



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.17

(21) Номер заявки
201791841

(22) Дата подачи заявки
2016.02.16

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) НОВЫЕ БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ПИОВЕРДИНУ И ПИОХЕЛИНУ

(31) 15305242.8

(32) 2015.02.18

(33) EP

(43) 2018.01.31

(86) PCT/EP2016/053226

(87) WO 2016/131804 2016.08.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПАЙЕРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС
ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Корвей Карстен, Штумп Хайке, Круйп
Йохен (DE), Каландра Бернхард,
Рей Астрид, Карст Натали, Муре
Мишель, Фресс Лоран (FR), Роте
Кристиан, Аллерсдорфер Андреа,
Виденманн Александер, Хиннер
Марлон (DE), Ландер Бредли (US),
Йензен Кристиан, Хюльсмейер
Мартин (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2011149962

MARY E. PEEK ET AL.: "Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition", INTERDISCIPLINARY PERSPECTIVES ON INFECTIOUS DISEASES, vol. 9, no. 3, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 126-10, XP055190936, ISSN: 1687-708X, DOI: 10.1128/JB.00396-11 abstract page 8, right-hand column, paragraph 2

HOLMES M. A. ET AL.: "Siderocalin (Lcn 2) Also Binds Carboxymycobactins, Potentially Defending against Mycobacterial Infections through Iron Sequestration", STRUCTURE, CURRENT BIOLOGY LTD., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 13, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 29-41, XP027638481, ISSN: 0969-2126 [retrieved on 2005-01-01], abstract; fig. 1

M. FLUCKINGER ET AL.: "Human Tear Lipocalin Exhibits Antimicrobial Activity by Scavenging Microbial Siderophores", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 48, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 3367-3372, XP055190970, ISSN: 0066-4804, DOI:10.1128/AAC.48.9.3367-3372.2004, page 3369, left-hand column

WO-A1-2004060918

(57) В изобретении предусматриваются мутеины hNGAL, которые связываются с членом семейства пиовердинов или пиохелином и могут использоваться в различных вариантах применения, в том числе фармацевтических вариантах применения, например, для подавления или ослабления роста *P. aeruginosa*. Изобретение также имеет отношение к способам получения одного или нескольких пиовердин- или пиохелин-связывающих мутеинов, описанных в данном документе, а также композициям, содержащим один или несколько из таких мутеинов. Настоящее раскрытие дополнительно относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие мутеины, а также к способам получения таких мутеинов и молекул нуклеиновых кислот. Кроме того, в изобретении раскрыты терапевтические и/или диагностические способы применения этих мутеинов, а также композиций, содержащих один или несколько таких мутеинов.

I. Предпосылки создания изобретения

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) является оппортунистическим патогеном, который вызывает острые инфекции, преимущественно в сочетании с повреждениями тканей. *P. aeruginosa* образует биопленки на имплантированных устройствах и на легочных тканях пациентов с наследственным заболеванием муковисцидозом. Биопленочные инфекции с трудом поддаются лечению с помощью традиционных препаратов-антибиотиков. Однако исследования показали, что для надлежащего образования биопленки *P. aeruginosa* необходимо железо, и следовательно системы захвата железа являются потенциальными мишенями для препаратов против *Pseudomonas*.

P. aeruginosa способна извлекать железо из среды организма-хозяина с помощью секретируемых железосвязывающих сидерофоров, пиохелина и пиовердина. Пиовердин (Pvd) представляет собой пептид-связанный лиганд гидроксаматного и катехолатного типа, а пиохелин (Pch) является дериватизированным конъюгатом салицилата и двух молекул цистеина, имеющий функциональные группы фенольного, карбоксилатного и аминокислотного лигандов. Была продемонстрирована роль Pvd и Pch в вирулентности *P. aeruginosa* с некоторыми указаниями на синергизм. Мутанты с двойным дефицитом, не способные вырабатывать оба сидерофора, являются намного более аттенуированными по вирулентности, чем любой мутант с одиночным дефицитом, не способный вырабатывать только один из двух сидерофоров (Takase et al., Infection and immunity, Apr. 2000, p.1834-1839). Кроме того, пиовердин выступает в роли сигнальной молекулы для контроля выработки нескольких факторов вирулентности, а также самого пиовердина; в то же время было высказано предположение, что пиохелин может быть частью системы получения двухвалентных металлов, таких как двухвалентное железо и цинк, для обеспечения патогенности *P. aeruginosa* в дополнение к трехвалентному железу (Visca et al., 1992).

Три структурно различных типа или группы пиовердинов были идентифицированы из нескольких штаммов *P. aeruginosa*: из *P. aeruginosa* ATCC 15692 (Briskot et al., 1989, Liebig's Ann Chem, p. 375-384), из *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tappe et al., 1993, J. Prakt-Chem., 335, p.83-87) и из природного изолята *P. aeruginosa* R (Gipp et al., 1991, Z. Naturforsch., 46c, p.534-541). Более того, при сравнительных биологических исследованиях 88 клинических изолятов и двух штаммов из вышеупомянутых коллекций выявили три различные штаммоспецифичные пиовердин-опосредованные системы захвата железа (Cornelis et al., 1989, Infect Immun., 57, p.3491-3497; Meyer et al., 1997, Microbiology, 143, p.35-43), в соответствии с эталонными штаммами: *P. aeruginosa* ATCC 15692 (Pvd I типа или Pvd I), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pvd II типа или Pvd II), а также клинические изоляты *P. aeruginosa* R и раб (Pvd III типа или Pvd III).

Каждый тип пиовердина имеет по три представителя (подтипа), отличающиеся боковой цепью, которая представляет собой сукцинил, сукцинамид или α -кетоглутарил, а именно сукцинил-Pvd I типа, сукцинамид-Pvd I типа, α -кетоглутарил-Pvd I типа, сукцинил-Pvd II типа, сукцинамид-Pvd II типа, α -кетоглутарил-Pvd II типа, сукцинил-Pvd III типа, сукцинамид-Pvd III типа и α -кетоглутарил-Pvd III типа.

Каждый штамм *P. aeruginosa* экспрессирует один тип Pvd, т.е. *P. aeruginosa* ATCC 15692 экспрессирует Pvd I типа, *P. aeruginosa* ATCC 27853 экспрессирует Pvd II типа, а *P. aeruginosa* R и раб экспрессируют Pvd III типа, при этом каждый тип Pvd включает в себя всех трех представителей соответствующего типа, и каждый указанный штамм также экспрессирует пиохелин.

В связи с этим авторы определили пиовердины и пиохелин в качестве мишеней, которые являются критически важными для патогенности *P. aeruginosa*, и разработали специфичные ингибиторы для таких мишеней, как раскрыто в данном документе, т. е. для каждого типа Pvd, в том числе для трех представителей (подтипов) каждого типа, отличающихся боковой цепью (Pvd I s, Pvd I sa, Pvd I α KG, Pvd II s, Pvd II sa, Pvd II α KG, Pvd III s, Pvd III sa, Pvd III α KG), а также для Pch, и в каждом случае как для свободного сидерофора, так и для сидерофора со связанным железом, без создания сильного селективного давления, обусловленного традиционными антибиотиками. Кроме того, авторы выбрали ингибиторы, которые различают свободный пиохелин и пиохелин, нагруженный железом.

Настоящее изобретение было получено как результат деятельности, предпринятой от лица Pieris AG, Sanofi-Aventis и Sanofi-Pasteur Inc., которые являются участниками действующего соглашения о совместных исследованиях, и было сделано в рамках соглашения о совместных исследованиях.

II. Определения

В следующем перечне определены термины, фразы и сокращения, применяемые на всем протяжении настоящего описания. Предусмотрено, что все термины, приведенные и определенные в данном документе, охватывают все грамматические формы.

Выражение "пиовердин", используемое в данном документе, означает флуоресцентный сидерофор, который продуцируется грамотрицательной бактерией *Pseudomonas aeruginosa* в условиях роста при недостатке железа и характеризуется высокой аффинностью к железу. Пиовердины состоят из трех структурных частей: дигидроксихинолинового хромофора, боковой цепи и вариативной пептидной цепи. Фрагмент, представляющий собой пептидную цепь, участвует в распознавании рецепторов и связывании с ними. Были идентифицированы три различных Pvd, отличающиеся своей боковой цепью (I-III типы). Размер и аминокислотный состав типов пиовердина являются уникальными для каждого вида, также как и специфичность распознавания пиовердина. Были разграничены три штамма *P. aeruginosa*, каждый из

которых вырабатывает отдельный тип пиовердина (I-III типы, фиг. 1) и когнатный рецептор FpvA.

Выражение "пиохелин", используемое в данном документе, означает тиазолин-дериватизированный конъюгат салицилата и двух молекул цистеина и имеющий функциональные группы фенольного, карбоксилатного и аминокислотного лиганда, который продуцируется *P. aeruginosa* и солубилизует трехвалентное железо. Пиохелин представляет собой структурно уникальный сидерофор, обладающий фенолатным фрагментом, но не имеющим ни гидроксаматного, ни катехолатного фрагмента (см. фиг. 1).

Выражение "поддающаяся выявлению аффинность", используемое в данном документе, означает способность связываться с выбранной мишенью с константой аффинности, как правило составляющей по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М или меньше. Как правило, более низкие значения аффинности уже нельзя измерить обычными способами, такими как ELISA, и следовательно они имеют второстепенное значение.

Как используется в данном документе, "аффинность связывания" белка по настоящему раскрытию (например, мутеина липокалина 2 человека) или полипептида слияния на его основе к выбранной мишени (в данном случае пиовердин или пиохелин) можно измерять (и тем самым определить значения K_D для комплекса мутеин-лиганд) с помощью множества способов, известных специалистам в данной области техники. Такие способы включают без ограничений флуоресцентное титрование, прямой ELISA, конкурентный ELISA, калориметрические способы, такие как изотермическая титрационная калориметрия (ITC) и поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore). Такие способы являются общепринятыми в данной области техники и их примеры также подробно представлены ниже.

Также следует отметить, что на образование комплекса между соответствующим связывающимся веществом и его лигандом влияет множество различных факторов, таких как концентрации соответствующих партнеров по связыванию, наличие конкурентов, pH и ионная сила применяемой буферной системы, а также экспериментальный способ, применяемый для определения константы диссоциации K_D (например, флуоресцентное титрование, прямой ELISA, конкурентный ELISA или поверхностный плазмонный резонанс, и это названы только некоторые из них), или даже математический алгоритм, который применяют для оценки экспериментальных данных.

Таким образом, специалисту в данной области также ясно, что значения K_D (константа диссоциации комплекса, образуемого между соответствующим связывающимся веществом и его мишенью/лигандом) могут варьировать в пределах определенного экспериментального диапазона, зависящего от способа и экспериментальной установки, которую применяют для определения аффинности конкретного мутеина к данному лиганду. Это означает, что может наблюдаться незначительное отклонение в измеренных значениях K_D или диапазоне допустимых значений, например в зависимости от того, было ли значение K_D определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore), конкурентного ELISA или "прямого ELISA".

Выражения "мутеин", "мутированный" фрагмент (независимо белок или нуклеиновая кислота) или "мутант", используемые в данном документе, относятся к замене, удалению или вставке одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот по сравнению с природной (дикого типа) нуклеиновой кислотой или "эталонным" каркасом белка. Указанный термин также включает фрагменты мутеина и варианты, описываемые в данном документе. Мутеины по настоящему раскрытию, их фрагменты или варианты предпочтительно сохраняют функцию связывания с пиовердином или пиохелином, как описано в данном документе.

Термин "фрагмент", используемый в данном документе в связи с мутеинами по настоящему раскрытию, относится к белкам или пептидам, полученным из полноразмерного зрелого липокалина 2 человека, которые укорочены на N-конце и/или C-конце, т. е. с отсутствием по меньшей мере одной из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут включать по меньшей мере 10, например более 20 или 30 или более последовательных аминокислот из первичной последовательности зрелого липокалина 2 человека, и обычно поддаются выявлению при иммуноанализе на зрелый липокалин 2 человека. В целом, термин "фрагмент", используемый в данном документе в отношении соответствующего белкового лиганда мутеина в соответствии с настоящим раскрытием, или комбинации в соответствии с настоящим раскрытием, или белка слияния, описанного в данном документе, относится к укороченным на N-конце и/или C-конце белковым или пептидным лигандам, которые сохраняют способность полноразмерного лиганда распознаваться и/или связываться мутеином в соответствии с настоящим раскрытием.

Термин "мутагенез", используемый в данном документе, означает, что экспериментальные условия выбраны таким образом, что природная аминокислота в данном положении последовательности зрелого липокалина 2 человека, может быть замещена по меньшей мере одной аминокислотой, которая не присутствует в данном определенном положении в соответствующей природной полипептидной последовательности. Термин "мутагенез" также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности с помощью удаления или вставки одной или нескольких аминокислот. Таким образом, в пределах объема настоящего раскрытия подразумевается, например, что одну аминокислоту в выбранном положении последовательности замещают отрезком из трех случайных мутаций, что приводит к вставке двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента в белке ди-

кого типа. Такую вставку или делецию можно вводить независимо друг от друга в любых пептидных сегментах, которые могут подвергаться в настоящем раскрытии мутагенезу.

Термин "случайный мутагенез" означает, что заранее заданная одиночная аминокислота (мутация) не присутствует в определенном положении последовательности, однако при этом по меньшей мере две аминокислоты могут внедряться с определенной вероятностью в заранее определенное положение последовательности во время мутагенеза.

"Идентичность" представляет собой свойство последовательностей, которое определяет их сходство или родство. Термин "идентичность последовательностей" или "идентичность", используемый в настоящем раскрытии, означает процентную долю попарно идентичных остатков после (гомологичного) выравнивания последовательности полипептида по настоящему раскрытию с рассматриваемой последовательностью относительно числа остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей измеряют путем деления числа идентичных аминокислотных остатков на общее число остатков и умножения произведения на 100.

Термин "гомология" используется в данном документе в своем обычном значении и включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые считаются консервативными заменами (например, замена глутаматного остатка на аспартатный остаток) в эквивалентных положениях в линейной аминокислотной последовательности полипептида по настоящему раскрытию (например, любом мутеине по настоящему раскрытию).

Процентную долю гомологии последовательностей или идентичности последовательностей можно определять в данном документе, например, с применением программы BLASTP, версия blastp 2.2.5 (от 16 ноября 2002 г.; см. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). В соответствии с данным вариантом осуществления процентная доля гомологии основана на выравнивании целых полипептидных последовательностей (матрица: BLOSUM 62; стоимость гэпов: 11,1; предельное значение установлено на 10^{-3}), в том числе пропептидных последовательностей, предпочтительно с применением в качестве эталона при попарном сравнении каркаса белка дикого типа. Его рассчитывают как процентную долю числа "положительных значений" (гомологичных аминокислот), указанных в качестве результата в выходной информации программы BLASTP, деленного на общее число аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

В частности, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, отличающегося от человеческого липокалина 2 дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности человеческого липокалина 2 дикого типа, специалист в данной области может применять средства и способы, хорошо известные из уровня техники, например, выравнивание, либо вручную, либо с применением компьютерных программ, таких как BLAST2.0, что обозначает Средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любую другую подходящую программу, которая применима для создания выравниваний последовательностей. Соответственно, человеческий липокалин 2 дикого типа может выступать в роли "последовательности, найденной в базе данных" или "эталонной последовательности", в то время как аминокислотная последовательность мутеина, отличающегося от человеческого липокалина 2 дикого типа, описанного в данном документе, выступает в роли "запрашиваемой последовательности". Термины "эталонная последовательность" и "последовательность дикого типа" используются в данном документе взаимозаменяемо.

"Гэпы" представляют собой промежутки при выравнивании, которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Таким образом, две копии абсолютно одинаковой последовательности характеризуются 100% идентичностью, а последовательности, которые являются менее высококонсервативными и имеют делеций, добавления или замены, могут характеризоваться более низкой степенью идентичности последовательностей. Специалистам в данной области техники будет понятно, что несколько компьютерных программ доступны для определения идентичности последовательностей с применением стандартных параметров, например, Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast 2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410) и Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197).

Термин "вариант", используемый в настоящем раскрытии, относится к производным белка или пептида, которые включают модификации аминокислотной последовательности, например, путем замены, делеций, или вставки, или химической модификации. Такие модификации в некоторых вариантах осуществления не снижают функциональность белка или пептида. Такие варианты включают белки, где одна или несколько аминокислот были замещены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от природных 20 аминокислот, например такими как орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Однако такие замены также могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещают химически подобным аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замещения в пределах 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; а также 6) фенилаланин, тирозин и триптофан.

Под "нативной последовательностью" липокалина 2 человека понимают липокалин 2 человека, который имеет такую же аминокислотную последовательность, как и соответствующий полипептид при-

родного происхождения. Таким образом, нативная последовательность липокалина 2 человека может характеризоваться аминокислотной последовательностью соответствующего природного липокалина 2 человека. Такой полипептид с нативной последовательностью можно выделять из природного источника или можно получать с помощью рекомбинантных способов или способов синтеза. Термин полипептид с "нативной последовательностью" охватывает, в частности, природные усеченные или секретируемые формы липокалина 2 человека, природные варианты формы, такие как формы, полученные в результате альтернативного сплайсинга, и природные аллельные варианты липокалина 2 человека. Выражение "вариант" полипептида означает биологически активный полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на приблизительно 50, 60, 70, 80% или по меньшей мере на приблизительно 85% идентичную аминокислотной последовательности полипептида с нативной последовательностью. Такие варианты включают например полипептиды, в которых один или несколько аминокислотных остатков добавлены на N- или C- конце полипептида. Как правило, вариант имеет последовательность, по меньшей мере на приблизительно 70%, в том числе по меньшей мере на приблизительно 80%, например по меньшей мере на приблизительно 85% идентичную аминокислотной последовательности, в том числе по меньшей мере на приблизительно 90% идентичную аминокислотной последовательности или по меньшей мере на приблизительно 95% идентичную аминокислотной последовательности полипептида с нативной последовательностью.

Термин "положение", в случае использования в соответствии с настоящим раскрытием, означает либо положение аминокислоты в пределах аминокислотной последовательности, описанной в данном документе, либо положение нуклеотида в пределах последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Для понимания терминов "соответствует" или "соответствующий", используемых в данном документе в контексте положений в аминокислотной последовательности одного или нескольких мутеинов, соответствующее положение определяется не только числом предыдущих нуклеотидов/аминокислот.

Соответственно, положение данной аминокислоты в соответствии с настоящим раскрытием, которая может подвергаться замене, может варьировать вследствие удаления или добавления аминокислот в любом другом месте в (мутантном или дикого типа) липокалине 2 человека. Аналогично, положение данного нуклеотида в соответствии с настоящим раскрытием, который может подвергаться замене, может варьировать вследствие делеций или дополнительных нуклеотидов в любом другом месте в 5'-нетранслируемой области (UTR) мутеина или человеческого липокалина 2 дикого типа, в том числе в промоторе и/или любых других регуляторных последовательностях или гене (в том числе экзонах и интронах).

Таким образом, что касается соответствующего положения в соответствии с настоящим раскрытием, предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот могут отличаться по указанному числу, а не по аналогичным соседним нуклеотидам/аминокислотам, хотя указанные соседние нуклеотиды/аминокислоты, которые могут подвергаться замене, удалению или добавлению, также охватывают одно или несколько соответствующих положений.

Кроме того, что касается соответствующего положения в мутеине на основании эталонного каркаса в соответствии с настоящим раскрытием, предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот структурно соответствуют положениям в каком-то другом месте в мутеине или человеческом липокалине 2 дикого типа, даже если они могут отличаться по указанному числу.

Термины "органическая молекула" или "малая органическая молекула", используемые в данном документе для неприродной мишени, обозначает органическую молекулу, содержащую по меньшей мере два атома углерода, но предпочтительно не более 7 или 12, способных вращению углеродных связей, с молекулярной массой в диапазоне от 100 до 2000 Да, предпочтительно от 100 до 1000 Да, и необязательно включающую в себя один или два атома металла.

Слова "выявлять", "выявление", "поддающийся выявлению" или "осуществлять выявление", используемые в данном документе, понимаются как на количественном, так и на качественном уровне, а также как их сочетание. Таким образом, они включают количественные, полуколичественные и качественные измерения молекулы, представляющей интерес.

Выражение "субъект" означает позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Термин "млекопитающее" используется в данном документе по отношению к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, в том числе без ограничений к человеку, одомашненным и сельскохозяйственным животным, а также животным из зоопарков, животным, используемым в спорте, или домашним животным, таким как овцы, собаки, лошади, кошки, коровы, крысы, свиньи, обезьяны, такие как макаки-крабоеды и т.д., в качестве нескольких иллюстративных примеров. Предпочтительно в данном документе млекопитающим является человек.

Выражение "эффективное количество" означает количество, достаточное для получения благоприятных или требуемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

Выражение "образец" определяют как биологический образец, взятый у любого субъекта. Биологические образцы включают без ограничений кровь, сыворотку крови, мочу, кал, семенную жидкость или ткань.

III. Описание графических материалов

Фиг. 1: показана структура сидерофоров *P. aeruginosa*. На фиг. 1А-С показаны структуры трех пиовердинов *P. aeruginosa*. Фиг. 1А: структура Pvd I типа (см. Birsht et al., 1989); фиг. 1В: структура Pvd II типа (см. Birsht et al., 1989); фиг. 1С: структура Pvd III типа (Gipp et al., 1991); фиг. 1D: R, присоединенный к хромофорной части, может представлять собой сукцинильную, сукцинамидную или α -кетоглутарилловую боковую цепь; и фиг. 1Е: структура пиохелина (Brandel et al., 2011).

Фиг. 2: представлены типичные измерения скорости ассоциации и скорости диссоциации с помощью поверхностного плазмонного резонанса связывания Pvd I s (+Fe) с мутеином липокалина под SEQ ID NO: 16 (фиг. 2А), связывание Pvd II s (+Fe) с мутеином липокалина под SEQ ID NO: 36 (фиг. 2В), связывание Pvd III (+Fe) с мутеином липокалина под SEQ ID NO: 53 (фиг. 2С) и связывание пиохелина (+Fe) с SEQ ID NO: 62 (фиг. 2D). Кроме того, отсутствие связывания соответствующих сидерофоров при 1200 нМ (200 нМ для пиохелина) с отрицательным контролем липокалина под SEQ ID NO: 64 показано на фиг. 2Е-Н.

Фиг. 3: показан иллюстративный профиль специфичности и перекрестной реактивности для мутеина липокалина под SEQ ID NO: 35, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Показано специфичное связывание с сукцинил-, сукцинамид- и α -кетоглутарил-пиовердином II, при этом показано отсутствие связывания с пиовердинами I типа и III типа, пиохелином, энтеробактином и десфероксамином. Для всех анализируемых образцов применяются высокие концентрации, составляющие 2 мкМ.

Фиг. 4: показаны иллюстративные данные из анализа по подавлению роста. Фиг. 4А: для Pvd I-специфичного мутеина под SEQ ID NO: 16 показано подавление роста у Pvd I-специфичного штамма *P. aeruginosa* (ATCC27853) по сравнению с контрольной культурой, выращиваемой без мутеина. Фиг. 4В: для Pvd II-специфичных мутеинов под SEQ ID NO: 19 и 36 показано подавление роста у Pvd II-специфичного штамма *P. aeruginosa* (ATCC15692) по сравнению с контрольной культурой, выращиваемой без мутеина. SEQ ID NO: 36 характеризуется более высокой аффинностью связывания по сравнению с SEQ ID NO: 19, и для нее показано более высокое подавление роста. Фиг. 4С: для Pvd III-специфичного мутеина под SEQ ID NO: 53 показано подавление роста у Pvd III-специфичного штамма *P. aeruginosa* (ATCC33360) по сравнению с контрольной культурой, выращиваемой без мутеина. Фиг. 4D: для Pch-специфичных мутеинов под SEQ ID NO: 62 показано подавление роста у штамма *P. aeruginosa* с нокаутом по Pvd I (ATCC15692 Δ pvdA), захват железа у которого зависит от Pch, по сравнению с контрольной культурой, выращиваемой без мутеина. В данном анализе применяли мутеины липокалина из расчета 10 мкМ.

Фиг. 5: на модели *P. aeruginosa*-индуцированной инфекции легких у мышей показано, что введение SEQ ID NO: 19 за 1 ч до и во время контрольного заражения бактериями предотвращает развитие инфекции у мышей дозозависимым образом. Значимый профилактический эффект наблюдали, начиная с введения SEQ ID NO: 19 из расчета 200 мкг/мышь, с максимальным эффектом из расчета 2000 мкг/мышь.

Фиг. 6: показана аминокислотная последовательность, экспрессируемая с целью кристаллизации, включающая стартовый метионин в положении 1, лизин в положении 2, гексагистидиновую метку в положении 3-8, линкерную область аминокислот DYDIPTT в положении 9-15 (SEQ ID NO: 132), сайт расщепления для протеазы вируса гравировки табака (TEV) ENLYFQG в положении 16-22 (SEQ ID NO: 133), за которым следует аминокислотная последовательность мутеина, представляющего интерес, начиная с положения 23 и далее.

На фиг. 7 показана структура комплекса SEQ ID NO: 31 -Pvd-Fe. Перекрывание двух молекул под SEQ ID NO: 31, т. е. цепи А и цепи В из асимметричной единицы.

Фиг. 8: показаны места взаимодействия SEQ ID NO: 31 и Pvd-Fe. Две молекулы из асимметричной единицы перекрываются. Изображены боковые цепи, взаимодействующие с Pvd-Fe.

Фиг. 9: показан состав Pvd. Атомы кислорода, участвующие в связывании железа, заключены в рамку.

IV. Подробное описание раскрытия

В настоящем раскрытии предусматривается полипептид, характеризующийся специфичностью связывания с пиовердином I, II, III типа или пиохелином, где полипептид предусматривает мутеин hNGAL, который связывается с пиовердином I, II, III типа или пиохелином с поддающейся выявлению аффинностью.

Термины "липокалин 2 человека", или "Lcn 2 человека", или "NGAL человека", или "hNGAL", используемые в данном документе, относятся к зрелому желатиназа-ассоциированному липокалину нейтрофилов (NGAL) человека с номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188. Мутеин липокалина 2 человека по настоящему раскрытию может также обозначаться в данном документе как "мутеин hNGAL". Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, можно применять в качестве предпочтительной "эталонной последовательности", более предпочтительно аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1, применяют в качестве эталонной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL, связывающий пиовердин (I, II или III типа) или пиохелин с поддающейся выявлению аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного цистеинового остатка на другую аминокислоту, например сериновый остаток. В некоторых других вариантах осуществления мутеин, связывающий пиовердин или пиохелин с поддающейся выявлению аффинностью, может включать один или несколько ненативных цистеиновых остатков, замещающих одну или несколько аминокислот hNGAL дикого типа. В соответствии с дополнительным конкретным вариантом осуществления мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием включает в себя по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты на цистеиновый остаток, с образованием тем самым одного или двух цистеиновых мостиков. В некоторых вариантах осуществления указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две петлевые области. В данном документе используется определение этих областей согласно Flower (Flower, 1996, выше, Flower, et al., 2000, выше) и Breustedt et al. (2005, выше).

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию не связывается с энтеробактерином.

В одном аспекте настоящее раскрытие включает различные мутеины hNGAL, которые связывают пиовердин или пиохелин, по меньшей мере, с поддающейся выявлению аффинностью. В данном смысле пиовердин или пиохелин рассматриваются как неприродный лиганд эталонного hNGAL дикого типа, при этом "неприродный лиганд" относится к соединению, которое не связывается с человеческим липокалином 2 дикого типа при физиологических условиях. Путем конструирования hNGAL дикого типа с одной или несколькими мутациями в определенных положениях последовательностей авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что возможна высокая аффинность и высокая специфичность в отношении неприродного лиганда, пиовердина или пиохелина. В некоторых вариантах осуществления в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше нуклеотидных триплетах, кодирующих определенные положения последовательности в человеческом липокаине 2 дикого типа 1, можно осуществлять случайный мутагенез посредством замены в этих положениях на подгруппу нуклеотидных триплетов.

Кроме того, мутеины по настоящему раскрытию могут иметь мутированный аминокислотный остаток в любом одном или нескольких, в том числе по меньшей мере в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати положениях последовательности, соответствующих определенным положениям последовательности линейной полипептидной последовательности hNGAL, таким как положения последовательности 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 и 145 в линейной полипептидной последовательности NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

Мутеин по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) из "исходного" белкового каркаса (такого как hNGAL) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием может также нести одну или несколько мутаций аминокислот в положении/положениях последовательности при условии, что такая мутация, по меньшей мере, существенным образом не препятствует активности связывания и укладке мутеина или не нарушает их. Такие мутации очень легко можно выполнять на уровне ДНК с применением общепринятых стандартных способов (Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т. е. аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности в отношении полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения в пределах 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; а также 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также можно вводить неконсервативные изменения в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения одиночных аминокислотных остатков также возможна либо вставка, либо удаление одной или нескольких непрерывных аминокислот из первичной структуры липокаина 2 человека при условии, что такие удаления или вставка приводят к образованию мутеина со стабильной укладкой/функционального мутеина (например, мутеины hNGAL с усеченным N- и C-концом). В таком мутеине, например, один или несколько аминокислотных остатков добавляют или удаляют на N- или C-конце полипептида. Как правило, такой мутеин может иметь аминокислотную последовательность, по меньшей мере на приблизительно 70%, в том числе по меньшей мере на приблизительно 80%, например по меньшей мере на приблизительно 85% идентичную аминокислотной последовательности зрелого hNGAL.

В качестве иллюстративного примера настоящее раскрытие также охватывает мутеины hNGAL, определяемые выше, в которых четыре аминокислотных остатка (G-N-I-K; положения 95-98; SEQ ID NO: 130) линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL были удалены (например, SEQ ID NO: 46).

Аминокислотная последовательность мутеина hNGAL, раскрытого в данном документе, характери-

зуется высокой степенью идентичности с последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1) по сравнению с идентичностью последовательности с другими липокалинами. В соответствии с данным общим контекстом аминокислотная последовательность мутеина по настоящему раскрытию, по меньшей мере, фактически аналогична аминокислотной последовательности природного hNGAL дикого типа при условии, что при выравнивании возможны гэпы (как определено ниже), которые являются результатом добавлений или удалений аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина по настоящему раскрытию, которая является фактически аналогичной последовательностям зрелого hNGAL, в некоторых вариантах осуществления имеет последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную или гомологичную последовательности, по меньшей мере на 75% идентичную или гомологичную последовательности, по меньшей мере на 80% идентичную или гомологичную последовательности, по меньшей мере на 82% идентичную или гомологичную последовательности, по меньшей мере на 85% идентичную или гомологичную последовательности, по меньшей мере на 87% идентичную или гомологичную последовательности или по меньшей мере на 90% идентичную или гомологичную последовательности, в том числе по меньшей мере на 95% идентичную или гомологичную последовательности зрелого hNGAL при условии, что сохраняется измененное положение или последовательность и что возможны один или несколько гэпов.

Мутеин по настоящему раскрытию, используемый в данном документе, "специфически связывается" с мишенью (например, пиовердином или пиохелином), если он способен различать данную мишень и одну или несколько эталонных мишеней, поскольку специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. "Специфичное связывание" можно определять, например, на основании проведения вестерн-блоттинга, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-тестов, FACS, ИНС и картирования с применением пептидов.

В одном варианте осуществления мутеины по настоящему раскрытию являются слитым на их N-конце и/или C-конце с партнером по слиянию, представляющим собой белковый домен, который увеличивает время полужизни мутеина в сыворотке крови. В дополнительных конкретных вариантах осуществления белковый домен представляет собой Fc-часть иммуноглобулина, CH3-домен иммуноглобулина, CH4-домен иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок.

В другом варианте осуществления мутеины по настоящему раскрытию конъюгируют с соединением, которое увеличивает время полужизни мутеина в сыворотке крови. Более предпочтительно, мутеин конъюгируют с соединением, выбранным из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидротилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, CH3-домена иммуноглобулина, CH4-домена иммуноглобулина, альбумин-связывающего пептида или альбумин-связывающего белка.

В еще одном варианте осуществления настоящее раскрытие относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин, раскрытый в данном документе. Настоящее раскрытие охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Мутеины, специфичные к пиовердину

Исследование изолятов *P. aeruginosa* на данный момент способствовало классификации пиовердина на три различные типа (Meyer et al., Use of Siderophores to Type Pseudomonads: The Three Pseudomonas Aeruginosa Pyoverdine Systems, Microbiology, 1997; vol. 143 no. 135-43). Примерно 42% изолятов *P. aeruginosa* имеют систему пиовердина, идентичную таковой Pvd I типа, 42% изолятов *P. aeruginosa* функционируют аналогично Pvd II типа, в то время как 16% изолятов *P. aeruginosa* принадлежат к Pvd III типа, соответственно (Cornelis et al., 1989a; табл. 4). Каждый тип имеет по три представителя (подтипа), отличающиеся боковой цепью, которая представляет собой сукцинил, сукцинамид или α -кетоглутарил, а именно сукцинил-Pvd I типа, сукцинамид-Pvd I типа, α -кетоглутарил-Pvd I типа, сукцинил-Pvd II типа, сукцинамид-Pvd II типа, α -кетоглутарил-Pvd II типа, сукцинил-Pvd III типа, сукцинамид-Pvd III типа и α -кетоглутарил-Pvd III типа.

Для борьбы с *P. aeruginosa*, вырабатывающей различные типы пиовердина, в настоящем раскрытии предусматриваются мутеины hNGAL, направленные против различных типов пиовердина. В настоящем раскрытии также предусмотрены полезные варианты применения таких мутеинов, способы получения пиовердин-связывающих мутеинов hNGAL, описанных в данном документе, а также композиции, содержащие такие мутеины. Пиовердин-связывающие мутеины hNGAL по настоящему раскрытию, а также их композиции можно применять в способах выявления пиовердина в образце или в способах связывания пиовердина в субъекте. Ранее не были описаны такие мутеины hNGAL, характеризующиеся этими признаками, связанными со способами применения, предусмотренными в настоящем изобретении.

Пиовердин не связывался природным hNGAL дикого типа, хотя природный лиганд hNGAL, энтеробактин, состыковывается с чашечкой hNGAL с высокой аффинностью. Таким образом, пиовердин представляет собой фактор вирулентности и скрытый сидерофор, который избегает распознавания с помощью hNGAL, что позволяет *P. aeruginosa* вызывать инфекцию (Peek et al., Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012).

Соответственно целью настоящего раскрытия является получение мутеинов, происходящих из желатиназа-ассоциированного липокалина нейтрофилов человека (NGAL), также называемого липокалин 2 человека, при этом мутеины, в отличие от природного hNGAL дикого типа, характеризуются высокой специфичностью к пиовердину.

Иллюстративные мутеины, специфические к пиовердину

В одном аспекте настоящее раскрытие относится к новым мутеинам липокалина 2 человека (Lcn2 человека или hNGAL) со специфичным связыванием, которые являются специфичными в отношении одного типа пиовердина, такого как Pvd I типа, Pvd II типа или Pvd III типа.

Один вариант осуществления настоящего раскрытия относится к мутеину, который способен связывать один тип пиовердина с поддающейся выявлению аффинностью, например аффинностью, измеряемой по K_D , составляющей приблизительно 200 нМ или меньше, например приблизительно 150 нМ или меньше.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предусматривается мутеин hNGAL, который способен связывать Pvd I типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше, например 15 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связывать сукцинил-Pvd I типа, сукцинамид-Pvd I типа и α -кетоглутарил-Pvd I типа в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен ингибировать захват железа, опосредованный сукцинил-пиовердином I типа, при значении IC_{50} , составляющем приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен подавлять рост бактерий штамма Pvd I в анализе, фактически описанном в примере 8.

В связи с этим настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид предусматривает мутеин hNGAL, и указанный 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, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 и 136 по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL, и при этом указанный полипептид связывает Pvd I типа, в том числе сукцинил-Pvd I типа, сукцинамид-Pvd I типа и α -кетоглутарил-Pvd I типа.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL, связывающий Pvd I типа по настоящему раскрытию, включает в себя в одном или нескольких 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: 1) один или несколько из следующих мутированных аминокислотных остатков:

Leu 36 → Asn, Thr, Val,
Trp или Phe; Ala 40 → Gly, Asn, Thr или Phe; Ile 41 → Arg, Ala,
Thr, Phe или Trp; Gln 49 → Ile, Leu, Val, Ala или Pro; Tyr 52 →
Met, Trp или Pro; Ser 68 → Asp, Val или Glu; Leu 70 → Gln, Trp,
Asp или Thr; Arg 72 → Trp, Ala, Ser, Leu, Pro или Glu; Lys 73 →
Asp, Leu, Ala, Glu или Asn; Asp 77 → Arg, Leu, Tyr, Ser, Gln,
Thr, Ile или Asn; Trp 79 → Gln, Asp, Ser, Arg, Met или Glu; Arg
81 → Gln, Gly, Ile, Glu, His или Asp; Asn 96 → His, Ile, Gly,
Tyr или Asp; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe или Tyr; Leu 103
→ Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp или Asn; Tyr 106 → His,
Gln или Phe; Lys 125 → Arg, Ser, Trp, Tyr, Val или Gly; Ser 127
→ Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr, His, Ile, Val или Asp; Tyr 132 → Trp,
Asn, Gly или Lys; и Lys 134 → Asn, His, Trp, Gly, Gln или Asp.

в некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все мутированные аминокислотные остатки в данных положениях последовательности зрелого hNGAL.

Кроме того, мутеин hNGAL, связывающий Pvd I типа в соответствии с настоящим раскрытием, может также содержать следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Lys 46 → Glu;
Thr 54 → Val или Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp
или Gln; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser или Asn и Thr 136 → Ala.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию, который связывается с Pvd I типа, включает в себя следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

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

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

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

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

Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 →

Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr;
Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

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

Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln
49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 →
Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp
77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 →
Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His;
Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr
136 → Ala;

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

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

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

В остаточной области, т.е. области, не относящейся к положениям последовательности 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 и 136, мутеин hNGAL по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-18 или их фрагмента или варианта.

Аминокислотная последовательность мутеина hNGAL, связывающего Pvd I типа по настоящему раскрытию, может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, например 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%, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-18.

Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина hNGAL с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-18, структурные гомологи которых характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющих более чем приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% по отношению к указанному мутеину hNGAL.

Мутеин hNGAL, связывающий Pvd I типа в соответствии с настоящим раскрытием, можно получить посредством мутагенеза природной формы липокалина 2 человека. В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Однако любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из иллюстративных замен ниже, предусмотрена в том случае, если мутеин сохраняет свою способность связываться с Pvd I типа и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том отношении, что он характеризуется 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 высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

В другом аспекте в настоящем раскрытии предусматривается мутеин hNGAL, который связывает Pvd II типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше, например 5 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В еще одних дополнительных вариантах осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связывать сукцинил-Pvd II типа, сукцинамид-Pvd II типа и α-кетоглутарил-Pvd II типа в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен ингибировать захват железа, опосредованный сукцинил-пиовердином II типа, при значении IC_{50} , составляющем приблизительно 150 нМ или меньше, в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен подавлять рост бактерий штамма Pvd II в анализе, фактически описанном в примере 8.

В некоторых других вариантах осуществления мутеин способен подавлять или ослаблять рост штаммов *P. aeruginosa*, экспрессирующих пиовердин II типа в анализе, фактически описанном в примере 10.

В данном отношении настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид включает в себя мутеин hNGAL, и указанный hNGAL по сравнению с линейной 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, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134, и при этом указанный полипептид связывается с Pvd II.

В некоторых вариантах осуществления Pvd II типа-связывающий мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя в одном или нескольких положениях последовательности 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1) один или несколько из следующих мутированных аминокислотных остатков:

Leu 36 → Asn, Ile или Val; Ala 40 → Glu, Gly, Asn, Thr или His; Ile 41 → Arg, Val или Thr; Gln 49 → Gly, Ala или Pro; Tyr 52 → Asn, Gly, Trp или Pro; Ser 68 → Asp, Arg или Glu; Leu 70 → Arg или Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser или Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln или Arg; Asp 77 → His, Ile, Met, Lys, Gly или Asn; Trp 79 → Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe или Trp; Arg 81 → Glu, Ser, Tyr или Asp; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn или Ala; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe или Tyr; Leu 103 → Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp или Val; Tyr 106 → Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met или Phe; Lys 125 → Ala, Ile или Asn; Ser 127 → Lys, Arg, Ser, Met, Asp или Asn; Tyr 132 → Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly или Val; и Lys 134 → Trp или Tyr.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все мутированные аминокислотные остатки в данных положениях последовательности зрелого hNGAL.

Кроме того, Pvd II типа-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием может также содержать следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp или Gln и Cys 87 → Ser.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию, который связывается с Pvd II типа, включает в себя следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В остаточной области, т.е. области, не относящейся к положениям последовательности 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134, мутеин hNGAL по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-37 или их фрагмента или варианта.

Аминокислотная последовательность Pvd II типа-связывающего мутеина hNGAL по настоящему раскрытию может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, например, 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%, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-37.

Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина hNGAL с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-37, структурные гомологи которых характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющих более чем приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% по отношению к указанному мутеину hNGAL.

Pvd II типа-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием можно получить

посредством мутагенеза природной формы липокалина 2 человека. В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Однако любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из иллюстративных замен ниже, предусмотрена в том случае, если мутеин сохраняет свою способность связываться с Pvd I типа и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том отношении, что он характеризуется 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 высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии предусматривается мутеин hNGAL, который связывает Pvd III типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше, например 10 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В еще одном дополнительном варианте осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связываться с сукцинилом Pvd III типа, сукцинамидом Pvd III типа и α -кетоглутарилем Pvd II типа, в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен ингибировать захват железа, опосредованный пиовердином III типа, со значением IC_{50} , составляющим приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен подавлять рост бактерий штамма Pvd II в анализе, фактически описанном в примере 8.

В данном отношении настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид включает в себя мутеин hNGAL, и указанный hNGAL по сравнению с линейной 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, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 и 145, и при этом указанный полипептид связывается с Pvd III.

В некоторых вариантах осуществления Pvd III типа-связывающий мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя в одном или нескольких 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: 1) один или несколько из следующих мутированных аминокислотных остатков:

Leu 36 → Phe или Glu; Ala
40 → Trp, Leu или Arg; Ile 41 → Met, Arg, Ala, Leu или Trp; Gln
49 → His, Ile, Arg, Lys, Met или Pro; Tyr 52 → Asn, Tyr, Arg,
Ser или Met; Ser 68 → Asp, Asn, Glu или Gln; Leu 70 → Lys, Asn
или Arg; Arg 72 → Leu, Arg, Gln или Tyr; Lys 73 → His, Leu, Ala,
Pro, Gln или Tyr; Asp 77 → Ala, Ile, Lys, Gln или Arg; Trp 79 →
Ser или Asp; Arg 81 → His, Ala, Ser или Val; Asn 96 → Met, Ile,
Arg, Gly, Leu или Val; Tyr 100 → Ala, Ile, Asn, Pro или Asp; Leu
103 → Gln, Gly, Phe или Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp или
Thr; Ser 127 → Val, His, Ile, Phe или Ala; Tyr 132 → Phe; и Lys
134 → Trp, Gln или Glu.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все мутированные аминокислотные остатки в данных положениях последовательности зрелого hNGAL.

Кроме того, Pvd III типа-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием может также содержать следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Leu 42 → Arg;
Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Asp 47 → Asn; Asn 65 → Asp; Cys 87 →
Ser; Ser 105 → Pro и Thr 145 → Pro.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию, который связывается с Pvd III типа, включает в себя следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp

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

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

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

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

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

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

В остаточной области, т. е. области, не относящейся к положениям последовательности 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 и 145, мутеин hNGAL по настоящему раскрытию может включать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-53 или их фрагмента или варианта.

Аминокислотная последовательность Pvd III типа-связывающего мутеина hNGAL по настоящему раскрытию может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, например, 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%, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-53.

Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина hNGAL с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-53, структурные гомологи которых характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющих более чем приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% по отношению к указанному мутеину hNGAL.

Pvd III типа-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием можно получить посредством мутагенеза природной формы липокалина 2 человека. В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Однако любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из иллюстративных замен ниже, предусмотрена в том случае, если мутеин сохраняет свою способность связываться с Pvd I типа и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том отношении, что

он характеризуется 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 высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

Варианты применения мутеинов, специфичных к пиовердину

Пиовердины являются основными сидерофорами псевдомонад, таких как *P. aeruginosa*. Эксперименты *in vitro* свидетельствовали о потенциальной роли пиовердина *P. aeruginosa* в высвобождении железа из ферритрансферрина, однако способность пиовердина конкурировать за железо *in vivo* была продемонстрирована лишь недавно (Meyer et al., 1996, *Infection and Immunity*, 64, p. 518-523). С помощью мышинной модели ожоговой травмы было отмечено, что отсутствие выработки пиовердина у мутантов, выращенных из вирулентного родительского штамма, коррелировало с потерей вирулентности таких мутантов, и что вирулентность восстанавливалась при добавлении гомологичного пиовердина, происходящего из штамма дикого типа. Кроме того, добавление гетерологичного пиовердина не восстанавливало вирулентность последних мутантов. Таким образом, точное знание пиовердин-опосредованной системы захвата железа, использованной конкретным изолятом *P. aeruginosa* во время инфицирования, является предпосылкой для развития новых путей лечения инфекций *P. aeruginosa* посредством бактериального метаболизма железа, например блокированием биосинтеза пиовердина или пиовердин-опосредованного транспорта железа.

Таким образом, в медицине существуют многочисленные возможные варианты применения пиовердин-связывающих мутеинов по настоящему раскрытию. В одном дополнительном аспекте настоящее раскрытие относится к применению пиовердин-связывающего мутеина, раскрытого в данном документе, для выявления пиовердина (I, II или III типа) в образце, а также соответствующего способа диагностики.

Настоящее раскрытие также включает применение одного или нескольких пиовердин-связывающих мутеинов, как описано в отношении образования комплекса с пиовердином (I, II или III типа).

Таким образом, в другом аспекте настоящего раскрытия раскрытые мутеины используются для выявления пиовердина (I, II или III типа). Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиовердин, способствуя тем самым образованию комплекса между мутеинами и пиовердином (I, II или III типа), и выявления комплекса с помощью подходящего сигнала.

Поддающийся выявлению сигнал может быть вызван меткой, как объяснялось выше, или изменением физических свойств вследствие связывания, т.е. самого образования комплекса. Одним примером является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого меняется во время связывания партнеров по связыванию, из которых один иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

Пиовердин-связывающие мутеины, раскрытые в данном документе, можно также использовать для отделения пиовердина (I, II или III типа). Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиовердин (I, II или III типа), способствуя тем самым образованию комплекса между мутеинами и пиовердином (I, II или III типа), и отделения комплекса от образца.

При использовании раскрытых мутеинов для выявления пиовердина, а также отделения пиовердина (I, II или III типа), мутеины и/или пиовердин, или их домен или фрагмент можно иммобилизовать на подходящей твердой фазе.

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии описывается диагностический или аналитический набор, содержащий пиовердин-связывающий мутеин в соответствии с настоящим раскрытием.

В дополнение к его применению в диагностике, в еще одном аспекте настоящее раскрытие охватывает применение пиовердин-связывающего мутеина по настоящему раскрытию или композиции, содержащей такой мутеин, для связывания пиовердина (I, II или III типа) у субъекта и/или подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта.

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии описывается способ связывания пиовердина (I, II или III типа) у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества одного или нескольких пиовердин-связывающих мутеинов по настоящему раскрытию или одной или нескольких композиций, содержащих такие мутеины.

В еще одном аспекте настоящее раскрытие включает способ подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества одного или нескольких пиовердин-связывающих мутеинов по настоящему раскрытию или одной или нескольких композиций, содержащих такие мутеины.

Мутеины, специфичные к пиохелину

Кроме того, в настоящем раскрытии удовлетворяется потребность в альтернативных ингибиторах пиохелина путем предоставления мутеинов hNGAL, которые связываются с пиохелином, и их полезных вариантах применения. Соответственно, в настоящем раскрытии также обеспечиваются способы получения и применения пиохелин-связывающих мутеинов, описанных в данном документе, а также композиции, которые можно применять в способах выявления пиохелина в образце или в способах связывания пиохелина у субъекта. Ранее не были описаны такие мутеины hNGAL, характеризующиеся этими при-

знаками, связанными со способами применения, предусмотренными в настоящем изобретении.

Иллюстративные мутеины, специфичные к пиохелину

В одном аспекте настоящее раскрытие связано с мутеином hNGAL, который связывает пиохелин в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше, например 1 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В еще одном дополнительном варианте осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связываться с пиохелином в комплексе с железом, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 500 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В еще одном дополнительном варианте осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связываться с пиохелином без комплекса с железом, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В еще одном дополнительном варианте осуществления один или несколько мутеинов hNGAL по настоящему раскрытию способны связываться с пиохелином в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше, например при измерении в анализе ELISA, описанном в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен ингибировать захват железа, опосредованный пиохелином, со значением IC_{50} , составляющим приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления мутеин способен подавлять бактериальный рост нокаута Pvd I ($\Delta pvdA$) в анализе, фактически описанном в примере 8.

В данном отношении настоящее раскрытие относится к полипептиду, где указанный полипептид включает в себя мутеин hNGAL, и указанный hNGAL по сравнению с линейной 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, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 и 141, и при этом указанный полипептид связывается с пиохелином.

В некоторых вариантах осуществления пиохелин-связывающий мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя в одном или нескольких положениях последовательности 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1) один или несколько из следующих мутированных аминокислотных остатков:

Leu 36 → His, Met или Val; Ala 40 → Ile, Gln, Tyr или Phe; Ile 41 → Leu, His или Trp; Gln 49 → His, Arg, Ser или Ala; Tyr 52 → Leu, Trp или Pro; Ser 68 → Asp или His; Leu 70 → Arg или Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser или Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln или Arg; Asp 77 → Arg, Thr, Pro или Asp; Trp 79 → Ala, Arg, Lys или Asp; Arg 81 → Thr, Ile или Trp; Asn 96 → Met, Asn, Pro или Ala; Tyr 100 → Gly, His или Glu; Leu 103 → Gly, Met, His или Gln; Tyr 106 → Met, Gly, Arg или Trp; Lys 125 → Trp, Phe, Gly или Leu; Ser 127 → Arg, Trp, Asp или Ile; Tyr 132 → Ala, Glu или Thr; и Lys 134 → Leu, Val, Asn или Phe.

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию включает в себя два или более, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все мутированные аминокислотные остатки в данных положениях последовательности зрелого hNGAL.

Кроме того, пиохелин-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием может также содержать следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg or Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser и Thr 141 → Ala.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL по настоящему раскрытию, который связывается с пиохелином, включает в себя следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77→ Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;

Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77→ Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125→ Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val;

Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77→ Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;

Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; или

Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77→ Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.

В остаточной области, т.е. области, не относящейся к положениям последовательности 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 и 141, мутеин hNGAL по настоящему раскрытию может включать в себя аминокислотную последовательность дикого типа (природную) за пределами мутированных положений аминокислотной последовательности.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин в соответствии с настоящим раскрытием содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-63 или их фрагмента или варианта.

Аминокислотная последовательность пиохелинсвязывающего мутеина hNGAL по настоящему рас-

крытию может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, например, 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%, в том числе на по меньшей мере 95% идентичностью с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-63.

Настоящее раскрытие также включает структурные гомологи мутеина hNGAL с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-63, структурные гомологи которых характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющих более чем приблизительно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% по отношению к указанному мутеину hNGAL.

Пиохелин-связывающий мутеин hNGAL в соответствии с настоящим раскрытием можно получить посредством мутагенеза природной формы липокалина 2 человека. В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Однако любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из иллюстративных замен ниже, предусмотрена в том случае, если мутеин сохраняет свою способность связываться с Pvd I типа и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том отношении, что он характеризуется 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 высокой идентичностью с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

2. Варианты применения мутеинов, специфичных к пиохелину

Пиохелин (Pch) является одним из двух основных сидерофоров, вырабатываемых и секретируемых *Pseudomonas aeruginosa* для ассимиляции железа. Он хелатирует железо во внеклеточной среде и транспортирует его в клетку с помощью специфического транспортера наружной мембраны, FptA. Pch в значительной степени хелатирует двухвалентные металлы, такие как Zn(II) ($pZn=11,8$ при $p[H] 7,4$) и Cu(II) ($pCu=14,9$ при $p[H] 7,4$) и образует главным образом комплексы 1:2 (M^{2+}/Pch). Сидерофоры не только задействованы в перемещении железа (III), но и с большей вероятностью проявляют другие специфичные биологические функции в тонком гомеостазе металлов в микроорганизмах.

Таким образом, в медицине существуют многочисленные возможные варианты применения мутеинов с аффинностью связывания к пиохелину по настоящему раскрытию. В одном дополнительном аспекте настоящее раскрытие относится к применению такого мутеина, раскрытого в данном документе, для выявления пиохелина в образце, а также соответствующего способа диагностики.

Настоящее раскрытие также включает в себя применение одного или нескольких мутеинов с аффинностью связывания к пиохелину, как описано в отношении образования комплекса с пиохелином.

Таким образом, в другом аспекте настоящего раскрытия раскрытые мутеины используются для выявления пиохелина. Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиохелин, способствуя тем самым образованию комплекса между мутеинами и пиохелином, и выявления комплекса с помощью подходящего сигнала.

Поддающийся выявлению сигнал может быть вызван меткой, как объяснялось выше, или изменением физических свойств вследствие связывания, т. е. самого образования комплекса. Одним примером является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого меняется во время связывания партнеров по связыванию, из которых один иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

Мутеины, раскрытые в данном документе, можно также использовать для отделения пиохелина. Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиохелин, способствуя тем самым образованию комплекса между мутеинами и пиохелином, и отделения комплекса от образца.

При использовании раскрытых мутеинов для выявления пиохелина, а также отделения пиохелина, мутеины и/или пиохелин или их домен или фрагмент можно иммобилизовать на подходящей твердой фазе.

Соответственно, можно определить наличие или отсутствие молекулы, такой как пиохелин, например в образце, а также ее концентрацию или содержание.

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии описывается диагностический или аналитический набор, содержащий мутеин с аффинностью связывания к пиохелину в соответствии с настоящим раскрытием.

В дополнение к его применению в диагностике, в еще одном аспекте настоящее раскрытие охватывает применение такого мутеина по настоящему раскрытию или композиции, содержащей такой мутеин, для связывания пиохелина у субъекта и/или подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта.

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии описывается способ связывания пиохелина у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества одного или нескольких мутеинов с аффинностью связывания к пиохелину по настоящему раскрытию или одной или нескольких композиций, содержащих такой мутеин.

В еще одном аспекте настоящее раскрытие включает способ подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества одного или нескольких мутеинов с аффинностью связывания к пиохелину по настоящему раскрытию или одной или нескольких композиций, содержащих такой мутеин.

С. Композиции, содержащие пиовердин-связывающий мутеин и/или пиохелин-связывающий мутеин и комбинацию мутеинов

P. aeruginosa представляет собой вид бактерии, которая широко распространена в окружающей среде и способна вызывать очень серьезные инфекции у пациентов в предрасполагающих условиях, таких как кистозный фиброз. *P. aeruginosa* синтезирует два основных сидерофора, пиовердин (Pvd) и пиохелин (Pch), для обеспечения своих потребностей в железе (III). Считается, что биопленочный способ роста является определяющим для персистентных инфекций *P. aeruginosa* (Costerton et al., 1999; Singh et al., 2000), а двойная экспрессия генов Pvd и Pch необходима для нормального развития биопленки (Banin et al., 2005).

Учитывая, что *P. aeruginosa* продуцирует впечатляющее количество факторов вирулентности, причем все они выполняют роль в ее патогенности, предпочтительной стратегией для эффективного подавления вирулентности *P. aeruginosa* является направленность на несколько факторов вирулентности.

Для данной цели настоящее раскрытие охватывает применение (i) первого мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину I типа, (ii) второго мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину II типа, (iii) третьего мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину III типа, и/или (iv) четвертого мутеина или его полипептида, специфичных к пиохелину, для связывания пиовердина I, II, III типа и/или пиохелина у субъекта. Такое применение предусматривают стадию введения субъекту эффективного количества (i) первого мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину I типа, (ii) второго мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину II типа, (iii) третьего мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину III типа, и/или (iv) четвертого мутеина или его полипептида, специфичных к пиохелину. Настоящее раскрытие также рассматривает применение (i) первого мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину I типа, (ii) второго мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину II типа, (iii) третьего мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину III типа, и/или (iv) четвертого мутеина или его полипептида, специфичных к пиохелину, для предотвращения или уменьшения захвата железа *P. aeruginosa* у субъекта посредством пиохелина и/или пиовердина. Аналогично, в настоящем раскрытии раскрывается применение (i) первого мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину I типа, (ii) второго мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину II типа, (iii) третьего мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину III типа, и/или (iv) четвертого мутеина или его полипептида, специфичных к пиохелину, для лечения или ослабления инфекции *P. aeruginosa* и/или образования биопленки у субъекта. В некоторых дополнительных вариантах осуществления инфекция *P. aeruginosa* может представлять собой острую или хроническую инфекцию.

Первый, второй, третий и/или четвертый мутеины или их полипептиды можно вводить в комбинации, в том числе одновременно, совместно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления первый, второй, третий и/или четвертый мутеины или их полипептиды можно включать в композицию, которую можно вводить. Композиция может включать эффективное количество первого, второго, третьего и/или четвертого мутеинов или их полипептидов в качестве активных компонентов, в сочетании по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным средством, разбавителем или носителем. Первый, второй, третий и/или четвертый мутеины или их полипептиды также можно вводить независимо друг от друга, в том числе с индивидуальными интервалами в независимых временных точках.

В некоторых вариантах осуществления используемый в настоящем раскрытии мутеин, специфичный к пиовердину (I, II или III типа), способен связываться с пиовердинами (соответственно I, II или III типа) с поддающейся выявлению аффинностью, т.е. с константой диссоциации, составляющей по меньшей мере 200 нМ, в том числе приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 25 нМ или приблизительно 15 нМ. В некоторых вариантах осуществления используемый в настоящем раскрытии мутеин, специфичный к пиовердину, способен связываться с пиохелином с поддающейся выявлению аффинностью, т.е. с константой диссоциации, составляющей по меньшей мере 200 нМ, в том числе приблизительно 100 нМ, приблизительно 50 нМ, приблизительно 25 нМ или приблизительно 15 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления мутеин из комбинации в соответствии с настоящим раскрытием связывается соответственно с пиовердином (I, II или III типа) или пиохелином, с константой диссоциации пиовердина (I, II или III типа соответственно) или пиохелина, составляющей по меньшей мере приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 0,1 нМ, приблизительно 10 пМ или даже меньше. Таким образом, в настоящем раскрытии обеспечивается комбинация (i) мутеина hNGAL, который характеризуется поддающейся выявлению аффинностью к пиовердину I типа (Pvd I s, sa, α KG +/-Fe), (ii) мутеина hNGAL, который характеризуется поддающейся выявлению аффинностью к пиовердину II типа (Pvd II s, sa, α KG +/-Fe), (iii) мутеина hNGAL, который характеризуется поддающейся выяв-

лению аффинностью к пиовердину III типа (Pvd III s, sa, α KG +/-Fe) и/или (iv) мутеина hNGAL, который характеризуется поддающейся выявлению аффинностью к пиохелину (Pch +/- Fe).

Дополнительные детали в отношении мутеинов hNGAL с поддающейся выявлению аффинностью к пиовердину можно найти в разделе А настоящего раскрытия.

В особо предпочтительном варианте осуществления мутеин, который является специфичным к пиовердину I типа, показан в любой из SEQ ID NO: 2-18. В особо предпочтительном варианте осуществления мутеин, который является специфичным к пиовердину II типа, показан в любой из SEQ ID NO: 19-37. В особо предпочтительном варианте осуществления мутеин, который является специфичным к пиовердину III типа, показан в любой из SEQ ID NO: 38-53.

Дополнительные детали в отношении мутеинов hNGAL с поддающейся выявлению аффинностью к пиохелину были раскрыты в разделе В настоящего раскрытия.

В предпочтительном варианте осуществления мутеин, который является специфичным к пиохелину, показан в любой из SEQ ID NO: 54-63.

Настоящее раскрытие также относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно из следующего: (i) первый мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину I типа, (ii) второй мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину II типа, (iii) третий мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину III типа, и (iv) четвертый мутеин или его полипептид, специфичные к пиохелину, композицию которых можно использовать в способе связывания пиовердина I, II, III типа и/или пиохелина.

Настоящее раскрытие относится к комбинации первого мутеина или его полипептида или композиции, второго мутеина или его полипептида или композиции, третьего мутеина или его полипептида или композиции и/или четвертого мутеина или его полипептида или его композиции. Один из этих мутеинов может связываться с пиовердином (I, II или III типа) в качестве неприродной мишени с поддающейся выявлению аффинностью. Один из этих мутеинов может связываться с пиохелином в качестве неприродной мишени с поддающейся выявлению аффинностью. Таким образом, соответствующий мутеин связывается соответственно с пиовердином I, II, III типа или пиохелином в качестве неприродной мишени. Термин "неприродная мишень" относится к соединению, которое не связывается с соответствующим липокалином (hNGAL дикого типа) в физиологических условиях. Например, первый мутеин или его полипептид или композиция связывается с пиовердином (I, II или III типа) или пиохелином, и второй, третий или четвертый мутеин или их полипептид или композиция может связываться соответственно с пиохелином или другим типом пиовердина, или наоборот. Комбинацию первого, второго, третьего и/или четвертого мутеинов или их полипептидов или композиций можно представлять в различных формах и направлениях.

В еще одном аспекте в настоящем раскрытии описывается способ связывания пиовердина I, II, III типа и/или пиохелина у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере одно из следующего: (i) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину I типа, (ii) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину II типа, (iii) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину III типа, и (iv) мутеин или его полипептид, специфичные к пиохелину. В некоторых вариантах осуществления такая композиция содержит два или более, например три или даже все из (i)-(iv).

В еще одном аспекте настоящее раскрытие включает в себя способ подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере одно из следующего: (i) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину I типа, (ii) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину II типа, (iii) мутеин или его полипептид, специфичные к пиовердину III типа, и (iv) мутеин или его полипептид, специфичные к пиохелину. В некоторых вариантах осуществления такая композиция содержит два или более, например три или даже все из (i)-(iv).

Настоящее раскрытие также включает применение (i) первого мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину I типа, (ii) второго мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину II типа, (iii) третьего мутеина или его полипептида, специфичных к пиовердину III типа, и/или (iv) четвертого мутеина или его полипептида, специфичных к пиохелину, для образования комплекса с пиовердином I, II, III типа и/или пиохелином.

Таким образом, в другом аспекте настоящего раскрытия раскрытые мутеины или полипептиды можно использовать для выявления пиовердина и пиохелина. Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов или полипептидов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиовердин и/или пиохелин, способствуя тем самым образованию комплекса соответственно между мутеинами или полипептидами и пиовердином и/или между мутеинами и пиохелином, и выявления комплекса с помощью подходящего сигнала.

Поддающийся выявлению сигнал может быть вызван меткой, как объяснялось выше, или изменением физических свойств вследствие связывания, т.е. самого образования комплекса. Одним примером является поверхностный плазмонный резонанс, значение которого меняется во время связывания партнеров по связыванию, из которых один иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

Мутеины или полипептиды, раскрытые в данном документе, можно также использовать для отде-

ления пиовердина и/или пиохелина. Такое применение может включать стадии приведения в контакт одного или нескольких указанных мутеинов, в подходящих условиях, с образцом, предположительно содержащим пиовердин и/или пиохелин, способствуя тем самым образованию комплекса соответственно между мутеинами и пиовердином и/или между мутеинами и пиохелином, и отделения комплекса от образца.

При использовании раскрытых мутеинов или полипептидов для выявления пиовердина и/или пиохелина, а также отделения пиовердина и/или пиохелина, мутеины и/или пиовердин и пиохелин или их домен или фрагмент можно иммобилизовать на подходящей твердой фазе.

Соответственно можно определить наличие или отсутствие пиовердина и/или пиохелина, например в образце, а также их концентрацию или уровень содержания.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предусматривается набор из частей. Набор включает в себя, в одном или нескольких контейнерах, отдельно или совместно, мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину I типа, или их композицию, мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину II типа, или их композицию, мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину III типа, или их композицию, и/или мутеин или полипептид, специфичные к пиохелину, или их композицию. В некоторых дополнительных предпочтительных вариантах осуществления набор содержит первый контейнер, который включает первый мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину I типа, или их композицию, второй контейнер, который включает в себя второй мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину II типа, или их композицию, третий контейнер, который включает в себя третий мутеин или полипептид, специфичные к пиовердину III типа, или их композицию и/или третий контейнер, который включает в себя четвертый мутеин или полипептид, специфичные к пиохелину, или их композицию. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает в качестве его неотъемлемой части или в качестве одного или нескольких отдельных документов информацию, относящуюся к содержанию или набору и к применению мутеинов или их полипептидов. В некоторых вариантах осуществления набор может включать одну или несколько композиций, которые разработаны для разбавления в разбавителе. Такой разбавитель, например стерильный разбавитель, можно также включать в набор, например в контейнере.

D. Мутеины по настоящему раскрытию

При использовании в данном документе в контексте мутеинов по настоящему раскрытию, которые связываются с пиовердином или пиохелином, термин "специфичный к" подразумевает, что мутеин направлен соответственно против пиовердина или пиохелина, связывается или реагирует с ними. Таким образом, под выражениями "направляясь к", "связываясь с" или "вступая в реакцию с" подразумевается, что мутеин специфически связывается соответственно с пиовердином или пиохелином. Термин "специфически" в данном контексте означает, что мутеин вступает в реакцию с пиовердиновым белком или пиохелиновым белком, как описано в данном документе, и фактически не реагирует с другим белком. Термин "другой белок" подразумевает любой белок, не относящийся соответственно к пиовердиновому или пиохелиновому белку, в том числе белки, тесно связанные с пиовердином или пиохелином или гомологичные им, против которых направлены мутеины, раскрытые в данном документе. Однако пиовердиновые или пиохелиновые белки, фрагменты и/или варианты от видов, отличных от человека, таких как описаны в контексте определения "субъект", не исключаются термином "другой белок". Термин "фактически не связывается" означает, что мутеин по настоящему раскрытию не связывается с другим белком, т.е. характеризуется перекрестной реактивностью, составляющей менее 30%, предпочтительно 20%, более предпочтительно 10%, особо предпочтительно менее 9, 8, 7, 6 или 5%. Вступает ли мутеин в реакцию специфически, как определено в данном документе выше, можно легко исследовать, помимо прочего, с помощью сравнения реакции мутеина липокалина по настоящему раскрытию с пиовердином или пиохелином и реакции указанного мутеина(ов) с другим белком(ами). "Специфическое связывание" можно также определять, например, на основании проведения вестерн-блоттинга, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-тестов, FACS, ИНС и картирования с применением пептидов.

Аминокислотная последовательность мутеина в соответствии с настоящим раскрытием характеризуется высокой идентичностью последовательности по отношению к липокалину 2 человека, по сравнению с идентичностью последовательностей с другим липокалином (также см. выше). В данном общем контексте аминокислотная последовательность мутеина из комбинации в соответствии с настоящим раскрытием по меньшей мере фактически аналогична аминокислотной последовательности соответствующего липокалина (hNGAL дикого типа). Соответствующая последовательность мутеина из комбинации в соответствии с настоящим раскрытием фактически аналогична последовательности зрелого hNGAL, например, идентична по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, в том числе по меньшей мере на 95% последовательности зрелого hNGAL. Разумеется, в данном отношении мутеин по настоящему раскрытию может содержать, для сравнения, замены, как описано в данном документе, которые придают мутеину способность связываться соответственно с пиовердином I, II, III типа или пиохелином. Обычно мутеин hNGAL включает в себя одну или несколько мутаций, по отношению к нативной последовательности hNGAL, -аминокислот в четырех петлях на открытом конце лиганд-связывающего сайта hNGAL. Как объяснялось выше, такие области необ-

ходимы при определении специфичности связывания мутеина с пиовердином I, II, III типа или пиохелином. Полученный из мутеина hNGAL или его гомолог может иметь 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, организованных на конце β -бочковидной структуры, которая расположена напротив природного связывающего кармана.

Мутеин в соответствии с настоящим раскрытием включает в себя одну или несколько, например 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 алином hNGAL, при условии, что такой мутеин будет способен связываться соответственно с пиовердином или пиохелином. Например, мутеин может иметь замену в положении, соответствующем отдаленному положению (т.е. в соответствующем положении) hNGAL. В некоторых вариантах осуществления мутеин из комбинации в соответствии с настоящим раскрытием включает в себя по меньшей мере две аминокислотные замены, в том числе 2, 3, 4, 5 или даже более аминокислотных замен нативной аминокислоты на аргининовый остаток. Соответственно нуклеиновая кислота из белка "эталонного" каркаса, как описано в данном документе, является целью мутагенеза для образования мутеина, который способен связываться соответственно с пиовердином I, II, III типа или пиохелином.

Кроме того, мутеин по настоящему раскрытию может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность на его N- или C-конце, предпочтительно C-конце, такую как Strep-tag, например метку Strep II без нарушения биологической активности (связывания со своей мишенью, например соответственно пиовердином или пиохелином) мутеина.

В частности, для определения того, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, отличающегося от hNGAL дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности hNGAL дикого типа, специалист может использовать средства и способы, хорошо известные в данной области техники, например выравнивания, либо вручную либо с помощью компьютерных программ, таких как BLAST2.0, которая означает средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любая другая подходящая программа, которая применима для создания выравниваний последовательностей. Соответственно, hNGAL дикого типа может выступать в роли "последовательности, найденной в базе данных" или "эталонной последовательности", в то время как аминокислотная последовательность мутеина, отличающегося от hNGAL дикого типа, описанного в данном документе, выступает в роли "запрашиваемой последовательности". Термины "эталонная последовательность" и "последовательность дикого типа" используются в данном документе взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Несмотря на это, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из нижеприведенных иллюстративных замен, рассматривается в том случае, если мутеин сохраняет свою способность связываться соответственно с пиовердином I, II, III типа или пиохелином, и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том отношении, что он по меньшей мере на 60%, например, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или больше идентичный "исходной" последовательности.

Как правило, консервативные замены представляют собой следующие замены, приведенные в соответствии с аминокислотой, подлежащей мутированию, при этом за каждой следует одно или несколько замещений, которые можно считать 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.

Другие замены также допустимы и их можно определить эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительного ориентира приведены следующие восемь групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые обычно можно принимать в качестве консервативных замен одной на другую:

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

Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно вводить более су-

ущественные изменения, такие как следующие, или как дополнительно описано ниже в ссылке к классам аминокислот, и подвергать продукты скринингу на наличие требуемой характеристики. Примерами таких более существенных изменений 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, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val
→ Met, Phe, Ala.

Существенных изменений биологических свойств hNGAL достигают с помощью выбора замен, которые значительно различаются по своему воздействию на сохранение: (а) структуры полипептидного остова в участке замены, например как лист или спиральная конформация, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте мишени или (с) величину боковой цепи. Природные остатки делятся на группы на основе 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 боковой цепи: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин.

Неконсервативные замены повлекут за собой обмен члена одного из этих классов на другой класс. Любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании надлежащей конформации hNGAL, также может быть заменен, как правило серином, для повышения устойчивости к окислению молекулы и предупреждения аберрантного сшивания. С другой стороны, для повышения ее устойчивости можно добавить цистеиновую связь(и).

Любую мутацию, в том числе вставку, как описано выше, можно выполнить очень легко в нуклеиновой кислоте, например на уровне ДНК с помощью общепринятых стандартных способов. Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т. е. аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности в отношении полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения в пределах 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 можно вводить неконсервативные изменения в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения одиночных аминокислотных остатков также возможна вставка или удаление одной или нескольких непрерывных аминокислот с первичной структурой hNGAL при условии, что эти делеции или вставки приводят к образованию мутеина со стабильной укладкой/функционального мутеина.

Модификации аминокислотной последовательности предусматривают направленный мутагенез положений одиночных аминокислот для упрощения субклонирования мутированного гена hNGAL или его частей с помощью включения в состав сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того, эти мутации также можно включить для дополнительного повышения аффинности мутеина к конкретной мишени, такой как пиовердин или пиохелин. Кроме того, мутации можно вводить для модулирования определенных характеристик мутеина, например, чтобы повысить стабильность укладки, стабильность в сыворотке крови, устойчивость белка или растворимость в воде, или чтобы снизить при необходимости склонность к агрегации. Например, природные цистеиновые остатки можно мутировать в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидных мостиков. Также можно намеренно мутировать другое положение аминокислотной последовательности на цистеин для введения новых реакционных групп, например для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропиловый крахмал (HES), биотин, пептиды или белки, или для образования неестественных дисульфидных связей. Полученный тиоловый фрагмент можно использовать для PEGилирования или HESилирования мутеина, например для увеличения времени полужизни соответствующего мутеина в сыворотке крови.

Также можно мутировать другие положения аминокислотной последовательности на цистеин для введения новых реакционных групп, например для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропиловый крахмал (HES), биотин, пептиды или белки, или для образования неестественных дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления, в случае если вышеуказанные фрагменты конъюгируют с мутеином по настоящему раскрытию, конъюгация с боковой цепью аминокислоты может быть предпочтительной. Подходящие боковые цепи аминокислот можно встретить в природе в аминокислотной последовательности hNGAL или их можно ввести с помощью мутагенеза. В случае если подходящий сайт связывания вводят с помощью мутагенеза, то одной возможностью является замещение аминокислоты в соответствующем положении на цистеиновый остаток.

По отношению к мутеину липокалина 2 человека иллюстративные возможности такой мутации для

введения цистеинового остатка в аминокислотную последовательность липокалина, в том числе мутеина липокалина 2 человека, включают введение цистеинового (Cys) остатка по меньшей мере в одно из положений последовательности, которые отвечают положениям последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 человеческой последовательности NGAL дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, где мутеин по настоящему раскрытию липокалина 2 человека имеет последовательность, в которой по сравнению с последовательностью с номером доступа к банку данных SWISS-PROT/UniProt P80188 цистеин был замещен на другой аминокислотный остаток, соответствующий цистеину можно повторно вводить в последовательность. В качестве иллюстративного примера цистеиновый остаток в положении аминокислоты 87 можно вводить в таком случае с помощью восстановления в цистеин, который изначально присутствует в последовательности с номером доступа SWISS-PROT P80188. Полученный тиоловый фрагмент в боковой цепи любых положений аминокислоты 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 и/или 158 можно использовать для ПЕГилирования или HЕСилирования мутеина, например для повышения времени полужизни соответствующего мутеина липокалина 2 человека в сыворотке крови.

В другом варианте осуществления для получения подходящих боковых цепей аминокислот для конъюгирования одного из вышеуказанных соединений с мутеином в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить искусственные аминокислоты с помощью мутагенеза. Как правило, эти искусственные аминокислоты разрабатывают для повышения реакционной способности и, таким образом, для облегчения конъюгации с требуемым соединением. Одним примером такой искусственной аминокислоты, которую можно вводить с помощью искусственной tRNA, является параацетилфенилаланин.

Для некоторых вариантов применения мутеинов, раскрытых в данном документе, может быть предпочтительным использовать их в форме белков слияния. В некоторых вариантах осуществления мутеин по настоящему раскрытию является слитым на N-конце или С-конце с белком, белковым доменом или пептидом, например сигнальной последовательностью и/или аффинной меткой.

Аффинные метки, такие как Strep-tag® или Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), myc-tag, FLAG-tag, His₆-tag или HA-tag, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, которые также способствуют легкому выявлению и/или очистке рекомбинантных белков, являются дополнительными примерами подходящих партнеров по слиянию. Наконец, белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или желтый флуоресцентный белок (YFP), также являются подходящими партнерами по слиянию для мутеинов по настоящему раскрытию.

Как правило, можно метить мутеины по настоящему раскрытию соответствующим химическим соединением или ферментом, которые прямо или косвенно образуют поддающееся выявлению соединение или сигнал в химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Примером физической реакции, и в то же время оптической реакции/маркера, является эмиссия флуоресценции при облучении или эмиссия рентгеновских лучей при использовании радиоактивной метки. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и β-галактозидаза являются примерами ферментативных меток (и в то же время оптических меток), которые катализируют образование хромогенных продуктов реакции. Как правило, все метки, широко используемые для антител (кроме тех, которые используются исключительно с фрагментом сахара в части Fc иммуноглобулинов) также можно использовать для конъюгации с мутеинами по настоящему раскрытию. Мутеины по настоящему раскрытию также можно конъюгировать с любым подходящим терапевтически активным средством, например, для целенаправленной доставки таких средств в конкретную клетку, ткань или орган, или для избирательного воздействия на клетки, например опухолевые клетки, без воздействия на окружающие нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных средств включают радионуклиды, токсины, небольшие органические молекулы и терапевтические пептиды (такие как пептиды, выступающие в роли агонистов/антагонистов рецептора клеточной поверхности, или пептиды, конкурирующие за сайт связывания белка с конкретной клеточной мишенью). Однако мутеины по настоящему раскрытию можно также конъюгировать с терапевтически активными нуклеиновыми кислотами, такими как молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, небольшие интерферирующие РНК, микро-РНК или рибозимы. Такие конъюгаты можно получать с помощью способов, хорошо известных в данной области техники.

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления мутеин по настоящему раскрытию можно конъюгировать с фрагментом, который увеличивает время полужизни мутеина в сыворотке крови (по данному вопросу см. также публикацию PCT WO 2006/56464, где такие стратегии конъюгации описаны в отношении мутеинов желатиназа-ассоциированного липокалина нейтрофилов человека с аффинностью связывания CTLA-4). Фрагментом, который увеличивает время полужизни в сыворотке крови, может быть молекула полиалкиленгликоля, гидроксипропиловый крахмал, молекулы жирных кислот, таких как пальмитиновая кислота (Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), часть Fc иммуноглобулина, домен CH3 иммуноглобулина, домен CH4 иммуноглобулина, альбумин-связывающий пептид или альбумин-связывающий белок, трансферрин, и это названы лишь некоторые из них. Альбумин-связывающий белок может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий белок, антитело, фрагмент ан-

титела, в том числе доменные антитела (см., например, патент США 6696245), или мутеин со активностью связывания по отношению к альбумину. Соответственно, подходящие партнеры по конъюгации для увеличения времени полужизни мутеина по настоящему раскрытию включают альбумин-связывающий белок, например бактериальный альбумин-связывающий домен, такой как таковой стрептококкового белка G (Konig, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Другими примерами альбумин-связывающих пептидов, которые можно использовать в качестве партнера по конъюгации, являются например таковые, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys, где Хаа₁ 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 и Хаа₄ представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной заявке США № 2003/0069395 или Dennis et al. (SEQ ID NO: 131; Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 35035-35043).

В соответствии с другими вариантами осуществления сам альбумин (Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 540-548) или биологически активный фрагмент альбумина можно использовать в качестве партнера по конъюгации мутеина по настоящему раскрытию. Термин "альбумин" включает все альбумины млекопитающих, такие как сывороточный альбумин или альбумин бычьей сыворотки или альбумин крысы. Альбумин или его фрагмент можно получить рекомбинантным путем, как описано в патенте США № 5728553 или Европейских патентных заявках №№ EP 0330451 и EP 0361991. Рекомбинантный альбумин человека (Recombunin®) Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания) можно конъюгировать или сливать с мутеином по настоящему раскрытию для увеличения времени полужизни мутеина.

Если альбумин-связывающий белок представляет собой фрагмент антитела, то он может представлять собой доменное антитело. Доменные антитела (dAb) разрабатывают для обеспечения точного контроля биофизических свойств и времени полужизни *in vivo* с целью создания оптимального профиля безопасности и эффективности продукта. Доменные антитела коммерчески доступны, например, от компании Domantis Ltd. (Кембридж, Великобритания, и Массачусетс, США).

С помощью трансферрина в качестве фрагмента для увеличения времени полужизни мутеинов по настоящему раскрытию мутеин можно генетически сливать с N- или C-концом негликозилированного трансферрина, или обоими. Негликозилированный трансферрин имеет время полужизни 14-17 дней, а трансферриновый белок слияния будет аналогичным образом иметь увеличенное время полужизни. Трансферриновый переносчик также обеспечивает высокую биодоступность, биораспределение и стабильность в кровотоке.

Данная технология коммерчески доступна от компании BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, Пенсильвания, США). Рекомбинантный трансферрин человека (DeltaFerrin™) для применения в качестве белкового стабилизатора/партнера для увеличения времени полужизни также коммерчески доступен от компании Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания).

Если часть Fc иммуноглобулина используется с целью увеличения времени полужизни мутеинов по настоящему раскрытию, то можно использовать технологию SynFusion™, коммерчески доступную от компании Syntonix Pharmaceuticals, Inc (Массачусетс, США). Применение данной технологии слияния Fc способствует созданию биофармацевтических препаратов более длительного действия, и например может состоять из двух копий мутеина, связанного с Fc-областью антитела для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности производства.

Еще одной альтернативой увеличению времени полужизни мутеинов по настоящему раскрытию является слияние с N- или C-концом мутеинов длинных, бесструктурных, гибких последовательностей с высоким содержанием глицина (например, полиглицина с приблизительно 20-80 последовательными глициновыми остатками). Данный подход, раскрытый например в WO 2007/038619, также был назван "rPEG" (рекомбинантный PEG).

Если в качестве партнера по конъюгации используется полиалкиленгликоль, то полиэтиленгликоль может быть замещенным, незамещенным, линейным или разветвленным. Он также может быть активированным полиалкиленовым производным. Примерами подходящих соединений являются молекулы полиэтиленгликоля (PEG), как описано в WO 99/64016, в патенте США № 6177074 или в патенте США № 6403564 по отношению к интерферону, или как описано для других белков, таких как PEG-модифицированная аспарагиназа, PEG-аденозиндезаминаза (PEG-ADA) или PEG-супероксиддисмутаза (см., например, Fuertges et al. (1990) *The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins* *J. Control. Release* 11, 139-148). Молекулярный вес такого полимера, например полиэтиленгликоля, может варьировать от приблизительно 300 до приблизительно 70000 Да, в том числе, например, полиэтиленгликоль с молекулярным весом приблизительно 10000, приблизительно 20000, приблизительно 30000 или приблизительно 40000 Да. Кроме того, как описано например в патентах США №№ 6500930 или 6620413, углеводные олиго- и полимеры, такие как крахмал или гидроксипропилкрахмал (HES), можно конъюгировать с мутеином по настоящему раскрытию с целью увеличения времени полужизни в сыворотке крови.

Кроме того, раскрытый в данном документе мутеин можно сливать с фрагментом, который может придавать новые характеристики мутеинам по настоящему раскрытию, такие как ферментативная активность или аффинность связывания по отношению к другим молекулам. Примерами подходящих партнеров по слиянию являются щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион-S-трансфераза, альбумин-связывающий домен белка G, белок A, фрагменты антител, домены олигомеризации или токсины.

В частности, можно сливать мутеин, раскрытый в данном документе, с активным сайтом отдельного фермента таким образом, чтобы оба "компонента" полученного в результате белка слияния совместно выступали в роли данной терапевтической мишени. Связывающий домен мутеина присоединяется к мишени, вызывающей заболевание, способствуя подавлению биологической функции мишени доменом фермента.

Настоящее раскрытие также относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины по настоящему раскрытию. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замены определенных кодонов на другие кодоны, определяющие одну и ту же аминокислоту, то настоящее раскрытие не ограничено определенной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, описанный в данном документе, но охватывает все молекулы нуклеиновых кислот, которые включают нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин. В данном отношении в настоящем раскрытии предусматриваются нуклеотидные последовательности, кодирующие некоторые мутеины по настоящему раскрытию, как показано в SEQ ID NO: 65-126.

В одном варианте осуществления настоящего раскрытия способ включает воздействие на молекулу нуклеиновой кислоты мутагенеза в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одну или даже несколько положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 и 145 линейной полипептидной последовательности NGAL человека (SEQ ID NO: 2).

Настоящее раскрытие также включает в себя молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутеины по настоящему раскрытию, которые включают в себя дополнительные мутации за пределами указанных положений последовательности экспериментального мутагенеза. Такие мутации часто являются устойчивыми и оказываются могут даже быть предпочтительными, например если они способствуют повышенной эффективности укладки, стабильности в сыворотке крови, термостабильности или аффинности связывания с лигандами мутеинов.

Молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящей заявке, можно "функционально связывать" с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями) для обеспечения экспрессии молекулы данной нуклеиновой кислоты.

Молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК, обозначают как "способную экспрессировать молекулу нуклеиновой кислоты" или способную "обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности", если она включает в себя элементы последовательности, которые содержат информацию, относящуюся к регуляции транскрипции и/или трансляции, и при этом такие последовательности "функционально связаны" с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, в которой регуляторные элементы последовательности и последовательность, подлежащая экспрессии, связаны так, что обеспечивается экспрессия генов. Точная природа регуляторных областей, необходимых для экспрессии генов, может варьировать у разных видов, однако как правило такие области включают в себя промотор, который у прокариот содержит собственно промотор, т.е. элементы ДНК, направляющие инициацию транскрипции, а также элементы ДНК, которые при транскрипции в РНК будут сигнализировать об инициации трансляции. Эти промоторные области в норме включают 5'-некодирующие последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, такие как -35/-10 боксы и элемент Шайна-Дальгарно у прокариот или ТАТА-бокс, СААТ-последовательности и 5'-кэпирующие элементы у эукариот. Такие области также могут включать энхансерные и репрессорные элементы, а также транслируемый сигнал и лидерные последовательности для направления нативного полипептида в конкретный компартмент клетки-хозяина.

Кроме того, 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, участвующие в терминации транскрипции, полиаденилировании и т.п. Однако если эти последовательности терминации не являются достаточно функциональными в определенной клетке-хозяине, то их можно заменить сигналами, функциональными в данной клетке.

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию может включать в себя регуляторную последовательность, такую как промоторная последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию включает в себя промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими промоторами прокариот являются, например, промотор *tet*, промотор *lacUV5* или промотор T7. Примерами промоторов, пригодных для экспрессии в эукариотических клетках, являются промоторы SV40 или промотор CMV.

Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему раскрытию могут также быть частью вектора или средства клонирования любого другого типа, такого как плазида, фагида, фаг, бакуловирус, космида или искусственная хромосома.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включена в фазмиду. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий умеренный фаг, такой как M13 или f1, или его функциональную часть, слитую с cDNA, представляющей интерес. После суперинфекции бактериальных клеток хозяев данным фазмидным вектором и соответствующим хелперным фагом (например, M13K07, VCS-M13 или R408) вырабатываются частицы интактных фагов, обеспечивая тем самым физическое связывание кодируемой гетерологичной cDNA со ее соответствующим полипептидом, выявляемом на поверхности фага (см., 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).

Такие средства клонирования могут включать в себя, кроме вышеописанных регуляторных последовательностей и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано выше, последовательности репликации и регуляторные последовательности, полученные от видов, сопоставимых с клеткой-хозяином, которая используется для экспрессии, а также селективные маркеры, придающие селективный фенотип трансформированным или трансфицированным клеткам. Большое количество подходящих клонируемых векторов известны в данной области техники и коммерчески доступны.

Молекулу ДНК, кодирующую мутеин, как описано в данном документе, в частности клонируемый вектор, содержащий кодирующую последовательность такого мутеина, можно трансформировать в клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформацию можно выполнить с помощью стандартных методик. Таким образом, настоящее раскрытие также направлено на клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, как раскрыто в данном документе.

Трансформированные клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей белок слияния по настоящему раскрытию. Подходящими клетками-хозяевами могут быть прокариотические, такие как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотические, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, клетки насекомых SF9 или High5, иммортализованные линии клеток млекопитающих (например, клетки HeLa или клетки CHO) или первичные клетки млекопитающих.

Настоящее раскрытие также относится к способу получения мутеина или его полипептида, как описано в данном документе, где мутеин или полипептид, фрагмент мутеина или полипептида или белок слияния мутеина или полипептида и другого полипептида получают начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин или полипептид, посредством способов генной инженерии. Способ можно осуществлять *in vivo*, мутеин или полипептид можно получать, например, в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и затем выделять из данного организма-хозяина или его культуры. Также можно получать белок *in vitro*, например с помощью системы трансляции *in vitro*.

При получении мутеина или его полипептида *in vivo* нуклеиновую кислоту, кодирующую такой мутеин или полипептид, вводят в подходящий бактериальный или эукариотический организм-хозяин посредством технологии рекомбинантной ДНК (как уже изложено выше). Для данной цели клетку-хозяина сначала трансформируют клонирующим вектором, который включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано в данном документе, с помощью общепринятых стандартных способов. Затем клетку-хозяина культивируют в условиях, которые обеспечивают экспрессию гетерологичной ДНК и, таким образом, синтез соответствующего полипептида. Впоследствии полипептид извлекают либо из клетки, либо из среды для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК, раскрытую в настоящей заявке, можно "функционально связывать" с другой молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию для обеспечения экспрессии белка слияния по настоящему раскрытию. В данном отношении функциональная связь представляет собой связь, в которой элементы последовательности первой молекулы нуклеиновой кислоты и элементы последовательности второй молекулы нуклеиновой кислоты соединяют таким образом, чтобы обеспечить экспрессию белка слияния в виде одного полипептида.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления природную дисульфидную связь между Cys 76 и Cys 175 можно удалить в мутеинах hNGAL по настоящему раскрытию. Соответственно, такие мутеины можно получать в клеточном компартменте, имеющем восстанавливающую окислительно-восстановительную среду, например, в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

В случае если мутеин по настоящему раскрытию включает в себя внутримолекулярные дисульфидные связи, предпочтительно направлять образующийся полипептид в клеточный компартмент, имеющий окисляющую окислительно-восстановительную среду, с помощью соответствующей сигнальной последовательности. Такая окисляющая среда может быть представлена периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или в просвете эндоплазматической сети эукариотических клеток, и обычно она способствует образованию структурных дисульфидных связей.

Однако также можно получить мутеин или его полипептид по настоящему раскрытию в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В данном случае мутеин или полипептид можно непосредственно получить в растворимом или уложенном состоянии, или извлечь в форме телец включения, с последующей ренатурацией *in vitro*. Дополнительным вариантом является применение конкретных штам-

мов хозяина, имеющих окисляющую внутриклеточную среду, которая может обеспечить таким образом образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.).

Однако мутеин или полипептид, описанные в данном документе, необязательно можно конструировать или получать только с помощью генной инженерии. Наоборот, такой мутеин или полипептид можно также получить с помощью химического синтеза, такого как метод твердофазного пептидного синтеза Меррифилда или с помощью транскрипции и трансляции *in vitro*. Например, является возможным, чтобы перспективные мутации выявляли с помощью молекулярного моделирования и затем синтезировали требуемый (разработанный) полипептид *in vitro* и исследовали активность связывания в отношении I, II, III типа или пиохелина. Способы твердофазного и/или жидкофазного синтеза белков хорошо известны в данной области техники (см., например, Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43).

В другом варианте осуществления мутеин или полипептид по настоящему раскрытию можно получать с помощью транскрипции/трансляции *in vitro* с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области техники.

Опытному специалисту будут понятны способы, полезные для получения мутеинов или их полипептидов, предполагаемых настоящим раскрытием, однако такие белковые последовательности или последовательности нуклеиновых кислот в явной форме в данном документе не раскрыты. В качестве общих сведений такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез положений одиночных аминокислот для упрощения субклонирования мутированного гена *hNGAL* или его частей с помощью включения в состав сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того, такие мутации также можно включать в состав для дополнительно повышения аффинности мутеина к своей мишени (например, соответственно пиовердину или пиохелину). Кроме того, мутации можно вводить для модулирования определенных характеристик мутеина с тем, чтобы повысить стабильность укладки, стабильность в сыворотке крови, устойчивость белка или растворимость в воде или чтобы снизить при необходимости склонность к агрегации. Например, природные цистеиновые остатки можно мутировать в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидных мостиков.

Мутеины или их полипептиды, раскрытые в данном документе, и их производные можно использовать во многих областях, аналогичного антителам или их фрагментам. Например, мутеины можно использовать для мечения ферментом, антителом, радиоактивным веществом или любой другой группой, имеющей биохимическую активность или определенные характеристики связывания. При выполнении этого их соответствующие мишени или их конъюгаты или белки слияния можно выявлять или приводить в контакт с ними. Кроме того, мутеины или их полипептиды по настоящему раскрытию могут применяться для выявления химических структур посредством общепринятых аналитических способов (например, ELISA или вестерн-блот) или с помощью микроскопии и иммуносенсоров. В данном отношении сигнал детекции может быть получен непосредственно с помощью подходящего конъюгата мутеина или белка слияния или опосредованно с помощью иммунохимической детекции связанного мутеина посредством антитела.

Дополнительные цели, преимущества и характеристики по настоящему раскрытию будут очевидны специалистам в данной области техники при изучении следующих примеров и сопровождающих их фигур, которые не носят ограничивающий характер. Таким образом следует понимать, что несмотря на то, что настоящее раскрытие определенным образом раскрыто с помощью иллюстративных вариантов осуществления и необязательных характеристик, за модификацией и изменением раскрытий, осуществляемых в данном документе, можно обращаться к специалистам в данной области техники, и такие модификации и изменения находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

V. Примеры

Пример 1. Очистка и биотинилирование сидерофоров *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa продуцирует три группы пиовердинов, т. е. пиовердин I типа, пиовердин II типа и пиовердин III типа. Каждая группа имеет три формы, различающиеся боковой цепью, которая представляет собой сукцинил, сукцинамид или α -кетоглутарил. Кроме того, *P. aeruginosa* продуцирует пиохелин. Все десять сидерофоров могут образовывать комплексы с железом в форме Fe^{3+} .

Для выбора и скрининга мутеинов, представляющих интерес, сидерофоры можно биотинилировать. Биотинилирование выполняли в отношении варианта сукцинила пиовердина I типа в боковой цепи сукцинила, в отношении варианта сукцинила пиовердина II типа в боковой цепи L-орнитина и в отношении варианта сукцинила пиовердина III типа, главным образом в боковой цепи глицина. Пиохелин биотинилировали в фенольном кольце.

Пример 2. Выбор мутеинов, специфически связывающихся с сидерофорами *P. aeruginosa*

Библиотеки на основе *hNGAL*, созданные с помощью случайного мутагенеза зрелого *hNGAL*, использовали для выбора мутеинов, специфически связывающихся с различными сидерофорами *P. aeruginosa*. Биотинилированный и железосодержащий сукцинил Pvd I, сукцинил Pvd II и сукцинил Pvd III, а также биотинилированный пиохелин, не содержащий железа, использовали в независимых способах фазового дисплея и выбора.

2×10^{12} фагмид из этих библиотек инкубировали с 200 или 500 нМ или 1 мкМ биотинилированной мишени. Парамагнитные гранулы, покрытые нейтравидином или стрептавидином, использовали для захвата мишени/фагмидных комплексов, которые затем выделяли с помощью магнита. Несвязанные фагмиды удаляли промыванием гранул PBST или PBS. Связанные фагмиды сначала элюировали с помощью 300 мкл 70 мМ триэтиламина в течение 10 мин, после чего выполняли немедленную нейтрализацию супернатанта с помощью 100 мкл 1 М Трис-Cl с pH 6,0. После одного промежуточного цикла промывания остаточные фагмиды элюировали с помощью 100 мМ глицина с pH 2,2 в течение 10 мин, после чего выполняли немедленную нейтрализацию с помощью 50 мкл 0,5 М Трис-основания. Обе элюционные фракции объединяли и использовали для инфицирования 4 мл XL1-голубой культуры *E. coli* (OD₅₅₀ 0,45-0,6) для реамплификации. После инкубации в течение 30 мин при перемешивании, бактерии собирали центрифугированием при $5000 \times g$ в течение 2 мин, ресуспендировали в 1 мл среды 2xYT и помещали на три больших планшета с агаром LB/Amp (10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, pH 7,5, 15 г/л агара, 100 мкг/мл ампициллина). Планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 32°C. Инфицированные клетки соскребали с агаровых планшетов с помощью 50 мл среды 2xYT, обогащенной 100 мкг/мл ампициллина (2xYT/Amp). 50 мл среды 2xYT/Amp вводили с соответствующим объемом бактериальной суспензии для достижения OD₅₅₀ 0,08. Культуру инкубировали при температуре 37°C на шейкере (160 об/мин) до достижения OD₅₅₀ 0,5 и затем инфицировали хелперными фагами ($1,5 \times 10^{11}$ pfu) при инкубации в течение 15 мин при осторожном перемешивании и в течение 45 мин на шейкере при температуре 37°C. Затем добавляли канамицин до конечной концентрации 70 мкг/мл с целью выбора бактерий, инфицированных хелперными фагами. В конечном итоге экспрессию мутеинов pIII-hNGAL индуцировали добавлением 25 нг/мл ангидротетрациклина.

Через 15 ч инкубации при температуре 24°C супернатант культуры удаляли центрифугированием ($5000 \times g$ в течение 20 мин). Затем 20 мл супернатанта пропускали через полиэфирсульфовую мембрану с размером пор 0,22 мкм. К фильтрату добавляли 5 мл раствора, содержащего 20% (вес./об.) PEG-8000 и 15% (вес./об.) NaCl в воде, и осторожно смешивали. Перед центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и $5000 \times g$ раствор инкубировали в течение 30 мин на льду. Осадок, содержащий фагмиды, растворяли в 1 мл буфера, содержащего 200 мМ борной кислоты, 160 мМ NaCl и 1 мМ EDTA. Нерастворенные частицы удаляли центрифугированием ($5000 \times g$ в течение 5 мин). Супернатант переносили в чистую пробирку и смешивали с 200 мкл раствора, содержащего 20% (вес./об.) PEG-8000 и 15% (вес./об.) NaCl в воде. Раствор инкубировали в течение 30 мин на льду и затем осажденные фагмиды собирали центрифугированием ($5000 \times g$ в течение 5 мин). Фагмиды ресуспендировали в PBS, обогащенном 50 мМ бензамидина, и использовали для следующего цикла выбора фагмид.

Выполняли четыре последовательных цикла выбора.

Использовали различные условия промывания: i) восемь раз с помощью 1 мл PBS/T, 5 мин инкубации для каждой стадии промывания во всех 4 циклах выбора, ii) число циклов промывания увеличивали от 1 до 4 циклов, iii) быстрые стадии промывания изменяли за счет 5 мин стадий инкубации-промывания и число стадий промывания увеличивали от цикла к циклу.

Фагмидную ДНК получали из клеток *E. coli*, инфицированных с помощью продукта четвертого цикла выбора, и кассету мутеина hNGAL выделяли расщеплением ДНК с использованием BstX1 и последующей очистки с помощью электрофореза в агарозном геле стандартными способами (Sambrook et al., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual). Кассету мутеина hNGAL вставляли в аналогичный разрезанный вектор, который обеспечивает выработку бактериями мутеинов hNGAL под контролем тетрациклинового промотора. CaCl₂-компетентные TG1-F' клетки трансформировали с помощью лигирующей смеси и помещали на планшеты LB/Amp.

Для оптимизации Pvd I, Pvd II, Pvd III и Pch-специфичных мутеинов создавали дополнительные библиотеки на основе мутеина под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 и затем под SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 45. Библиотеки создавали с помощью способов на основе смещенной рандомизации выбранных положений или полимеразной цепной реакции (ПЦР) сниженной точности. Выбор мутеинов выполняли как описано, но с повышенной строгостью.

Для облегчения экспрессии в эукариотических клетках удаляли потенциальные сайты N-гликозилирования (Asn-X-Ser/Thr).

Кроме того, для дополнительной оптимизации устойчивости вводили мутации.

Пример 3. Выявление мутеинов, специфически связывающихся с соответствующими сидерофорами *P. aeruginosa*, с помощью скрининга ELISA высокой производительности

Отдельные колонии использовали для внесения среды 2xYT/Amp и роста в течение ночи (14-18 ч.) до достижения устойчивой фазы. Затем 50 мкл 2xYT/Amp вводили из культур устойчивой фазы и инкубировали в течение 3 ч при 37°C и затем смешали до 22°C до достижения OD₅₉₅ 0,6-0,8. Выработку мутеинов индуцировали добавлением 10 мкл среды 2xYT/Amp, обогащенной 1,2 мкг/мг ангидротетрациклина. Культуры инкубировали при 22°C до следующего дня. После добавления 40 мкл 5% (вес./об.) BSA в PBS/T и инкубации в течение 1 ч при 25°C культуры были готовы для использования в скрининговых

анализах.

Специфичное связывание выделенных мутеинов с соответствующими сидерофорами-мишенями изучали с помощью покрытия смеси нейтравидина и стрептавидина в соотношении 1:1 (5 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4°C на микротитрационных планшетах. После блокирования в течение 1 ч с помощью 2% BSA в PBST соответствующий биотинилированный сидерофор-мишень, используемый для выбора, захватывали на покрытых микротитрационных планшетах при концентрации 1,5-2,5 мкг/мл в PBS/T. Планшеты, аналогичным образом покрытые биотинилированным альдостероном, использовали при скрининге в качестве отрицательной контрольной мишени. Затем 20 мкл BSA-блокированных культур добавляли в покрытый микротитрационный планшет, содержащий захваченную мишень или альдостерон, и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Связанные мутеины выявляли в течение 1 ч после инкубации с использованием антитела к T7, конъюгированного с пероксидазой хрена (Merck KgaA, Дармштадт), или антитела к Streptag, конъюгированного с пероксидазой хрена (IBA, Геттинген). Для количественного определения добавляли 20 мкл флуорогенного пероксидазного субстрата QuantaBlu и определяли флуоресценцию при длине волны возбуждения 320 нм и длине волны излучения 430 нм. Затем секвенировали мутеины, специфически связывающиеся с соответствующими сидерофорами-мишенями.

Для выбора мутеинов с повышенной аффинностью и устойчивостью выполняли скрининг i) со сниженной концентрацией антигенов и/или ii) с конкуренцией с небитинилированной мишенью и/или iii) с инкубированием супернатанта для скрининга при 65°C или 70°C перед добавлением к целевому планшету и/или iv) с использованием форматов обратного скрининга, где мутеины захватывали с использованием Streptag на микротитрационных планшетах, покрытых антителом к Streptag, добавляли различные концентрации биотинилированной мишени и выявляли с помощью экстравидина-HRP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Пример 4. Экспрессия мутеинов

Уникальные мутеины экспрессировали с использованием C-концевой последовательности SAW-SHPQFEK (SEQ ID NO: 127; в том числе использовали SA-линкер и Strep-tag® II, WSHQPFEK (SEQ ID NO: 128) в *E. coli* в среде 2YT-Amp для очистки мутеинов после экспрессии с помощью аффинной хроматографии с использованием стрептактин и препаративной эксклюзионной хроматографии.

Пример 5. Аффинность мутеинов по отношению к растворимым сидерофорам *P. aeruginosa*, определенная на основе ELISA

Связывание мутеинов в растворе анализировали с помощью "ELISA связывания в растворе", принцип которого был следующим: исследуемый мутеин в постоянной концентрации инкубировали с лигандами в различных концентрациях (Pvd I s, sa, α KG +/-Fe/Pvd II s, sa, α KG +/-Fe/Pvd III s, sa, α KG +/-Fe/Pch +/-Fe) в течение 1 ч. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси мутеин/лиганд переносили на планшет для ELISA с биотинилированными Pvd I s (+ Fe), Pvd II s (+ Fe), Pvd III s (+Fe) или Pch, иммобилизованными с использованием нейтравидина, для измерения остаточной концентрации свободных мутеинов. Концентрацию свободных (не связанных с лигандами) мутеинов определяли с помощью количественной настройки ELISA.

Подробно, 384-луночный планшет, пригодный для измерений флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600 с черным плоским дном, с высокой степенью связывания) покрывали 20 мкл нейтравидина при концентрации 5 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. После промывания покрытые нейтравидином лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 0,1% Tween 20 и 2% BSA (PBS-T/BSA), в течение 1 ч при комнатной температуре. После повторного промывания 20 мкл биотинилированного пиовердина или пиохелина в блокирующем буфере в концентрации 1 мкг/мл добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре и избыточный реагент удаляли.

Мутеины в фиксированной концентрации инкубировали в растворе с лигандом в различной концентрации (Pvd I s, sa, α KG +/-Fe/Pvd II s, sa, α KG +/-Fe/Pvd III s, sa, α KG +/-Fe/Pch +/-Fe) с использованием подходящей исходной концентрации, которую серийно разбавляли в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в PBS-T/BSA. Через 1 ч после инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили в 384-луночный планшет, на который иммобилизовали биотинилированный пиовердин или пиохелин для захвата несвязанных (свободных) мутеинов в течение 20 мин при комнатной температуре. Для обеспечения трансформации считываемых показателей ELISA в абсолютные концентрации свободных мутеинов, стандартную кривую, содержащую различные концентрации мутеинов, получали в PBS-T/BSA, и также инкубировали в течение 20 мин на том же планшете ELISA.

Остаточные супернатанты снимали и 20 мкл антитела к hNGAL, меченого HRP, добавляли в заранее определенной оптимальной концентрации в PBS-T/BSA и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Антитело к hNGAL получали иммунизацией кроликов смесью мутеинов и после этого объединяли с HRP с помощью набора (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя для получения конъюгата антитело-HRP. После промывания, к каждой лунке добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Thermo) и реакцию продолжали в течение 15-60 мин. Интенсивность флуоресценции каждой лунки на планшете считывали с помощью микропланшета-ридера для флуоресценции (Tecan или Molecular Devices). Для оценки данных концен-

трацию мутеина, $c(\text{мутеина})_{\text{free}}$, рассчитывали на основе результатов стандартной кривой и откладывали на графике в зависимости от концентрации лиганда, $c(\text{лиганда})$. Для получения концентрации лиганда, при которой образование комплекса лиганд/мутеин блокировали на 50% (IC_{50}), кривые подбирали с помощью нелинейной регрессии с использованием модели связывания в одном участке в соответствии с $c(\text{мутеина})_{\text{free}} = c(\text{мутеина})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{лиганда}) / IC_{50})$, при этом общая концентрация меченого вещества $c(\text{мутеина})_{\text{tot}}$ и значение IC_{50} служили в качестве свободных параметров. Подбор кривых выполняли с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 4.

Полученные значения IC_{50} обобщены в табл. 1А-D. Мутеины, выбранные против биотинилированного и железосодержащего сукцинила Pvd I, сукцинила Pvd II и сукцинила Pvd III, соответственно связывали со всеми подтипами соответствующей группы Pvd, т. е. мутеинами, выбранными против биотинилированного и железосодержащего сукцинила Pvd I, связанными с аналогичной аффинностью с сукцинилом Pvd I, сукцинамидом, α -кетоглутарилем в комплексе с ионом железа или без такового, мутеинами, выбранными против биотинилированного и железосодержащего сукцинила Pvd II, связанными с аналогичной аффинностью с сукцинилом Pvd II, -сукцинамидом, α -кетоглутарилем в комплексе с ионом железа или без такового, и мутеинами, выбранными против биотинилированного и железосодержащего сукцинила Pvd III, связанными с аналогичной аффинностью с сукцинилом Pvd III, -сукцинамидом, α -кетоглутарилем в комплексе с ионом железа или без такового. Большинство выбранных мутеинов связаны с сопоставимой аффинностью со всеми подтипами соответствующей группы в комплексе с ионом железа или без такового.

Отбор против биотинилированного пиохелина, не содержащего железа, приводил к мутеинам липокалина, связывающимся предпочтительно с пиохелином, не содержащим железа, таким как мутеины липокалина под SEQ ID NO: 56 и 57, связывающиеся с двух-трехзначной наномолярной аффинностью с железосодержащим Pch и со слабой аффинностью с железосодержащим Pch или не связывающиеся вообще, и к мутеинам липокалина, таким как под SEQ ID NO: 55, связывающимся предпочтительно с железосодержащим пиохелином.

Оптимизация аффинности SEQ ID NO: 56 приводила к образованию мутеинов липокалина, связывающихся с повышенной аффинностью с Pch, не содержащим железа, и не связывающихся вообще или связывающихся со слабой аффинностью с железосодержащим Pch, где оптимизация аффинности SEQ ID NO: 55 приводила к образованию мутеинов липокалина, связывающихся с повышенной более чем в 75 раз аффинностью с Pch, не содержащим железа, а также с однозначной наномолярной аффинностью с железосодержащим Pch.

Таким образом, после завершения выбора и оптимизации мутеинов липокалина лишь четыре различные мутеина могли связываться со всеми 10 подтипами сидерофоров *P. Aeruginosa* в комплексе с ионом железа и без такового (Pvd I s, sa, α KG +/-Fe; . Pvd II s, sa, α KG +/- Fe; Pvd III s, sa, α KG +/- Fe; Pch +/- Fe).

Таблица 1А. Связывание мутеинов с сукцинилом, сукцинамидом, α -кетоглутарилем +/-Fe³⁺ сидерофора пиовердина *P. aeruginosa* в растворе

	ELISA связывания в растворе					
	IC50: нМ					
	Pvd I s (+Fe)	Pvd I sa (+Fe)	Pvd I aKG (+Fe)	Pvd I s (-Fe)	Pvd I sa (-Fe)	Pvd I aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 2	24	19	13	26	19	13
SEQ ID NO: 4	97	43	91	57	28	50
SEQ ID NO: 5	97	49	73	57	32	42
SEQ ID NO: 6	44	30	37	48	31	36
SEQ ID NO: 7	173	126	59	290	129	53
SEQ ID NO: 8	2,38	1,33	2,15	2,3	0,98	1,8
SEQ ID NO: 9	3,3	1,37	2,4	3,7	1,6	2,9
SEQ ID NO: 10	3,4	1,1	2,87	3,8	0,92	2,9
SEQ ID NO: 11	2,97	1,9	2,57	4	2	3,1
SEQ ID NO: 12	6,8	4,7	6,4	6,9	4,8	5,6
SEQ ID NO: 13	0,5	0,27	0,37	0,36	0,2	0,24
SEQ ID NO: 14	2,4	1,7	3,1	2,4	1,1	2,2
SEQ ID NO: 15	1,1	0,59	1,2	0,86	0,42	0,69
SEQ ID NO: 16	1,3	0,84	1,6	1	0,63	0,83
SEQ ID NO: 18	5,3	2,2	3,9	2,8	1,8	2,5

Таблица 1В. Связывание мутеинов с сукцинилом, сукцинамидом, α -кетоглутарилем +/- Fe^{3+} растворимого сидерофора пиовердина II *P. aeruginosa* в растворе

	ELISA связывания в растворе					
	IC50: нМ					
	Pvd II s (+Fe)	Pvd II sa (+Fe)	Pvd II aKG (+Fe)	Pvd II s (-Fe)	Pvd II sa (-Fe)	Pvd II aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 19	30	36	21	23	42	34
SEQ ID NO: 20	48	40	85	63	40	89
SEQ ID NO: 26	0,34	0,39	1,3	0,45	0,45	0,75
SEQ ID NO: 27	0,78	1,53	1,97	1,02	1,12	1,4
SEQ ID NO: 28	0,91	1,75	2,25	1,14	1,5	1,65
SEQ ID NO: 29	0,68	1,5	1,9	0,95	1,2	1,6
SEQ ID NO: 30	0,29	0,53	3	0,4	0,3	2,85
SEQ ID NO: 31	0,29	0,29	1,1	0,38	0,35	0,64
SEQ ID NO: 32	0,27	0,32	1,25	0,42	0,37	0,72
SEQ ID NO: 33	0,28	0,32	1,3	0,4	0,32	0,7
SEQ ID NO: 34	0,29	0,32	1,6	0,27	0,32	1,2
SEQ ID NO: 35	0,33	0,39	0,76	0,34	0,42	0,99
SEQ ID NO: 36	0,33	0,39	0,76	0,34	0,42	0,99
SEQ ID NO: 37	0,19	0,28	2,1	0,2	0,3	1,4

Таблица 1С. Связывание мутеинов с сукцинилом, сукцинамидом, α -кетоглутарилем +/- Fe^{3+} сидерофора пиовердина III *P. aeruginosa* в растворе

	ELISA связывания в растворе					
	IC50: нМ					
	Pvd III s (+Fe)	Pvd III sa (+Fe)	Pvd III aKG (+Fe)	Pvd III s (-Fe)	Pvd III sa (-Fe)	Pvd III aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 39	146	147	23	95	94	23
SEQ ID NO: 42	35	15	78	25	7,2	69
SEQ ID NO: 43	0,31	0,25	1,4	0,6	0,46	1,90
SEQ ID NO: 44	0,35	0,26	0,93	0,35	0,21	1,10
SEQ ID NO: 45	0,75	0,43	1,50	0,41	0,46	1,70
SEQ ID NO: 46	0,69	0,30	1,02	0,44	0,30	1,20
SEQ ID NO: 47	0,37	0,30	0,82	0,17	0,28	0,58
SEQ ID NO: 48	0,28	0,22	0,95	0,29	0,24	0,64
SEQ ID NO: 49	0,32	0,27	0,79	0,21	0,27	0,62
SEQ ID NO: 50	0,29	0,35	0,95	0,29	0,37	0,82
SEQ ID NO: 51	0,37	0,37	0,97	0,35	0,34	1,1
SEQ ID NO: 52	0,32	0,31	1	0,31	0,31	1
SEQ ID NO: 53	0,21	0,25	0,54	0,19	0,63	0,33

Таблица 1D. Связывание мутеинов с сидерофором пиохелина +/- Fe^{3+} *P. aeruginosa* в растворе

	ELISA связывания в растворе IC50: нМ	
	pch (+Fe)	pch (-Fe)
SEQ ID NO: 55	361	Н/Д
SEQ ID NO: 56	Н/Д	51
SEQ ID NO: 57	Н/Д	147
SEQ ID NO: 58	Н/Д	10
SEQ ID NO: 59	Н/Д	11
SEQ ID NO: 60	8,6	45
SEQ ID NO: 61	5,1	42
SEQ ID NO: 62	4,7	26
SEQ ID NO: 63	5,6	26

Для распределения аффинности с высокой производительностью использовали тот же самый анализ, однако с менее различающимися концентрациями лиганда.

Пример 6. Аффинность связывания мутеинов с сидерофорами *P. aeruginosa*, определенная в Biacore

В анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) использовали инструмент Biacore T200 (GE Healthcare) для измерения аффинности связывания мутеинов с сукцинилом, сукцина-

мидом, - α -кетоглутарилом пиовердина I в комплексе с ионом железа, или с сукцинилом, -сукцинамидом, - α -кетоглутарилом пиовердина II в комплексе с ионом железа, сукцинилом, сукцинамидом, - α -кетоглутарилом пиовердина III в комплексе с ионом железа. Мутеины, выбранные для связывания с пиовердинами и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 64), биотинилировали в течение 2 ч при комнатной температуре, используя соответствующий излишек EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo, Cat# 21329), после этого проводили отделение не вступившего в реакцию биотина с использованием вращающегося планшета для обессоливания Zeba (Thermo, № по кат. 21329) в соответствии с инструкциями производителя.

В анализе аффинности SPR биотинилированные мутеины и отрицательный контроль захватывали на сенсорный чип CAP с помощью набора Biotin CAPture (GE Healthcare): Сенсорный чип CAP предварительно иммобилизовали с помощью олигонуклеотида ssDNA. Неразбавленный реагент Biotin CAPture (стрептавидин, конъюгированный с комплементарным олигонуклеотидом ss-DNA) наносили со скоростью потока 2 мкл/мин в течение 300 с. Затем 1-100 мкг/мл биотинилированных мутеинов или отрицательного контроля наносили в течение 300 с при скорости потока 5 мкл/мин. Эталонный канал загружали только реагентом Biotin CAPture.

Для определения аффинности связывания четыре-пять разбавлений соответствующих представителей Pvd (Pvd I, II, III, в том числе сукцинила, сукцинамида, - α -кетоглутарила +Fe) в концентрации, находящейся в диапазоне 5-2000 нМ, получали в буфере HBS-EP+ (GE Healthcare) и наносили на подготовленную поверхность чипа. Применяли скорость нанесения 30 мкл/мин, использовали подход для оценки кинетики за один цикл и за несколько циклов, при времени контакта с образцом 120-180 с и времени диссоциации 900-2400 с. Отсутствие связывания с отрицательным контролем под SEQ ID NO: 64 подтверждали с помощью высокой концентрации (например, 1200 нМ) соответствующего Pvd.

После иммобилизации лиганда, для анализа с применением оценки кинетики за один цикл все 4-5 концентраций Pvd перед контролем диссоциации применяли последовательно в возрастающем порядке. Для анализа с применением оценки кинетики за несколько циклов применяли 4 разбавления Pvd, при этом каждая следовала за фазой диссоциации. Все измерения выполняли при температуре 25°C. Восстановления поверхности сенсорного чипа CAP достигали введением 6 M Gua-HCl с 0,25 M NaOH, с последующим дополнительным промыванием подвижным буфером и периодом стабилизации 120 с. Данные оценивали с помощью компьютерной программы Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Применяли двойное сравнение с образцом. Для подбора исходных данных использовали модель связывания в соотношении 1:1.

Полученные константы скорости реакции для выбора мутеинов липокалина обобщены в табл. 2А-С. Мутеины липокалина можно получать для каждой группы Pvd, связывающегося в диапазоне от субнано-молярных до небольших однозначных наномолярных значений со всеми подтипами соответствующей группы Pvd. Однако природный лиганд Fe-энтеробактина hNGAL дикого типа не связывался Pvd-специфичными мутеинами липокалина.

Таблица 2А. Константы скорости реакции Pvd I-специфичных мутеинов липокалина с сукцинилом - сукцинамидом и - α -кетоглутарилом Pvd I в комплексе с Fe³⁺

SEQ ID NO	Pvd I s (+Fe)			Pvd I sa (+Fe)			Pvd I k (+Fe)			Fe-энтеробактин
	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	
SEQ ID NO: 8	5,37E+04	1,79E-04	3,33	1,11E+05	1,20E-04	1,06	4,74E+04	2,35E-04	4,95	нет связ.
SEQ ID NO: 9	3,31E+04	3,30E-04	9,97	8,02E+04	2,57E-04	3,20	3,80E+04	5,32E-04	14,03	нет связ.
SEQ ID NO: 10	3,47E+04	4,78E-04	13,78	8,63E+04	3,04E-04	3,52	5,02E+04	6,31E-04	12,57	нет связ.
SEQ ID NO: 11	2,84E+04	4,04E-04	14,22	6,76E+04	2,97E-04	4,40	3,48E+04	5,86E-04	16,84	нет связ.
SEQ ID NO: 13	1,17E+05	6,15E-05	0,53	1,65E+05	4,24E-05	0,26	9,51E+04	8,37E-05	0,88	нет связ.
SEQ ID NO: 16	3,56E+04	1,88E-04	5,28	5,43E+04	1,56E-04	2,87	3,14E+04	2,54E-04	8,10	нет связ.

Таблица 2В. Константы скорости реакции Pvd II-специфичных мутеинов липокалина с сукцинилом - сукцинамидом и - α -кетоглутарилом Pvd II в комплексе с Fe³⁺

SEQ ID NO	Pvd II s (+Fe)			Pvd II sa (+Fe)			Pvd II k (+Fe)			Fe-энтеробактин
	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	k _{on} [1/Mc]	k _{off} [1/c]	K _D [нМ]	
SEQ ID NO: 32	1,15E+06	1,09E-03	0,94	1,37E+06	9,55E-04	0,7	1,09E+05	3,74E-04	3,44	нет связ.
SEQ ID NO: 33	1,23E+06	1,25E-03	1,02	1,41E+06	1,04E-03	0,74	9,93E+04	4,16E-04	4,19	нет связ.
SEQ ID NO: 35	1,31E+05	4,59E-05	0,35	2,48E+05	4,58E-05	0,18	4,35E+04	1,49E-04	3,42	нет связ.
SEQ ID NO: 36	1,10E+05	4,30E-05	0,39	1,38E+05	3,67E-05	0,27	2,86E+04	5,62E-05	1,97	нет связ.

Таблица 2С. Константы скорости реакции Pvd III-специфичных мутеинов липокалина с сукцинилом - сукцинамидом и - α -кетоглутарилом Pvd III в комплексе с Fe^{3+}

SEQ ID NO:	Pvd III s (+Fe)			Pvd III sa (+Fe)			Pvd III k (+Fe)			Fe-энтеробактин
	K_{on} [1/Мс]	K_{off} [1/с]	K_D [нМ]	K_{on} [1/Мс]	K_{off} [1/с]	K_D [нМ]	K_{on} [1/Мс]	K_{off} [1/с]	K_D [нМ]	
SEQ ID NO: 43	7,05E+04	1,58E-04	2,24	3,52E+04	1,07E-04	3,04	5,73E+04	3,03E-04	5,29	н. о.
SEQ ID NO: 44	5,62E+04	1,42E-04	2,53	3,03E+04	8,90E-05	2,94	4,82E+04	2,71E-04	5,64	н. о.
SEQ ID NO: 45	5,90E+04	1,59E-04	2,70	3,27E+04	9,91E-05	3,03	4,73E+04	3,30E-04	6,99	н. о.
SEQ ID NO: 46	8,32E+04	1,66E-04	2,00	4,36E+04	6,90E-05	1,58	7,67E+04	2,41E-04	3,15	н. о.
SEQ ID NO: 47	7,89E+04	7,91E-05	1,00	1,28E+05	2,52E-05	0,20	2,92E+04	2,62E-04	8,97	н. о.
SEQ ID NO: 48	6,70E+04	1,06E-04	1,58	1,48E+05	9,51E-05	0,64	2,72E+04	1,58E-04	5,81	н. о.
SEQ ID NO: 49	6,88E+04	1,05E-04	1,52	1,34E+05	1,12E-04	0,84	2,81E+04	4,29E-05	1,53	н. о.
SEQ ID NO: 53	5,10E+04	4,19E-05	0,82	6,73E+04	3,90E-05	0,58	3,88E+04	1,40E-04	3,60	нет связ.

Кроме того, отсутствие связывания с различными сидерофорами, не принадлежащими к соответствующей подгруппе пиовердина (I, II, III) и MMP-9, подтверждали с помощью вышеописанного анализа с помощью внесения высоких концентраций (≥ 1 мкМ) следующих анализируемых веществ на иммобилизованный мутеин: Fe-энтеробактина, дефероксамина, пиохелина, пиовердинов из соответствующих подгрупп, проформы MMP-9 и активированного MMP-9. Обобщение этого анализа представлено в табл. 3.

Для определения констант скорости реакции и образующейся KD для взаимодействия мутеина под SEQ ID NO: 62 с Pch +Fe мутеин или отрицательный контроль под SEQ ID NO: 64 иммобилизовали на поверхности чипа CM5 с помощью стандартного химического анализа аминов. Поверхность чипа активировали с помощью EDC и NHS. Затем 5 мкг/мл раствора мутеина или отрицательного контроля в 10 мМ ацетата с pH 4,0 наносили при скорости потока 10 мкл/мин до достижения высокого уровня иммобилизации, составляющего приблизительно 2000 RU. Остаточные активированные группы гасили этаноламином. Эталонные каналы обрабатывали EDC/NHS, а затем этаноламином (холостая иммобилизация).

Для определения аффинности, пять разбавлений пиохелина (+Fe) получали в буфере HBS-P+ и наносили на подготовленную поверхность чипа. Анализ связывания проводили при времени контакта 180 с, времени диссоциации 1200-1800 с и скорости потока 30 мкл/мин. Измерения выполняли при 25°C. Восстановление поверхности иммобилизованных мутеинов достигали тремя последовательными введениями 10 мМ Gly-HCl с pH 1,5 (120 с), после дополнительного промывания подвижным буфером и периода стабилизации. Данные оценивали с помощью компьютерной программы Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Применяли двойное сравнение с образцом. Для подбора исходных данных использовали модель связывания в соотношении 1:1.

Полученная константа скорости реакции для SEQ ID NO: 62 показана в табл. 2D.

С помощью того же самого анализа, отсутствие связывания с сидерофорами, отличающимися от пиохелина и MMP-9, подтверждали с помощью нанесения высоких концентраций (≥ 1 мкМ) следующих анализируемых веществ на иммобилизованный мутеин SEQ ID NO: 62: Fe-энтеробактина, дефероксамина, пиовердина, проформы MMP-9 и активированного MMP-9. Обобщение результатов показано в табл. 3.

Таблица 2D. Константы скорости реакции пиохелина, специфичного к мутеину липокалина, под SEQ ID NO: 62 по отношению к пиохелину, образующему комплекс с Fe^{3+}

SEQ ID NO:	pch (+Fe)		
	K_{on} [1/Мс]	K_{off} [1/с]	K_D [нМ]
SEQ ID NO: 62	2,25E+06	6,43E-04	0,29

Таблица 3. Специфичность связывания мутеинов липокалина с Pvd I, Pvd II, Pvd III или пиохелином

	Pvd I s (+Fe)	Pvd II s (+Fe)	Pvd III s (+Fe)	pch (+Fe)	Энтеробактин (+Fe)	Дефероксамин	Проформа MMP-9	Активированный MMP-9
SEQ ID NO: 16	+	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 36	-	+	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 53	-	-	+	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 62	-	-	-	+	-	-	-	-
SEQ ID NO: 64	-	-	-	-	+	-	-	-

Пример 7. Функциональное исследование мутеинов, связывающихся с сидерофорами *P. aeruginosa*; ингибирование захвата железа

Для определения подавления функционального захвата железа в живых бактериях, мутеины липокалина, связывающиеся с *P. aeruginosa*, в концентрации диапазона доз инкубировали в течение 1 ч со 100 нМ сидерофора, содержащего радиоактивное железо, в буфере Трис HCl 50 мМ с pH 8,0 перед инкубацией в течение 30 мин с бактериями в конечной концентрации, составляющей OD=1, при 595 нм в 96-луночном планшете. Затем бактерии фильтровали с помощью сборщика клеток через 96-луночный фильтровальный планшет GF/B, предварительно инкубированный с раствором полиэтиленimina в концентрации 5%, и промывали 3 раза буфером Трис. После фильтрования и сушки в каждую фильтровальную лунку перед подсчетом добавляли 30 мкл сцинтиляционного коктейля. При использовании железосодержащего пиовердина сидерофор инкубировали в течение 15 мин с $^{55}\text{Fe-Cl}_3$ в буфере Трис с соотношением пиовердина и железа 4:1 в 200 мкМ конечном растворе. Для нагрузки пиохелина радиоактивным железом, 40 мкл раствора $^{55}\text{FeCl}_3$ в концентрации, составляющей 0,25 мМ в HCl 0,5 н., добавляли к метаноловому раствору пиохелина в концентрации 1 мМ. Через 15 мин времени инкубации добавляли 940 мкл Трис HCl 50 мМ с pH 8,0, с получением 20 мкМ раствора $^{55}\text{Fe-Pch}$ с соотношением пиохелина и железа 2:1. Бактерии получали следующим образом: в 10 мл культуры, полученной в течение ночи в среде Мюллера-Хинтона, вводили выделенный клон, центрифугировали, промытый осадок ресуспендировали в 25 мл среды сукцината и инкубировали при встряхивании в течение 2 ч. Одновременно в 20 мл среды Мюллера-Хинтона вводили 5 мл культуры, полученной в течение ночи, и инкубировали при встряхивании в течение 2 ч для использования в качестве фонового уровня захвата железа. Затем 25 мл культур бактерий центрифугировали и промывали соответствующей средой перед суспендированием осадка в буфере Трис HCL 50 мМ с pH 8,0, и измеряли OD при 595 нм для получения конечной концентрации в анализе, составляющей OD=1.

Процент включения рассчитывали для каждой точки концентрации, а подавление рассчитывали с помощью компьютерной программы для внутреннего пользования. Для данного расчета максимальное содержание захвата железа основано на значении, полученном в минимальной среде сукцината, не содержащей какого-либо мутеина липокалина, а фоновое значение получали в обогащенной среде Мюллера-Хинтона, где рецептор сидерофора не экспрессировался.

Таблица 4. Мутеины липокалина блокировали захват *P. aeruginosa*, как иллюстративно показано для мутеинов липокалина под SEQ ID NO: 16, 37, 53 и 62

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

Пример 8. Функциональное исследование мутеинов, связывающихся с сидерофорами *P. aeruginosa*; подавление роста

Подавление бактериального роста определяли по инкубированию мутеинов, связывающихся с сидерофорами *P. aeruginosa* в среде сукцината, обработанной Chelex, обогащенной раствором примесных элементов и 0,1 мг/мл BSA с бактериальной культурой MS, разбавленной до конечного значения OD 0,05 при 595 нм в черном 96-луночном планшете с прозрачным дном. Планшет инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, встряхивая через каждые 20 мин и считывая значения OD при 595 нм в ридере IEMS MF от Thermo Labsystem. Подавление роста иллюстративно показано для штамма Pvd I и Pvd I-специфического мутеина под SEQ ID NO: 16 на фиг. 4A, для штамма Pvd II и Pvd II-специфического мутеина под SEQ ID NO: 19 и под SEQ ID NO: 36 на фиг. 4B, для штамма Pvd III и Pvd III-специфического мутеина под SEQ ID NO: 53 на фиг. 4C и для Pvd I-нокаутированного (ΔpvdA) штамма, зависимого от пиохелина для захвата железа для роста, и пиохелин-специфического мутеина под SEQ ID NO: 62 на фиг. 4D. В качестве контроля выступал бактериальный рост без мутеина липокалина.

Пример 9. Оценка устойчивости мутеинов

Для оценки температуры плавления в качестве общего показателя общей устойчивости сидерофор-специфичные мутеины (под SEQ ID NO: 13-18; 26, 31-36; 47-53; 58-62) при концентрации белка 1 мг/мл в PBS (Gibco) изучали (25-100°C) при 1°C/мин с помощью капиллярного инструмента nanoDSC (CSC 6300, TA Instruments). Температуру плавления (T_m) рассчитывали, исходя из отображенной термограммы с помощью интегрированной компьютерной программы Nano Analyze.

Полученные температуры плавления, а также начало плавления для мутеинов липокалина (под SEQ ID NO: 13-18; 26, 31-36; 47-53; 58-62) приведены в табл. 5A-D ниже. Для всех групп Pvd, а также для му-

теинов липокалина рch Tm в диапазоне 70°C, наилучший мутеин липокалина для каждого типа Pvd и рch в диапазоне от 68 до 74°C можно выбрать с указанием соответствующей устойчивости молекул.

Таблица 5А. Tm и начало плавления Pvd I-специфичных мутеинов липокалина, как определено с помощью nanoDSC

SEQ ID	nanoDSC	
	Tm °C	Начало
SEQ ID NO: 13	59	51
SEQ ID NO: 14	61	51
SEQ ID NO: 15	68	59
SEQ ID NO: 16	69	60
SEQ ID NO: 17	61	53
SEQ ID NO: 18	61	54

Таблица 5В. Tm и начало плавления Pvd II-специфичных мутеинов липокалина, как определено с помощью nanoDSC

SEQ ID	nanoDSC	
	Tm °C	Начало
SEQ ID NO: 26	65	58
SEQ ID NO: 31	67	60
SEQ ID NO: 32	64	56
SEQ ID NO: 33	67	61
SEQ ID NO: 34	67	56
SEQ ID NO: 35	71	63
SEQ ID NO: 36	70	61

Таблица 5С. Tm и начало плавления Pvd III-специфичных мутеинов липокалина, как определено с помощью nanoDSC

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

Таблица 5D. Tm и начало плавления рch-специфичных мутеинов липокалина, как определено с помощью nanoDSC

SEQ ID	nanoDSC	
	Tm °C	Начало
SEQ ID NO: 58	63	51
SEQ ID NO: 59	60	54
SEQ ID NO: 60	68	56
SEQ ID NO: 61	69	63
SEQ ID NO: 62	74	63

Для оценки устойчивости во время хранения и замораживания/размораживания мутеины в концентрации 1 мг/мл в PBS инкубировали в течение 1 недели при температуре 37°C или подвергали циклам замораживания/размораживания. Активный мутеин определяли с помощью количественного ELISA. Мономерный белок определяли с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Иллюстративные данные для SEQ ID NO: 16, 36, 53, 62 показаны в табл. 6.

Для определения активности белков применяли следующий ELISA: 384-луночный планшет, пригодный для измерений флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, с черным плоским дном, с высокой степенью связывания) покрывали 20 мкл нейтравидина (Thermo Scientific) при концентрации 5 мкг/мл в PBS в течение ночи при температуре 4°C. После промывания покрываемые нейтравидином лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера (2% об./вес BSA в PBS, содержащем 0,1% об./об. Tween 20) в течение 1 ч. После повторного промывания добавляли 20 мкл биотинилированного и железосодержащего сукцинила пиовердина I, сукцинила пиовердина II, сукцинила пиовердина III или биотинилированного

пиохелина 1 мкг/мл в блокирующем буфере. Планшет промывали и 20 мкл соответствующим образом разбавленного белкового стандарта, эталонного образца, не подвергнутого стрессовому воздействию, или образца, подвергнутого стрессовому воздействию, переносили в планшет ELISA и инкубировали. Для количественного определения связанного с планшетом белка планшет ELISA промывали, удаляли остаточные супернатанты и добавляли 20 мкл антитела к hNGAL, меченого HRP, в заранее определенной оптимальной концентрации в блокирующем буфере и инкубировали. После промывания в каждую лунку добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Pierce) и реакцию продолжали в течение 20-30 мин. Интенсивность флуоресценции каждой лунки планшета считывали с помощью микропланшет-ридера для флуоресценции (Tecan).

Если не указано иное, то все стадии инкубации выполняли в течение 1 ч при комнатной температуре, и после каждой стадии инкубации планшет промывали пять раз 100 мкл буфера PBS-T (PBS, 0,05% Tween 20) с помощью моечной машины Biotek ELx405 select CW.

Для вышеописанного ELISA получали калибровочную кривую, включающую 11 разбавлений, обычно находящихся в диапазоне 0,008-500 нг/мл, и для каждого образца получали три различных независимых разбавления в пределах линейного диапазона калибровочной кривой. Для разбавления использовали блокирующий буфер, необязательно обогащенный 1% плазмой крови человека или мышиных.

Калибровочную кривую подбирали с помощью модели 4-параметрической логистической (4PL) нелинейной регрессии и использовали для расчета активных концентраций белка для исследуемых образцов. Определяемые активные концентрации белка сравнивали с образцом, не подвергнутому стрессовому воздействию, хранящемуся в той же концентрации и в той же матрице.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию выполняли в системе HPLC Agilent с двумя колонками Superdex 75 5/150 GL (GE Healthcare) в ряду, использующем PBS (Gibco) в качестве элюента, при скорости потока 0,3 мл/мин.

Для оценки устойчивости при хранении в плазме мутеины в концентрации 0,5 мг/мл инкубировали в течение 1 недели при 37°C в плазме крови человека, мыши и крысы. Активный мутеин определяли с помощью описанного количественного ELISA.

Все исследуемые мутеины липокалина оказались устойчивыми при всех исследуемых условиях.

Таблица 6. Устойчивость после 3 циклов замораживания/размораживания (F/T); через 1 неделю хранения в PBS при 37°C и через 1 неделю хранения в плазме крови человека (hu), мыши (mu) или крысы, определяемая по восстановлению активности в qELISA и содержанию мономеров в аналитическом SEC: устойчивы в qELISA=100 +/- 15%; устойчивы в aSEC=100 +/- 5% (извлечение площади пика мономеров, сравниваемой с эталонным образцом, не подвергнутому стрессовому воздействию); для всех образцов, в том числе эталонных образцов, определяли содержание мономеров на 100% площади.

		3xF/T, -20°C, 1 мг/мл		1 неделя PBS, 37°C, 1 мг/мл		1 неделя плазма крови человека, 37°C	1 неделя плазма крови мыши, 37°C	1 неделя плазма крови крысы, 37°C
Мутеин	Сидерофор	% восстановления активности в qELISA	% мономеров в aSEC	% восстановления активности в qELISA	% мономеров в aSEC	% восстановления активности в qELISA		
SEQID NO: 16	Pvd I	102	98	86	98	86	100	100
SEQID NO: 36	Pvd II	99	101	104	98	93	91	110
SEQID NO: 53	Pvd III	98	99	107	102	92	83	101
SEQID NO: 62	pch	107	100	95	104	97	102	95

Пример 10. Эффективность in vivo мутеинов липокалина в мышинной модели

У мышей изучали профилактический эффект SEQ ID NO: 19 после внутривенного (в/в) введения при *P. aeruginosa*-индуцированной легочной инфекции.

SEQ ID NO: 19 вводили за 1 ч до инфицирования и во время инфекции. Бактериальную нагрузку в легких оценивали через 24 ч после инфицирования.

Штаммом, используемым в данном исследовании, был *P. aeruginosa* (ATCC27853). Начиная с *P. aeruginosa*, хранящегося при температуре -80°C в смеси PBS/15% глицеринг, культуру, полученную в течение ночи, хранили при температуре 37°C при встряхивании в бульоне Мюллера-Хинтона, после чего добавляли субкультуру (100 мкл культуры, полученной в течение ночи, +100 мл МНВ) до конца логарифмической фазы роста. Культуру промывали дважды и ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере для замораживания при 1E+09 CFU/мл. Для каждого эксперимента размораживали новый флакон и инокулят исследовали по числу жизнеспособных клеток.

Самцов мышей линии Swiss в возрасте 7-8 недель (5 животных/группа), приобретенных в Janvier la-

boratories (Route des chênes secs, 53940 Le Genest Saint Ile, Франция), до использования акклиматизировали в течение по меньшей мере 5 дней. Животных держали при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ при относительной влажности 40-70% и 12-15 сменах свежего воздуха/час. Световой цикл 12/12 ч: световая фаза с 7.00 до 19.00 (нормальный цикл). Показания температуры и относительной влажности непрерывно фиксировали. Содержали по 5 животных на клетку и обеспечивали свободный доступ к воде и стандартному рациону (стандартный рацион АО4 С (SAFE)). Все эксперименты проводили с разрешения этического комитета Sanofi R&D (CEPAL).

Легочную инфекцию индуцировали с помощью интраназальной атаки мышей линии Swiss 1, $E+07$ CFU/мышь *P. aeruginosa* в концентрации 50 мкл NaCl 0,9%.

SEQ ID NO: 19 в концентрациях 200, 400, 1000 или 2000 мкг/мышь вводили за 1 ч до инфицирования и во время инфекции с помощью в/в болюса.

Через 24 ч после инфицирования животных выводили из эксперимента и определяли, а также выражали в $\log_{10}$ CFU/мл в виде среднего $\pm$ ст. ош. сред. знач., количество бактерий из легочных гомогенатов.

Статистический анализ выполняли с помощью SAS v9.2. Для представления фигур использовали компьютерную программу Excel 2003. Сравнения доз SEQ ID NO: 19 в зависимости от носителя оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием критерия Дуннетта (ZAR J.H., "Biostatistical Analysis", Prentice Hall International Editions, 4ème édition, 1999.; C.W. Dunnett, "A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control", J. Amer. Statist. Assoc, 50 (1955), pp. 1096-1121, 1955).

В модели *P. aeruginosa*-индуцированной легочной инфекции у мышей вводили SEQ ID NO: 19 за 1 ч до и во время бактериальной атаки, и SEQ ID NO: 19 предотвращала развитие инфекции у мышей дозозависимым образом. Значимый профилактический эффект наблюдали для SEQ ID NO: 19, начиная с концентрации 200 мкг/мышь, с максимальным эффектом при концентрации, составляющей 2000 мкг/мышь.

Пример 11. Кристаллизация

Для определения трехмерной структуры белка SEQ ID NO: 31 в комплексе с Pvd-Fe применяли следующую процедуру.

Последовательность белка, обозначенную на фиг. 6, клонировали в плазмиде pET-24a и экспрессировали в виде конструкции сайта распознавания на N-конце меченой 6His-TEV протеазы.

Плазмиду использовали для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) Star и полученные клоны вводили в среду Overnight Express Instant TB (Novagen), а клетки собирали через 47 ч после инкубации при температуре 18°C при перемешивании со скоростью 200 об./мин при конечном значении OD_{600} , составляющем 4,7. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 500 mM NaCl, 10 mM имидазола, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM TCEP, 5% глицерина и 20 mM Трис с pH 7,4 и лизировали с помощью стандартной ультразвуковой процедуры. Полученный экстракт удаляли с помощью низкоскоростного центрифугирования и супернатант фильтровали через мембрану 22 нм перед загрузкой в 5 мл колонку Ni NTA (Qiagen), предварительно уравновешенную 100 mM NaCl, 10 mM имидазола, 100 mM буфера HEPES с pH 8. Белок элюировали линейным градиентом имидазола от 10 до 300 mM и дополнительно диализировали в течение ночи в 100 mM NaCl, 10 mM имидазола, 100 mM буфера HEPES с pH 8. Белок концентрировали до 20 мг/мл и загружали в гель-фильтрационную колонку Superdex 75 (GE). Полученный белок диализировали в 100 mM NaCl, 10 mM буфера HEPES pH 8 в течение ночи в присутствии протеазы TEV (соотношение 1/50) для удаления 6His N-концевой метки с последующей стадией очистки отрицательной Ni NTA, как описано выше, для разделения отделенного белка. Конечный белок концентрировали до значения 12 мг/мл в 100 mM NaCl, 50 mM HEPES с pH 7,5 предварительно делили на аликваты, мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C для дальнейшего использования.

Для кристаллизации белок инкубировали с Pvd-Fe в 10-кратной молярной концентрации в течение ночи и помещали для исследования кристаллизации, проводимой в планшетах формата SBS, где 100 нл капель белка смешивали с 100 нл раствора для исследования кристаллизации в экспериментах формата сидячих капель при диффузии паров при 20 и 4°C . Выявили несколько пиков кристаллизации и условия кристаллизации дополнительно оптимизировали для получения хорошо дифрагирующих кристаллов с качеством, определенным рентгенографическим методом.

Качество дифракции кристаллов оценивали с помощью источника рентгеновских лучей в синхротроне и лучшие дифрагирующие кристаллы получали в условиях 20% PEG3350 и 0,2 M $LiSO_4$ при 20°C . Лучшие кристаллы защищали с помощью криопротекции повышением концентрации PEG3350 до 35%, затем мгновенной заморозки в жидком азоте и набор данных $1,8 \text{ \AA}$ собирали при температуре 100 K.

Рентгенографические данные обрабатывали с помощью MOSFLM, структуру белка определяли способом молекулярного замещения с использованием pdb 1LKE в качестве модели поиска и структурную модель дополнительно очищали до качества $R_{\text{free}}=0,233$ - $R=0,200$ в P41212 с 2 тройными белковыми комплексами на асимметричную единицу.

Структура белка представляла собой классический каркас липокалина с Pvd-Fe, связанным с обои-

ми мутеиновыми белками в асимметричной единице, фиг. 7. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании Pvd-Fe, анализировали и представляли на фиг. 8. Атомы кислорода Pvd, непосредственно связывающие Fe, выявляли и представляли на фиг. 9.

Настоящее изобретение относится к полипептиду, характеризующемуся специфичностью связывания с пиовердином I, II, III типа или пиохелином, где полипептид содержит мутеин hNGAL, который связывается с пиовердином I, II, III типа или пиохелином с поддающейся выявлению аффинностью.

В одном варианте осуществления мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 и 145 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления указанный мутеин способен связывать пиовердин I типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше при измерении с помощью инструмента Biotec T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с сукцинилом Pvd I типа, сукцинамидом Pvd I типа и α -кетоглутарилом Pvd I типа, в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен ингибировать захват железа, опосредованный пиовердином I типа, со значением IC_{50} , составляющим приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен подавлять бактериальный рост штамма Pvd I в анализе, фактически описанном в примере 8.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере один из следующих мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Leu 36

→ Asn, Thr, Val, Trp или Phe; Ala 40 → Gly, Asn, Thr или Phe;
 Ile 41 → Arg, Ala, Thr, Phe или Trp; Gln 49 → Ile, Leu, Val, Ala
 или Pro; Tyr 52 → Met, Trp или Pro; Ser 68 → Asp, Val или Glu;
 Leu 70 → Gln, Trp, Asp или Thr; Arg 72 → Trp, Ala, Ser, Leu, Pro
 или Glu; Lys 73 → Asp, Leu, Ala, Glu или Asn; Asp 77 → Arg, Leu,
 Tyr, Ser, Gln, Thr, Ile или Asn; Trp 79 → Gln, Asp, Ser, Arg,
 Met или Glu; Arg 81 → Gln, Gly, Ile, Glu, His или Asp; Asn 96 →
 His, Ile, Gly, Tyr или Asp; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe
 или Tyr; Leu 103 → Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp или
 Asn; Tyr 106 → His, Gln или Phe; Lys 125 → Arg, Ser, Trp, Tyr,
 Val или Gly; Ser 127 → Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr, His, Ile, Val
 или Asp; Tyr 132 → Trp, Asn, Gly или Lys; и Lys 134 → Asn, His,
 Trp, Gly, Gln или Asp.

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Lys 46 → Glu; Thr 54 → Val или Ala; Ile 55
 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp или Gln; Ile 80 → Thr; Cys 87 →
 Ser или Asn и Thr 136 → Ala.

В другом варианте осуществления мутеин 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 или 21 мутированный аминокислотный остаток в положениях последовательности 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого белка NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys

87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
 Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
 Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asn; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
 Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
 Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
 Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
 Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;
 Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;
 Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His; или
 Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-18 или их фрагмента или варианта.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связывать пиовердин II типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с сукцинилом Pvd II типа, сукцинамидом Pvd II типа и α -кетоглутарилем Pvd II типа, в комплексе с железом и без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше при измерении в анализе ELISA, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен ингибировать захват железа, опосредованный пиовердином II типа, со значением IC_{50} , составляющем приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен подавлять бактериальный рост штамма Pvd II в анализе, фактически описанном в примере 8.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен подавлять рост штаммов *P. aeruginosa*, экспрессирующих пиовердин II типа в анализе, фактически описанном в примере 9.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере один из следующих мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Leu 36

→ Asn, Ile или Val; Ala 40 → Glu, Gly, Asn, Thr или His; Ile 41 → Arg, Val или Thr; Gln 49 → Gly, Ala или Pro; Tyr 52 → Asn, Gly, Trp или Pro; Ser 68 → Asp, Arg или Glu; Leu 70 → Arg или Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser или Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln или Arg; Asp 77 → His, Ile, Met, Lys, Gly или Asn; Trp 79 → Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe или Trp; Arg 81 → Glu, Ser, Tyr или Asp; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn или Ala; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe или Tyr; Leu 103 → Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp или Val; Tyr 106 → Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met или Phe; Lys 125 → Ala, Ile или Asn; Ser 127 → Lys, Arg, Ser, Met, Asp или Asn; Tyr 132 → Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly или Val и Lys 134 → Trp или Tyr.

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp или Gln и Cys 87 → Ser.

В другом варианте осуществления мутеин 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 или 21 мутированный аминокислотный остаток в положениях последовательности 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого белка NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью природного hNGAL дикого типа:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-37 или их фрагмента или варианта.

В другом варианте осуществления указанный мутеин способен связывать пиовердин III типа в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с сукцинилом Pvd III типа, сукцинамидом Pvd III типа и α -кетоглутарилом Pvd III типа, в комплексе с железом и без

такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше при измерении в анализе, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен ингибировать захват железа, опосредованный пиовердином III типа, со значением IC_{50} , составляющем приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен подавлять бактериальный рост штамма Pvd III в анализе, фактически описанном в примере 8.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 и 145 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере один из следующих мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Leu 36

→ Phe или Glu; Ala 40 → Trp, Leu или Arg; Ile 41 → Met, Arg, Ala, Leu или Trp; Gln 49 → His, Ile, Arg, Lys, Met или Pro; Tyr 52 → Asn, Tyr, Arg, Ser или Met; Ser 68 → Asp, Asn, Glu или Gln; Leu 70 → Lys, Asn или Arg; Arg 72 → Leu, Arg, Gln или Tyr; Lys 73 → His, Leu, Ala, Pro, Gln или Tyr; Asp 77 → Ala, Ile, Lys, Gln или Arg; Trp 79 → Ser или Asp; Arg 81 → His, Ala, Ser или Val; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Gly, Leu или Val; Tyr 100 → Ala, Ile, Asn, Pro или Asp; Leu 103 → Gln, Gly, Phe или Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp или Thr; Ser 127 → Val, His, Ile, Phe или Ala; Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp, Gln или Glu.

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Leu 42 → Arg; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg;

Asp 47 → Asn; Asn 65 → Asp; Cys 87 → Ser; Ser 105 → Pro и Thr

145 → Pro.

В другом варианте осуществления мутеин 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 или 21 мутированный аминокислотный остаток в положениях последовательности 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 и 145 линейной полипептидной последовательности зрелого белка NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Met; Gln

49 → His; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Lys; Arg 72 →

Gln; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys

87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gly; Tyr 106 →

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В другом варианте осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38-53 или их фрагмента или варианта.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связывать пиохелин в комплексе с железом при K_D , составляющей приблизительно 20 нМ или меньше при измерении с помощью инструмента Biacore T200 в анализе, фактически описанном в примере 6.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с пиохелином в комплексе с железом, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 500 нМ или меньше при измерении в анализе, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с пиохелином без комплекса с железом, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше при измерении в анализе, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL способен связываться с пиохелином в комплексе с железом или без такового, с аффинностью, измеренной по значению IC_{50} , составляющему приблизительно 200 нМ или меньше при измерении в анализе, фактически описанном в примере 5.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен ингибировать захват железа, опосредованный пиохелином, со значением IC_{50} , составляющим приблизительно 150 нМ или меньше в формате конкурентного ELISA, фактически описанного в примере 7.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL способен подавлять бактериальный рост нокаута

(ΔpvdA) в анализе, фактически описанном в примере 8.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 и 141 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере один из следующих мутированных аминокислотных остатков по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Leu 36

→ His, Met или Val; Ala 40 → Ile, Gln, Tyr или Phe; Ile 41 → Leu, His или Trp; Gln 49 → His, Arg, Ser или Ala; Tyr 52 → Leu, Trp или Pro; Ser 68 → Asp или His; Leu 70 → Arg или Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser или Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln или Arg; Asp 77 → Arg, Thr, Pro или Asp; Trp 79 → Ala, Arg, Lys или Asp; Arg 81 → Thr, Ile или Trp; Asn 96 → Met, Asn, Pro или Ala; Tyr 100 → Gly, His или Glu; Leu 103 → Gly, Met, His или Gln; Tyr 106 → Met, Gly, Arg или Trp; Lys 125 → Trp, Phe, Gly или Leu; Ser 127 → Arg, Trp, Asp или Ile; Tyr 132 → Ala, Glu или Thr и Lys 134 → Leu, Val, Asn или Phe.

В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит следующую замену по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg or Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser и Thr 141 → Ala.

В другом варианте осуществления мутеин 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 или 21 мутированный аминокислотный остаток в положениях последовательности 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 и 141 линейной полипептидной последовательности зрелого белка NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL содержит один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

Trp; Lys 125→ Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val;
 Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ala; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77→ Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Arg; Lys 125→ Leu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Asn;
 Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77→ Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;
 Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77→ Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125→ Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val;
 Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77→ Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
 Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; или
 Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77→ Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125→ Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.

В другом варианте осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-63 или их фрагмента или варианта.

В другом варианте осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-63 или их фрагмента или варианта.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL содержит один или несколько неприродных цистеиновых остатков, замещающих одну или несколько аминокислот hNGAL дикого типа.

В другом варианте осуществления указанный мутеин hNGAL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного цистеинового остатка другой аминокислотой.

В другом варианте осуществления указанная аминокислота представляет собой сериновый остаток.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL конъюгируют с соединением, выбранным из группы, состоящей из органической молекулы, ферментативной метки, радиоактивной метки, окрашенной метки, флуоресцентной метки, хромогенной метки, люминесцентной метки, гаптена, диоксигена, биотина, цитостатического средства, токсина, комплекса металла, металла и коллоидного золота.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL является слитым на N-конце и/или C-конце с партнером по слиянию, который представляет собой белок или домен белка или пептид.

В другом варианте осуществления мутеин hNGAL конъюгируют с соединением, которое увеличивает время полужизни полипептида в сыворотке крови.

В другом варианте осуществления полипептид содержит соединение, которое продлевает время полужизни в сыворотке крови, выбранное из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроэтилкрахмала, части Fc иммуноглобулина, домена CH3 иммуноглобулина, домена CH4 иммуноглобулина, альбумин-связывающего пептида или альбумин-связывающего белка.

В другом варианте осуществления полиалкиленгликоль представляет собой полиэтилен (PEG) или его активированное производное.

В другом варианте осуществления охватывается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нук-

леотидную последовательность, кодирующую любой из полипептидов, упомянутых в данном документе.

В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты функционально связывают с регуляторной последовательностью для обеспечения экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержится в векторе или в фagemидном векторе.

В другом варианте осуществления охватывается клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты любой из нуклеиновых кислот, упомянутых в данном документе.

В другом варианте осуществления охватывается способ получения полипептида, описанного в данном документе, где полипептид получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, посредством способов генной инженерии.

В другом варианте осуществления полипептид получают в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и выделяют из данного организма-хозяина или его культуры.

В другом варианте осуществления охватывается композиция, содержащая один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей из (i) полипептида, специфичного к пиовердину I типа, (ii) полипептида, специфичного к пиовердину II типа, (iii) полипептида, специфичного к пиовердину III типа, и (iv) полипептида, специфичного к пиохелину.

В другом варианте осуществления композиция содержит один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей из (i) полипептида, специфичного к пиовердину I типа, (ii) полипептида, специфичного к пиовердину II типа, (iii) полипептида, специфичного к пиовердину III типа, и (iv) полипептида, специфичного к пиохелину.

В другом варианте осуществления композиция содержит три или четыре полипептида, выбранных из группы, состоящей из (i) полипептида, специфичного к пиовердину I типа, (ii) полипептида, специфичного к пиовердину II типа, (iii) полипептида, специфичного к пиовердину III типа, и (iv) полипептида, специфичного к пиохелину.

В другом варианте осуществления композиция содержит полипептид, специфичный к пиовердину I типа.

В другом варианте осуществления композиция содержит полипептид, специфичный к пиовердину II типа.

В другом варианте осуществления композиция содержит полипептид, специфичный к пиовердину III типа.

В другом варианте осуществления композиция содержит полипептид, специфичный к пиохелину.

В другом варианте осуществления указанная композиция дополнительно включает в себя по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное средство, разбавитель или носитель.

В другом варианте осуществления способ получения пиовердина I, II, III типа и/или пиохелина у субъекта предусматривает введение указанному субъекту эффективного количества любой из композиций, упомянутых в данном документе.

В другом варианте осуществления охватывается способ подавления или ослабления роста *P. aeruginosa* у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества любой из композиций, упомянутых в данном документе.

В другом варианте осуществления включен набор, содержащий один или несколько контейнеров, отдельно или совместно, и любую из композиций, упомянутых в данном документе.

В другом варианте осуществления охватывается применение (i) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиохелином, для связывания с пиовердином I, II, III типа и/или пиохелином у субъекта.

В другом варианте осуществления охватывается применение (i) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиохелином, для предотвращения или уменьшения захвата железа *P. aeruginosa* пиовердином и/или пиохелином у субъекта.

В другом варианте осуществления охватывается применение (i) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиохелином.

вии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиохелином, для лечения или ослабления биопленочной инфекции *P. aeruginosa* у субъекта.

В другом варианте осуществления биопленочная инфекция *P. aeruginosa* представляет собой острую или хроническую инфекцию.

В другом варианте осуществления указанные первый, второй, третий и/или четвертый полипептиды вводят в комбинации, в том числе одновременно, совместно или последовательно.

В другом варианте осуществления указанный первый, второй, третий и/или четвертый полипептиды вводят независимо друг от друга, в том числе с индивидуальными интервалами времени в независимых временных точках.

В другом варианте осуществления охватывается комбинация (i) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида в соответствии с любым полипептидом, упомянутым в данном документе, способным связываться с пиохелином.

Варианты осуществления, описанные в данном документе, можно подходящим образом применять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, специально не описанных в данном документе. Таким образом, например, термины "содержащий", "в том числе" и т.д. следует понимать широко и без ограничений. Кроме того, термины и выражения, используемые в данном документе, были использованы в качестве терминов описания, а не ограничения, и отсутствует какое-либо намерение при использовании таких терминов и выражений исключать любые эквиваленты показанных и описанных характеристик или их частей, однако считается, что эти различные модификации возможны в пределах объема заявляемого изобретения. Таким образом, следует понимать, что несмотря на то, что варианты осуществления настоящего раскрытия определенным образом были раскрыты с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных характеристик, за их модификацией и вариантами можно обращаться к специалистам в данной области техники, и такие модификации и изменения считаются находящимися в объеме настоящего раскрытия. Все патенты, патентные заявки, учебники и рецензируемые публикации, описанные в данном документе, включены с помощью ссылки во всей своей полноте. Кроме того, если определение или использование термина в источнике, который включен в данный документ с помощью ссылки, не согласуется или противоречит определению этого термина, представленного в данном документе, то используется определение этого термина, представленного в данном документе, и не используется определение этого термина в источнике. Каждый из более узких видов или субродовых группировок, находящихся в пределах основного раскрытия, также образует часть настоящего изобретения. Это включает в себя основное описание изобретения с оговоркой или отрицательным ограничением, устраняющими любой объект из данного рода, независимо от того, упоминается ли исключенный материал в данном документе специально или нет. Кроме того, если характеристики описаны с точки зрения групп Маркуша, то специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее раскрытие также тем самым описывается с точки зрения любого индивидуального члена или подгруппы членов группы Маркуша. Дополнительные варианты осуществления будут очевидны из следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, характеризующийся специфичностью связывания с пиовердином I, II, III типа или пиохелином, где полипептид содержит мутеин hNGAL, который связывается с пиовердином I, II, III типа или пиохелином с K_D 200 нМ или меньше, где мутеин hNGAL содержит мутированный аминокислотный остаток в одном или нескольких положениях, соответствующих положениям 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 и 145 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1) и, где мутеин имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-63.

2. Полипептид по п.1, где полипептид содержит мутеин, который имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-63.

3. Полипептид по п.1, где полипептид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-63.

4. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по п.1.

5. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.4.

6. Способ получения полипептида по п.1, где полипептид получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, посредством способов генной инженерии.

7. Композиция, содержащая один или несколько полипептидов, выбранных из группы, состоящей

из (i) полипептида по п.1, специфичного к пиовердину I типа, (ii) полипептида по п.1, специфичного к пиовердину II типа, (iii) полипептида по п.1, специфичного к пиовердину III типа, и (iv) полипептида по п.1, специфичного к пиохелину.

8. Способ связывания пиовердина I, II, III типа и/или пиохелина у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции по п.7.

9. Набор, содержащий в одном или нескольких контейнерах, отдельно или совместно, полипептид по п.1, специфичный к пиовердину I типа, или композицию, содержащую его, полипептид по п.1, специфичный к пиовердину II типа, или композицию, содержащую его, полипептид по п.1, специфичный к пиовердину III типа, или композицию, содержащую его, и/или полипептид по п.1, специфичный к пиохелину, или композицию, содержащую его.

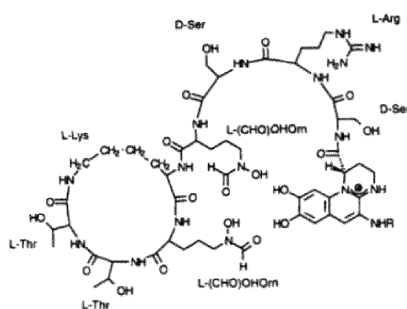
10. Применение (i) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида по п.1, способного связываться с пиохелином, для связывания с пиовердином I, II, III типа и/или пиохелином у субъекта.

11. Применение (i) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида по п.1, способного связываться с пиохелином, для связывания с пиовердином I, II, III типа и/или пиохелином у субъекта, для предотвращения или уменьшения захвата железа *P. aeruginosa* у субъекта посредством пиохелина и/или пиовердина.

12. Применение (i) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином I типа, (ii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином II типа, (iii) полипептида по п.1, способного связываться с пиовердином III типа, и/или (iv) полипептида по п.1, способного связываться с пиохелином для лечения или облегчения протекания у субъекта биопленочной инфекции *P. aeruginosa*.

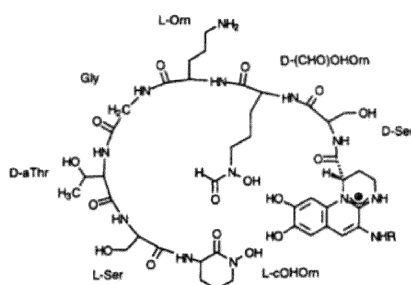
13. Комбинация двух или более полипептидов по п.1.

A



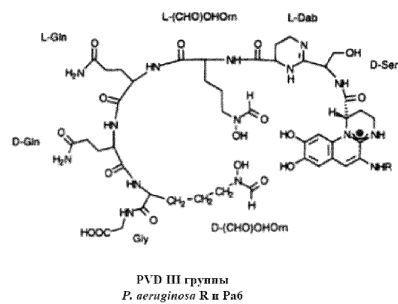
PVD I группы
P. aeruginosa ATCC 15692 (PAO1)

B

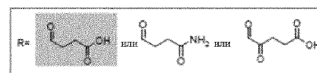


PVD II группы
P. aeruginosa ATCC 27853

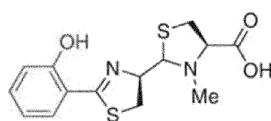
C



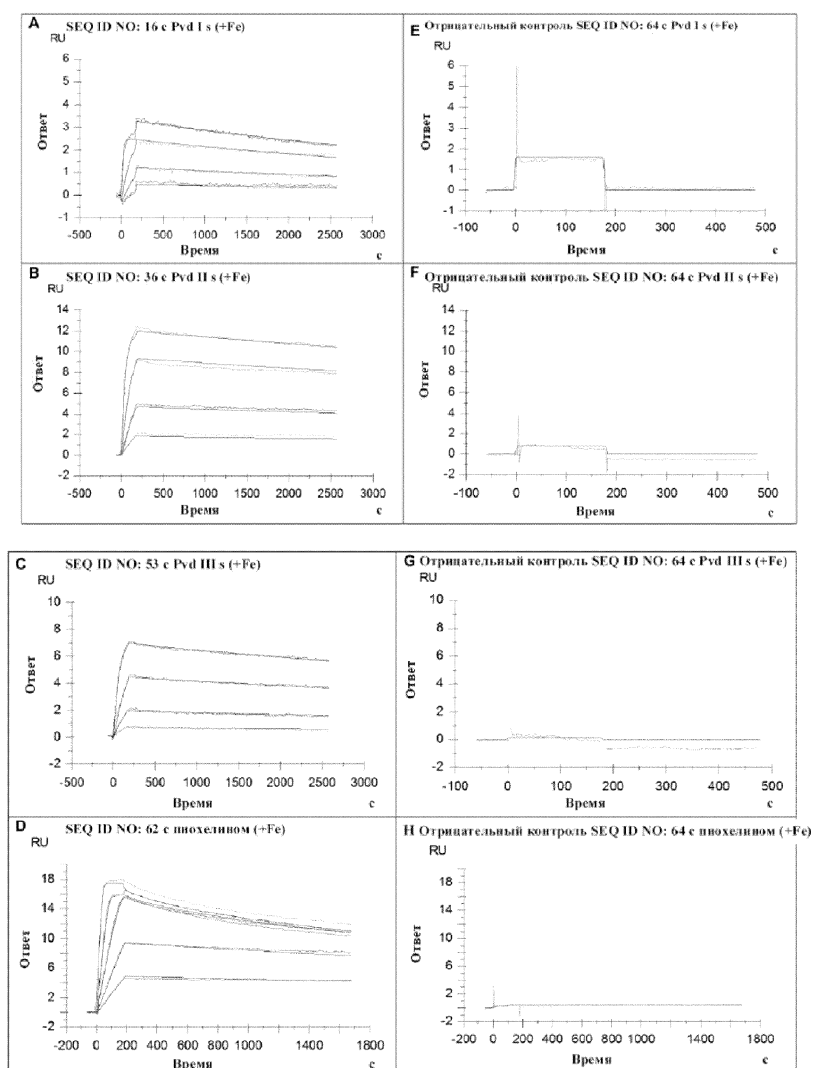
D



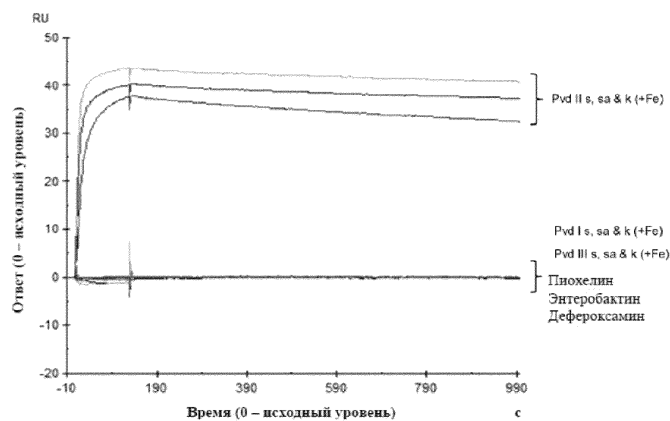
E



Фиг. 1



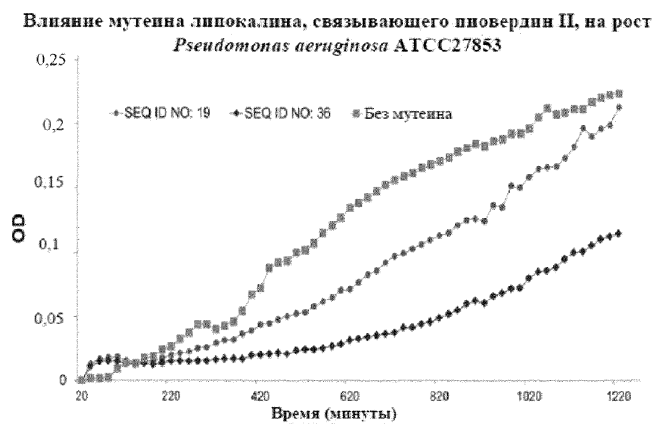
Фиг. 2



Фиг. 3

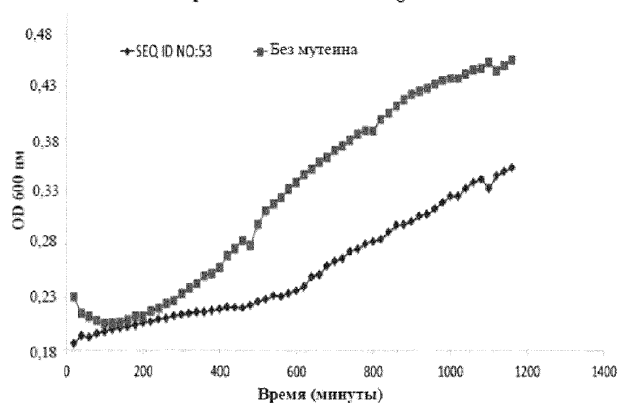


Фиг. 4А



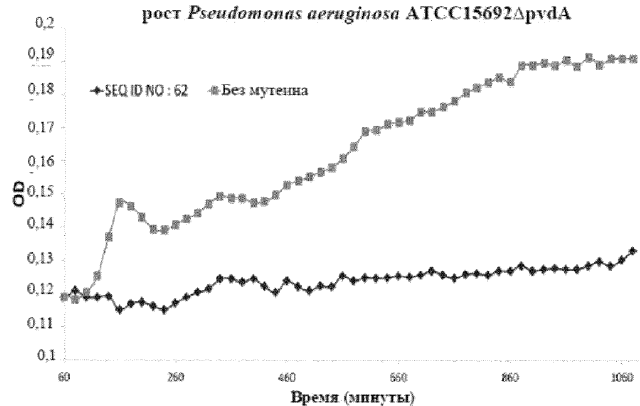
Фиг. 4В

Влияние мутена липокалина, связывающего пивердин III, на рост *Pseudomonas aeruginosa* ATCC33360



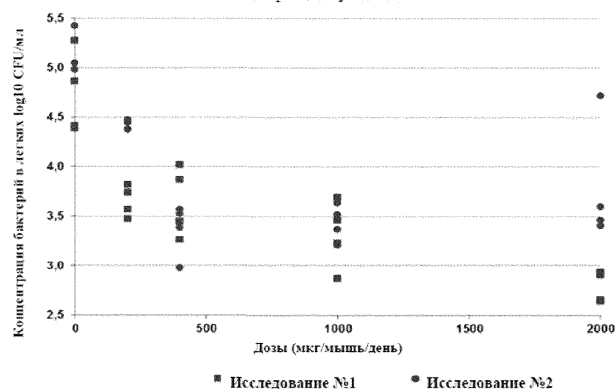
Фиг. 4С

Влияние мутена липокалина, связывающего пивердин, на рост *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692ΔpydA



Фиг. 4D

Доза-эффект SEQ ID NO: 19 при *P. aeruginosa*-индуцированных легочных инфекциях у мышей



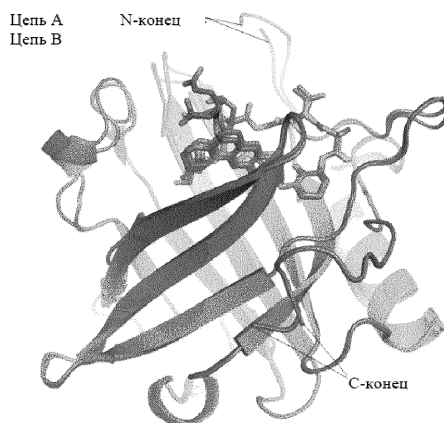
Фиг. 5

Аминокислотная последовательность экспрессируемого белка (SEQ ID NO: 129)

MKHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGQDSTDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHG
 KWYVVGVAGNTILREDKDPGKMNIYELKEDKSYNVTDVRFIRKKCHYYIDT
 FVPGSQPGFTLGNISYPGTTSQLVRVSTNYNQHAMVFFKIVRQNRIFW
 ITLYGRTELKELSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG

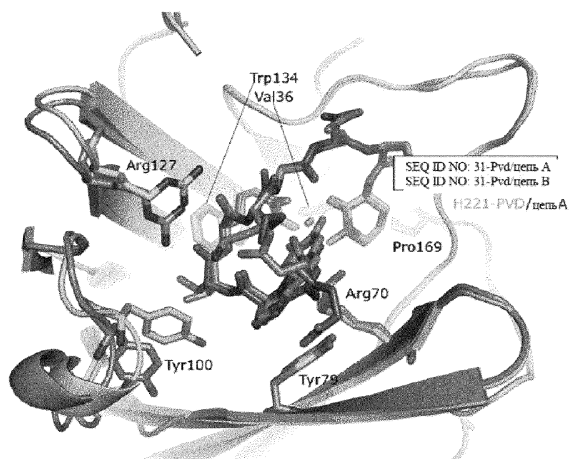
Фиг. 6

SEQ ID NO: 31 – Структура комплекса Pvd-Fe, перекрываются две молекулы
 SEQ ID NO: 31, т. е. цепь А и цепь В из асимметричной единицы.



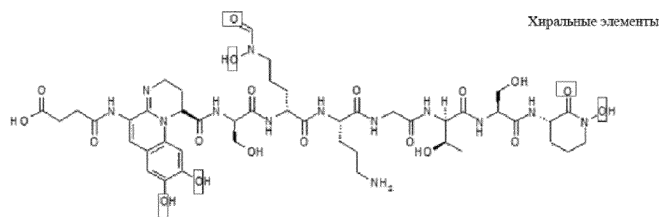
Фиг. 7

SEQ ID NO: 31 и взаимодействия Pvd-Fe. Перекрываются две молекулы из асимметричной единицы. Обозначены боковые цепи, взаимодействующие с Pvd-Fe.



Фиг. 8

Композиция Pvd, атомы кислорода, участвующие в связывании железа, заключены в рамку.



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2