутеин hNGAL содержит по сравнению с нативной последовательностью hNGAL одну или более мутаций в четырех петлях в открытом конце лигандсвязывающего участка hNGAL. Как объяснялось выше, эти области важны для определения
 10 специфичности связывания мутеина в отношении Ang-2. Полученный из мутеина hNGAL или его гомолог может содержать один, два, три, четыре или более мутированных аминокислотных остатков в любом положении последовательности в N-концевой области и/или в трех пептидных петлях BC, DE и FG, расположенных в конце структуры β-бочки, которая находится напротив природного связывающего кармана.

[130] Мутеин в соответствии с изобретением содержит одну или более, например,
 15 две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или даже двадцать замен по сравнению с соответствующим нативным липокалином hNGAL, при условии, что такой мутеин способен связываться с Ang-2. Например, мутеин может содержать замену в положении, соответствующем отдельному
 20 положению (т.е. в соответствующем положении) hNGAL. В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин в комбинации в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере две аминокислотные замены, включая 2, 3, 4, 5 или даже более аминокислотных замен нативной аминокислоты остатком аргинина. Соответственно, нуклеиновая кислота «стандартной» белковой структуры, описанной в данном
 25 документе, является объектом мутагенеза с целью создания мутеина, который способен связываться с Ang-2.

[131] Также мутеин согласно настоящему изобретению может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность в N- или C-конце, предпочтительно C-конце, такую как Strep-метка, например, Strep II-метка, без влияния
 30 на биологическую активность (связывание со своей мишенью, например, Ang-2) мутеина.

[132] В частности, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, отличного от hNGAL дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности hNGAL дикого типа, специалист может использовать средства и методы, хорошо известные в данной
 35 области техники, например, выравнивание, проводимое как вручную, так и с помощью компьютерных программ, таких как BLAST2.0, что расшифровывается как Basic Local Alignment Search Tool (основное средство поиска локального выравнивания), или ClustalW или любой другой подходящей программы, которая подходит для создания выравнивания последовательностей. Соответственно, hNGAL дикого типа может
 40 служить в качестве «эталонной последовательности» или «стандартной последовательности», тогда как аминокислотная последовательность мутеина, отличного от описанного в данном документе hNGAL дикого типа, служит в качестве «запрашиваемой последовательности». Термины «стандартная последовательность» и «последовательность дикого типа» взаимозаменяемо употребляются в данном
 45 документе.

[133] В некоторых вариантах реализации изобретения замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Не смотря на это, предусмотрена любая замена, включая неконсервативную замену или одну или более из типовых замен,

приведенных ниже, до тех пор, пока мутеин сохраняет свою способность связываться с Ang-2 и/или он имеет идентичность с замещенной последовательностью, в которой по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более идентичности с «исходной» последовательностью.

[134] В общем случае консервативные замены представляют собой следующие замены, приведенные в соответствии с предназначенной для мутации аминокислотой, за которой следует одно или более замещений, которые могут считаться консервативными: Ala → Gly, Ser, Val; Arg Lys; Asn Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. Разрешены также другие замены, которые можно определить эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительного руководства приведены следующие восемь групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые, как правило, можно рассматривать как консервативные замены по отношению друг к другу:

- a. аланин (Ala), глицин (Gly);
- b. аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);
- c. аспарагин (Asn), глутамин (Gln);
- d. аргинин (Arg), лизин (Lys);
- e. изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val);
- f. фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp);
- g. серин (Ser), треонин (Thr); и
- h. цистеин (Cys), метионин (Met)

[135] Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда можно вносить более существенные замены, такие как приведены ниже или описаны ниже в отношении классов аминокислот, и проводить скрининг продуктов в отношении желаемых характеристик. Примерами таких более существенных замен являются: Ala → Leu, Ile; Arg Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, норлейцин; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ne, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

[136] Существенные модификации биологических свойств hNGAL осуществляют, выбирая замены, которые значительно отличаются по своему действию на поддержание (a) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке или (c) объема боковой цепи. Остатки природного происхождения делятся на группы на основании общих свойств боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; (2) нейтральные гидрофильные: цистеин, серин, треонин; (3) кислые: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; (4) основные: аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин.

[137] Неконсервативные замены включают замещение представителя одного из этих классов другим классом. Также может быть замещен любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в поддержание правильной конформации hNGAL, в общем случае серином, для улучшения устойчивости к окислению молекулы и предотвращения aberrантного перекрестного связывания. И наоборот, цистеиновые связи можно добавлять для улучшения стабильности.

[138] Любую мутацию, включая обсуждаемую выше вставку, можно очень легко провести в нуклеиновой кислоте, например, на уровне ДНК, используя общепринятые стандартные способы. Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или удаления, а также аминокислотные замены.

5 Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком со сходными химическими свойствами, в частности, в отношении полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения между представителями следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин
10 и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны также возможно вносить неконсервативные изменения в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения одиночных аминокислотных остатков также возможно вставлять или удалять одну или более последовательных аминокислот первичной структуры hNGAL до тех пор, пока эти
15 удаления или вставки приводят к получению стабильного свернутого/функционального мутеина.

[139] Модификации аминокислотной последовательности включают направленный мутагенез единичных аминокислотных положений с целью упрощения субклонирования мутированного гена hNGAL или его частей путем включения участков расщепления
20 для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того, эти мутации также можно вносить для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении заданной мишени, такой как Ang-2. Помимо этого, мутации можно вводить с целью модуляции определенных характеристик мутеина, такой как улучшение стабильности сворачивания, сывороточной стабильности, устойчивости белка или растворимости в воде, или для
25 снижения тенденции к агрегации в случае необходимости. Например, цистеиновые остатки природного происхождения можно мутировать на другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидных мостиков. Также возможно преднамеренно мутировать другие положения аминокислотной последовательности на цистеин с целью внесения новых реактивных групп, например, для конъюгации с другими соединениями,
30 такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования дисульфидных связей, не существующих в природе. Созданный тиоловый компонент можно использовать для ПЭГилирования или ГЕКирирования мутеина, например, с целью повышения периода полужизни соответствующего мутеина в сыворотке крови.

35 [140] Также возможно преднамеренно мутировать другие положения аминокислотной последовательности на цистеин с целью внесения новых реактивных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования дисульфидных связей, не существующих в природе.

40 [141] В некоторых вариантах реализации изобретения, если один из вышеуказанных компонентов конъюгирован с мутеином согласно изобретению, преимущество может обеспечить конъюгация с боковой цепью аминокислоты. Подходящие боковые цепи аминокислот в аминокислотной последовательности hNGAL могут иметь природное происхождение или могут быть внесены с помощью мутагенеза. В случае внесения
45 подходящего связывающего участка с помощью мутагенеза, одной из возможностей является замещение аминокислоты в соответствующем положении цистеиновым остатком.

[142] В отношении мутеина человеческого липокалина 2 типовой возможностью

такой мутации является внесение цистеинового остатка в аминокислотную последовательность липокалина, включая мутеин человеческого липокалина 2, для внесения цистеинового остатка (Cys) по меньшей мере в одно из положений последовательности, которые соответствуют положениям последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности человеческого NGAL дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых мутеин человеческого липокалина 2 согласно изобретению имеет последовательность, в которой, по сравнению с последовательностью с номером доступа в банке данных SWISS-PROT/UniProt P80188, цистеин был замещен другим аминокислотным остатком, соответствующий цистеин может быть повторно внесен в последовательность. В качестве иллюстративного примера цистеиновый остаток в аминокислотном положении 87 можно вносить в таком случае путем возвращения цистеина, исходно присутствующего в последовательности с номером доступа SWISS-PROT № P80188. Созданный тиоловый компонент в участке любом из аминокислотных положений 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 и/или 158 можно использовать для ПЭГилирования или ГЕКирирования мутеина, например, с целью повышения периода полужизни соответствующего мутеина человеческого липокалина 2 в сыворотке крови.

[143] В другом варианте реализации изобретения с целью обеспечения подходящих аминокислотных боковых цепей для конъюгации одного из вышеуказанных соединений с мутеином согласно настоящему изобретению можно вносить искусственные аминокислоты с помощью мутагенеза. В общем случае такие искусственные аминокислоты конструируют так, чтобы они были более реактивными и, следовательно, облегчали конъюгацию с желаемым компонентом. Одним примером такой искусственной аминокислоты, которую можно вносить с помощью искусственной тРНК, является параацетилфенилаланин.

[144] В некоторых вариантах реализации изобретения мутеин согласно изобретению может быть слит по N-концу или C-концу с белком, белковым доменом или пептидом, например, сигнальной последовательностью и/или аффинной меткой.

[145] Аффинные метки, такие как Strep-метка® или Strep-метка® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), мус-метка, FLAG-метка, Hisg-метка или HA-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, также обеспечивают возможность легкого выявления и/или очистки рекомбинантных белков и являются дополнительными примерами партнеров по слиянию. И наконец, белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ) или желтый флуоресцентный белок (ЖФБ), также являются подходящими партнерами для слияния с мутеинами согласно изобретению.

[146] В общем случае возможно метить мутеины согласно изобретению любым подходящим химическим веществом или ферментом, который прямым или непрямым образом генерирует выявляемое соединение или сигнал в химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Примером физической реакции и одновременно оптической реакции/оптического маркера является флуоресценция после облучения или рентгеновское излучение в случае применения радиоактивной метки. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и β -галактозидаза являются примерами ферментных меток (и в то же время оптических меток), которые катализируют образование продуктов хромогенной реакции. В общем случае все метки, обычно используемые для антител (за исключением тех, которые используются исключительно с сахарным компонентом или Fc-частью иммуноглобулинов), также можно использовать для конъюгации с мутеинами согласно изобретению. Мутеины согласно изобретению

также можно конъюгировать с любым подходящим терапевтически активным агентом, например, для направленной доставки таких агентов в заданную клетку, ткань или орган или для избирательного нацеливания на клетки, например, опухолевые клетки, не влияя на окружающие их нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных агентов включают радионуклиды, токсины, небольшие органические молекулы и терапевтические пептиды (такие как пептиды, действующие в качестве агонистов/антагонистов рецепторов клеточной поверхности, или пептиды, конкурирующие за участок связывания белка на заданной клеточной мишени). При этом мутеины согласно изобретению также можно конъюгировать с терапевтически активными молекулами нуклеиновых кислот, такими как антисмысловые молекулы нуклеиновых кислот, малые интерферирующие РНК, микроРНК или рибозимы. Такие конъюгаты можно получать способами, хорошо известными в данной области техники.

[147] Как указано выше, мутеин согласно изобретению может в некоторых вариантах реализации изобретения быть конъюгирован с компонентом, который продлевает период полужизни мутеина в сыворотке крови (по данной теме смотрите также публикацию согласно РСТ WO 2006/56464, в которой такие стратегии конъюгации описаны в отношении мутеинов человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов, обладающего аффинностью связывания в отношении CTLA-4). Компонентом, который продлевает период полужизни в сыворотке крови, может быть молекула полиалкиленгликоля, гидроксиэтиловый крохмал, молекулы жирных кислот, таких как пальмитиновая кислота (Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* 52, 1-9), Fc-часть иммуноглобулина, СН3-домен иммуноглобулина, СН4-домен иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок, трансферрин, если называть только некоторые. Альбуминсвязывающий белок может представлять собой бактериальный альбуминсвязывающий белок, антитело, фрагмент антитела, включая доменные антитела (см. патент США 6696245, например), или мутеин, проявляющий активность связывания в отношении альбумина. Соответственно, подходящие партнеры по конъюгации для продления времени полужизни мутеина согласно изобретению включают альбуминсвязывающий белок, например, бактериальный альбуминсвязывающий белок, такой как представитель стрептококковых протеинов G (Konig, T. & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Другими примерами альбуминсвязывающих пептидов, которые можно использовать в качестве партнеров по конъюгации, являются, например, пептиды, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys, где Хаа_i представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Хаа₂ представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Хаа₃ представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; а Хаа₄ представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в заявке на патент США 2003/0069395 (в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки) или в Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 35035-35043).

[148] В других вариантах реализации изобретения сам альбумин (Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548) или его биологический фрагмент можно использовать в качестве партнера по конъюгации мутеина согласно изобретению. Термин «альбумин» включает все альбумины млекопитающих, такие как человеческий сывороточный альбумин или бычий сывороточный альбумин, или крысиный альбумин. Альбумин или его фрагмент может быть получен рекомбинантным способом, как описано в патенте США № 5728553 или заявках на Европейский патент EP 0 330 451 и

EP 0 361 991 (в полном объеме включенных в данный документ посредством ссылки). Рекомбинантный человеческий альбумин (Рекомбумин®) от Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK) можно конъюгировать или сливать с мутеином согласно изобретению с целью продления времени полужизни мутеина.

5 [149] Если альбуминсвязывающий белок представляет собой фрагмент антитела, он может представлять собой доменное антитело. Доменные антитела (dAb) конструируют так, чтобы обеспечить точный контроль биофизических свойств и *in vivo* времени полужизни для создания профиля продукта с оптимальной безопасностью и эффективностью. Доменные антитела доступны, например, от Domantis Ltd. (Cambridge,
10 UK и MA, USA).

[150] При использовании трансферрина для продления времени полужизни мутеинов согласно изобретению мутеины могут, в общем случае, быть слиты с N- или C-концом или обеими концами негликозилированного трансферрина. Время полужизни негликозилированного трансферрина составляет 14-17 дней, и слитый белок
15 трансферрина также будет иметь аналогично продленное время полужизни. Трансферриновый носитель также обеспечивает повышение биодоступности, биораспределения и циркуляционной стабильности. Эта технология доступна на коммерческой основе от BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, USA).

Рекомбинантный человеческий трансферрин (DeltaFerrinTM) для применения в качестве
20 партнера для стабилизации/продления времени полужизни также доступен на коммерческой основе от Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, UK).

[151] Если в целях продления времени полужизни мутеина согласно изобретению используют Fc-часть иммуноглобулина, можно применять технологию SynFusionTM,
25 доступную на коммерческой основе от Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, USA). Применение этой технологии Fc-слияния позволяет создавать биофармацевтические препараты более продолжительного действия и может, например, включать использование двух копий мутеина, связанных с Fc-областью антитела, для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности.

30 [152] Другой альтернативой продления времени полужизни мутеинов согласно изобретению является слияние с N- или C-концом мутеинов длинных, неструктурированных, гибких, богатых глицином последовательностей (например, полиглицина, содержащего от около 20 до 80 последовательных остатков глицина). Этот подход раскрыт, например, в W02007/038619 и также называется «rPEG»
35 (рекомбинатный PEG).

[153] Если в качестве партнера по конъюгации используется полиалкиленгликоль, полиалкиленгликоль может быть замещенным, незамещенным, линейным или разветвленным. Также он может представлять собой активированное производное полиалкилена. Примерами подходящих соединений являются молекулы
40 полиэтиленгликоля (ПЭГ), описанные в WO 99/64016, в патенте США 6177074 или в патенте США 6403564 в отношении интерферона, или описанные для других белков, таких как ПЭГ-модифицированная аспарагиназа, ПЭГ-аденозиндеаминаза (ПЭГ-АДА) или ПЭГ-скпероксиддисмутаза (смотрите, например, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148). Молекулярная масса такого полимера, например, полиэтиленгликоля, может находиться
45 в диапазоне от около 300 до около 70000 дальтон, включая, например, полиэтиленгликоль с молекулярной массой около 10000, около 20000, около 30000 или около 40000 дальтон. Кроме того, например, как описано в патентах США 6500930 или 6620413, в целях продления периода полужизни в сыворотке крови к мутеину

согласно изобретению можно конъюгировать углеводные олиго- и полимеры, такие как крахмал или гидроксипропиловый крахмал (ГЭК).

[154] Кроме того, раскрытый в данном документе мутеин можно сливать с компонентом, который может придавать мутеинам согласно изобретению новые характеристики, такие как ферментативная активность или аффинность связывания в отношении других молекул. Примерами подходящих партнеров по слиянию являются щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион-S-трансфераза, альбуминсвязывающий домен протеина G, протеина A, фрагменты антител, олигомеризационные домены или токсины.

[155] В частности, возможно слить раскрытый в данном документе мутеин с отдельным активным участком фермента так, чтобы оба «компонента» полученного в результате слитого белка вместе действовали на заданную терапевтическую мишень. Связывающий домен мутеина присоединяется к вызывающей заболевание мишени, позволяя ферментному домену аннулировать биологическую функцию мишени.

[156] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины согласно изобретению. Так как вырожденность генетического кода позволяет проводить замещения определенных кодонов другими кодонами, отвечающими за такую же аминокислоту, изобретение не ограничено конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей описанный в данном документе мутеин, но включает все молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин. В связи с этим, в настоящем изобретении предложены нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 21-34, кодирующие некоторые мутеины согласно изобретению.

[157] В одном варианте реализации изобретения способ включает подвержение молекулы нуклеиновой кислоты мутагенезу в нуклеотидных триплеттах, кодирующих по меньшей мере одно или даже более положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности человеческого NGAL (SEQ ID NO: 16).

[158] Изобретение также включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутеины согласно изобретению, которые содержат дополнительные мутации за пределами указанных положений последовательности экспериментального мутагенеза. Такие мутации часто хорошо переносятся и даже могут обеспечивать преимущество, например, если они улучшают эффективность сворачивания, сывороточную стабильность, температурную стабильность или лигандсвязывающую аффинность мутеинов.

[159] Раскрытая в данной заявке молекула нуклеиновой кислоты может быть «функционально связана» с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями), обеспечивающей экспрессию этой молекулы нуклеиновой кислоты.

[160] Говорят, что молекула нуклеиновой кислоты, такая как ДНК, «способна экспрессировать молекулу нуклеиновой кислоты» или способна «обеспечивать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты», если она содержит элементы, содержащие информацию относительно транскрипционной и/или трансляционной регуляции, и такие последовательности «функционально связаны» с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, в которой элементы регуляторной последовательности и предназначенная для экспрессии

последовательность связаны способом, обеспечивающим генную экспрессию. Точная природа регуляторных областей, необходимых для генной экспрессии, может варьироваться для разных видов, но в общем случае эти области включают промотор, который у прокариотов содержит как промотор *per se*, т.е. элементы ДНК, управляющие инициацией транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрибировании в РНК будут сигнализировать об инициации трансляции. Такие области промотора обычно содержат 5' некодирующие последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, такие как -35/-10 боксы и элемент Шайна-Дальгарно у прокариотов или ТАТА-бокс, последовательности СААТ и 5'-кэпирующие элементы у эукариотов. Эти области также могут содержать энхансерные или репрессорные элементы, а также транслируемые сигнальные и лидерные последовательности для нацеливания нативного полипептида на специфический компартмент в клетке-хозяине.

[161] Кроме того, 3' некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, вовлеченные в терминацию транскрипции, полиаденилирование и т.д. Однако, если эти терминаторные последовательности недостаточно функциональны в конкретной клетке-хозяине, они могут быть замещены сигналами, функциональными в этой клетке.

[162] Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может содержать регуляторную последовательность, такую как промоторная последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению содержит промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор *tet*, промотор *lacUV5* или промотор T7. Примерами промоторов, применяемых в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор ЦМВ.

[163] Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению также могут быть частью вектора или любого другого средства клонирования, такого как плазида, фагида, фаг, бакуловирус, космоида или искусственная хромосома.

[164] В одном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты включена в фазмиду. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область умеренного фага, такого как M13 или f1, или ее функциональную область, слитую с представляющей интерес кДНК. После суперинфекции бактериальных клеток-хозяев таким фазмидным вектором и соответствующим хелперным фагом (например, M13K07, VCS-M13 или R408) вырабатываются интактные фаговые частицы, обеспечивая физическое сопряжение кодируемой гетерологической кДНК с соответствующим полипептидом, представленным на поверхности фага (смотрите, например, Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424, или Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93).

[165] Такие средства клонирования могут включать, помимо описанных выше регуляторных последовательностей и нуклеотидной последовательности, кодирующей описанный в данном документе мутин, репликационные и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином, применяемой для экспрессии, а также селективные маркеры, придающие трансформированным или трансфицированным клеткам выбранный фенотип. В данной области техники известно и доступно на коммерческой основе большое количество подходящих клонирующих векторов.

[166] Молекула ДНК, кодирующая описанный в данном документе мутин, и, в частности, клонирующий вектор, содержащий кодирующую последовательность такого

мутеина, можно трансформировать в клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформацию можно осуществлять, используя стандартные методы. Таким образом, изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей раскрытую в данном документе молекулу нуклеиновой кислоты.

5 [167] Трансформированные клетки-хозяев культивируют в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок согласно изобретению. Подходящие клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотическими, такими как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, SF9 или High5 клетки насекомых,
10 иммортализованные линии клеток млекопитающих (например, клеток HeLa или клеток CHO) или первичные клетки млекопитающих.

[168] Изобретение также относится к способу получения описанного в данном документе мутеина, причем мутеин или полипептид, фрагмент мутеина или слитый белок мутеина получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин или
15 полипептид, с помощью методов генетической инженерии. Способ можно осуществлять *in vivo*, например, мутеин или полипептид можно получать в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине, а затем выделять из организма-хозяина или культуры. Также возможно получать белок *in vitro*, например, используя *in vitro* систему трансляции.

20 [169] При получении мутеина *in vivo* нуклеиновую кислоту, кодирующую такой мутеин или полипептид, вносят в подходящий бактериальный или эукариотический организм-хозяин посредством технологии рекомбинантных ДНК (как уже было отмечено выше). С этой целью клетку-хозяина сначала трансформируют клонирующим вектором, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный
25 в данном документе мутеин, используя общепринятые стандартные методы. Затем клетку-хозяина культивируют в условиях, которые обеспечивают экспрессию гетерологичной ДНК и, следовательно, синтез соответствующего полипептида. Впоследствии полипептид выделяют из клетки-хозяина или культуральной среды.

[170] В некоторых вариантах реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты,
30 такая как ДНК, раскрытая в данной заявке, может быть «функционально связана» с другой молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению для обеспечения экспрессии слитого белка согласно изобретению. В связи с этим функциональная связь представляет собой такую связь, в которой элементы последовательности первой молекулы нуклеиновой кислоты и элементы последовательности второй молекулы
35 нуклеиновой кислоты связаны таким образом, который обеспечивает экспрессию слитого белка в виде одного полипептида.

[171] Кроме того, в некоторых вариантах реализации в мутеинах hNGAL согласно изобретению можно удалять природную дисульфидную связь между Cys 76 и Cys 175. Соответственно, такие мутеины можно получать в клеточном компартменте,
40 содержащем восстановительную среду, например, в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

[172] В случае, когда мутеин согласно изобретению содержит внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительно направлять образующийся полипептид в клеточный компартмент, содержащий окислительную среду, используя
45 соответствующую сигнальную последовательность. Такая окислительная среда может находиться в периплазме грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или в полости эндоплазматического ретикула эукариотических клеток и обычно способствует образованию структурных

дисульфидных связей.

[173] Однако также возможно получать мутеин согласно изобретению в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В этом случае мутеин или полипептид можно получать как прямым образом в растворимом и свернутом состоянии, так и

5 восстанавливать в форме телец включения с последующей ренатурацией *in vitro*. Дополнительной опцией является применение специфических штаммов хозяев, содержащих окислительную внутриклеточную среду, что может, таким образом, обеспечивать образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8).

10 [174] При этом описанный в данном документе мутеин или полипептид не обязательно должен быть создан или получен только с помощью генной инженерии. Наоборот, такой мутеин или полипептид также может быть получен с помощью химического синтеза, такого как твердофазный полипептидный синтез по Меррифилду, или с помощью *in vitro* транскрипции и трансляции. Например, возможна ситуация, когда

15 перспективные мутации определяют с помощью молекулярного моделирования, а затем синтезируют желаемый (сконструированный) полипептид *in vitro* и исследуют активность связывания в отношении Ang-2. Способы твердофазного и/или жидкофазного синтеза белков хорошо известны в данной области техники (смотрите, например, Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43).

20 [175] В другом варианте реализации изобретения мутеин или полипептид согласно изобретению можно получать путем *in vitro* транскрипции/трансляции, применяя общепринятые методы, известные специалистам в данной области техники.

[176] Для специалиста очевидны методы, которые можно применять для получения мутеинов или их полипептидов, предусмотренных настоящим изобретением, но чьи

25 белковые или нуклеотидные последовательности явным образом не раскрыты в данном документе. В качестве обзора, такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез единичных аминокислотных положений с целью упрощения субклонирования мутированного гена hNGAL или его частей путем внесения участков расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме

30 того, эти мутации также можно включать для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении его мишени (например, Ang-2 или Ang-1 соответственно). Помимо этого, мутации можно вводить с целью модуляции определенных характеристик мутеина, таких как улучшение стабильности сворачивания, сывороточной стабильности, устойчивости белка или растворимости в воде, или для снижения тенденции к агрегации

35 в случае необходимости. Например, цистеиновые остатки природного происхождения можно мутировать на другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидных мостиков.

[177] Раскрытые в данном документе мутеины или их полипептиды, а также их производные можно применять во многих областях, аналогично антителам или их

40 фрагментам. Например, мутеины можно применять для мечения ферментом, антителом, радиоактивным веществом или любой другой группой, имеющей биохимическую активность или определенные характеристики связывания. Таким образом, возможно выявление или приведение в контакт их соответствующих мишеней или конъюгатов, или слитых белков. Кроме того, мутеины или их полипептиды согласно изобретению

45 могут служить для выявления химических структур с помощью принятых аналитических методов (например, ELISA или вестерн-блоттинга) или с помощью микроскопии или иммуносенсорика. В связи с этим, выявляемый сигнал может генерироваться прямым образом, посредством применения подходящего конъюгата или слитого белка мутеина,

или непрямым образом, посредством иммунохимического выявления связанного мутеина с помощью антитела.

[178] Дополнительные объекты, преимущества и признаки этого изобретения станут очевидны для специалистов в данной области техники после изучения нижеприведенных

Примеров и присоединенных графических материалов, которые не являются ограничивающими. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение специально раскрыто с помощью типовых вариантов реализации и необязательных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и вариации изобретения, раскрытого в данном документе, и что такие модификации и вариации считаются входящими в объем данного изобретения.

V. ПРИМЕРЫ

[179] Пример 1: Отбор мутеинов, специфически связывающихся с Ang-2

[180] Для отбора мутеинов, специфически связывающихся с Ang-2, использовали библиотеки, полученные путем случайного мутагенеза зрелого hNGAL.

[181] 2×10^{12} фагмид из этих библиотек инкубировали с 200 нМ биотинилированного человеческого Ang-2 (R & D System). Парамагнитные гранулы, покрытые нейтравидином или стрептавидином использовали для захвата комплексов мишень/фагмида, которые впоследствии выделяли с помощью магнита. Несвязанные фагмиды удаляли, промывая гранулы ФСБТ или ФСБ. Связанные фагмиды сначала элюировали с помощью 300 мкл 70 мМ триэтиламина с последующей незамедлительной нейтрализацией супернатанта с помощью 100 мкл 1 М Трис-Cl, pH 6,0. После одного промежуточного промывочного цикла оставшиеся фагмиды элюировали с помощью 100 мМ глицина, pH 2,2, в течение 10 мин с последующей незамедлительной нейтрализацией с помощью 50 мкл 0,5 М Трис-основания. Обе элюированные фракции объединяли и использовали для инфицирования 4 мл культуры E. coli XL1-blue для повторной амплификации.

[182] Проводили четыре последовательных этапа отбора. Фагмидную ДНК получали из клеток E. coli, инфицированных продуктом четвертого этапа селекции, а кассету мутеина hNGAL выделяли путем расщепления. Кассету мутеина hNGAL вставляли в аналогично вырезанный вектор, который обеспечивает бактериальную выработку мутеинов hNGAL под управлением тетрациклинового промотора. CaCl₂-компетентные клетки TG1-F' трансформировали лигационной смесью и высевали на планшеты LB/Amp.

[183] Для оптимизации Ang-2-специфических мутеинов создавали дополнительные библиотеки на основании последовательностей мутеина SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3. Библиотеки создавали, используя методы на основании содержащей ошибку рандомизации выбранных положений или полимеразной цепной реакции (ПЦР) с внесением ошибок. Отбор оптимизированных мутеинов проводили, как описано выше, но в условиях повышенной жесткости.

[184] Пример 2: Определение мутеинов, специфически связывающихся с Ang-2 с помощью высокопроизводительного скрининга ELISA

[185] Для инокуляции среды 2xYT/Amp использовали индивидуальные колонии и выращивали в течение ночи (14-18 ч) до стационарной фазы. После этого из культур стационарной фазы инокулировали 50 мкл 2xYT/Amp и инкубировали в течение 3 ч при 37°C, а затем температуру снижали до 22°C до достижения ОП₅₉₅ 0,6-0,8. Получение мутеинов индуцировали добавлением 10 мкл 2xYT/Amp, дополненной 1,2 мкг/мл ангидротетрациклина. Культуры инкубировали при 22°C до следующего дня. После добавления 40 мкл 5% (масс./об.) БСА в ФСБ/Т и инкубации в течение 1 ч при 25°C культуры были готовы для применения в скрининговом анализе.

[186] Специфическое связывание выделенных мутеинов с человеческим Ang-2 исследовали, покрывая микротитровальные планшеты 1:1 смесью нейтравидина и стрептавидина (5 мкг/мл в ФСБ) в течение ночи при 4°C. После блокирования планшета в течение 1 ч с помощью 2% БСА в ФСБТ проводили захват используемой для отбора биотинилированной мишени на покрытых микротитровальных планшетах в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ/Т. Планшеты, покрытые таким же образом, но без биотинилированной мишени, использовали в качестве отрицательной контрольной мишени при проведении скрининга. После этого добавляли 20 мкл заблокированных БСА культур в покрытый микротитровальный планшет, содержащий захваченную мишень или альдостерон, и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Связанные мутеины выявляли через 1 ч инкубации с антителом против стрептавидиновой метки, конъюгированным с пероксидазой хрена (IBA, Boettingen). Для проведения количественной оценки добавляли 20 мкл флуорогенного пероксидазного субстрата QuantaBlu и определяли флуоресценцию при длине волны возбуждения 320 нм и длине волны испускания 430 нм. Затем проводили секвенирование мутеинов, специфически связывающихся с Ang-2.

[187] Чтобы отобрать мутеины с повышенной аффинностью и стабильностью, проводили скрининг i) со сниженной концентрацией антигена и/или ii) с конкуренцией с Tie-2 Fc (Reliatech), и/или iii) инкубацией скринингового супернатанта при 65°C или 70°C перед добавлением в целевой планшет, и/или iv) с применением обратного формата скрининга, в котором мутеины захватывали с помощью стрептавидиновой метки на микротитровальных планшетах, покрытых антителом против стрептавидиновой метки (Qiagen), а разные концентрации мишени добавляли и выявляли с помощью HRP-меченого антитела против His-метки (Abeam).

[188] Пример 3: Экспрессия мутеинов

[189] Уникальные мутеины экспрессировали с С-концевой последовательностью (SEQ ID NO: 15), включая Strep-метку® II, в среде 2YT-Amp, чтобы провести очистку мутеинов после экспрессии методом Strep-Tactin аффинной хроматографии и препаративной эксклюзионной хроматографии.

[190] Пример 4: Аффинность мутеинов к Ang-2, определяемая в ELISA-анализе

[191] Связывание мутеинов исследовали методом сэндвич-анализа ELISA. В частности, 384-луночный планшет, подходящий для измерения флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черное плоское дно, высокая степень связывания) покрывали 20 мкл Ang-2 в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4°C. После промывки покрытые Ang-2 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 0,1% Твин 20 и 2% БСА (ФСБ-Т/БСА) в течение 1 ч при комнатной температуре.

[192] 20 мкл серийно разведенных мутеинов инкубировали в ФСБ-Т/БСА в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ).

[193] Оставшиеся супернатанты утилизировали и добавляли 20 мкл HRP-меченого антитела против стрептавидиновой метки в преопределенной оптимальной концентрации в ФСБ-Т/БСА и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки в каждую лунку добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Thermo) и оставляли реакцию на период от 15 до 60 минут. Интенсивность флуоресценции каждой лунки на планшете считывали, используя флуоресцентное считывающее устройство для микропланшетов (Tecan или Molecular Devices). Аппроксимацию кривых проводили, используя программное обеспечение GraphPad Prism 4. Полученные в результате значения EC50 обобщены в Таблице 1, ниже.

[194] Таблица 1:

SEQ ID мутеина	EC50 mean [nM]
SEQ ID NO: 1	3,7
SEQ ID NO: 2	3
SEQ ID NO: 3	2,8
SEQ ID NO: 5	3,5
SEQ ID NO: 7	2,1
SEQ ID NO: 8	2,4
SEQ ID NO: 9	2,1
SEQ ID NO: 11	2,3

[195] Пример 5: Конкурентный режим действия мутеина липокалина, связывающегося с Ang-2

[196] Связываются ли отобранные мутеины с человеческим Ang-2 в конкурентном режиме, исследовали *in vitro*, используя конкурентный формат ELISA-анализа (смотрите типовые мутеины липокалина на Фиг. 1). В этом эксперименте неизменную концентрацию человеческого Ang-2 инкубировали с разными концентрациями мутеинов липокалина в течение 1 ч. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси мутеина липокалина/Ang-2 переносили в планшет ELISA, покрытый рецептором человеческой Tie-2, чтобы определить концентрацию hAng-2, который не был заблокирован для связывания с hTie-2.

[197] Все этапы инкубации проводили со смешиванием при 300 об/мин, а планшет промывали после каждого этапа инкубации с помощью 80 мкл буфера ФСБ-Т (ФСБ, 0,05 % Твин 20) пять раз, используя селективный промывочный буфер Biotek EL405 CW (Biotek). На первом этапе 384-луночный буфер прямым образом покрывали 20 мкл растворимого человеческого hTie-2 Fc (Reliatech) в концентрации 2 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4 °C. После промывки лунки, покрытые hTie-2 Fc, блокировали с помощью 60 мкл ФСБ-Т/БСА (2% БСА в ФСБ, содержащем 0,1% Твин 20) в течение 1 ч при комнатной температуре.

[198] Фиксированную концентрацию 0,5 нМ человеческого Ang-2 инкубировали в растворе с разными концентрациями SEQ ID NO: 1-14 или с SEQ ID NO: 16 в качестве отрицательного контроля, и с эталонными антителами 1 и 2 (SEQ ID NO: 17/18 и 19/20 соответственно) в качестве положительных контролей, используя стабильную стартовую концентрацию, которая была серийно разведена в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в буфере ФСБ-Т/БСА. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили в покрытый hTie-2 Fc планшет для захвата несвязанного (свободного) или неконкурентно связанного hAng-2 в течение 20 мин при КТ. Чтобы обеспечить пересчет результатов ELISA в абсолютную концентрацию свободного Ang-2 (ср. ниже), получали стандартную кривую, включающую разные концентрации hAng-2 в ФСБ-Т/БСА, и инкубировали в течение 20 мин в том же планшете.

[199] Чтобы сделать возможным выявление и количественную оценку связанного hAng-2, удаляли оставшиеся супернатанты и добавляли 20 мкл HRP-меченого антитела

против HIS-метки в концентрации в ФСБ-Т/БСА и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки в каждую лунку добавляли 20 мкл quanta blue, а интенсивность флуоресценции каждой лунки считывали, используя флуоресцентное считывающее устройство для микропланшетов (Tescan или Molecular Devices).

[200] Оценку проводили следующим образом: рассчитывали концентрацию свободного hAng-2 $k(\text{Ang-2})_{\text{своб.}}$ (по параллельно определяемой стандартной кривой) и наносили на график в сравнении с концентрацией SEQ ID NO: 1-14, 16 и эталонных антител 1 и 2 (SEQ ID NO: 17/18 и 19/20 соответственно), $k(\text{SEQ ID NO: 1-14, 16, 17/18 и 19/20})$. Чтобы получить концентрацию SEQ ID NO: 1-14, 16, 17/18 и 19/20, при которой образование комплекса hAng-2/hTie-2 Fc блокируется на 50% (IC50), кривые аппроксимировали нелинейной регрессионной моделью со связыванием в одном участке в соответствии с $k(\text{Ang-2})_{\text{своб.}} = c(\text{Ang-2})_{\text{общ.}} / (1 + k(\text{SEQ ID NO: 1-14, 16, 17/18 и 19/20}) / 1050))$, с общей следовой концентрацией $k(\text{Ang-2})_{\text{общ.}}$ и значением IC50 в качестве свободных параметров (как показано на Фиг. 1). Аппроксимацию кривых проводили, используя программное обеспечение GraphPad Prism 4. Полученные в результате значения IC50 обобщены в Таблице 2, ниже.

[201] Таблица 2:

SEQ ID мутеина	IC50, среднее значение [нМ]
SEQ ID NO: 1	0,5581
SEQ ID NO: 2	1,711
SEQ ID NO: 3	0,3194
SEQ ID NO: 4	0,4123
SEQ ID NO: 5	0,8613
SEQ ID NO: 6	0,06273
SEQ ID NO: 7	0,06193
SEQ ID NO: 8	0,07083
SEQ ID NO: 9	0,09287
SEQ ID NO: 10	0,07940
SEQ ID NO: 11	0,09877
SEQ ID NO: 12	0,1312
SEQ ID NO: 13	0,1842
SEQ ID NO: 14	0,1054
SEQ ID NO: 19/20	0,03067
SEQ ID NO: 17/18	0,01580

[202] Пример 6: Аффинность мутеинов, связывающихся с Ang-2, определенная с

помощью Biacore

[203] В анализе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) использовали прибор Biacore T200 (GE Healthcare) для измерения аффинности связывания мутеинов с hAng-2. Проводили биотинилирование мутеинов, отобранных для связывания с Ang-2, и отрицательного контроля (SEQ ID NO: 16) в течение 2 ч при комнатной температуре, применяя соответствующий избыток EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo).

Биотинилированные образцы очищали от непрореагировавшего биотина, используя Zeba Spin Desalting Plate (Thermo) в соответствии с инструкциями производителя.

[204] В ППР-анализе аффинности проводили захват биотинилированных мутеинов и отрицательного контроля на сенсорном чипе CAP, используя набор Biotin CAPture (GE Healthcare): сенсорный чип CAP предварительно иммобилизуют олиго оцДНК.

Неразведенный реагент Biotin CAPture (стрептавидин, конъюгированный с комплементарным олиго оцДНК) применяли при скорости потока 2 мкл/мин в течение 300 с. После этого применяли 0,02 мкг/мл биотинилированных мутеинов или отрицательного контроля в течение 300 с при скорости потока 5 мкл/мин. Так как аналит Ang-2 является мультимерной молекулой, цель состояла в создании поверхности с минимальной плотностью лигандов для снижения бивалентных взаимодействий на поверхности чипа до минимума. Стандартный канал загружали только реагентом Biotin CAPture.

[205] Чтобы определить аффинность связывания, готовили четыре разведения человеческого Ang-2 с концентрациями в диапазоне 1-27 нМ в буфере HBS-EP+ (GE Healthcare) и применяли к приготовленной поверхности чипа. При применении при скорости потока 30 мкл/мин использовали многоцикловый кинетический подход со временем контакта образца 180 с и временем диссоциации 4600 с. Все измерения проводили при 25°C. Восстановление поверхности сенсорного чипа CAP осуществляли с помощью инъекции 6 М Gua-HCl с 0,25 М NaOH с последующей дополнительной промывкой экспериментальным буфером и периодом стабилизации 120 с. Оценку данных проводили с помощью программного обеспечения Biacore T200 (V 1.0).

Использовали двойное сравнение со стандартом. Для аппроксимации исходных данных использовали 1:1 модель связывания, даже если было известно, что аналит является мультимером.

[206] Полученные в результате кинетические константы для выборки мутеинов липокалина обобщены ниже в Таблице 3. Такие типовые мутеины липокалина (SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 11) связывают человеческий Ang-2 с аффинностью в диапазоне 0,2-1,4 нМ, тогда как для отрицательного контроля связывание не определяется (SEQ ID NO: 16). Следует отметить, что аппроксимированные величины были получены на основании предположения, что применение очень низкой плотности лигандов со значениями R_{макс} ниже десяти снижает мультивалентные взаимодействия до пренебрежимо малого уровня.

[207] Таблица 3:

SEQID мутеина	k_{acc} [$M^{-1} \cdot c^{-1}$]	$k_{дисс}$ [c^{-1}]	КД [нМ]	Rмакс [EO]
SEQ ID NO: 9	3,2E+05	9,4E-05	0,29	5,4
SEQ ID NO: 7	1,8E+05	2,6E-04	1,43	8,1
SEQ ID NO: 8	3,5E+05	1,3E-04	0,37	6,5
SEQID NO: 11	4,0E+06	8,7E-04	0,21	2,6

[208] Пример 7: Специфичность и межвидовая перекрестная реактивность мутеина липокалина в отношении Ang-1 и Ang-2

[209] Специфичность и межвидовую перекрестную реактивность мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11) и эталонного антитела (SEQ ID NO: 17/18) исследовали методом «конкурентного ELISA-анализа в растворе» (смотрите типовые мутеины липокалина, Фиг. 2), принцип которого в следующем: постоянную концентрацию SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и эталонного антитела (SEQ ID NO: 17/18) инкубировали с разными концентрациями лигандов (человеческий Ang-2, человеческий Ang-1, человеческий Ang-4, мышинный Ang2 и мышинный Ang 3, а также hVEGF-A в качестве отрицательного контроля (R&D system)) в течение 1 ч. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси мутеин/лиганд переносили в планшет ELISA с иммобилизованным hAng-2 для определения концентрации оставшихся свободных мутеинов липокалина SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и свободного эталонного антитела. Концентрацию свободных (несвязанных) SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и свободного эталонного антитела определяли с помощью установки для количественного ELISA-анализа. Следует обратить внимание на то, что этот анализ был основан на том, что все лиганды были нацелены на тот же самый участок связывания в SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18, т.е. что лиганды, связанные с SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18, конкурируют друг с другом.

[210] В следующем подробном экспериментальном протоколе этапы инкубации и промывки проводили, как описано выше, согласно протоколу конкурентного ELISA-анализа (смотрите Пример 5). 384-луночный планшет, подходящий для измерения флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черное плоское дно, высокая степень связывания) покрывали 20 мкл человеческого ангиопоэтина 2 в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4 °C. После промывки покрытые Ang-2 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера (ФСБ-Т/БСА) в течение 1 ч при комнатной температуре.

[211] Фиксированную концентрацию 0,1 нМ SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18 инкубировали в растворе с разными концентрациями лигандов (hAng-2, mAng-2, hAng-1, mAng-3 и hAng-4, и VEGF-A), используя подходящую стартовую концентрацию, которую серийно разводили в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в ФСБ-Т/БСА. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили в 384-планшет с иммобилизованным hAng-2 для захвата несвязанных компонентов (свободных SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18) в течение 20 мин при КТ. Чтобы обеспечить пересчет результатов ELISA в абсолютную концентрацию свободных SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18 (ср. ниже), получали стандартную кривую, включающую разные концентрации SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 11 и 17/18 в ФСБ-Т/БСА, и инкубировали

в течение 20 мин в том же планшете ELISA.

[212] Удаляли остаточные супернатанты и добавляли 20 мкл HRP-меченого антитела к мутеину липокалина в predetermined оптимальной концентрации в ФСБ-Т/БСА и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Антитело против мутеина липокалина получали путем иммунизации кроликов смесью мутеинов липокалина и после этого связывали с HRP, используя набор (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя, для получения конъюгата антитело-HRP. После промывки в каждую лунку добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (Quantabluе, Pierce) и оставляли реакцию на 60 минут. Интенсивность флуоресценции каждой лунки на планшете считывали, используя считывающее устройство для микропланшетов Genios Plus (Tecan). Чтобы провести оценку данных рассчитывали концентрацию свободных мутеинов $k(\text{мутеин})_{\text{своб.}}$ на основании результатов стандартной кривой и наносили на график против концентрации лигандов, $k(\text{лиганд})$. Чтобы получить концентрацию лигандов, при которой образование комплекса hAng-2/мутеин блокируется на 50% (IC50), кривые аппроксимировали нелинейной регрессионной моделью со связыванием в одном участке в соответствии с $k(\text{мутеин})_{\text{своб.}} = k(\text{мутеин})_{\text{общ.}} / (1 + k(\text{лиганд}) / \text{IC50})$, с общей следовой концентрацией $k(\text{мутеин})_{\text{своб.}}$ и значениями IC50 в качестве свободных параметров. Аппроксимацию кривой проводили, используя программное обеспечение GraphPad Prism 4. Указанная аппроксимация кривой дала результаты, которые обобщены в нижеследующей Таблице 4.

[213] Таблица 4:

	ELISA для связывания в растворе					
	IC50: нМ					
	hAng-1	hAng-2	mAng-2	hAng-4	mAng-3	hVEGF-A
SEQ ID NO: 17/18	26	0,6	0,07	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 3	Н/Д	1,4	1,8	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 1	>100	2,5	0,65	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 11	0,89	0,49	0,05	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 8	9,3	0,5	0,08	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 7	0,47	0,41	0,05	Н/Д	Н/Д	Н/Д
SEQ ID NO: 9	1,9	0,76	0,11	Н/Д	Н/Д	Н/Д

[214] Как проиллюстрировано на Фиг. 2, данные демонстрируют, что SEQ ID NO: 8 проявляла высокую аффинность в отношении человеческого и мышиногo Ang-2, а SEQ ID NO: 7 проявляла высокую аффинность не только в отношении человеческого и мышиногo Ang-2, но также в отношении человеческого Ang-1.

[215] Пример 8: Мутеины липокалина, блокирующие связывание человеческого и мышиногo Ang-2 с экспрессирующими hTie-2 клетками

[216] Связываются ли мутеины липокалина с человеческим Ang-2 и мышинным Ang-2 конкурентным образом, исследовали на сверхэкспрессирующих hTie-2 клетках НЕК,

используя формат анализа конкурентной клеточной электрохемолуминесценции (ЭХЛ) (смотрите Фиг. 3 и 4). В этом эксперименте постоянную концентрацию человеческого Ang-2 и мышиноного Ang-2 инкубировали с разными концентрациями мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 1, 3, 6-14) и эталонным антителом (SEQ ID NO: 19/20) в течение 1 ч. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси мутеина липокалина/Ang-2 переносили в планшет MSD, покрытый сверхэкспрессирующими hTie-2 клетками НЕК, для определения концентрации hAng-2 или mAng-2, связывание которых с hTie-2 не было заблокировано.

[217] Все этапы инкубации проводили при комнатной температуре и два раза промывали планшеты после каждого этапа инкубации 80 мкл буфера ФСБ, используя промывочный буфер Biotek EL405 select CW (Biotek). На первом этапе 384-луночный планшет предварительно покрывали в течение 5 минут поли-D-лизином и дважды промывали ФСБ. Высекали 10^4 клеток НЕК:hTie-2 на лунку и оставляли для прикрепления к поверхности лунок на ночь при 37°C. После промывки покрытые клетками лунки блокировали 60 мкл ФСБ/казеина (2% казеин в ФСБ) в течение 1 ч при комнатной температуре.

[218] Фиксированную концентрацию человеческого Ang-2 или мышиноного Ang-2 инкубировали в растворе с разными концентрациями SEQ ID NO: 1, 3, 6-14 и эталонным антителом (SEQ ID NO: 19/20), используя подходящую стартовую концентрацию SEQ ID NO: 1,3, 6-14 и эталонного антитела, которые серийно разводили в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в буфере ФСБ/казеин. Через 1 ч инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили в покрытый НЕК:hTie2 планшет для захвата не связанного конкурентно hAng-2 в течение 1 ч при КТ. Получали стандартную кривую, включающую разные концентрации hAng-2 или мышиноного Ang-2 в ФСБ/казеине, и инкубировали в течение 1 ч в том же планшете.

[219] Чтобы обеспечить выявление и количественную оценку связанного hAng-2 и мышиноного Ang-2, удаляли оставшиеся супернатанты и добавляли 20 мкл смеси антитела против HIS-метки (Abeam) и меченого сульфo-меткой антикозьего антитела (Mesoscale Discovery) в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ/казеине и инкубировали в течение 1 ч при КТ. После промывки в каждую лунку добавляли 35 мкл не содержащего сурфактанта считывающего буфера, а сигнал ЭХЛ каждой лунки считывали с помощью считывающего устройства Mesoscale Discovery.

[220] Оценку и аппроксимацию кривой проводили, используя программное обеспечение GraphPad Prism 4, а полученные результаты обобщены в Таблице 5, ниже.

[221] Таблица 5:

	hAng2	mAng-2
SEQ ID мутеина	IC50 [нМ]	IC50 [нМ]
SEQ ID NO: 3	10,73	23,17
SEQ ID NO: 1	18,91	3,982
SEQ ID NO: 6	3,464	1,206
SEQ ID NO: 7	3,596	1,228
SEQ ID NO: 8	3,746	1,245
SEQ ID NO: 9	3,817	1,39
SEQ ID NO: 10	4,626	1,046
SEQ ID NO: 11	4,793	1,448
SEQ ID NO: 12	5,287	3,118
SEQ ID NO: 13	5,431	7,343
SEQ ID NO: 14	6,41	2,32
SEQ ID NO: 19/20	1,999	0,8826

[222] Пример 9: Опосредованная мутеином липокалина блокировка Ang-2 в клеточном анализе пролиферации

[223] Способность мутеинов липокалина SEQ ID NO: 1, 3, 7-9 и 11 нейтрализовать биологическую активность hAng-2 оценивали, применяя краткосрочный биоанализ пролиферации, используя эндотелиальные клетки лимфатических микрососудов (LEC). Проллиферация LEC может ингибироваться агентами, имеющими hAng-2-нейтрализующее действие. В этом анализе SEQ ID NO: 1, 3, 7-9 и 11 добавляли в обедненную сыворотку клеток LEC в культуре. Через три дня в культуре оценивали степень пролиферации, путем количественной оценки числа жизнеспособных клеток. Это осуществляли с помощью анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent (Promega) чтобы определить уровни АТФ, которые коррелируют с числом метаболически активных клеток. Способность SEQ ID NO: 1, 3, 7-9 и 11 нейтрализовать hAng-2 оценивали по их значению IC50, т.е. концентрации мутеинов липокалина, которая приводит к полумаксимальному ингибированию опосредованной hAng-2 пролиферации.

[224] Подробная процедура проведения анализа описывается следующим образом. LEC поддерживали в ЕВМ, 5% фетальной телячьей сыворотки и дополняющем наборе MV2.

Анализ проводили в 96-луночных белых планшетах с прозрачным дном (Greiner) в объеме 25 мкл на лунку.

[225] Клетки LEC культивировали в пробирках для клеточного культивирования в стандартных условиях в соответствии с инструкциями производителя (PAA Laboratories), 37°C, атмосфера 5% CO₂).

[226] В 1 день эксперимента адгезивные клетки отделяли от их субстрата с помощью трипсина/ЭДТА в соответствии с инструкциями производителя. После этого клетки центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин, ресуспендировали в ЕВМ и фильтровали через 100 мкм клеточный фильтр (Falcon), чтобы удалить клеточные агрегаты. Затем клетки высевали в 96-луночные планшеты для тканевого культивирования с плоским дном (Greiner) при плотности 3200 клеток на лунку,

используя конечный объем 100 мкл. Их инкубировали 1 час в стандартных условиях.

[227] Через 1 час в лунки добавляли серийные разведения SEQ ID NO: 1, 3, 7-9, 11 отрицательных контролей (SEQ ID NO: 16 и человеческого IgG изотипического антитела (Dianova)) и эталонных антител 1 и 2 (SEQ ID NO: 17/18 и 19/20 соответственно). Все титрационные серии проводили при серийном разведении 1:3 в аналитической среде и при подходящей стартовой концентрации. После этого клетки оставляли для пролиферации в течение 72 часов при 37°C. Для проведения количественной оценки клеточной пролиферации через 72 часа к клеткам добавляли по 25 мкл реагентов CellTiter-Glo в каждую лунку и инкубировали в течение 2 минут на орбитальной качалке, чтобы индуцировать лизис клеток, а люминесценцию измеряли, используя считывающее устройство PheraStar FS.

[228] Значение IC50 определяли, используя программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), путем нанесения на график стандартизированных сигналов против концентрации образца и нелинейной регрессии данных с сигмоидальной моделью доза-ответ.

[229] Результаты эксперимента показаны на Фиг. 5. Раскрытый выше анализ пролиферации проведен по трем независимым экспериментам. Результаты обобщены в Таблице 6, ниже.

[230] Таблица 6:

SEQID мутеина	IC50. среднее значение [нМ]
SEQ ID NO: 1	2,252
SEQ ID NO: 3	2,806
SEQ ID NO: 7	0,1992
SEQ ID NO: 8	0,0780
SEQ ID NO: 9	0,1423
SEQ ID NO: 11	0,1692
SEQ ID NO: 17/18	0,0668
SEQ ID NO: 19/20	0,0435

[231] SEQ ID NO: 8 демонстрировала среднее значение EC50 0,07 нМ, эталонное антитело 1 (SEQ ID NO: 17/18) демонстрировало значение EC50 0,06 нМ, а эталонное антитело 2 (SEQ ID NO: 19/20) демонстрировало значение EC50 0,04 нМ. Отрицательные контроли не оказывали влияние на пролиферацию. Следовательно, данные демонстрируют, что SEQ ID NO: 8 и эталонные антитела демонстрировали сравнимую эффективность в этом функциональном анализе.

[232] Пример 10: Оценка стабильности мутеинов

[233] Полученные в результате температуры плавления (T_m), а также начало плавления мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 1,3, 7-9, 11) приведены в Таблице 7, ниже, по сравнению с эталонным антителом (SEQ ID NO: 17/18). Отобранные мутеины липокалина имели T_m в диапазоне от 65 до 77°C, что свидетельствует о хорошей стабильности молекул.

[234] Таблица 7: T_m и начало плавления согласно данным nanoDSC для Ang-2-специфических мутеинов липокалина и эталонного антитела

SEQID мутеина	Tm [°C]	начало плавления [°C]
SEQ ID NO: 1	64	59
SEQ ID NO: 3	66	59
SEQ ID NO: 7	76	68
SEQ ID NO: 8	73	63
SEQ ID NO: 9	77	70
SEQ ID NO: 11	75	65
SEQ ID NO:17/18	69,5/76,1 /83,4	64

[235] Чтобы оценить стабильность при хранении, типовые мутеины инкубировали в пробирках в концентрации 1 мг/мл в течение 1 недели при 37°C. Определение активных мутеинов проводили методом количественного ELISA-анализа. Определение мономерного белка проводили методом аналитической эксклюзионной хроматографии. Полученные в результате данные для SEQ ID NO: 1, 3, 7-9 и 11 приведены в Таблице 8, ниже.

[236] Для исследования белковой активности применяли следующий ELISA-анализ: 384-луночный планшет, подходящий для измерения флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черное плоское дно, высокая степень связывания) покрывали 20 мкл Ang-2 (Thermo Scientific) в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4 °C. После промывки покрытые Ang-2 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера (2% масс./об. БСА в ФСБ, содержащего 0,1% об./об. Твин-20) в течение 1 ч. Планшет промывали и переносили 20 мкл соответствующим образом разведенного белкового стандарта, не подвергавшегося стрессовым условиям стандартного образца или подвергавшегося стрессовым условиям образца в планшет ELISA и инкубировали. Чтобы провести количественную оценку связанного с планшетом белка, планшет ELISA промывали, удаляли оставшиеся супернатанты и добавляли 20 мкл HRP-меченого антитела к hNGAL в предопределенной оптимальной концентрации в блокирующем буфере и инкубировали. После промывки в каждую лунку добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Pierce) и оставляли реакцию на 20-30 минут. Интенсивность флуоресценции каждой лунки считывали, используя флуоресцентное считывающее устройство для микропланшетов (Tecan).

[237] Если не указано иное, все этапы инкубации проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, а после каждого этапа инкубации планшет пять раз промывали 100 мкл буфера ФСБ-Т (ФСБ, 0,05 % Твин 20), используя промывочный буфер Biotek ELx405 select CW.

[238] Для вышеописанного ELISA-анализа получали калибровочную кривую, включающую 11 разведений, как правило, в диапазоне 0,008-500 нг/мл, и для каждого образца готовили три разных, независимых разведения в линейном диапазоне

калибровочной кривой. Для разведений использовали блокирующий буфер, необязательно дополненный 1% человеческой или мышинной плазмой.

[239] Аппроксимацию калибровочной кривой проводили, используя 4-параметрическую логистическую (4PL) нелинейно-регрессионную модель, и использовали для расчета концентрации активного белка для исследуемых образцов. Определенные концентрации активного белка сравнивали с не подвергавшимся стрессовым условиям образцом в той же концентрации и в той же матрице.

[240] Аналитическую эксклюзионную хроматографию проводили на ВЭЖХ-системе Agilent с двумя колонками Superdex 75 5/150 GL (GE Healthcare) в линии, используя ФСБ (Gibco) в качестве элюента при скорости потока 0,3 мл/мин.

[241] Чтобы оценить стабильность при хранении в плазме, типовые мутеины инкубировали в пробирках в концентрации 0,5 мг/мл в течение 1 недели при 37°C в человеческой и мышинной плазме. Определение активных мутеинов проводили методом количественного ELISA-анализа, как описано выше.

[242] Все исследуемые мутеины липокалина оказались стабильными во всех условиях исследования, а результаты исследований обобщены в Таблице 8, ниже.

[243] Таблица 8: Стабильность после 3 циклов заморозка/разморозка (З/Р); хранение в течение 1 недели в ФСБ при 37°C и хранение в течение 1 недели в человеческой (чел.) или мышинной (мыш.) плазме оценивали по восстановлению активности в анализе qELISA и мономерному содержанию в ЭХ: стабильны в случае qELISA = 100 +/- 15%; стабильны в случае аЭХ = 100 +/- 5% (восстановление площади пика мономеров по сравнению с не подвергавшимся стрессовым условиям образцом); для всех образцов, включая стандарты, было обнаружено содержание мономеров на 100 процентах площади.

	заморозка/ разморозка		1 неделя, ФСБ, 37°C		1 неделя, чел. плазма	1 неделя, мыш. плазма
SEQ ID мутеина	Q ELISA	ВЭЖХ	Q ELISA	HPLC	Q ELISA	Q ELISA
SEQ ID NO: 2	104	100	94	97	-	-
SEQ ID NO: 3	95	98	100	96	-	-
SEQ ID NO: 1	102	103	99	105	-	-
SEQ ID NO: 7	-	-	-	-	99	85
SEQ ID NO: 8	-	-	-	-	89	93
SEQ ID NO: 9	-	-	-	-	99	100
SEQ ID NO: 11	-	-	-	-	100	89
SEQ ID NO: 17/18	108	109	87	103	-	-

[244] Варианты реализации, иллюстративно описанные в данном документе, легко можно реализовать на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, специальным образом не раскрытых в данном документе. Таким образом, например, термины «содержащий», «включающий» и т.д. следует воспринимать в расширенном смысле и без ограничений. Кроме того, употребляемые в данном документе термины и выражения использовались как термины для описания, но не ограничения, а использование этих терминов и выражений не предусматривает исключение любых эквивалентов приведенных и описанных признаков или их частей, но предполагается, что возможны различные модификации, входящие в объем заявляемого изобретения. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящие варианты реализации были специальным образом раскрыты с помощью предпочтительных вариантов реализации и необязательных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к их модификациям и вариациям, а такие модификации и вариации считаются входящими в объем этого изобретения. Все описанные в данном документе патенты, патентные заявки, руководства и рецензируемые публикации в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Кроме того, если определение или применение термина в ссылочном материале не согласуется или противоречит определению этого термина, приведенному в данном документе, приоритет имеет определение этого термина, приведенное в данном документе, а определение этого термина в ссылочном материале не имеет приоритета. Каждый из более узко определенных компонентов и субгенерических групп, попадающих в общее описание, также составляет часть этого изобретения. Это включает общее описание изобретения при условии или отрицательном ограничении, подразумевающим удаление из перечня любого предмета, вне зависимости от того, приведен ли исключаемый материал специальным образом в данном документе. Кроме того, если признаки описаны в терминах групп Маркуша, специалистам в данной области техники понятно, что изобретение также описано в терминах любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша. Дополнительные варианты реализации станут понятны из нижеприведенной формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Pieris Pharmaceuticals GmbH
 <120> Новые белки, специфические в отношении ангиогенеза
 <130> P1E15265PCT
 <150> EP15152826.2
 <151> 2015-01-28
 <160> 34
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 1
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

RU 2 720 688 C2

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

Asp Gly
 <210> 3
 <211> 178
 <212> Белок
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 3

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

Asp Gly
 <210> 4
 <211> 178
 <212> Белок
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 4

40 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Val Glu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 45 Val Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Trp Leu Lys Lys Cys Lys Tyr Asn Ile
 65 70 75 80

RU 2 720 688 C2

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Gly Pro Gly Met Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 5 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Thr Val Met Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 10 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 5
 15 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 20 <400> 5
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 25 Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Ile Lys Met Ser Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Val Thr Ile Val Tyr Phe Thr Arg Lys Lys Cys Ser Tyr Arg Ile
 30 65 70 75 80
 Tyr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Pro
 85 90 95
 Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 35 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Tyr Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Trp Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 40 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 6
 45 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> мутеин hNGAL

<400> 6

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

25 Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<223> мутеин hNGAL

<400> 7

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

Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 5 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 8
 <211> 178
 10 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 8
 15 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 20 35 40 45
 Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
 65 70 75 80
 25 Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly
 85 90 95
 Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys His Val Leu Gln
 30 115 120 125
 Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 35 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 9
 <211> 178
 40 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 9
 45 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30

RU 2 720 688 C2

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

Asp Gly
 <210> 11
 <211> 178
 <212> Белок
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 11

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

Asp Gly
 <210> 12
 <211> 178
 <212> Белок
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 <400> 12

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 40 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 45 Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 65 70 75 80

RU 2 720 688 C2

His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 5 Thr Asn Tyr Asp Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Val Met Gln
 115 120 125
 Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 10 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 13
 15 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> мутеин hNGAL
 20 <400> 13
 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
 20 25 30
 25 Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
 35 40 45
 Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 30 65 70 75 80
 His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asp
 85 90 95
 Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 35 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Gly Met Met Gln
 115 120 125
 Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 40 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly
 <210> 14
 45 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> мутеин hNGAL

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Asp Gly

<210> 15

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<223> Стреп-метка

<400> 15

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

35 <210> 16

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

40 <223> hNGAL дикого типа

<400> 16

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

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

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

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

	50		55		60												
	Asn	Val	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Arg	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Tyr	Trp	Ile	
	65					70					75					80	
	Arg	Thr	Phe	Val	Pro	Gly	Cys	Gln	Pro	Gly	Glu	Phe	Thr	Leu	Gly	Asn	
5					85					90					95		
	Ile	Lys	Ser	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Ser	Tyr	Leu	Val	Arg	Val	Val	Ser	
				100					105					110			
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Lys	Val	Ser	Gln	
				115				120						125			
10	Asn	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu	
	130					135					140						
	Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly	
	145					150					155					160	
	Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile	
15				165					170					175			
	Asp	Gly															
	<210>	17															
	<211>	459															
	<212>	Белок															
20	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	тяжелая цепь эталонного антитела 1															
	<400>	17															
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
25	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
				20					25					30			
	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
				35				40					45				
30	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60						
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
35				85						90					95		
	Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	
				100					105					110			
	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	
				115				120						125			
40	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	
	130					135						140					
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	
	145					150					155					160	
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
45				165						170					175		
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
				180				185						190			
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	

RU 2 720 688 C2

			195					200					205					
		Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
		210					215					220						
5		Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
		225					230					235					240	
		Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
		245					250					255						
		Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
10		260					265					270						
		Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
		275					280					285						
		Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
		290					295					300						
15		Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
		305					310					315					320	
		Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
		325					330					335						
		Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
20		340					345					350						
		Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
		355					360					365						
		Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
		370					375					380						
25		Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
		385					390					395					400	
		Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
		405					410					415						
		Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
30		420					425					430						
		Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
		435					440					445						
		Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		450					455											
35		<210>	18															
		<211>	214															
		<212>	Белок															
		<213>	Искусственная последовательность															
		<220>																
40		<223>	легкая цепь эталонного антитела 1															
		<400>	18															
		Gln	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	
		1	5					10					15					
		Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	
45		20					25					30						
		His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	
		35					40					45						
		Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
		50					55					60						

RU 2 720 688 C2

	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly
	65					70					75					80
	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His
					85					90					95	
5	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys
				100					105					110		
	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln
				115				120					125			
	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly
10			130					135				140				
	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly
	145					150				155					160	
	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala
				165					170					175		
15	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser
				180					185					190		
	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val
			195					200					205			
	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser										
20		210														
	<210>	19														
	<211>	452														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
25	<220>															
	<223>	тяжелая цепь эталонного антитела 2														
	<400>	19														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1			5					10					15		
30	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30			
	Asp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45				
	Ser	Ala	Ile	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val	Lys
35		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu
	65				70				75					80		
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85					90					95			
40	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110			
	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115				120						125				
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
45		130				135					140					
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145				150				155					160		
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro

RU 2 720 688 C2

[illegible]

RU 2 720 688 C2

	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
		35						40					45				
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
		50					55					60					
5	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
	65					70					75					80	
	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Asp	Asn	Ser	Gln	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
10				100					105					110			
	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
		130					135					140					
15	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					165					170					175		
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
20				180					185					190			
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
			195					200					205				
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
		210															
25	<210>	21															
	<211>	536															
	<212>	ДНК															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
30	<223>	мутеин hNGAL															
	<400>	21															
	caggactcca	cctcagacct	gatcccagcc	ccacctctga	gcaaggtccc	tctgcagcag										60	
	aacttccagg	acaaccaatt	ccatgggaaa	tggatatgtcg	tgggccaagc	cggaattac										120	
	atcctgcgtg	aggataagga	tccgggaaaa	atgtgggcga	ccatttacga	gttgaaagaa										180	
35	gataaatcat	ataacgtcac	cgaggtgagc	tttggaccta	agaaatgcaa	ttacaccatt										240	
	tggacctttg	tgccggggag	ccagccgggc	gagtttactt	taggcggaat	taaaagtcct										300	
	ccgggcgga	catcaacctt	ggtccgcgtc	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg										360	
	gtgttcttca	agcacgtgct	gcagaaccgc	gagttctttg	agatcacact	gtacgggcgc										420	
	acgaaagaac	tgacaagcga	gctgaaggaa	aattttatcc	gcttttccaa	atctctgggc										480	
40	ctccctgaaa	accacatcgt	cttcctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cggcag										536	
	<210>	22															
	<211>	536															
	<212>	ДНК															
	<213>	Искусственная последовательность															
45	<220>																
	<223>	мутеин hNGAL															
	<400>	22															
	caggactcca	cctcagacct	gatcccagcc	ccacctctga	gcaaggtccc	tctgcagcag										60	

	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaatcac	120
	cgtctgcgtg aggataagga tccgggaaaa atgcacgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat ataacgtcac cgacgtgacc tttgcattca agaaatgcaa ttaccgtatt	240
	cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttgg	300
5	ccgggcgaga catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agaccgtgat gcagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 23	
10	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
15	<400> 23	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaattgg	120
	tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat ataacgtcac ccaagtggga tttgagcaaa agaaatgcaa atacagcatt	240
20	cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taaaagttgg	300
	ccgggcgaga catcactgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agggagtgat gcagaaccgc gaggtttttg caatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
25	<210> 24	
	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 24	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaattgtt	120
	gagctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
35	gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt ttttggctga agaaatgcaa atacaatatt	240
	cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtga	300
	ccgggcatga catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agaccgtgat gcagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
40	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 25	
	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 25	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60

	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcccaagc cggaaattac	120
	tggctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgtctgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat ataacgtcac catcgtgtac tttacccgta agaaatgcag ctaccgtatt	240
	tacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccctat taaaagttac	300
5	ccgggcgaca catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcacgtgta ccagaaccgc gagtggtttg agatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 26	
10	<211> 535	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
15	<400> 26	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cggggtgtcg tttgggccta agaaatgcaa ttacaggatt	240
20	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtctt	300
	ccgggccaga catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535
25	<210> 27	
	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 27	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcagtc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
35	gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtct tttgggccga agaaatgcaa ttacaggatt	240
	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtcct	300
	ccgggcgata catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcg	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
40	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 28	
	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 28	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60

	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtc tttggggcta agaaatgcaa ttacaggatt	240
	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtgtat	300
5	ccgggcggga catcaacggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 29	
10	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
15	<400> 29	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtc tttggggcta agaaatgcaa ttaccgtatt	240
20	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtccg	300
	ccgggcggga catcaacggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
25	<210> 30	
	<211> 535	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 30	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccgcagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
35	gataaatcat atgacgtcac cggtgtgtct tttggggcta agaaatgctt ttacaggatt	240
	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggtat taaaagtccg	300
	ccgggcggga catcaacggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
40	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535
	<210> 31	
	<211> 536	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 31	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60

	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
	attctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac cgaggtgtct tttggtccta agaaatgcaa ttacaggatt	240
	tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtctt	300
5	ccgggcggta catcaacttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcag	536
	<210> 32	
10	<211> 535	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
15	<400> 32	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctg tgggcgttgc cggaaattgg	120
	tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
	gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
20	cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaacat taaaagttag	300
	ccgggcgaca catcaccgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacgacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agggagtgat gcaggatcgc gaggtttttg caatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535
25	<210> 33	
	<211> 535	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 33	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60
	aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctg tgggcgttgc cggaaattgg	120
	tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
35	gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
	cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taagagttgg	300
	ccgggcgaca catcaccgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
	gtgttcttca agggaatgat gcaggaccgc gaggtttttg caatcacact gtacgggcgc	420
	acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
40	ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca	535
	<210> 34	
	<211> 535	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> мутеин hNGAL	
	<400> 34	
	caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag	60

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag taggtatggc cggaaattgg 120
gatctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac ccagggtggcg tttgagcaga agaaatgcaa gtactcgatt 240
catacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagttgg 300
5 cccgggcgata catcaccttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca aggggggtgat gcagaaccgc gaggtgtttg ctatcacact gtacggggcg 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggca 535

10 (57) Формула изобретения

1. Мутеин человеческого липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (hNGAL), способный связывать Ang-2, где аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере шестнадцать из следующих мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной
15 последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16): Gln28 → His; Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp, Arg, Glu, Asp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 →
20 Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu, Pro или Phe; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu, Tyr или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val; и Lys 134 → Ala, Glu или Trp, при этом мутеин hNGAL обладает идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 85% по отношению
25 к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14.

2. Мутеин hNGAL по п. 1, где мутеин hNGAL способен связывать Ang-2 с Кд около 5 нМ или меньше.

3. Мутеин hNGAL по п. 1, где мутеин hNGAL способен связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной посредством определения значения EC50, составляющего
30 около 5 нМ или меньше, согласно измерениям в ELISA-анализе.

4. Мутеин hNGAL по п. 1, где мутеин hNGAL способен связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной посредством определения значения IC50, составляющего около 5 нМ или меньше, согласно измерениям в конкурентном ELISA-анализе.

5. Мутеин hNGAL по п. 1, где мутеин hNGAL способен ингибировать или снижать
35 пролиферацию эндотелиальных клеток лимфатических микрососудов, опосредованную Ang-2, со значением IC50 около 5 нМ или меньше согласно данным анализа клеточной пролиферации.

6. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-5, где аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит один или более из следующих мутированных аминокислотных
40 остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16): Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

7. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-5, где аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит один из следующих наборов мутированных аминокислотных
45 остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16):

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Trp; Cys

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr;

Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala; или

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

8. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-7, где мутеин hNGAL способен связывать
10 Ang-1 с аффинностью, измеренной посредством определения значения IC50, составляющего около 150 нМ или меньше.

9. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-8, где мутеин hNGAL перекрестно реагирует как с человеческим Ang-2, так и с мышинным Ang-2.

10. Мутеин hNGAL по п. 9, где мутеин hNGAL способен связывать мышинный Ang-2
15 с аффинностью, измеренной посредством определения значения IC50, составляющего около 5 нМ или меньше.

11. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-10, где мутеин hNGAL способен блокировать связывание человеческого Ang-2 с hTie-2 и мышинового Ang-2 с hTie-2 со значением IC50 около 25 нМ или меньше, соответственно.

20 12. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-11, где мутеин hNGAL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14 и их фрагментов, где во фрагменте отсутствует по меньшей мере одна из N-концевых и/или C-концевых аминокислот мутеина hNGAL.

13. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-11, где мутеин hNGAL обладает
25 идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90% по отношению к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14.

14. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-13, где мутеин hNGAL содержит один или более ненативных цистеиновых остатков, замещающих одну или более аминокислот hNGAL в положениях последовательности, соответствующих положениям
30 последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 16).

15. Мутеин hNGAL по любому из пп. 1-13, где указанный мутеин hNGAL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного цистеинового остатка другой аминокислотой, выбранной из лейцина, метионина, аланина, валина, изолейцина, серина,
35 треонина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, глицина, пролина, триптофана, тирозина, фенилаланина.

16. Мутеин hNGAL по п. 15, где указанная другая аминокислота представляет собой сериновый остаток.

17. Конъюгат, содержащий мутеин hNGAL по любому из пп. 1-13 для связывания
40 Ang-2, где мутеин hNGAL конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из органической молекулы, ферментной метки, радиоактивной метки, цветной метки, флуоресцентной метки, хромогенной метки, люминесцентной метки, гаптена, дигоксигенина, биотина, цитостатического агента, токсинов, комплекса металла, металла, коллоидного золота и соединения, которое обеспечивает продление периода
45 полужизни мутеина hNGAL в сыворотке крови.

18. Слитый белок, содержащий мутеин hNGAL по любому из пп. 1-13 для связывания Ang-2, где мутеин hNGAL слит по его N-концу и/или его C-концу с партнером по слиянию, который представляет собой белок, белковый домен или пептид.

19. Слитый белок по п. 18, где соединение, которое обеспечивает продление периода полужизни мутеина hNGAL в сыворотке крови, выбрано из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), гидроксипропилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, CH3-домена иммуноглобулина, CH4-домена иммуноглобулина, альбуминсвязывающего пептида и альбуминсвязывающего белка.

20. Молекула нуклеиновой кислоты для обеспечения экспрессии мутеина hNGAL в клетке-хозяине, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин hNGAL по любому из пп. 1-16.

21. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 20, где молекула нуклеиновой кислоты содержится в векторе или фагмидном векторе.

22. Клетка-хозяин для генной экспрессии, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 20 или 21.

23. Способ получения мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16, где полипептид получают начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин hNGAL, где мутеин hNGAL получают в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и выделяют из этого организма-хозяина, или его культуры, или в *in vitro* системе трансляции.

24. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом, содержащая эффективное количество мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16.

25. Композиция по п. 24, где указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно из фармацевтически приемлемого вспомогательного средства, разбавителя или носителя.

26. Применение мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 для выявления Ang-2 в образце.

27. Комбинация по меньшей мере (a) мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 и (b) антиангиогенного агента для антиангиогенного лечения.

28. Комбинация по п. 27, где мутеин hNGAL и антиангиогенный агент вводятся в комбинации, включая одновременное, параллельное или последовательное введение.

29. Комбинация по п. 27, где мутеин hNGAL и антиангиогенный агент вводятся независимо друг от друга, в том числе через индивидуальные интервалы времени в независимые моменты времени.

30. Комбинация по п. 27, где комбинация содержится в одной композиции.

31. Комбинация по любому из пп. 27-30, где антиангиогенный агент выбран из группы, состоящей из: (i) антагонистов Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 и/или Tie-2; (ii) антагонистов Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF и/или EG-VEGF; (iii) антагонистов дельта-подобного лиганда 4 (DLL4, специфического в отношении сосудов лиганда Notch); (iv) антагонистов рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR); и (v) ингибиторов цитокинов.

32. Комбинация по любому из пп. 27-30, где антиангиогенный агент представляет собой ингибитор VEGF.

33. Комбинация по п. 32, где ингибитор VEGF выбран из группы, состоящей из: VEGF-Trap, бевацизумаба (Avastin®), сорафениба (Nexavar®), сунитиниба (Sutent®) и пазопаниба (Votrient®).

34. Комбинация по п. 32 или 33, где ингибитор VEGF является антагонистом VEGF-A и/или антагонистом VEGF-C.

35. Комбинация по любому из пп. 27-34, где комбинация дополнительно содержит дополнительный антиангиогенный агент.

36. Комбинация по п. 35, где первый антиангиогенный агент является антагонистом VEGF-A, а второй антиангиогенный агент является антагонистом VEGF-C.

37. Комбинация по п. 34 или 36, где антагонист VEGF-A представляет собой антитело к VEGF-A или мутеин липокалина, который обладает специфичностью связывания в отношении VEGF-A.

38. Комбинация по п. 34 или 36, где антагонист VEGF-C представляет собой антитело к VEGF-C или мутеин липокалина, который обладает специфичностью связывания в отношении VEGF-C.

39. Применение мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 для производства фармацевтической композиции, подходящей для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом.

40. Применение комбинации по любому из пп. 27-38 для производства фармацевтической композиции, подходящей для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом.

41. Способ связывания Ang-2 у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16, или композиции по п. 24 или 25, или комбинации по любому из пп. 27-38.

42. Способ ингибирования ангиогенеза у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16, или композиции по п. 24 или 25, или комбинации по любому из пп. 27-38.

43. Способ лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом, у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16, или композиции по п. 24 или 25, или комбинации по любому из пп. 27-38.

44. Способ по п. 43, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из: роста опухоли, глазных нарушений, сосудистых заболеваний, воспалительных или инфекционных заболеваний, рака, неоваскулярных заболеваний глаза, артрита и псориаза.

45. Применение мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 для связывания Ang-2 у субъекта.

46. Применение композиции по п. 24 или 25 для связывания Ang-2 у субъекта.

47. Применение комбинации по любому из пп. 27-38 для связывания Ang-2 у субъекта.

48. Применение мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 для ингибирования ангиогенеза у субъекта.

49. Применение композиции по п. 24 или 25 для ингибирования ангиогенеза у субъекта.

50. Применение комбинации по любому из пп. 27-38 для ингибирования ангиогенеза у субъекта.

51. Применение мутеина hNGAL по любому из пп. 1-16 для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом.

52. Применение композиции по п. 24 или 25 для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом.

53. Применение по п. 52, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из роста опухоли, глазных нарушений, сосудистых заболеваний, воспалительных или инфекционных заболеваний, рака, неоваскулярных заболеваний глаз, артрита и псориаза.

54. Применение комбинации по любому из пп. 27-38 для лечения заболевания или нарушения, связанного с дерегулированным ангиогенезом.

55. Применение по п. 54, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из роста опухоли, глазных нарушений, сосудистых заболеваний, воспалительных или инфекционных заболеваний, рака, неоваскулярных заболеваний глаз, артрита и псориаза.

5

10

15

20

25

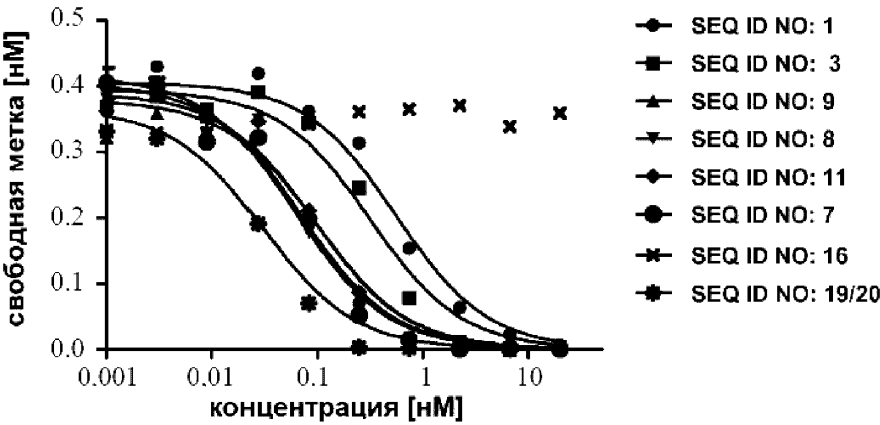
30

35

40

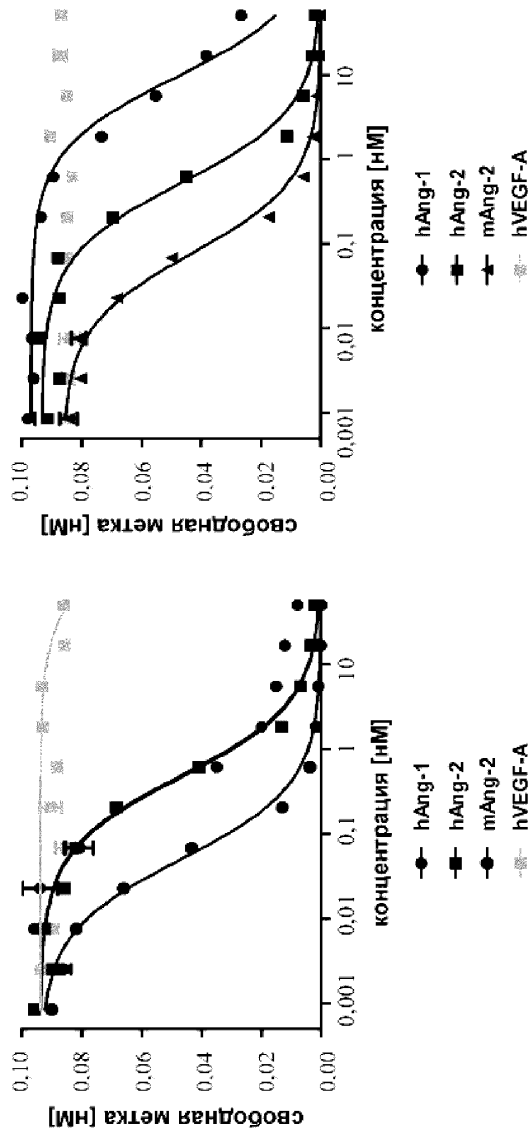
45

1



Фигура 1

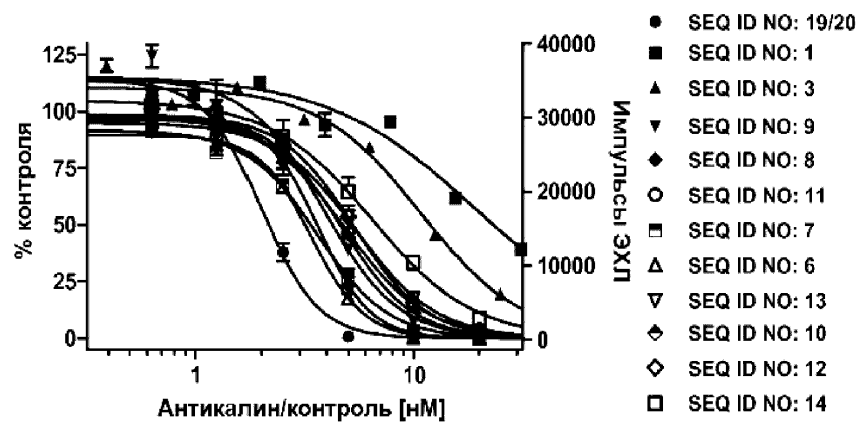
2



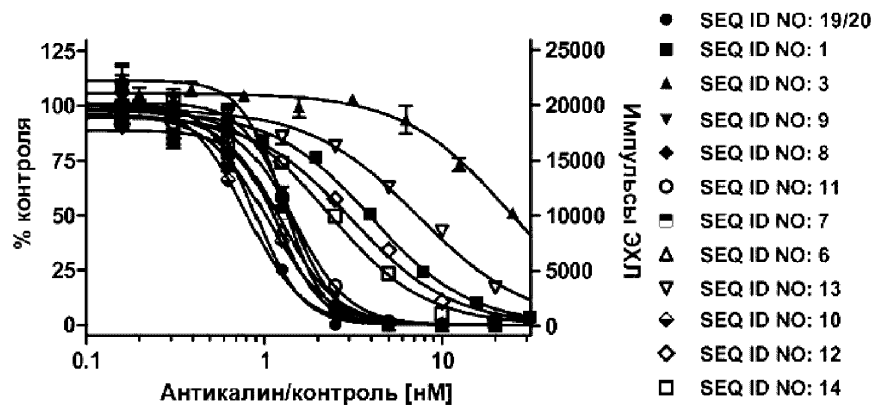
SEQ ID NO: 8

SEQ ID NO: 7

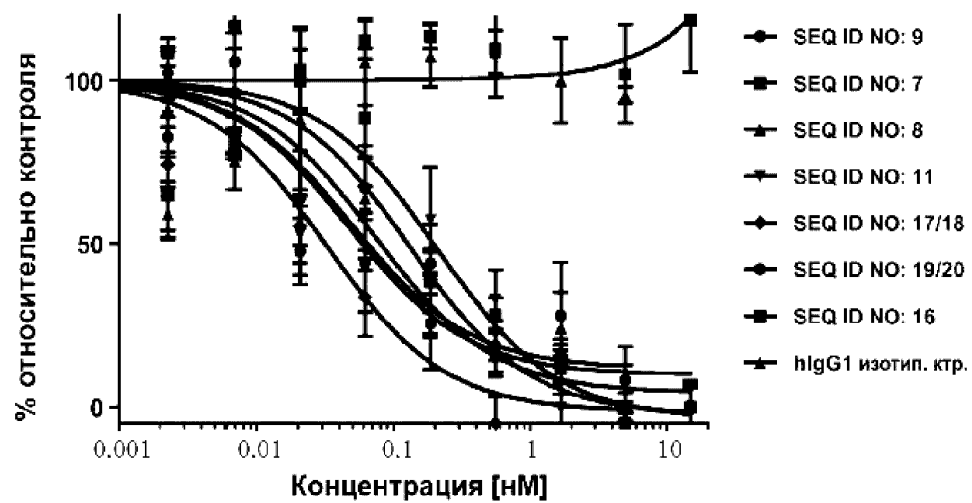
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5