(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035586 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.10

(21) Номер заявки
201891141

(22) Дата подачи заявки
2016.11.30

(51) Int. Cl. ***C07K 19/00*** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВЫЕ АНТИАНГИОГЕННЫЕ СЛИТЫЕ БЕЛКИ

(31) **15197019.1**
(32) **2015.11.30**
(33) **EP**
(43) **2018.10.31**
(86) **PCT/AU2016/051168**
(87) **WO 2017/091850 2017.06.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПИЕРИС ОСТРЕЛИА ПТИ ЛТД. (AU)

(72) Изобретатель:
Ольвилль Шейн, Бел Айба Рачида Сихам, Виденман Александер (DE)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A2-2009142460
WO-A1-2010111625
WO-A2-2015177175
WO-A2-2015104406
WO-A2-2006078717
WO-A2-2003029463
WO-A1-2016122996
WO-A1-2016120307

(57) Изобретение предусматривает слитые полипептиды, содержащие фрагмент, специфичный в отношении Ang-2, и другой фрагмент - в отношении VEGF-A, причем такой слитый полипептид можно применять в качестве антагониста Ang-2 и VEGF-A. Такой слитый полипептид можно использовать во многих фармацевтических применениях, например в качестве средства, применимого для ингибирования или уменьшения ангиогенеза. Настоящее изобретение также касается способов получения слитых полипептидов, описанных в данном документе, а также композиций, содержащих такие слитые полипептиды. Настоящее изобретение дополнительно относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим такие слитые полипептиды, их аминокислотным последовательностям и способам получения таких слитых полипептидов и молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, в настоящем изобретении раскрыты пути применения в терапии и/или диагностике этого слитого полипептида, а также композиций, содержащих один или более таких слитых полипептидов.

035586 B1

035586 B1

I. Уровень техники изобретения

Ангиогенез, т.е. образование новых кровеносных сосудов из существующих сосудов, необходим для многих физиологических и патологических процессов. Обычно ангиогенез тесно регулируется про- и антиангиогенными факторами, однако в случае заболеваний, таких как рак, офтальмологические неоваскулярные заболевания, артрит и псориаз, процесс может протекать неправильно (Folkman, J., Nat. Med., 1:27-31 (1995)). Известен ряд заболеваний, ассоциированных с дерегулированным или нежелательным ангиогенезом. Такие заболевания включают без ограничения офтальмологическую неоваскуляризацию, такую как ретинопатии (в том числе диабетическая ретинопатия), возрастная макулярная дистрофия, псориаз, гемангиобластома, гемангиома, артериосклероз, воспалительное заболевание, такое как ревматоидное или ревматическое воспалительное заболевание, в частности артрит (в том числе ревматоидный артрит), или другие хронические воспалительные расстройства, такие как хроническая астма, артериальный или пост-трансплантационный атеросклероз, эндометриоз и неопластические заболевания, например так называемые солидные опухоли и опухоли жидких тканей (или гематопоэтические) (такие как лейкемии и лимфомы). Другие заболевания, ассоциированные с нежелательным ангиогенезом, будут очевидны для специалиста в данной области техники.

Хотя в регуляции ангиогенеза задействованы многие системы трансдукции сигнала, одна из наиболее хорошо описанных и наиболее селективных в отношении эндотелиальных клеток систем включает в себя рецепторную тирозинкиназу Tie-2, которая селективно экспрессируется в эндотелии сосудов (называемая "Tie-2" или "Tie-2R" (также называемая "ORK"), Tie-2 мыши также называется "tek") и ее лиганды, ангиопоэтины (Yancopoulos, G. D. et al., Nature 407: 242-48 (2000); Gale, N. W. и Yancopoulos, G. D., Genes Dev. 13: 1055-1066 (1999)).

Известны четыре ангиопоэтина; от ангиопоэтина-1 ("Ang-1" в качестве альтернативы имеет сокращение ANGPT1 или Ang1) до ангиопоэтина-4 ("Ang-4"). Эти ангиопоэтины также называются "лиганды Tie-2" (Davis, S., et al., Cell, §7:1161-1169 (1996); Grosios, K., et al., Cytogenet Cell Genet, §4:118-120 (1999); Holash, J., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42: 1611-1625 (1999); Koblizek, T.I., et al., Current Biology, S:529-532 (1998); Lin, P., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95:8829-8834 (1998); Maisonpierre, P.C., et al., Science, 277:55-60 (1997); Papapetropoulos, A., et al., Lab Invest, 79: 213-223 (1999); Sato, T. N., et al., Nature, 375:70-74 (1998); Shyu, K.G., et al., Circulation, 95: 2081-12087 (1998); Suri C, et al., Cell, 37:1171-1180 (1996); Suri, C, et al., Science, 252:468-471 (1998); Valenzuela, D.M., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 96: 1904-1909 (1999); Witzenbichler, B., et al., J Biol Chem, 273: 18514-18521 (1998)).

Как Ang-1, так и -2 связываются с Tie-2 с аффинностью, составляющей 3 нМ (K_d) (Maisonpierre, P.C, et al., Science 277 (1997) 55-60). В то время как связывание Ang-1 с Tie-2 стимулирует фосфорилирование рецептора в культивируемых эндотелиальных клетках, наблюдалось, что Ang-2 выступает в роли как агониста, так и антагониста фосфорилирования рецептора Tie-2 (Davis S., et al., (1996), выше; Maisonpierre, P.C., et al., (1997), выше; Kim I., J.H. Kim et al., Oncogene 19(39):4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska K., P.C. Maisonpierre, et al., Cardiovascular Research 49(3):659-70 (2001)). Фенотипы нокаутов Tie-2 и Ang-1 у мышей одинаковы, что дает основание предполагать, что Ang-1-стимулированное фофорилирование Tie-2 опосредует ремоделирование и стабилизацию развивающихся сосудов внутриутробно посредством поддержания адгезии эндотелиальных клеток и поддерживающих клеток (Dumont D. J., et al., Genes & Development, 8:1897-1909 [1994]; Sato T. N., et al., Nature, 376: 10-14 (1995); Suri C, et al., (1996), выше). Считается, что роль Ang-1 в стабилизации сосудов является консервативной у взрослых людей, у которых он широко и конститутивно экспрессируется (Hanahan D., Science, 277:48-50 (1997); Zagzag D., et al., Experimental Neurology, 59: 391-400 (1999)). Наоборот, экспрессия Ang-2 главным образом ограничена сайтами сосудистого ремоделирования, где, как считается, блокирует функцию Ang-1, индуцируя таким образом состояние пластичности сосудов, способствующее ангиогенезу (Hanahan D., (1997), выше; Holash J., et al., Science, 284:1994-1998 (1999); Maisonpierre P. C, et al., (1997), выше).

Ангиопоэтин-2 человека ("Ang-2", в качестве альтернативы сокращенный ANGPT2 или Ang2) описан у Maisonpierre, P.C., et al., Science 277 (1997) 55-60 и Cheung, A. H., et al., Genomics 48 (1998) 389-91. В многочисленных опубликованных исследованиях предположительно продемонстрирована селективная в отношении сосудов экспрессия Ang-2 при болезненных состояниях, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом (Bunone, G., et al., American Journal of Pathology, 155:1961-1916 (1999); Etoh T., et al., Cancer Research, 67:2145-2153 (2001); Hangai M., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42: 1611-1625 (2001); Holash J., et al., (1999) выше; Kuroda K., et al., Journal of Investigative Dermatology, 116: 113-120 (2001); Otani A., et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40:1912-1920 (1999); Stratmann A., et al., American Journal of Pathology, 153: 1459-1466 (1998); Tanaka S., et al., J Clin Invest, 203:34-345 (1999); Yoshida Y., et al., International Journal of Oncology, 25:1221-1225 (1999); Yuan K., et al., Journal of Periodontal Research, 35:165-171 (2000); Zagzag D., et al., (1999) выше). Эффективная анти-Ang-2-терапия будет приносить пользу огромной группе пациентов с ангиогенез-ассоциированными заболеваниями, такими как рак, ретинопатии, артрит и псориаз.

Значимым фактором, который также участвует в физиологическом ангиогенезе и различных заболеваниях и расстройствах, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом, например ростом солидных опухолей, является фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A (также известный как VEGF) (Fer-

rara, Nature (2005) 438, 967-974). Действительно, в экспериментах с нейтрализующими антителами и другими ингибиторами было показано, что блокада пути VEGF-A может быть достаточной для значительной супрессии роста опухолей, ассоциированных с ангиогенезом, во многих моделях (Willett, Cancer Cell (2007) 10(2), 145-147; Batchelor, Cancer Cell (2007) 11(1), 83-95), и многие терапии, нацеливающие на данный фактор, были успешны в качестве средств сосудистой нормализации у пациентов, страдающих от различных состояний, возникающих в результате патологического ангиогенеза, в том числе неоваскулярной возрастной макулярной дистрофии (nAMD) (Rosenfeld, N Engl J Med (2006) 355(14), 1419-1431; Trichonas G, Ophtalmol Ther (2013) 2(2), 89-98; Martin, N Engl J Med (2011) 364(2), 1897-1908; Solomon, Cochrane Database Syst Rev (2013) 8, Art. No.:CD005139).

Однако в недавнем исследовании в отношении терапии, нацеленной на блокаду VEGF, было обнаружено, что такие виды терапии могут способствовать более инвазивному клеточному фенотипу и усиливать диссеминацию опухолевых клеток (Casanovas, Cancer Cell (2005) 8(4), 299-309; Pae-Ribes, Cancer Cell (2009) 15, 220-231). Одна теория, в которой рассчитывают на данный эффект, основана на значительном ограничении снабжения опухоли кислородом, которое имеет место при применении антиангиогенных средств, вызывая состояние гипоксии. Гипоксия может приводить к транскрипционной активации ряда генов посредством стабилизации фактора транскрипции HIF-1α, который в присутствии кислорода подлежит протеосомному разрушению кислород-зависимыми пропил-гидроксилазами. Гены, нацеленные для активации, включают сам VEGF-A, который в нормальной ситуации способствовал бы ангиогенезу, чтобы преодолеть гипоксию. Также было заявлено, что экспрессия Ang-2' может индуцироваться VEGF-A в условиях гипоксии и, таким образом, может дополнительно способствовать дестабилизации сосудов в процессе физиологического или патологического ангиогенеза (Simon J. Cell Physiol (2008) 217(3), 809-818).

Совсем недавно была дополнительно установлена функциональная связь между Ang-2 и VEGF-A, когда предположили, что Ang-2 может отвечать за компенсаторную реваскуляризацию и рост опухоли во время анти-VEGF-терапии, и при этом было показано, что он вмешивается в анти-VEGFR-2-индуцированную нормализацию сосудов (Bullock, J Clin Oncol (2010) 28, abstr 4630). Данные также подтверждают комплементарный механизм действия антагонистов Ang-2 и VEGF в контекстном предупреждении ангиогенеза и роста опухолей (Hashizume, Cancer Res (2010) 70, 2213-2223).

Учитывая перекрывание и компенсаторные механизмы действия ключевых ангиогенных факторов с высоким терапевтическим потенциалом, таких как Ang-2 и VEGF-A, клинический потенциал нынешних видов монотерапии является очевидно ограниченным (Bergers, Nat Rev Cancer (2008) 8, 592-603). В самом деле, преклинические данные недавно показали, что одновременный блок обоих факторов приводит к увеличенной противоопухолевой, антиангиогенной и антиметастатической активности по сравнению с таковой при применении определенных моноспецифических средств в отдельности (Kienast, Clin Cancer Res (2013) 19(24), 6730-6740). В данном контексте существует явная потребность в разработке эффективных средств с двойным нацеливанием, таких как полипептид, раскрытый в данном документе.

Настоящее изобретение удовлетворяет данную потребность и предусматривает анти-VEGF-A/Ang2 биспецифические терапевтические белки. Нынешние биспецифические антитела, специфичные в отношении VEGF-A и Ang-2, являются, однако, субоптимальными, ограниченными, например моновалентностью и геометрией, что может влиять на захват мишени и эффективность, не говоря уже о том, что характеризуются относительно высокой молекулярной массой, составляющей примерно 150 кДа. Настоящее изобретение преодолевает эти и другие ограничения, предусматривая новые би-и мультиспецифические слитые полипептиды, которые являются по меньшей мере бивалентными в отношении каждой из требуемых терапевтических мишеней и характеризуются уникальной геометрией для улучшенного захвата мишени.

II. Определения

В нижеприведенном перечне определены термины, фразы и сокращения, используемые по всему данному описанию. Подразумевается, что все термины, перечисленные и определенные в данном документе, охватывают все грамматические формы.

Как используется в данном документе, "Ang-1", если не указано, что он происходит от видов, отличных от человека (например, "Ang-1 мыши", "Ang-1 обезьяны" и т.д.), означает Ang-1 человека, полноразмерный белок, определенный с помощью Swiss Prot Q15389, или его биологически активный фрагмент (например, фрагмент белка Ang-1, который способен индуцировать ангиогенез in vitro или in vivo).

Как используется в данном документе, "Ang-2", если не указано, что он происходит от видов, отличных от человека (например, "Ang-2 мыши", "Ang-2 обезьяны" и т.д.), означает Ang-2 человека, полноразмерный белок, определенный с помощью Swiss Prot 015123, (также см. фиг. 6 патента США № 6166185; включенного в данный документ с помощью ссылки в полном объеме) или его биологически активный фрагмент (например, фрагмент белка Ang-2, который способен индуцировать ангиогенез in vitro или in vivo).

Термин "Tie-2" (также называемый в уровне техники "tek"), если не указано, что он происходит от видов, отличных от человека (например, "Tie-2 мыши", "Tie-2 обезьяны" и т.д.), относится к Tie-2 человека или его биологически активному фрагменту. Tie-2 человека характеризуется аминокислотной по-

следовательностью, изложенной в базе данных белковых последовательностей NCBI под номером доступа AAA61130.

Как используется в данном документе, "VEGF-A" может представлять собой белок человека с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P15692, белок хомяка с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot Q99PS1, бычий белок с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P15691, белок свиньи с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P49151, белок лошади с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot Q9GKR0, белок овцы с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P50412, белок мыши с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot Q00731, белок крысы с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P16612, белок цыпленка с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P67964, белок морской свинки с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P26617 или фрагмент соответствующего белка. Как упомянуто в данном документе, термин "VEGF" включает VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и/или PLGF. Примеры белков VEGF описаны в данном документе. Предпочтительно указанный термин при использовании в контексте настоящего изобретения и, в частности, при использовании в контексте одного из мутеинов липокалина комбинации согласно настоящему изобретению, относится к VEGF-A. Таким образом, термин "VEGF" включает полноразмерный VEGF, но также включает фрагменты VEGF, предпочтительно VEGF-A, и/или варианты, такие как сплайс-варианты VEGF, предпочтительно VEGF-A. Предпочтительно, указанные фрагменты или варианты являются функциональными, т. е. они характеризуются активностью/функцией VEGF, предпочтительно VEGF-A, описанными в данном документе. Соответственно, если один из мутеинов липокалина комбинации согласно настоящему изобретению называется специфичным в отношении VEGF, то это означает, что такой мутеин липокалина может связывать VEGF, предпочтительно VEGF-A, (a) фрагмент(ы) VEGF, предпочтительно VEGF-A, и/или (a) вариант(ы) VEGF-A, предпочтительно VEGF-A.

Как используется в данном документе, термин "выявляемая аффинность" означает способность связываться с выбранной мишенью с константой аффинности, составляющей, как правило, по меньшей мере приблизительно 10-5 М или ниже. Более низкие значения аффинности, как правило, уже не поддаются измерению с помощью стандартных способов, таких как ELISA, а следовательно имеют второстепенное значение.

Используемую в данном документе "аффинность связывания" белка согласно настоящему изобретению (например, мутеина липокалина 2 человека) в отношении выбранной мишени (в данном случае Ang-1 или Ang-2) можно измерять (и таким образом определять значения K_d комплекса "мутеин-лиганд") с помощью множества способов, известных специалисту в данной области техники. Такие способы включают без ограничения флуоресцентное титрование, прямой ELISA, конкурентный ELISA, калориметрические способы, такие как изотермическая титрационная калориметрия (ITC) и поверхностный плазмонный резонанс (Biacore). Такие способы хорошо известны из уровня техники, и их примеры также подробно описаны ниже.

Следует также отметить, что на образование комплекса между соответствующей связывающей молекулой и ее лигандами влияет много различных факторов, таких как концентрации соответствующих партнеров по связыванию, наличие конкурентов, значение pH и ионная сила используемой буферной системы, а также экспериментальный способ, используемый для определения константы диссоциации K_d (например, флуоресцентное титрование, прямой ELISA, конкурентный ELISA или поверхностный плазмонный резонанс, при этом упомянуты лишь некоторые из них), или даже математический алгоритм, который используется для оценки экспериментальных данных.

Следовательно, специалисту в данной области также очевидно, что значения K_d (константа диссоциации комплекса, образованного между соответствующей связывающей молекулой и ее мишенью/лигандом) могут варьироваться в пределах определенного экспериментального диапазона, в зависимости от способа и экспериментальной установки, которая используется для определения аффинности конкретного мутеина в отношении данного лиганда. Это означает, что может иметь место незначительное отклонение в измеренных значениях K_d или диапазоне допусков, зависящее, например, от того, было ли значение K_d определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore), конкурентного ELISA или "прямого ELISA".

Как используется в данном документе, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению "специфически связывает" мишень (например, Ang-1 или Ang-2) или характеризуется "специфичностью связывания" в отношении мишени, если он способен отличать эту мишень от одной или более эталонных мишеней, поскольку специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. "Специфичное связывание" можно определять, например, в соответствии с результатами вестерн-блоттингов, тестов ELISA, RIA, ECL, IRMA, с использованием IHC и пептидных сканирований.

Термины "липокалин 2 человека", или "Lcn 2 человека", или "NGAL человека", или "hNGAL", используемые в данном документе, относятся к зрелому липокалину человека, ассоциированному с жела-

тиназой нейтрофилов (NGAL), под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188. Мутеин липокалина 2 человека согласно настоящему изобретению также может называться в данном документе как "мутеин hNGAL". Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, можно использовать в качестве предпочтительной "эталонной последовательности", более предпочтительно в качестве эталонной последовательности используют аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1.

Как используется в данном документе, термины "мутеин", "подвергнутый мутации" объект (либо белок, либо нуклеиновая кислота) или "мутант" означают обмен, делецию или вставку одного или более нуклеотидов или аминокислот по сравнению со встречающимся в природе (дикого типа) "эталонным" остовом нуклеиновой кислоты или белка. Термин "мутеин", используемый в данном документе, также включает его функциональные фрагменты или варианты. Фрагменты или варианты конкретных мутеинов, описанных в настоящем изобретении, предпочтительно сохраняют функцию связывания с Ang-1 или Ang-2, например с выявляемой или даже более высокой аффинностью, и такие фрагменты или варианты представляют собой "функциональные фрагменты или варианты" эталонных мутеинов, раскрытых в данном документе.

Термин "фрагмент", используемый в данном документе применительно к мутеинам липокалина согласно настоящему изобретению, относится к белкам или пептидам, полученным из полноразмерного зрелого липокалина 2 человека, который укорочен с N-конца и/или С-конца, т. е. у него отсутствует по меньшей мере одна из N-концевых и/или С-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут включать по меньшей мере 10 или более, 20 или более, 30 или более последовательных аминокислот из первичной последовательности зрелого липокалина 2 человека и обычно являются выявляемыми в иммунологическом анализе на зрелый липокалин. У такого фрагмента может отсутствовать до 2, до 3, до 4, до 5, до 10, до 15, до 20, до 25 или до 30 (включая все промежуточные количества) N-концевых и/или С-концевых аминокислот. Понятно, что фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент полноразмерного зрелого липокалина 2 человека (мутеин), что означает то, что он предпочтительно содержит карман связывания полноразмерного липокалина 2 человека (мутеина), из которого он был получен. В качестве иллюстративного примера такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере аминокислоты 28-134, предпочтительно по меньшей мере аминокислоты 13-157 из линейной полипептидной последовательности полноразмерного зрелого липокалина 2 человека.

Как правило, термин "фрагмент", используемый в данном документе в отношении соответствующего белкового лиганда мутеина согласно настоящему изобретению или комбинации в соответствии с настоящим изобретением, относится к укороченным с N-конца и/или С-конца белковым или пептидным лигандам, которые сохраняют способность полноразмерного лиганда быть распознанными и/или связанными мутеином в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "мутагенез", используемый в данном документе, означает, что экспериментальные условия выбраны таким образом, что аминокислота, встречающаяся в природе в данном положении последовательности зрелого липокалина 2 человека, может быть заменена по меньшей мере одной аминокислотой, которая не присутствует в этом конкретном положении в соответствующей природной полипептидной последовательности. Термин "мутагенез" также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности путем делеции или вставки одной или более аминокислот. Таким образом, в пределах объема настоящего изобретения находится то, что, например, одну аминокислоту в выбранном положении последовательности заменяют отрезком из трех случайных мутаций, что приводит к вставке двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента белка дикого типа. Такая вставка или делеция могут быть введены независимо друг от друга в любой из пептидных сегментов, которые могут быть подвергнуты мутагенезу согласно настоящему изобретению.

Термин "случайный мутагенез" означает, что в определенном положении последовательности предопределенная единичная аминокислота (мутация) не присутствует, а по меньшей мере две аминокислоты могут быть включены с определенной вероятностью в заранее определенное положение последовательности в ходе мутагенеза.

"Идентичность" является свойством последовательностей, с помощью которого определяют их сходство или родство. Термин "идентичность последовательностей" или "идентичность", используемый в настоящем изобретении, означает процентную долю попарно идентичных остатков, -последующее (гомологичное) выравнивание последовательности полипептида согласно настоящему изобретению с последовательностью запроса, -относительно количества остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательностей определяют путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество остатков и умножения полученного результата на 100.

Термин "гомология" используется в данном документе в его общепринятом значении, и он включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые рассматриваются как консервативные замены (например, обмен остатка глутамата на остаток аспартата) в эквивалентных положениях в линейной аминокислотной последовательности полипептида согласно настоящему изобретению (например, любого мутеина согласно настоящему изобретению).

Процентную долю гомологии последовательностей или идентичности последовательностей, на-

пример, можно определять в данном документе с использованием программы BLASTP, версии blastp 2.2.5 (от 16 ноября 2002 г.; см. Altschul S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). В данном варианте осуществления процентная доля гомологии основана на выравнивании целых полипептидных последовательностей (матрица: BLOSUM 62; штрафы за введение гэпа: 11,1; пороговое значение устанавливали как 10-3), в том числе последовательностей пропептидов, предпочтительно с использованием остова белка дикого типа в качестве эталона в сравнительном анализе пар. Ее рассчитывают как процентную долю количества "положительных результатов" (гомологичных аминокислот), указанных в качестве результата в расчете с помощью программы BLASTP, разделенных на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

В частности, для того, чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, отличного от человеческого липокалина 2 дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности человеческого липокалина 2 дикого типа, специалист в данной области может применять средства и способы, хорошо известные из уровня техники, например, выравнивания либо вручную, либо с использованием компьютерных программ, таких как BLAST2.0, которая означает средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая подходит для получения выравниваний последовательностей. Соответственно, человеческий липокалин 2 дикого типа может служить в качестве "последовательности для сравнения" или "эталонной последовательности", тогда как аминокислотная последовательность мутеина, отличного от человеческого липокалина 2 дикого типа, описанного в данном документе, служит в качестве "искомой последовательности". Термины "эталонная последовательность" и "последовательность дикого типа" используются в данном документе взаимозаменяемо.

"Гэпы" представляют собой пространства в выравнивании, которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Таким образом, две абсолютно одинаковые копии последовательности характеризуются 100% идентичностью, а последовательности, которые являются менее высококонсервативными и имеют делеции, добавления или замещения, могут характеризоваться более низкой степенью идентичности последовательностей. Специалисту в данной области будет понятно, что для определения идентичности последовательностей с использованием стандартных параметров доступны несколько компьютерных программ, например Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410) и Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197).

Термин "вариант", используемый в настоящем изобретении, относится к производным белка или пептида, которые предусматривают модификации аминокислотной последовательности, например, путем замены, делеции, вставки или химической модификации. В некоторых вариантах осуществления такие модификации не снижают функциональность белка или пептида. Такие варианты предусматривают белки, в которых одна или более аминокислот были замещены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от 20 аминокислот, встречающихся в природе, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксилизин, норвалин. Однако такие замены также могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещается химически подобным аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замещения из числа 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.

Под "нативной последовательностью" липокалина 2 человека подразумевается липокалин 2 человека, который характеризуется такой же аминокислотной последовательностью, как и соответствующий полипептид, полученный из природной среды. Таким образом, нативная последовательность липокалина 2 человека может характеризоваться аминокислотной последовательностью соответствующего встречающегося в природе липокалина 2 человека. Такой полипептид с нативной последовательностью может быть выделен из природной среды или может быть получен с помощью рекомбинантных способов или способов синтеза. Термин "нативная последовательность" полипептида, как правило, охватывает встречающиеся в природе усеченные или секретированные формы липокалина 2 человека, встречающиеся в природе вариантные формы, такие как, в качестве альтернативы, сплайсированные формы и встречающиеся в природе аллельные варианты липокалина 2 человека. "Вариант" полипептида означает биологически активный полипептид, характеризующийся по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80% или по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида. Такие варианты включают, к примеру, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены или удалены с N- или С-конца полипептида. Как правило, вариант характеризуется по меньшей мере приблизительно 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, как например, по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности, в том числе по меньшей мере приблизительно 90% идентичностью аминокислотной последовательности или по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью.

Термин "положение" при использовании в соответствии с настоящим изобретением означает либо

положение аминокислоты в аминокислотной последовательности, описанной в данном документе, либо положение нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Для понимания термина "соответствует" или "соответствующий", используемого в данном документе в отношении положений в аминокислотной последовательности одного или более мутеинов, соответствующее положение определено не только номером предыдущих нуклеотидов/аминокислот. Следовательно, положение указанной аминокислоты в соответствии с настоящим изобретением, которая может быть заменена, может варьироваться за счет делеции или добавления аминокислот в любом месте (мутантного или дикого типа) липокалина 2 человека. Подобным образом положение данного нуклеотида в соответствии с настоящим изобретением, который может быть замещен, может варьировать вследствие делеции или дополнительных нуклеотидов в любом месте в мутеине или 5'-нетранслируемой области (UTR) человеческого липокалина 2 дикого типа, в том числе промоторе и/или любых других регуляторных последовательностях или гене (в том числе экзонах и интронах).

Таким образом, в отношении соответствующего положения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот могут отличаться обозначенными номерами от подобных соседних нуклеотидов/аминокислот, однако указанные соседние нуклеотиды/аминокислоты, которые могут быть обменены, удалены или добавлены, также предусматриваются в одном или более из соответствующих положений.

Кроме того, в отношении соответствующего положения в мутеине на основе эталонного остова в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно понимать, что положения нуклеотидов/аминокислот являются структурно соответствующими положениям в любом месте мутеина человеческого липокалина 2 дикого типа, даже если они могут отличаться обозначенными номерами.

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

Слова "выявлять", "выявление", "выявляемый" или "выявляющий", используемые в данном документе, понимаются как на количественном, так и на качественном уровне, равно как и их комбинация. Таким образом, они подразумевают количественные, полуколичественные и качественные измерения молекулы, представляющей интерес.

"Субъект" представляет собой позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. Термин "млекопитающее" используется в данном документе для обозначения любого животного, классифицируемого как млекопитающее, в том числе без ограничения людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарков, для занятий спортом или животных-питомцев, как, например, овец, собак, лошадей, кошек, коров, крыс, свиней, высших приматов, таких как яванские макаки, и т.д., при этом упомянуты лишь некоторые иллюстративные примеры. Предпочтительно, млекопитающим в данном документе является человек.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для обеспечения полезных или требуемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одно или более введений.

"Образец" определяется как биологический образец, взятый у любого субъекта. Биологические образцы включают без ограничения кровь, сыворотку крови, мочу, экскременты, семенную жидкость или ткань.

Термин "метастаз" в соответствии с настоящим изобретением относится к передаче раковых клеток из первичной опухоли в один или более участков в любом месте у пациента, где развиваются вторичные опухоли. Методы определения того, метастазировал ли рак, известны из уровня техники и включают сканирование костей скелета, рентгенографию грудной клетки, сканирование CAT, сканирование MRI и тесты на опухолевые метчики. Термин "предупреждение метастаза" означает, что метастаз первичной опухоли или рака является предупрежденным, замедленным или сниженным, а следовательно развитие вторичных опухолей предупреждено, замедлено или снижено. Предпочтительно метастаз, т.е. вторичные опухоли легкого, является предупрежденным или сниженным, что означает то, что метастатическая передача раковых клеток из первичной опухоли в легкое предупреждена или снижена.

Термин "рак", используемый в данном документе, относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфоцитарные лейкемии, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярно-клеточный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или интраокулярная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак груди, рак матки, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, гепатоцеллюлярный рак, рак желчных протоков, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли оси позвоночника, глиома

мозгового ствола, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шваномы, эпендимоны, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, в том числе не поддающиеся лечению версии любой из вышеназванных форм рака или комбинация одного или более вышеназванных форм рака.

Термин "сосудистые заболевания" включает рак, воспалительные заболевания, атеросклероз, ишемию, травму, сепсис, COPD, астму, диабет, AMD, ретинопатию, инсульт, ожирение, острое повреждение легких, кровоизлияние, пропотевание жидкости из сосудов, например цитокин-индуцируемое, аллергию, болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит Хашимото, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гигантоклеточный артериит, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, болезнь Крона, множественный склероз, язвенный колит, в частности солидные опухоли, интраокулярные неоваскулярные синдромы (такие как пролиферативные ретинопатии или возрастная макулярная дистрофия (AMD)), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman, J., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 10931- 10934; Klagsbran M., et al., Annu. Rev. Physiol. 53 (1991) 217-239; и Garner A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner A., and Klintworth, G. K. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710).

Термин "антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, содержащих четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные с помощью дисульфидных связей, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно в данном документе HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно в данном документе LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые находятся вперемешку с более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и V1 состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от амино-конца до карбоксил-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к Ang-2 (или его антигенсвязывающая часть) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природным или искусственным образом модифицированы.

Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе параллельного анализа двух или более CDR. Последовательности CDR можно легко определять на основе последовательностей вариабельных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи. Предпочтительный способ в контексте данного изобретения представляет собой способ IMGT, описанный в Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999). CDR1 состоит из положений 27-38, CDR2 состоит из положений 56-65, CDR3 у V-генов зародышевой линии состоит из положений 105-116, CDR3 у перегруппированных V-J-генов или V-D-J-генов состоит из положений 105-117 (положение, предшествующее J-PHE или J-TRP 118) с гэпами в верхней части петли у перегруппированного CDR3-IMGT из менее 13 аминокислот или с дополнительными положениями 112.1, 111.1, 112.2, 111.2 и т.д. у перегруппированного CDR3-IMGT из более 13 аминокислот. Положения, указанные в данном абзаце, приведены в соответствии с нумерацией IMGT, описанной в Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999).

Термин "антитело", используемый в данном документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем или генетически сконструированный полипептид или гликобелок, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, предусматривающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе например библиотек фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и химически манипулировать с использованием методик молекулярной биологии, например, для организации одного или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или введения кодонов, получения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')2; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и минитела, также охвачены экспрессией "антигенсвязывающего фрагмента", используемого в данном документе. Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет обычно содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и будет обыч-

но содержать по меньшей мере одну CDR, которая расположена рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, ассоциированный с доменом VL, домены VH и VL могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Как альтернатива, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

III. Описание графических материалов

Фиг. 1: представлен общий вид строения репрезентативных слитых полипептидов, описанных в данной заявке, которые являются биспецифичными в отношении мишеней VEGF-A и Ang-2. Репрезентативные слитые полипептиды были созданы на основе антитела, специфичного в отношении VEGF-A (SEQ ID NO: 8 и 9), и мутеина липокалина, специфичного в отношении Ang-2 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3). Мутеины липокалина были слиты с любым из двух С-концов антитела. Полученные в результате слитые полипептиды имеют SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO:8 и 15.

Фиг. 2: изображены результаты экспериментов ELISA, в которых определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов, используемых для сравнения биспецифичного антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и антитела положительного контроля (SEQ ID NO: 8 и 9) в отношении VEGF-A. Рекомбинантный VEGF-A наносили на микротитровальный планшет и тестируемые средства титровали, начиная с концентрации 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли с помощью антитела к Fc IgG человека, как описано в примере 2. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50 и максимальным сигналом в качестве незаданных параметров и наклоном, который фиксировали для единообразия.

Фиг. 3: представлены результаты экспериментов ELISA, в которых определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), используемых для сравнения биспецифичного антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, в отношении Ang-2 (SEQ ID NO: 2 и 3). Рекомбинантный Ang-2 наносили на микротитровальный планшет, и тестируемые средства титровали, начиная с концентрации 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли с помощью антитела к Fc IgG человека или антитела к липокалину, как описано в примере 3. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50 и максимальным сигналом в качестве незаданных параметров, и наклоном, который фиксировали для единообразия.

Фиг. 4: проиллюстрированы результаты эксперимента ELISA, в котором определяли способность репрезентативных слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) одновременно связывать обе мишени - VEGF-A и Ang-2. (A) Рекомбинантный VEGF-A наносили на микротитровальный планшет с последующим титрованием слитых полипептидов, начиная с концентрации 100 нМ. Впоследствии добавляли постоянную концентрацию биотинилированного Ang-2 человека, который выявляли с помощью экстравидина, как описано в примере 4. (B) Также применяли альтернативный формат, в котором Ang-2 наносили на микротитровальный планшет с последующим титрованием слитых полипептидов, начиная с концентрации 100 нМ. Впоследствии добавляли постоянную концентрацию биотинилированного VEGF-A человека.

Фиг. 5: продемонстрировано, что слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и используемый для сравнения контроль (SEQ ID NO: 6 и 7) способны блокировать взаимодействие между Ang-2 человека и его рецептором Tie-2 человека, сверхэкспрессированных в клетках HEK. Постоянную концентрацию Ang-2 человека предварительно инкубировали с переменными концентрациями слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) или используемого для сравнения контроля (SEQ ID NO: 6 и 7). Не нейтрализованный Ang-2 определяли посредством антитела к HIS-метке. Данные приводили в соответствие с моделью связывания в одном участке.

Фиг. 6: продемонстрировано, что слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и используемые для сравнения контроли (SEQ ID NO: 6 и 7; SEQ ID NO: 8 и 9) способны блокировать биологическую активность VEGF-A и/или hAng-2 в клеточном анализе пролиферации. В анализе добавляли слитые полипептиды, отрицательный контроль изотипа IgG и два используемых для сравнения антитела к эндотелиальным клеткам лимфатических сосудов человека (LEC), дополненных VEGF-A. В эксперименте показано, что пролиферация LEC блокируется слитыми полипептидами (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) со значениями IC50 в диапазоне 1,2-0,5 нМ. Используемый для сравнения контроль антитела к VEGF-A (SEQ ID NO: 8 и 9) ингибировал пролиферацию со значением IC50, составляющим 1,2 нМ. Мутеины липокалина (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) частично ингибировали клеточную пролиферацию с IC50, составляющим 1,9-1,7 нМ, при этом используемое для сравнения антитело к Ang-2 (SEQ ID NO: 6 и 7) характеризовалось IC50, составляющим 4,2 нМ. Отрицательные контроли изотипа IgG и SEQ ID NO: 1 не оказывали эффекта в отношении клеточной пролиферации. Данные приводили в соответствие с сигмоидальной моделью доза-ответ.

Фиг. 7: представлен результат фармакокинетического анализа биспецифических слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) на кроликах. Самки кроликов получали тестируемые продукты в виде интравитреальной инъекции в правый глаз при дозе, составляющей 100 мкг/глаз. Уровни лекарственного средства выявляли с помощью ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней VEGF-A и Ang-2. Данные приводили в соответствие с использованием некомпартментной модели.

IV. Подробное описание изобретения

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две субъединицы в любом порядке: первую субъединицу, которая предусматривает полноразмерный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен, специфичный в отношении VEGF-A, и вторую субъединицу, которая предусматривает мутеин липокалина, специфичный в отношении Ang-2. Субъединицы могут быть связаны посредством ковалентной связи, например пептидной связи.

В некоторых вариантах осуществления одна субъединица может быть связана с другой субъединицей, как фактически показано на фиг. 1. Например, один мутеин липокалина может быть связан посредством пептидной связи с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, С-концом легкой цепи иммуноглобулина и/или N-концом легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых конкретных вариантах осуществления субъединица, представляющая собой мутеин липокалина, может, следовательно, быть слита на своем N-конце и/или своем С-конце с субъединицей, представляющей собой иммуноглобулин. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления две субъединицы могут быть соединены с помощью пептидного линкера. Линкер может иметь любую структуру и размер и будет понятен специалисту в данной области. Предпочтительный линкер представляет собой линкер (G4S)3, например, который показан под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид также может содержать третью или дополнительную субъединицу. Например, полипептид может содержать третью субъединицу, которая содержит мутеин липокалина, специфичный в отношении мишени, отличной от Ang-2 или VEGF-A, при этом третья субъединица может быть присоединена своим N- или С-концом к С- или N-концу соответственно либо первой, либо второй субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению VEGF-A-специфичная субъединица слита с Ang-2-специфичной субъединицей.

В некоторых дополнительных определенных вариантах осуществления VEGF-A-специфичная субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин (такой как моноклональное антитело) или его антигенсвязывающий домен, и Ang-2-специфичная субъединица содержит мутеин липокалина. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 12, SEQ ID NO: 8 и 13, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15, SEQ ID NO: 9 и 16, SEQ ID NO: 8 и 17, SEQ ID NO 9 и 24, SEQ ID NO 8 и 25, SEQ ID NO 9 и 26, SEQ ID NO 8 и 27, SEQ ID NO 9 и 28, SEQ ID NO 8 и 29, SEQ ID NO 9 и 30, SEQ ID NO 8 и 31, SEQ ID NO 9 и 32, SEQ ID NO 8 и 33, SEQ ID NO 9 и 34, SEQ ID NO 8 и 35, SEQ ID NO 9 и 36, SEQ ID NO 8 и 37, SEQ ID NO 9 и 38, SEQ ID NO 8 и 39, SEQ ID NO 9 и 40, SEQ ID NO 8 и 41, SEQ ID NO 9 и 42, SEQ ID NO 8 и 43, SEQ ID NO 9 и 44, SEQ ID NO 8 и 45, SEQ ID NO 9 и 46, SEQ ID NO 8 и 47, SEQ ID NO 9 и 48, SEQ ID NO 8 и 49, SEQ ID NO 9 и 50, SEQ ID NO 8 и 51, SEQ ID NO 9 и 52, SEQ ID NO 8 и 53, SEQ ID NO 9 и 54, SEQ ID NO 8 и 55, SEQ ID NO 9 и 56, SEQ ID NO 8 и 57, SEQ ID NO 9 и 58, SEQ ID NO 8 и 59, SEQ ID NO 9 и 60, SEQ ID NO 8 и 61, SEQ ID NO 9 и 62, SEQ ID NO 8 и 63, SEQ ID NO 9 и 64, SEQ ID NO 8 и 65, SEQ ID NO 9 и 66, SEQ ID NO 8 и 67, SEQ ID NO 9 и 68, SEQ ID NO 8 и 69, SEQ ID NO 9 и 70 и SEQ ID NO 8 и 71. В некоторых вариантах осуществления VEGF-A-специфичная субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин (такой как моноклональное антитело) или его антигенсвязывающий домен, где моноклональное антитело имеет области, определяющие комплементарность (CDR), тяжелой цепи и CDR легкой цепи, содержащиеся в антителе, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 12, SEQ ID NO: 8 и 13, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15, SEQ ID NO: 9 и 16, SEQ ID NO: 8 и 17, SEQ ID NO 9 и 24, SEQ ID NO 8 и 25, SEQ ID NO 9 и 26, SEQ ID NO 8 и 27, SEQ ID NO 9 и 28, SEQ ID NO 8 и 29, SEQ ID NO 9 и 30, SEQ ID NO 8 и 31, SEQ ID NO 9 и 32, SEQ ID NO 8 и 33, SEQ ID NO 9 и 34, SEQ ID NO 8 и 35, SEQ ID NO 9 и 36, SEQ ID NO 8 и 37, SEQ ID NO 9 и 38, SEQ ID NO 8 и 39, SEQ ID NO 9 и 40, SEQ ID NO 8 и 41, SEQ ID NO 9 и 42, SEQ ID NO 8 и 43, SEQ ID NO 9 и 44, SEQ ID NO 8 и 45, SEQ ID NO 9 и 46, SEQ ID NO 8 и 47, SEQ ID NO 9 и 48, SEQ ID NO 8 и 49, SEQ ID NO 9 и 50, SEQ ID NO 8 и 51, SEQ ID NO 9 и 52, SEQ ID NO 8 и 53, SEQ ID NO 9 и 54, SEQ ID NO 8 и 55, SEQ ID NO 9 и 56, SEQ ID NO 8 и 57, SEQ ID NO 9 и 58, SEQ ID NO 8 и 59, SEQ ID NO 9 и 60, SEQ ID NO 8 и 61, SEQ ID NO 9 и 62, SEQ ID NO 8 и 63, SEQ ID NO 9 и 64, SEQ ID NO 8 и 65, SEQ ID NO 9 и 66, SEQ ID NO 8 и 67, SEQ ID NO 9 и 68, SEQ ID NO 8 и 69, SEQ ID NO 9 и 70 и SEQ ID NO 8 и 71.

В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, который содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 и 97.

В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, который содержит последовательности нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72-85.

В некоторых вариантах осуществления Fc-часть иммуноглобулина, включенного в слитый полипептид согласно настоящему изобретению, может способствовать поддержанию уровней содержания слитого полипептида в сыворотке крови, которые крайне важны для его стабильности и стойкости в организме. Например, в тех случаях, когда Fc-часть связывается с Fc-рецепторами на эндотелиальных клетках и на фагоцитах, слитый полипептид может интернализироваться и возвращаться обратно в кровоток, что увеличивает время его полужизни.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, как например, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,3 нМ или приблизительно 0,15 нМ, например при оценке указанной аффинности в отношении VEGF-A в анализе ELISA, фактически описанном в примере 2.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать VEGF-A со значением EC50, сопоставимым со значением EC50 у иммуноглобулина, специфичного в отношении VEGF-A, который включен в такой слитый полипептид, как например, антитело с тяжелой и легкой цепями, представленными под SEQ ID NO: 8 и 9, например, при исследовании указанного иммуноглобулина и слитого полипептида в анализе ELISA, фактически описанном в примере 2.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, как например, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,25 нМ или приблизительно 0,1 нМ, например, при оценке указанной аффинности в отношении Ang-2 в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3. Слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать Ang-2 со значением EC50, сопоставимым со значением EC50 для мутеина липокалина, специфичного в отношении Ang-2, который включен в такой слитый полипептид, такого как мутеины липокалина под SEQ ID NO: 2 и 3, например, при оценке указанного мутеина липокалина и слитого полипептида в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3.

В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды согласно настоящему изобретению, специфичные в отношении как VEGF-A, так и Ang-2, могут быть способны к одновременному связыванию VEGF-A и Ang-2, например, при оценке указанного слитого полипептида в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть способны блокировать связывание Ang-2 человека с клетками, экспрессирующими Tie-2 человека, в формате анализа конкурентной клеточной электрохемилюминесценции (ECL), фактически описанном в примере 5.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению способен блокировать VEGF-A-зависимую клеточную пролиферацию, в частности, нейтрализовать биологическую активность VEGF-A в краткосрочном анализе пролиферации с использованием эндотелиальных клеток лимфатических капилляров (LEC), фактически описанном в примере 6.

A. Иллюстративные иммуноглобулины, которые включены в слитые полипептиды

В некоторых вариантах осуществления в отношении слитого полипептида первая субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий домен, специфичный в отношении VEGF-A. Иммуноглобулин может представлять собой, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и предпочтительно представляет собой IgG1. В дополнительных вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой моноклональное антитело к VEGF-A. Несколько иллюстративных примеров таких иммуноглобулинов включают, например, бевацизумаб (торговое название Avastin) и ранибизумаб (торговое название Люцентис).

B. Иллюстративные мутеины липокалина, которые включены в слитые полипептиды.

Как используется в данном документе, "липокалин" определяют как мономерный белок массой примерно 18-20 кДа, имеющий цилиндрический β-складчатый лист с супервторичной структурной областью, содержащей несколько (предпочтительно восемь) β-нитей, соединенных попарно с помощью нескольких (предпочтительно четырех) петель на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Именно разнообразие петель в остальной части жесткого остова липокалина приводит к появлению разнообразия различных видов связывания среди представителей семейства липокалинов, при этом каждый способен приспосабливаться к мишеням различного размера, формы и с различными химическими особенностями (рассмотрены, например, в Flower, D.R. (1996), выше; Flower, D.R. et al. (2000), выше, или Skerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350). В действительности липокалиновое семейство белков возникло природным путем для связывания широкого спектра лигандов, причем они характеризуются необычайно низкими уровнями общей консервативности последовательности (зачастую

идентичности последовательностей составляют менее 20%), сохраняя при этом высококонсервативный общий паттерн укладывания. Соответствие между положениями в разных липокалинах хорошо известно специалисту в данной области техники. См., например, патент США № 7250297.

Как отмечалось выше, липокалин представляет собой полипептид, определяемый его супервторичной структурой, а именно, цилиндрическим β-складчатым листом с супервторичной структурной областью, содержащий восемь β-нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Настоящее изобретение не ограничено мутеинами липокалина, конкретно раскрытыми в данном документе. В данном отношении настоящее изобретение относится к мутеину липокалина имеющий цилиндрический β-складчатый лист с супервторичной структурной областью, содержащей восемь β-нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания, где по меньшей мере одна аминокислота каждой из по меньшей мере трех из указанных четырех петель была подвергнута мутации, и где указанный липокалин является эффективным в связывании Ang-2 с выявляемой аффинностью.

В другом конкретном варианте осуществления мутеин липокалина, раскрытый в данном документе, представляет собой мутеин липокалина 2 человека. Термины "липокалин 2 человека", или "Lcn 2 человека", или "NGAL человека", используемые в данном документе, относятся к зрелому липокалину человека, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов (NGAL), под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188. Мутеин липокалина 2 человека согласно настоящему изобретению также может называться в данном документе как "мутеин hNGAL". Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, можно использовать в качестве предпочтительной "эталонной последовательности", более предпочтительно в качестве эталонной последовательности используют аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина другой аминокислотой, например остатком серина. В некоторых других вариантах осуществления мутеин липокалина, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может включать один или более ненативных остатков цистеина, замещающих одну или более аминокислот липокалина дикого типа. В дополнительном конкретном варианте осуществления мутеин липокалина в соответствии с настоящим изобретением включает по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты остатком цистеина с образованием таким образом одного или более цистеиновых мостиков. В некоторых вариантах осуществления указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две петлевых области. Определение этих областей используется в данном документе в соответствии с Flower (Flower, 1996, выше, Flower, et al., 2000, выше) и Breustedt et al. (2005, выше).

Полипептиды согласно настоящему изобретению, которые отчасти направлены против или специфичны в отношении Ang-2, включают в себя любое количество специфически связывающих мутеинов-белков, в которых за основу взят остов определенного белка. Предпочтительно количество соответственно нуклеотидов или аминокислот, которые заменяют, удаляют или вставляют, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше, как например, 25, 30, 35, 40, 45 или 50, при этом предпочтительными являются 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11, и даже более предпочтительными являются 9, 10 или 11. Однако предпочтительно, чтобы мутеин липокалина согласно настоящему изобретению по-прежнему был способен к связыванию Ang-2.

В одном аспекте данный слитый полипептид согласно настоящему изобретению включает в себя разные мутеины липокалина, которые связывают Ang-2 по меньшей мере с выявляемой аффинностью. В этом смысле Ang-2 может рассматриваться как отличный от природного лиганд эталонного липокалина дикого типа, где "отличный от природного лиганд" означает соединение, которое не связывается с липокалинами дикого типа в физиологических условиях. Путем внесения одной или более мутаций в определенные положения последовательности липокалинов дикого типа авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что высокая аффинность и высокая специфичность в отношении отличного от природного лиганда Ang-2 являются возможными. В некоторых вариантах осуществления в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже большем количестве нуклеотидных триплетов, кодирующих определенные положения в последовательности липокалинов дикого типа, можно осуществлять случайный мутагенез посредством замены в этих положениях на подмножество нуклеотидных триплетов.

К тому же мутеины липокалина, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, могут иметь подвергнутый мутации аминокислотный остаток в любом одном или более, в том числе по меньшей мере в любом одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати или двенадцати положений в последовательности, соответствующих определенным положениям последовательности в линейной полипептидной последовательности эталонного липокалина.

Слитый полипептид согласно настоящему изобретению может включать в себя аминокислотную последовательность дикого типа (природную) "исходного" остова белка (такого как липокалин) вне под-

вергнутых мутации положений аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также может нести одну или более аминокислотных мутаций в положении/положениях последовательности, если только такая мутация, по меньшей мере в значительной степени, не препятствует связывающей активности и укладыванию мутеина или не нарушает их. Такие мутации могут быть выполнены очень легко на уровне ДНК с использованием разработанных 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 замещен аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности что касается полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также возможно введение неконсервативных изменений в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения отдельных аминокислотных остатков существует также возможность либо вставлять, либо подвергать делеции одну или более последовательных аминокислот первичной структуры hNGAL, если только эти делеции или вставка приводят в результате к стабильно уложенному/функциональному мутеину (например, мутеинам hNGAL с усеченными N- и С-концами). В таком мутеине, к примеру, один или более аминокислотных остатков добавлены или подвергнуты делеции на N- или С-конце полипептида. В целом такой мутеин может характеризоваться приблизительно по меньшей мере 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, как например по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL. В качестве иллюстративного примера настоящее изобретение также охватывает мутеины NGAL, определенные выше, в которых были подвергнуты делеции аминокислотные остатки (Lys-Asp-Pro, положения 46-48) линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина 2 человека (hNGAL) (SEQ ID NO: 1).

Аминокислотная последовательность раскрытого в данном документе мутеина липокалина, содержащегося в слитом полипептиде, характеризуется высокой идентичностью последовательности с эталонным липокалином по сравнению с идентичностями последовательностей с другими липокалинами. В данном общем смысле аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению по меньшей мере в значительной степени подобна аминокислотной последовательности эталонного липокалина, при условии, что при выравнивании в ней возможны гэпы (как определено ниже), которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которая в значительной степени подобна последовательностям эталонного липокалина, в некоторых вариантах осуществления характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 75% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 80% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 82% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 85% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 87% идентичностью или гомологией последовательности или по меньшей мере 90% идентичностью или гомологией последовательности, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью или гомологией последовательности с последовательностью эталонного липокалина, при условии, что сохраняются измененное положение или последовательность и что возможны один или более гэпов.

Как используется в данном документе, мутеин липокалина, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, "специфически связывает" мишень (например, Ang-2), если он способен отличать данную мишень от одной или более эталонных мишеней, поскольку специфичность связывания является не абсолютным, а относительным свойством. "Специфичное связывание" можно определять, например, в соответствии с результатами вестерн-блоттингов, тестов ELISA, RIA, ECL, IRMA, с использованием FACS, IHC и пептидных сканирований.

В одном варианте осуществления мутеины липокалина согласно настоящему изобретению слиты на своем N-конце и/или своем С-конце с партнером по слиянию, который представляет собой белковый домен, удлиняющий время полужизни мутеина в сыворотке крови. В дополнительных конкретных вариантах осуществления белковый домен представляет собой Fc-часть иммуноглобулина, домен CH3 иммуноглобулина, домен CH4 иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок.

В другом варианте осуществления мутеины липокалина согласно настоящему изобретению конъюгированы с соединением, которое удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови. Более предпочтительно, мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроксиэтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, CH3-домена иммуноглобулина, CH4-домена иммуноглобулина, альбуминсвязывающего пептида и альбуминсвязывающего белка.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый полипептид, содер-

жащий раскрытый в данном документе мутеин липокалина. Настоящее изобретение охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает слитый полипептид, содержащий мутеин липокалина, который связывает Ang-2, и их полезные пути применения. Настоящее изобретение также предусматривает способы получения такого слитого полипептида, содержащего Ang-2-связывающую субъединицу, описанного в данном документе, а также композиций, содержащих такой слитый полипептид. Ang-2-связывающую субъединицу согласно настоящему изобретению, а также ее композиции, можно применять в способах выявления Ang-2 в образце или в способах связывания Ang-2 у субъекта. Ранее не был описан такой слитый полипептид, содержащий такие мутеины липокалина человека с такими характеристиками, присущими применениям, предусмотренным в настоящем изобретении.

1. Иллюстративные мутеины липокалина, специфичные в отношении Ang-2

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает слитый полипептид, содержащий Ang-2-связывающие мутеины липокалина 2 человека (Lcn2 человека или hNGAL).

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к слитому полипептиду, содержащему мутеин, который способен связывать Ang-2 с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, измеренная с помощью значения K_d, составляющего приблизительно 200 нМ или меньше, как например приблизительно 150 нМ или меньше.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает слитый полипептид, содержащий мутеин hNGAL, который способен связывать Ang-2 с K_d, составляющей приблизительно 5 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 при поверхностном плазмонном резонансе (SPR).

В некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной с помощью значения EC50, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA.

В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной с помощью значения IC50, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в формате анализа конкурентного ELISA.

В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны к ингибированию или уменьшению пролиферации эндотелиальных клеток лимфатических капилляров, опосредованному Ang-2 со значением IC50, составляющим приблизительно 5 нМ или меньше в клеточном анализе пролиферации.

В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, проявляют перекрестную реактивность как с Ang-2 человека, так и Ang-2 мыши. В некоторых вариантах осуществления один или более таких мутеинов способны связывать как Ang-2 человека, так и Ang-2 мыши с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, измеренная с помощью значения K_d, составляющего приблизительно 200 нМ или меньше, как например приблизительно 150 нМ или меньше.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более таких мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 мыши с аффинностью, измеренной с помощью значения IC50, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA.

В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более таких мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны блокировать связывание Ang-2 человека с hTie-2 и Ang-2 мыши с hTie-2 со значением IC50, составляющим приблизительно 25 нМ или меньше, соответственно, в формате конкурентного клеточного ECL.

В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к Ang-4 человека. В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к Ang-3 мыши. В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к VEGF-A человека.

В связи с этим настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, где указанный слитый полипептид содержит 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 подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, и при этом указанный полипептид связывает Ang-2 с выявляемой аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в сли-

том полипептиде согласно настоящему изобретению, содержит в одном или более положениях последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих аминокислотных остатков, подвергнутых мутации:

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

В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, как например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все подвергнутые мутации аминокислотные остатки в этих положениях последовательности зрелого hNGAL.

В дополнение, Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может также включать следующую замену, по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Gln 28 → His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, который связывается с Ang-2, включает следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Каждый из этих наборов аминокислотных замен может дополнительно включать замены Gln 28 → His и Cys 87 → Ser.

В остальной области, т.е. области, отличающейся от положений последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77-77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) вне подвергнутых мутации положений аминокислотной последовательности.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, или ее функциональный фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления такой фрагмент или вариант представляет собой структурный гомолог мутеина, определенного под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97.

Аминокислотная последовательность Ang-2-связывающего мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, как 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% идентичностью, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97.

В еще некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL, проявляющий перекрестную реактивность к Ang-2 человека и/или Ang-2 мыши, в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, и ее функциональные фрагменты или варианты.

Настоящее изобретение также включает структурные гомологи мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, структурные гомологи которой характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющей более чем приблизительно 60%, предпочтительно более

чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% относительно указанного мутеина hNGAL.

Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно получать путем мутагенеза встречающейся в природе формы липокалина 2 человека (или hNGAL). В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из приведенных ниже иллюстративных замен, предусматриваются в том случае, если только мутеин сохраняет свою способность связываться с Ang-2, и/или он характеризуется идентичностью последовательности, впоследствии содержащей замену, в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, как например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более высокая идентичность с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один слитый полипептид согласно настоящему изобретению, содержащий Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, или его конъюгат, или слитый белок, описанные в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый наполнитель.

Соответственно, Ang-2-связывающие мутеины hNGAL, содержащиеся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно составлять в композиции с применением фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также установленных способов получения (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science и Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно применять фармацевтически инертные неорганические или органические наполнители.

C. Мутеины, содержащиеся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению

При использовании в данном документе в контексте слитого полипептида согласно настоящему изобретению, термин "специфичный в отношении" со ссылкой на мутеин, который связывается с Ang-2, включает то, что мутеин, который направлен против, связывается или вступает в реакцию с Ang-2. Таким образом, состояние "направленный на", "связывающийся" или "вступающий в реакцию" включает то, что мутеин специфически связывается с Ang-2. Термин "специфически" в данном контексте означает, что мутеин захватывает Ang-2, который описан в данном документе, но фактически не захватывает другую мишень. Связывает или захватывает ли мутеин специфически мишень, как определено в данном документе выше, можно легко протестировать, в частности, путем сравнения реакции мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с Ang-2, и реакции указанного мутеина с другой мишенью(-ями). "Специфичное связывание" также можно определять, например, в соответствии с результатами вестерн-блоттингов, тестов ELISA, RIA, ECL, IRMA, с использованием FACS, IHC и пептидных сканирований.

Аминокислотная последовательность мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, характеризуется высокой идентичностью с последовательностью липокалина 2 человека по сравнению с идентичностями последовательностей с другим липокалином (см. также выше). В данном общем контексте аминокислотная последовательность мутеина из комбинации в соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере, в значительной степени подобна аминокислотной последовательности соответствующего липокалина (hNGAL дикого типа). Соответствующая последовательность мутеина из комбинации в соответствии с настоящим изобретением, которая в значительной степени подобна последовательности зрелого hNGAL, как например, характеризуется по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичностью, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью последовательности зрелого hNGAL. В связи с этим, разумеется, мутеин согласно настоящему изобретению может содержать, по аналогии, замены, описанные в данном документе, которые делают мутеин способным к связыванию Ang-2. Как правило, мутеин hNGAL содержит одну или более мутаций, - по отношению к нативной последовательности hNGAL, -аминокислот в четырех петлях на открытом конце сайта связывания лиганда hNGAL. Как объясняется выше, эти области являются важными для определения специфичности связывания мутеина в отношении Ang-2. Мутеин, полученный из hNGAL или его гомолога, может иметь один, два, три, четыре или более подвергнутых мутации аминокислотных остатков в любом положении последовательности в N-концевой области и/или в трех пептидных петлях BC, DE и FG, расположенных на конце структуры в виде β-бочонка, которая расположена напротив природного кармана связывания.

Мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включает одну или более, как 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 липокалином hNGAL, при условии, что такой мутеин должен быть способным к связыванию с Ang-2. Например, мутеин может иметь замену в положении, соответствующем отдельному положению (т. е. в соответствующем положении) hNGAL. В некоторых вариантах осуществления мутеин из комбинации в соответствии с настоящим изобретением

включает по меньшей мере две аминокислотные замены, в том числе 2, 3, 4, 5 или даже больше аминокислотных замен нативной аминокислоты на остаток аргинина. Соответственно, нуклеиновую кислоту из остова "эталонного" белка, описанного в данном документе, подвергают мутагенезу с целью создания мутеина, который способен к связыванию с Ang-2.

Также мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность на своем N- или С-конце, предпочтительно С-конце, такую как Strep-метка, например Strep-метка II, без воздействия на биологическую активность (связывание со своей мишенью, например Ang-2) мутеина.

В частности, для того чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, отличного от hNGAL дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, специалист в данной области может применять средства и способы, хорошо известные из уровня техники, например, выравнивания либо вручную, либо с использованием компьютерных программ, таких как BLAST2.0, которая означает средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая подходит для получения выравниваний последовательностей. Соответственно, hNGAL дикого типа может служить в качестве "последовательности для сравнения" или "эталонной последовательности", тогда как аминокислотная последовательность мутеина, отличного от hNGAL дикого типа, описанного в данном документе, служит в качестве "искомой последовательности". Термины "эталонная последовательность" и "последовательность дикого типа" используются в данном документе взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из перечисленных ниже иллюстративных замен, рассматривается как возможная лишь в том случае, если мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, сохраняет свою способность связываться с Ang-2, и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, как например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более высокая идентичность с "исходной" последовательностью.

Как правило, консервативные замены представляют собой следующие замены, перечисленные с учетом аминокислоты, подвергаемой мутации, при этом за каждой следует одно или более замещений, которые могут рассматриваться как консервативные:

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 они могут быть определены эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительной ориентировки, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые, как правило, могут рассматриваться как ограничивающие консервативные замены друг для друга:

a) аланин (Ala), глицин (Gly);

b) аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);

c) аспарагин (Asn), глутамин (Gln);

d) аргинин (Arg), лизин (Lys);

e) изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val);

f) фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp);

g) серин (Ser), треонин (Thr) и

h) цистеин (Cys), метионин (Met).

Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда могут быть введены более существенные изменения, такие как следующие, или которые дополнительно описаны ниже в отношении классов аминокислот, и при этом продукты подвергают скринингу в отношении 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, Norleucine; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

Существенные модификации биологических свойств hNGAL осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по их влиянию на сохранение (a) структуры полипептидного каркаса в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) большей части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы, исходя из общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, метионин, ала-

нин, 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 цепей: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин.

Неконсервативные замены будут включать в себя обмен представителя одного из этих классов на другой класс. Любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержание правильной конформации hNGAL, также может быть заменен, как правило, серином, для улучшения стойкости молекулы к окислению и предупреждения неправильного образования поперечных связей. В свою очередь, цистеиновая связь(и) может быть добавлена(ы) для улучшения ее стабильности.

Любая мутация, в том числе вставка, которая обсуждалась выше, может быть легко выполнена на уровне нуклеиновой кислоты, например ДНК, с использованием известных стандартных способов. Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности что касается полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также возможно введение неконсервативных изменений в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения отдельных аминокислотных остатков также возможна либо вставка, либо делеция одной или более последовательных аминокислот первичной структуры hNGAL, при условии, что эти делеции или вставка приводят к стабильно уложенному/функциональному мутеину.

Модификации аминокислотной последовательности включают направленный мутагенез одиночных аминокислотных положений для упрощения субклонирования подвергнутого мутации гена hNGAL или его частей с помощью введения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того, эти мутации также можно вводить для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении указанной мишени, такой как Ang-2. Более того, мутации можно вводить, чтобы модулировать определенные характеристики мутеина, как например, для улучшения стабильности укладывания, стабильности в сыворотке крови, устойчивости белка, или растворимости в воде, или для снижения склонности к агрегированию, если в этом существует необходимость. Например, встречающиеся в природе остатки цистеина можно подвергать мутации в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидного мостика. Существует также возможность подвергнуть преднамеренной мутации другие аминокислотные положения последовательности в цистеин с целью введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей. Полученный тиоловый фрагмент можно использовать для ПЭГилирования или ГЭКилирования мутеина, например для увеличения времени полужизни соответствующего мутеина в сыворотке крови.

Существует также возможность подвергнуть мутации другие аминокислотные положения последовательности в цистеин с целью введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления, если один из приведенных выше фрагментов конъюгируется с мутеином, содержащимся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, то конъюгация с боковой цепью аминокислоты может быть преимущественной. Подходящие боковые цепи аминокислот могут встречаться в природе в аминокислотной последовательности hNGAL, или их можно вводить с помощью мутагенеза. В том случае если подходящий сайт связывания вводят посредством мутагенеза, один вариант представляет собой замещение аминокислоты в соответствующем положении остатком цистеина.

В отношении мутеина липокалина человека 2, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, иллюстративными возможностями такой мутации являются введение остатка цистеина в аминокислотную последовательность липокалина, в том числе мутеина липокалина 2 человека, включение введения остатка цистеина (Cys) по меньшей мере в одно из положений последовательности, которое соответствует положениям 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности дикого типа NGAL человека. В некоторых вариантах осуществления, в которых мутеин липокалина 2 человека согласно настоящему изобретению имеет последовательность, в которой, по сравнению с последовательностью под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, цистеин был замещен другим аминокислотным остатком, соответствующий цистеин может быть повторно введен в последовательность. В качестве иллюстративного примера остаток цистеина в аминокислотном положении 87 может быть введен в таком случае путем возвращения цистеина, который первоначально присутствует в последовательности под номером доступа SWISS-PROT P80188. Полученный тиоловый фрагмент с боковой стороны любого из аминокислотных положений 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146

и/или 158 можно использовать для ПЭГилирования или ГЭКилирования мутеина, например для увеличения времени полужизни соответствующего мутеина липокалина 2 человека в сыворотке крови.

В другом варианте осуществления путем мутагенеза для конъюгирования одного из приведенных выше соединений с мутеином, содержащимся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно вводить искусственные аминокислоты с обеспечением подходящих боковых цепей аминокислот. Как правило, эти искусственные аминокислоты конструируют таким образом, чтобы они были более реакционноспособными и таким образом облегчали конъюгацию с требуемым соединением. Одним примером такой искусственной аминокислоты, которую можно вводить посредством искусственной тРНК, является пара-ацетил-фенилаланин.

В некоторых вариантах осуществления мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может быть слит на своем N-конце или своем С-конце с белком, белковым доменом или пептидом, к примеру 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), тус-метка, FLAG-метка, His6-метка или НА-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, также обеспечивающие легкое выявление и/или очистку рекомбинантных белков, являются дополнительными примерами подходящих партнеров по слиянию. И, 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 согласно настоящему изобретению.

В целом, можно маркировать мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с помощью любого соответствующего химического вещества или фермента, которые непосредственно или опосредованно образуют выявляемое соединение или сигнал при химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Примером физической реакции, и в то же время оптической реакции/метчика, является испускание флуоресценции при облучении или испускание Х-лучей при использовании радиоактивного маркера. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и β-галактозидаза являются примерами ферментных маркеров (и в то же время оптических маркеров), которые катализируют образование продуктов хромогенной реакции. В целом, все маркеры, широко используемые для антител (за исключением тех, которые используют только с фрагментом сахара в Fc-части иммуноглобулинов), также можно использовать для конъюгации с мутеинами, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также можно конъюгировать с любым пригодным терапевтически активным средством, например, для целенаправленной доставки таких средств к данной клетке, ткани или органу или для селективного целенаправленного воздействия на клетки, например клетки опухоли, без воздействия на близлежащие нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных средств включают радионуклиды, токсины, небольшие органические молекулы и терапевтические пептиды (такие как пептиды, действующие в качестве агонистов/антагонистов рецептора клеточной поверхности, или пептиды, конкурирующие за сайт связывания белка на данной клеточной мишени). Однако мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также можно конъюгировать с терапевтически активными нуклеиновыми кислотами, такими как молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, малыми интерферирующими РНК, микро-РНК или рибозимы. Такие конъюгаты можно получать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники.

Как указано выше, мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления может конъюгировать с фрагментом, который удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови (в связи с этим см. также публикацию заявки согласно PCT WO 2006/56464, в которой такие стратегии конъюгации описаны в отношении мутеинов липокалина человека, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов, с аффинностью связывания в отношении CTLA-4). Фрагмент, который удлиняет время полужизни в сыворотке крови, может представлять собой молекулу полиалкиленгликоля, гидроксиэтилкрахмал, молекулы жирных кислот, такие как пальмитиновая кислота (Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), Fc-часть иммуноглобулина, CH3-домен иммуноглобулина, CH4-домен иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок, трансферрин, при этом упомянуты лишь некоторые. Альбуминсвязывающий белок может представлять собой бактериальный альбуминсвязывающий белок, антитело, фрагмент антитела, в том числе доменные антитела (см., например, патент США № 6696245), или мутеин с активностью связывания в отношении альбумина. Соответственно, подходящие партнеры по конъюгации для удлинения времени полужизни мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включают альбуминсвязывающий белок, например бактериальный альбуминсвязывающий домен, такой как белок G стрептококка (König, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Другими примерами альбуминсвязывающих пептидов, которые можно использовать в качестве партнера по конъюгации, к примеру, являются таковые, имеющие консенсусную последовательность Cys-Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Cys, где Xaa_1 представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa_2 представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa_3 представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr и Xaa_4 представляет собой Asp, Gly,

Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной заявке США 2003/0069395 (включенной в данный документ с помощью ссылки в полном объеме) или в Dennis et al. (Dennis M. S., Zhang M., Meng Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043).

В других вариантах осуществления собственно 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, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Термин "альбумин" включает альбумины всех млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека, или бычий сывороточный альбумин, или альбумин крысы. Альбумин или его фрагмент можно получить рекомбинантно, как описано в патенте США № 5728553 или заявках на Европейский патент №№ EP 0330451 и EP 0361991 (которые включены в данный документ с помощью ссылки в полном объеме). Рекомбинантный альбумин человека (Recombumin®) от Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания) можно конъюгировать или сливать с мутеином согласно настоящему изобретению для удлинения времени полужизни мутеина.

Если альбумин-связывающий белок представляет собой фрагмент антитела, то он может быть доменным антителом. Доменные антитела (dAb) сконструированы для обеспечения возможности точного контроля биофизических свойств и времени полужизни in vivo с обеспечением оптимального профиля безопасности и эффективности продукта. Доменными антителами являются, например, коммерчески доступные от Domantis Ltd. (Кембридж, Великобритания и Массачусетс, США).

При использовании трансферрина в качестве фрагмента для удлинения времени полужизни мутеинов, содержащихся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, мутеины могут быть генетически слиты с N-или С-концом, или с обоими, негликозилированного трансферрина. Негликозилированный трансферрин характеризуется временем полужизни, составляющим 14-17 дней, и белок, слитый с трансферрином, будет точно так же характеризоваться удлиненным временем полужизни. Носитель, представляющий собой трансферрин, также обеспечивает высокие показатели биодоступности, биораспределения и стабильности в кровотоке. Эта технология является коммерчески доступной от BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, Пенсильвания, США). Рекомбинантный трансферрин человека (DeltaFerrin™) для использования в качестве стабилизатора белка/партнера для удлинения времени полужизни также является коммерчески доступным от Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания).

Если Fc-часть иммуноглобулина используется с целью пролонгирования времени полужизни мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, то можно использовать технологию SynFusion™, коммерчески доступную от Syntonix Pharmaceuticals, Inc (Массачусетс, США). Применение этой технологии Fc-слияния обеспечивает возможность создания биофармацевтических средств более длительного действия и может предусматривать, например, две копии мутеина, связанные с Fc-областью антитела, для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности выработки.

Еще одной альтернативой для пролонгирования времени полужизни мутеинов согласно настоящему изобретению является слияние с N-или С-концом мутеинов длинных неструктурированных гибких последовательностей, богатых глицином (например, полиглицин с приблизительно 20-80 последовательными остатками глицина). Такой подход, раскрытый в WO 2007/038619, например, также был назван "рПЭГ" (рекомбинантный ПЭГ).

Если в качестве партнера по конъюгации используется полиалкиленгликоль, то полиалкиленгликоль может быть замещенным, незамещенным, линейным или разветвленным. Он также может представлять собой активированное полиалкиленовое производное. Примерами подходящих соединений являются молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые описаны в WO 99/64016, в патенте США 6177074 или в патенте США 6403564 касательно интерферона, или которые описаны в отношении других белков, таких как ПЭГ-модифицированная аспарагиназа, ПЭГ-аденозиндезаминаза (PEG-ADA) или ПЭГ-супероксиддисмутаза (см., например, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified белки J. Control. Release 11, 139-148). Молекулярная масса такого полимера, как например полиэтиленгликоль, может варьировать от приблизительно 300 до приблизительно 70000 Да, включая, например, полиэтиленгликоль с молекулярной массой, составляющей приблизительно 10000, приблизительно 20000, приблизительно 30000 или приблизительно 40000 Да. Более того, как описано, например, в патентах США 6500930 или 6620413, углеводные олиго- и полимеры, такие как крахмал или гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), могут быть конъюгированы с мутеином согласно настоящему изобретению с целью удлинения времени полужизни в сыворотке крови.

Кроме того мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно сливать с фрагментом, который может придавать новые характеристики мутеинам согласно настоящему изобретению, такие как ферментативная активность или аффинность связывания в отношении других молекул. Примерами подходящих партнеров по слиянию являются щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион-S-трансфераза, альбуминсвязывающий домен белка G, белок A, фрагменты антител, домены олигомеризации или токсины.

В частности, может быть возможным слияние мутеина, который содержится в слитом полипептиде

согласно настоящему изобретению согласно данному документу, с активным сайтом отдельного фермента, вследствие чего оба "компонента" полученного в результате слитого белка действуют совместно на данную терапевтическую мишень. Например, связывающий домен мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, прикрепляется к мишени, обусловливающей заболевание, обеспечивая возможность домену фермента разрушать биологическую функцию мишени.

Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замены определенных кодонов на другие кодоны, определяющие ту же самую аминокислоту, то настоящее изобретение не ограничено конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано в данном документе, а охватывает все молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин. В связи с этим настоящее изобретение предусматривает нуклеотидные последовательности, показанные под SEQ ID NO: 72-85, кодирующие некоторые мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает воздействие на молекулы нуклеиновой кислоты мутагенезом в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одно или даже больше из положений в последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

Настоящее изобретение также включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, которые включают в себя дополнительные мутации вне указанных положений последовательности экспериментального мутагенеза. Такие мутации часто допустимы или могут даже оказаться преимущественными, например, если они способствуют улучшенной эффективности укладывания, стабильности в сыворотке крови, термостойкости или аффинности связывания с лигандом мутеинов.

Молекула нуклеиновой кислоты, раскрытая в данной заявке, может быть "функционально связана" с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями) для обеспечения экспрессии этой молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК, называют "молекулой нуклеиновой кислоты, способной к экспрессии" или способной "обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности", если она включает в себя элементы последовательности, которые содержат информацию относительно транскрипционной и/или трансляционной регуляции, и такие последовательности "функционально связаны" с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, при которой элементы регуляторной последовательности и последовательность, подлежащая экспрессии, соединены таким образом, что обеспечивается экспрессия гена. Определенные особенности регуляторных областей, необходимых для экспрессии гена, могут варьировать между видами, но в общем эти области включают в себя промотор, который у прокариот содержит как промотор per se, т.е. элементы ДНК, направляющие инициацию транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрибировании в РНК будут запускать сигнал об инициации трансляции. Обычно эти промоторные области включают в себя 5'-некодирующие последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, такие как боксы -35/-10 и элемент Шайн-Дальгарно у прокариот или TATA-бокс, последовательности CAAT и 5'-кэпирующие элементы у эукариот. Такие области также могут включать в себя энхансерные или репрессорные элементы, а также транслированные сигнальные и лидерные последовательности для нацеливания нативного полипептида на конкретный компартмент клетки-хозяина.

В дополнение к этому 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, вовлеченные в терминацию транскрипции, полиаденилирование или т.п. Однако, если такие последовательности терминации не в достаточной степени функциональны в конкретной клетке-хозяине, тогда их можно заменить сигналами, функциональными в такой клетке.

Ввиду этого молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может включать регуляторную последовательность, такую как промоторная последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включает промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор tet, промотор lacUV5 или промотор T7. Примерами промоторов, применимых для экспрессии в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор CMV.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению также могут быть частью вектора или любого другого типа средства для клонирования, такого как плазмида, фагмида, фаг, бакуловирус, космида или искусственная хромосома.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включена в фазмиду. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область умеренного фага, такого как M13 или f1, или его функциональную часть, слитую с кДНК, представляющей интерес. После суперинфекции бактери-

альных клеток-хозяев этим фагмидным вектором и соответствующим хелперным фагом (например, M13K07, VCS-M13 или R408) продуцируются интактные фаговые частицы, обеспечивая таким образом физическое сопряжение закодированной гетерологичной кДНК с ее соответствующим полипептидом, экспонированным на поверхности фага (см., например, Lowman, H.B. (1997) Аппи. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424, или Rodi, D.J., and Makowski L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93).

Такие средства для клонирования могут включать, помимо вышеописанных регуляторных последовательностей, также последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано в данном документе, последовательности для репликации и контрольные последовательности, полученные от вида, совместимого с клеткой-хозяином, которую используют для экспрессии, а также метчики отбора, обеспечивающие селектируемый фенотип у трансформированных или трансфицированных клеток. Из уровня техники известно большое количество подходящих векторов клонирования, и они являются коммерчески доступными.

Молекулой ДНК, кодирующей мутеин, который содержится в слитом полипептиде, как описано в данном документе, и, в частности, вектором клонирования, содержащим кодирующую последовательность такого мутеина, можно трансформировать клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформацию можно осуществлять с использованием стандартных методик. Таким образом, настоящее изобретение также направлено на клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, которая раскрыта в данном документе.

Трансформированные клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок согласно настоящему изобретению. Подходящие клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как Escherichia coli (E. coli) или Bacillus subtilis, или эукариотическими, такими как Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, клетками насекомых SF9 или High5, иммортализованными клеточными линиями млекопитающих (например, клетками HeLa или клетками CHO) или первичными клетками млекопитающих.

Настоящее изобретение также относится к способу получения мутеина, который содержится в слитом полипептиде, описанном в данном документе, где мутеин или полипептид, фрагмент мутеина или слитый белок мутеина получают, исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, с помощью способов генной инженерии. Способ можно осуществлять in vivo, при этом мутеин или полипептид, например, можно получать в организме-хозяине бактериального или эукариотического происхождения, а затем выделять из этого организма-хозяина или его культуры. Также возможно получать белок in vitro, например путем применения системы трансляции in vitro.

При получении in vivo мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту, кодирующую такой мутеин или полипептид, вводят в подходящий организм-хозяин бактериального или эукариотического происхождения с помощью технологии рекомбинантной ДНК (как уже обозначалось выше). С данной целью клетку-хозяина вначале трансформируют вектором клонирования, который включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин, который описан в данном документе, с применением известных стандартных способов. Затем клетку-хозяина культивируют в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии гетерологичной ДНК и, как следствие, синтез соответствующего полипептида. Впоследствии полипептид выделяют либо из клетки, либо из среды для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, такая как ДНК, раскрытая в данной заявке, может быть "функционально связана" с другой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению для обеспечения возможности экспрессии слитого белка согласно настоящему изобретению. При этом функциональная связь представляет собой связь, в которой элементы последовательности первой молекулы нуклеиновой кислоты и элементы последовательности второй молекулы нуклеиновой кислоты соединены таким образом, что обеспечивается возможность экспрессии слитого белка в виде единого полипептида.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления встречающаяся в природе дисульфидная связь между Cys 76 и Cys 175 может быть удалена в мутеинах hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Соответственно, такие мутеины можно получать в компартменте клетки, содержащем среду с восстанавливающим окислительно-восстановительным потенциалом, например в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

В случае если мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включает в себя внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительным направлять образующийся полипептид в компартмент клетки, содержащий среду с окисляющим окислительно-восстановительным потенциалом, с помощью соответствующей сигнальной последовательности. Эта окисляющая среда может обеспечиваться периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как E. coli, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или в просвете эндоплазматического ретикулума эукариотических клеток, и она обычно способствует образованию дисульфидных связей в структуре.

Однако также возможно получение мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно E. coli. В данном случае мутеин или полипептид может быть либо непосредственно получен в растворимом и уложенном состоянии, ли-

бо выделен в форме тел включения с последующей ренатурацией in vitro. Дополнительной возможностью является применение конкретных штаммов-хозяев с окисляющей внутриклеточной средой, которая таким образом может обеспечивать образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.).

Однако мутеин или полипептид, которые содержатся в слитом полипептиде, описанном в данном документе, не обязательно можно создавать или получать только путем применения генной инженерии. Вместо этого такой мутеин или полипептид можно также получать путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез полипептидов по Меррифилду, или путем транскрипции и трансляции in vitro. Например, возможно, что представляющие интерес мутации определяют с помощью молекулярного моделирования, а затем синтезируют необходимый (разработанный) полипептид in vitro и изучают активность связывания в отношении Ang-2. Способы твердофазного синтеза и/или синтеза в жидкой фазе белков хорошо известны из уровня техники (см., например, Bruckdorfer T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43).

В другом варианте осуществления мутеин или полипептид, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно получать путем транскрипции/трансляции in vitro, применяя общепринятые способы, известные специалистам в данной области техники.

Специалисту в данной области будут понятны способы, применимые для получения мутеинов или полипептидов, которые содержатся в их слитом полипептиде, предполагаемых в настоящем изобретении, однако последовательности белков или нуклеиновых кислот которых в данном документе явным образом не раскрыты. В качестве обзора такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез отдельных аминокислотных положений для упрощения субклонирования подвергнутого мутации гена hNGAL или его частей путем введения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того такие мутации можно также вводить для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении его мишени (например, соответственно Ang-2 или Ang-1). Более того, мутации можно вводить для модулирования определенных характеристик мутеина, как например, для улучшения стабильности укладывания, стабильности в сыворотке крови, устойчивости белка, или растворимости в воде, или для снижения склонности к агрегированию, если в этом существует необходимость. Например, встречающиеся в природе остатки цистеина можно подвергать мутации в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидного мостика.

Мутеины или полипептиды, содержащиеся в их слитом полипептиде, раскрытые в данном документе, а также их производные, можно применять во многих областях, как и в случае их антител или фрагментов. Например, мутеины можно применять для маркирования ферментом, антителом, радиоактивным веществом или любой другой группой с биохимической активностью или определенными характеристиками связывания. С помощью такого подхода их соответствующие мишени, или их конъюгаты, или слитые белки можно выявлять или приводить в контакт с ними. Кроме того, мутеины или их полипептиды согласно настоящему изобретению могут служить для выявления химических структур с помощью известных аналитических способов (например, ELISA или вестерн-блоттинга) или с помощью микроскопического исследования или иммуносенсорных анализов. В связи с этим, сигнал для выявления может быть получен либо непосредственно путем применения подходящего конъюгата мутеина или слитого белка, либо опосредованно путем иммунохимического выявления мутеина, связанного посредством антитела.

Дополнительные объекты, преимущества и характеристики настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники после изучения следующих примеров и прилагаемых к ним фигур, которые не предназначены быть ограничивающими. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение специфически раскрыто с помощью иллюстративных вариантов осуществления и необязательных характеристик, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и вариации изобретений, приведенных в них в данном документе, и что такие модификации и вариации рассматриваются как часть объема настоящего изобретения.

D. Примерные пути применения, применения и получение слитых полипептидов

Для ангиогенеза необходимо связывание сигнальных молекул, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), с рецепторами на поверхности нормальных эндотелиальных клеток. При связывании VEGF и других эндотелиальных факторов роста со своими рецепторами на эндотелиальных клетках внутри этих клеток инициируются сигналы, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов. Один подход к разработке эффективного антиангиогенного способа лечения заключался в объединении средств, которые действуют в отношении различных мишеней, вовлеченных в ангиогенез, предпочтительно мишеней, которые действуют посредством хорошо изолированных путей передачи сигнала, таким образом, настоящее изобретение охватывает применение слитого полипептида, содержащего две субъединицы, где первая субъединица содержит иммуноглобулин или его функциональный фрагмент, специфичные в отношении VEGF-A, и вторая субъединица содержит мутеин hNGAL, специфичный в отношении Ang-2. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид способен блокировать или способствовать блокированию по меньшей мере одного из таких сигналов, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитый полипептид можно применять в комбинации с одним или более дополнительных антиангиогенных средств. Используемое в данном документе "антиангиогенное средство" означает любое вещество, способное ингибировать или нарушать связывание одной из таких сигнальных молекул со своим рецептором. В некоторых вариантах осуществления антиангиогенное средство способно блокировать или способствовать блокированию одного из таких сигналов, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления эти дополнительные антиангиогенные средства включают (i) антагонисты Ang-1, Ang-3, Ang-4 и/или Tie-2; (ii) антагонисты Flt1, KDR, Flt4, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF и/или EG-VEGF; (iii) антагонисты дельта-подобного лиганда 4 (DLL4, сосудоспецифичный лиганд Notch), (iv) антагонисты рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и (v) ингибиторы цитокинов. В некоторых дополнительных вариантах осуществления антагонист DLL4 может представлять собой антитело к DLL4 (например, антитело к DLL4, раскрытое в патентной заявке США № 2009/0142354, как например REGN421 и т.д.). В некоторых дополнительных вариантах осуществления антагонист EGFR может представлять собой антитело к EGFR или низкомолекулярный ингибитор активности EGFR. Другие антиангиогенные средства, которые можно преимущественно вводить в комбинации с Ang-2-связывающими мутеинами hNGAL согласно настоящему изобретению, включают ингибиторы цитокинов, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 и/или с их соответствующими рецепторами.

В связи с этим настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любой из слитых полипептидов, упомянутых в данном документе, и антиангиогенное средство, такое как антагонист одного или более DLL4, EGFR или любого из вышеупомянутых цитокинов, где антагонист может представлять собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, siRNA, пептитело, нанотело, антитело, фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')2; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; сконструированную молекулу (такую как диатело, триатело, тетратело, минитело и минимальная распознающая единица); противовирусный препарат, антибиотик, анальгетик, кортикостероиды и/или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID).

В некоторых вариантах осуществления указанная сконструированная молекула может представлять собой EGF-подобный домен, домен "двойная петля", домен I типа фибронектина, домен II типа фибронектина, домен III типа фибронектина, домен PAN, домен Gla, домен SRCR, домен ингибитора семейства Kunitz/трипсина поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора серинпротеазы по типу ингибиторов семейства Kazal, домен Trefoil (P-типа), домен фактора фон Виллебранда типа C, анафилатоксин-подобный домен, домен CUB, повтор I типа тиреоглобулина, домен LDL-рецептора класса A, домен Sushi, домен Link, домен I типа тромбоспондина, домен иммуноглобулина или иммуноглобулин-подобный домен (например, доменные антитела или верблюжьи антитела только с тяжелой цепью), домен лектина C-типа, домен MAM, домен фактора фон Виллебранда A-типа, домен соматомедина B, коровый домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 C-типа, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен ламининового типа, домен C2, "каппа-тело" (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10:949-57 (1997)), "минитело" (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" EMBO J 13:5303-9 (1994)), "диатело" (Holliger et al. "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments" PNAS USA 90:6444-6448 (1993)), "янусин" (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" EMBO J 10: 3655-3659 (1991) и Traunecker et al. new molecular design for bispecific reagents" Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992), нанотело, аднектин, тетранектин, микротело, аффилин, аффитело, анкирин, кристаллин, ноттин, убиквитин, белки с "цинковыми пальцами", аутофлуоресцентный белок, анкирин или белок с анкириновым повтором или белок с богатыми лейцином повторами, авимер (Silverman Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec; 23(12): 1556-61, электронная публикация в Nat. Biotech., выпуск 20 ноября 2005 г.).

При объединении с одним или более дополнительных средств согласно настоящему изобретению слитый полипептид согласно настоящему изобретению можно вводить до, одновременно с (например, в одном и том же составе или в отдельных составах) или после введения другого средства(ств). Слитый полипептид и антиангиогенное средство можно вводить в комбинации, в том числе параллельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления комбинации согласно настоящему изобретению, слитый полипептид согласно настоящему изобретению и антиангиогенные средства можно включать в одну композицию, которую можно вводить.

Композиция может содержать эффективное количество слитого полипептида согласно настоящему изобретению и антиангиогенного средства в качестве активных ингредиентов совместно по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным средством, разбавителем или носителем. В связи с этим комбинации согласно настоящему изобретению можно составлять в композиции с применением фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также установленных способов получения (Gen-

naro and Gennaro (2000) Remington: The Science и Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно применять фармацевтически инертные неорганические или органические наполнители.

Слитый полипептид согласно настоящему изобретению и антиангиогенное средство также можно вводить независимо друг от друга, в том числе с индивидуальными временными интервалами в независимые моменты времени. Комбинации слитого полипептида согласно настоящему изобретению и антиангиогенного средства можно предоставлять в различных формах и в любой ориентации.

Слитый полипептид согласно настоящему изобретению и его комбинации также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антиангиогенное средство представляет собой антагонист любого компонента из систем рецепторов VEGF/VEGF и системы рецепторов ангиопоэтин/Tie-2; оно представляет собой любое из Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF, EG-VEGF, Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 или Tie-2. Путь VEGF-VEGFR и путь Tie-2 следует рассматривать в качестве двух независимых медиаторов, важных для процесса ангиогенеза in vivo (Siemeister G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91; Jendreyko N., et al., Journal of Biological Chemistry, 278: 47812-47819 (2003); Jendreyko N., et al., PNAS, 102: 8293-8298 (2005)).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает применение (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств для ингибирования дерегулированного ангиогенеза у субъекта. Такое применение включает стадию введения субъекту эффективного количества (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств.

Подобным образом настоящее изобретение раскрывает применение (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств для лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта. В некоторых дополнительных вариантах осуществления заболевания или расстройства, ассоциированные с дерегулированным ангиогенезом, включают рак, офтальмологические неоваскулярные заболевания (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C, упомянутый в данном документе.

Дополнительные подробности в отношении слитых полипептидов согласно настоящему изобретению, содержащим субъединицу с выявляемой аффинностью в отношении Ang-2, можно найти в разделе B настоящего изобретения.

В особенно предпочтительном варианте осуществления слитый полипептид, который содержит субъединицу, специфичную в отношении Ang-2, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, или их функциональных фрагментов или вариантов. В некоторых вариантах осуществления такие фрагменты или варианты представляют собой структурные гомологи мутеина, определенного под любым из SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из следующих: (i) слитый полипептид согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств, композицию из которых можно применять для ингибирования дерегулированного ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C, упомянутый в данном документе.

В связи с этим комбинации согласно настоящему изобретению можно составлять в композиции с применением фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также установленных способов получения (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science и Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно применять фармацевтически инертные неорганические или органические наполнители.

В еще другом аспекте настоящее изобретение отображает способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере следующее: (i) слитый полипептид согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств. В некоторых дополнительных вариантах осуществления заболевания или расстройства, ассоциированные с дерегулированным ангиогенезом, включают рак, офтальмологические неоваскулярные заболевания (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C, упомянутый в данном документе.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ ингибирования или уменьшения дерегулированного ангиогенеза у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит, по меньшей мере, следующее: (i) слитый полипептид

согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств.

Настоящее изобретение дополнительно характеризуется следующими пунктами.

Пункт 1. Слитый полипептид, содержащий первую субъединицу и вторую субъединицу, где первая субъединица состоит из иммуноглобулина или его антигенсвязывающего домена, специфичных в отношении VEGF-A, где вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов человека (hNGAL), специфичного в отношении Ang-2.

Пункт 2. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

Пункт 3. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 2.

Пункт 4. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 200 пМ или меньше.

Пункт 5. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 200 пМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 2.

Пункт 6. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

Пункт 7. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3.

Пункт 8. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 250 пМ или меньше.

Пункт 9. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 250 пМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3.

Пункт 10. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

Пункт 11. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

Пункт 12. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 500 пМ или меньше.

Пункт 13. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 500 пМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

Пункт 14. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1,5 нМ или меньше.

Пункт 15. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1,5 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

Пункт 16. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 600 пМ или меньше.

Пункт 17. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 600 пМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

Пункт 18. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен блокировать связывание Ang-2 человека с Tie-2 человека со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

Пункт 19. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен блокировать связывание Ang-2 человека с Tie-2 человека со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, в формате конкурентной клеточной ECL, фактически описанной в примере 5.

Пункт 20. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен снижать или блокировать по меньшей мере одну из биологических функций VEGF-A.

Пункт 21. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид способен снижать или блокировать

по меньшей мере одну из биологических функций VEGF-A, в частности VEGF-A-зависимую клеточную пролиферацию, как например в функциональном клеточном анализе пролиферации, фактически описанном в примере 6.

Пункт 22. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид характеризуется временем полужизни у кролика, составляющим приблизительно 3-5 дней.

Пункт 23. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид характеризуется временем полужизни у кролика, составляющим приблизительно 3-5 дней, как например при оценке в фармакокинетическом анализе, фактически описанном в примере 7.

Пункт 24. Слитый полипептид по п.1, где слитый полипептид характеризуется временем полужизни у субъекта-человека, составляющим приблизительно 3-5 дней.

Пункт 25. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит один или более подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

Пункт 26. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит один или более подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях 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.

Пункт 27. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe;

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

Пункт 28. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов подвергнутых мутации аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln 28 →His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

Пункт 29. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин 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 подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

Пункт 30. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где каждый из наборов аминокислотных замен необязательно дополнительно включает замены Gln 28 → His и Cys 87 → Ser.

Пункт 31. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где вторая субъединица содержит мутеин с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3 и их функциональных фрагментов или вариантов.

Пункт 32. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность мутеина характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3.

Пункт 33. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где одна или более субъединиц содержит один или более элементов, которые конъюгированы с соединением, выбранным из группы, состоящей из органической молекулы, ферментного маркера, радиоактивного маркера, цветного маркера, флуоресцентного маркера, хромогенного маркера, люминесцентного маркера, гаптена, дигоксигенина, биотина, цитостатического средства, токсина, комплексного соединения металла, металла и коллоидного золота.

Пункт 34. Слитый полипептид по п.33, где вторая субъединица содержит мутеин, который проявляет перекрестную реактивность как к Ang-2 человека, так и Ang-2 мыши.

Пункт 35. Слитый полипептид по п.34, где вторая субъединица содержит мутеин, способный связывать Ang-2 мыши с аффинностью, измеренной с помощью значения EC50, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше.

Пункт 36. Слитый полипептид по п.34, где вторая субъединица содержит мутеин, способный связывать Ang-2 мыши с аффинностью, измеренной с помощью значения EC50, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в стандартном анализе ELISA.

Пункт 37. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где мутеин из второй субъединицы может быть конъюгирован с соединением, которое удлиняет время полужизни полипептида в сыворотке крови.

Пункт 38. Слитый полипептид по п.37, где соединение, которое продлевает время полужизни в сыворотке крови, выбрано из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроксиэтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, CH3-домена иммуноглобулина, CH4-домена иммуноглобулина, альбуминсвязывающего пептида и альбуминсвязывающего белка.

Пункт 39. Слитый полипептид по п.38, где полиалкиленгликоль представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его активированное производное.

Пункт 40. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанные первая и вторая субъединицы соединены посредством пептидной связи.

Пункт 41. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где первая субъединица и вторая субъединица соединены посредством пептидной связи между N-концом мутеина липокалина второй субъединицы и C-концом константной области тяжелой цепи (CH) иммуноглобулина первой субъединицы.

Пункт 42. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где первая субъединица соединена со второй субъединицей посредством пептидной связи между N-концом мутеина липокалина второй субъединицы и C-концом константной области легкой цепи (CL) иммуноглобулина первой субъединицы.

Пункт 43. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где первая субъединица соединена со второй субъединицей посредством пептидной связи между C-концом мутеина липокалина второй субъединицы и N-концом константной области легкой цепи (CH) иммуноглобулина первой субъединицы.

Пункт 44. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где первая субъединица соединена со второй субъединицей посредством пептидной связи между C-концом мутеина липокалина второй субъединицы и N-концом константной области легкой цепи (CL) иммуноглобулина первой субъединицы.

Пункт 45. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где пептидная связь обеспечена пептидным линкером (G4S)3.

Пункт 46. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где пептидная связь содержит по меньшей мере 4 остатка глицина и по меньшей мере один остаток серина.

Пункт 47. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где пептидная связь содержит по меньшей мере одну единицу (G4S).

Пункт 48. Слитый полипептид по п.48, где указанная единица (G4S) может повторяться n раз, где n = 1-10.

Пункт 49. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где иммуноглобулин представляет собой моноклональное антитело.

Пункт 50. Слитый полипептид по п.51, где моноклональное антитело содержит области тяжелой цепи, определяющие комплементарность (CDR), которые содержатся в тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8,

и CDR легкой цепи, которые содержатся в легкой цепи под SEQ ID NO 9.

Пункт 51. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь, определенную под SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, определенную под SEQ ID NO 9.

Пункт 52. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где моноклональное антитело содержит каркас IgG1.

Пункт 53. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб.

Пункт 54. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный полипептид содержит аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 9 и 10, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 8 и 11, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 9 и 12, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 8 и 13, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 9 и 14, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 8 и 15, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 9 и 16, или аминокислоты, представленные под SEQ ID NO: 8 и 17.

Пункт 55. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.1-54.

Пункт 56. Молекула нуклеиновой кислоты по п.55, где молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторной последовательностью для обеспечения возможности экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты.

Пункт 57. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-56, где молекула нуклеиновой кислоты содержится в векторе или фагмидном векторе.

Пункт 58. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.56-57.

Пункт 59. Способ получения слитого полипептида по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий стадию экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин.

Пункт 60. Способ по п.59, где слитый полипептид получают в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине и выделяют из этого организма-хозяина или его культуры.

Пункт 61. Фармацевтическая композиция, содержащая слитый полипептид по любому из пп.1-54.

Пункт 62. Применение слитого полипептида по любому из пп.1-54 для изготовления фармацевтической композиции, подходящей для лечения, предупреждения и/или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом.

Пункт 63. Применение слитого полипептида по любому из пп.1-54 для одновременного связывания Ang-2 и VEGF-A у субъекта.

Пункт 64. Применение слитого полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для одновременного связывания Ang-2 и VEGF-A у субъекта.

Пункт 65. Применение слитого полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для ингибирования ангиогенеза у субъекта.

Пункт 66. Применение полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для лечения пациента, страдающего возрастной макулярной дистрофией (ARMD) "влажного" типа.

Пункт 67. Применение полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для выявления факторов ангиогенеза в диагностических целях.

Пункт 69. Способ одновременного связывания Ang-2 и VEGF-A у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту слитого полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид.

Пункт 70. Способ ингибирования или уменьшения ангиогенеза у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества слитого полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид.

Пункт 71. Способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества слитого полипептида по любому из пп.1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид.

Пункт 72. Способ по п.71 или применение по п.62, где заболевание или расстройство выбраны из группы, состоящей из: роста опухоли, глазных расстройств, сосудистых заболеваний, воспалительных или инфекционных заболеваний, рака, офтальмологических неоваскулярных заболеваний, артрита и псориаза.

Пункт 73. Диагностический или аналитический набор, содержащий слитый полипептид по любому из пп.1-54 или композицию, содержащую такой слитый полипептид.

V. Примеры

Пример 1. Экспрессия и анализ слитых полипептидов

Для одновременного связывания VEGF-A и Ang-2 авторы данного изобретения получали несколько репрезентативных слитых полипептидов антитело-мутеин липокалина, сливая вместе антитело, содержащее тяжелую и легкую цепи, представленные под SEQ ID NO: 8 и 9, и один из мутеинов липокалина

под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 с помощью неструктурированного линкера (G4S)3 (SEQ ID NO: 19). Различные форматы, которые были сконструированы, показаны на фиг. 1. Такие слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) получали посредством слияния одного из мутеинов липокалина под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 с любым из двух С-концов антитела.

Конструкции получали путем синтеза генов и клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих. Затем их транзиентно экспрессировали в клетках CHO. Концентрацию слитых полипептидов в среде с клеточной культурой измеряли с помощью сенсорного устройства с белком А от ForteBio (Pall Corp.) и количественно оценивали с помощью стандарта, представляющего собой IgG1 человека.

Слитые полипептиды очищали с применением хроматографии с белком А с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS). После очистки с помощью SEC фракции, содержащие мономерный белок, объединяли и снова анализировали с помощью аналитической SEC. В соответствии с этим анализом слитые полипептиды были полностью мономерными без выявляемых мультимерных молекул или агрегатов.

Пример 2. Специфичность слитых полипептидов относительно VEGF-A

Авторы данного изобретения применяли анализ ELISA для определения аффинности слитых белков к рекомбинантному VEGF-A. Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на ночь на микротитровальные планшеты при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T). Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем промывали. Различные концентрации используемого для сравнения биспецифического антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и антитела положительного контроля (SEQ ID NO: 8 и 9) или слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации с разбавленным в концентрации, составляющей 1:5000, антителом Fc-HRP к IgG человека (№ 109-035-098, Jackson Laboratory) в PBS-T. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo), и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

Результат эксперимента наносили на график на фиг. 2 совместно с аппроксимированными кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и максимальный сигнал были незаданными параметрами, и наклон фиксировали для единообразия. Наблюдаемые значения EC50 находились в одинаковом диапазоне для всех исследуемых слитых полипептидов и используемого для сравнения антитела (0,8-0,15 нМ).

Пример 3. Специфичность слитых полипептидов относительно Ang-2

Авторы данного изобретения использовали анализ ELISA для определения аффинности слитых полипептидов и мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 к рекомбинантному Ang-2 человека (Creative BioMart). Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS-T. Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем промывали. Различные концентрации Ang-2-специфичного мутеина липокалина в мономерной форме (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) или слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) или биспецифического используемого для сравнения контроля (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре с разбавленным в концентрации, составляющей 1:1000, конъюгированным с антителом HRP к липокалину в PBS-T или разбавленным в концентрации 1:5000 антителом Fc-HRP к IgG человека (№109-035-098, Jackson Laboratory) в PBS-T. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo), и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

Результат эксперимента наносили на график на фиг. 3 совместно

с аппроксимированными кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и максимальный сигнал были незаданными параметрами, и наклон фиксировали для единообразия. Наблюдаемые значения EC50 для всех исследуемых слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) были сходными и варьировали от 0,21 до 0,23 нМ. Значение, полученное для мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, составляло 0,35-0,5 нМ, в то время как биспецифическое антитело, используемое для сравнения, характеризовалось EC50, составляющим 0,83 нМ.

Пример 4. Демонстрация одновременного связывания мишени в условиях на основе ELISA

Для демонстрации одновременного связывания слитых полипептидов с VEGF-A и Ang-2 применяли формат ELISA с двойным связыванием. Рекомбинантный VEGF-A (R&D Systems) в PBS (5 мкг/мл) наносили на ночь на микротитровальные планшеты при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой

стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T), с использованием установки Biotek ELx405 для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками. Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем снова промывали. В лунки добавляли различные концентрации слитых полипептидов и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Затем добавляли биотинилированный Ang-2 человека в постоянной концентрации, составляющей 1 мкг/мл, в PBS-T на 1 ч. После промывки в лунки на 1 ч добавляли экстравидин-HRP (Sigma-Adrich, 1:5000 в PBS-T). После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат с HRP (QuantaBlu, Thermo) и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

Как альтернатива, рекомбинантный Ang-2 (Creative BioMart) в PBS (5 мкг/мл) наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T), с использованием установки для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками Biotek ELx405.

Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем снова промывали. Различные концентрации слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Затем добавляли биотинилированный VEGF-A человека в постоянной концентрации, составляющей 1 мкг/мл, в PBS-T на 1 ч. После промывки в лунки на 1 ч добавляли экстравидин-HRP (Sigma-Adrich, 1:5000 в PBS-T). После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат с HRP (QuantaBlu, Thermo) и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на фиг. 4. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались отчетливыми сигналами связывания со значениями EC50, находящимися в диапазоне 0,36 до 0,55 нМ, при нанесении VEGF-A на планшет, что демонстрировало то, что такие слитые полипептиды способны одновременно связывать VEGF-A и Ang-2. Биспецифическая молекула, используемая для сравнения (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23), характеризовалась более низким сигналом связывания со значением EC50, составляющим 1,8 нМ (фиг. 4A). При использовании альтернативного проведения анализа, когда Ang-2 наносили на планшет и для выявления применяли биотинилированный VEGF-A, все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четкими сигналами связывания со значениями EC50 в диапазоне от 0,95 до 1,3 нМ, при этом биспецифическая молекула, используемая для сравнения, опять-таки характеризовалась более низким сигналом связывания со значением EC50, составляющим 14 нМ (фиг. 4B). Данное неудовлетворительное связывание биспецифического антитела, используемого для сравнения, может происходить по причине его моновалентного связывания мишени.

Пример 5. Блокирование слитыми полипептидами связывания Ang-2 человека с клетками, экспрессирующими hTie-2

Связывание слитых полипептидов с Ang-2 человека в конкурентном режиме исследовали на клетках HEK, сверхэкспрессирующих hTie-2, с использованием формата анализа конкурентной клеточной электрохемилюминесценции (ECL) (фиг. 5). В данном эксперименте постоянную концентрацию Ang-2 человека инкубировали с разными концентрациями слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), мутеинами липокалина, представляющими собой положительный контроль (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3), используемым для сравнения антителом (SEQ ID NO: 6 и 7) и отрицательными контролями (SEQ ID NO: 1 и hIgG1) в течение 1 ч. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси связывающий фрагмент/Ang-2 переносили на планшет MSD, покрытый клетками HEK, сверхэкспрессирующими hTie-2, для измерения концентрации hAng-2, который не был блокирован для связывания с hTie-2 соответственно.

Все стадии инкубации осуществляли при комнатной температуре и планшет промывали после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл буфера PBS два раза с применением устройства для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками Biotek EL405 (Biotek). На первой стадии 384-луночный планшет предварительно покрывали на 5 мин поли-D-лизином и дважды промывали с помощью PBS. Высевали 10^4 клеток HEK:hTie-2 на лунку, и обеспечивали прилипание к поверхности лунок в течение ночи при 37°C. После промывки покрытые клетками лунки блокировали с помощью 60 мкл PBS/казеина (2% казеина в PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Установленную концентрацию Ang-2 человека инкубировали в растворе с различными концентрациями слитых полипептидов, мутеинами липокалина, представляющими собой положительный контроль, антителом, используемом для сравнения, и отрицательными контролями с использованием подходящей исходной концентрации, которую серийно разбавляли в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в буфере PBS/казеин. После 1 ч инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили на планшет, покрытый HEK:hTie2, для захвата конкурентно несвязанного hAng-2 на 1 ч мин. при к.т. Стандартную кривую, включающую различные концентрации hAng-2, получали в PBS/казеине и также инкубировали в течение 1 ч на том же планшете.

Для обеспечения выявления и количественного определения связанного hAng-2, остаточные надосадочные жидкости удаляли и добавляли 20 мкл смеси антитела к HIS-метке (Abcam) и Sulfotag-маркированного антитела к Ig козы (Mesoscale Discovery) в концентрации 1 мкг/мл в PBS/казеине, и инкубировали в течение 1 ч при к.т. После промывки в каждую лунку добавляли 35 мкл буфера для считывания без поверхностно-активных веществ и сигнал ECL в каждой лунке считывали с применением считывающего устройства Mesoscale Discovery.

Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на фиг. 5. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четким ингибированием связывания hAng-2 с hTie2 со значениями EC50, варьирующими от 0,3 до 0,4 нМ, при этом используемая для сравнения молекула и мутеины липокалина также характеризовались сходными значениями от 0,3 до 0,6 нМ.

Пример 6. Опосредованная слитыми полипептидами блокировка VEGF-A в клеточном анализе пролиферации

Способность слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3), используемых для сравнения антител (SEQ ID NO: 6 и 7; SEQ ID NO: 8 и 9), и отрицательными контролями (SEQ ID NO: 1 и hIgG1) нейтрализовать биологическую активность VEGF-A оценивали посредством применения краткосрочного биологического анализа пролиферации с использованием эндотелиальных клеток лимфатических капилляров (LEC). Пролиферацию LEC можно ингибировать с помощью средств, обладающих нейтрализующим эффектом в отношении как hVEGF-A, так и hAng-2. Поскольку непосредственно hAng-2 не добавляли в анализ, то эндогенный hAng-2 высвобождался клетками LEC.

LEC содержали в EBM, 5% фетальной телячьей сыворотки и дополнительном наборе MV2 в стандартных условиях в соответствии с инструкциями производителя (PAA Laboratories), 37°C, атмосфера с 5% CO_2). В 1-й день эксперимента прилипающие клетки отделяли от их субстрата с помощью трипсина/EDTA в соответствии с инструкциями производителя. Далее клетки центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, повторно суспендировали в EBM и фильтровали через сито для клеток с размером пор 100 мкм (Falcon) для удаления агрегатов клеток. Затем клетки высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном для культур тканей (Greiner) с плотностью 3200 клеток на лунку, используя конечный объем, составляющий 100 мкл. Их инкубировали в течение 1 ч в стандартных условиях. Через 1 ч серии разбавлений всех исследуемых средств (предварительно инкубированных с hVEGF-A (R&D systems) при 50 нг/мл в течение 30 мин) добавляли к клеткам LEC в культуре. Через трое суток в культуре степень пролиферации анализировали путем определения количества жизнеспособных клеток. Это осуществляли с применением люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega) для измерения уровней АТФ, которые коррелируют с количеством метаболически активных клеток. Оценивали способность слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и VEGF-A-специфичной молекулы, используемой для сравнения (SEQ ID NO: 8 и 9), нейтрализовать индуцированную VEGF-A пролиферацию. Способность Ang-2-специфичных мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) и используемого для сравнения антитела (SEQ ID NO: 6 и 7) нейтрализовать hIL-23 также анализировали по его значению IC50, т.е. концентрации мутеинов липокалина, которая приводит к половинному ингибированию hAng-2-опосредованной пролиферации.

Значения IC50 определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) путем построения графика стандартизованного сигнала в зависимости от концентрации образцов и нелинейной регрессии данных с сигмоидальной моделью доза-ответ.

Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на фиг. 6. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четким ингибированием пролиферации со значениями EC50, находящимися в диапазоне от 1,2 до 0,5 нМ, при этом используемая для сравнения молекула VEGF-A характеризовалась EC50, составляющим 1,2. hAng-2-специфичные мутеины липокалина и используемый для сравнения контроль hAng-2 (SEQ ID NO: 6 и 7) частично ингибировали пролиферацию со значениями IC50, составляющими 1,2-4,2 нМ. Отрицательные контроли не проявляли эффекта в отношении пролиферации.

Пример 7. Фармакокинетическая оценка слитых полипептидов in vivo

При оценке слитых полипептидов in vivo применяли интравитреальную инъекцию тестируемого средства кроликам (HY79b; пигментированный), после чего следовало взятие образцов крови, стекловидного тела и ткани сетчатки на протяжении 336-часового периода. Вкратце, кроликам (n=16 на обработку) инъецировали 100 мкг слитого полипептида (SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) в один глаз (правый), при этом другой глаз (левый) использовали как контроль (т.е., необработанный). Периодически проводили офтальмологические исследования для оценки общего состояния здоровья глаз кроликов.

Фармакокинетику тестируемых средств определяли на основе плазмы крови и стекловидного тела, взятых у кроликов на протяжении 336-часового периода после инъекции. В частности, кровь и стекловидное тело брали у кроликов через 2, 8, 24, 72, 96, 168, 216 и 336 ч после введения дозы (n=2 кролика на обработку, умерщвленных в каждой временной точке).

Уровни лекарственного средства выявляли с помощью ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли

целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней VEGF-A и Ang-2, как описано в примере 4. Данные аппроксимировали с применением некомпартментной модели с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 5. На фиг. 7 показаны линейные графические изображения концентрации в стекловидном теле с течением времени для конструкций под SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15. Данные показывают, что биспецифические слитые белки характеризуются значениями конечного периода полужизни, находящимися в диапазоне примерно 3,7-4,5 дней.

Варианты осуществления, иллюстративно описанные в данном документе, можно надлежащим образом осуществлять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, специально не раскрытых в данном документе. Таким образом, например, термины "содержащий", "включающий", "состоящий из" и т.д. следует читать как имеющие расширительное и неограничивающие значение. В дополнение, термины и выражения, используемые в данном документе, были использованы в качестве терминов описания, а не ограничения, и в использовании таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить любые эквиваленты продемонстрированных и описанных характеристик или их частей, однако следует понимать, что в пределах объема заявленного изобретения возможны разные модификации. Таким образом, следует понимать, что несмотря на то, что данные варианты осуществления были конкретно раскрыты с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных характеристик, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к их модификации и вариациям, и что такие модификации и вариации рассматриваются как часть объема настоящего изобретения. Все патенты, патентные заявки, руководства и прошедшие рецензию публикации, описанные в данном документе, включены в данный документ с помощью ссылки в полном их объеме. Более того, в тех случаях, когда определение или использование термина в ссылочном документе, который включен в данный документ с помощью ссылки, не согласуется или противоречит определению такого термина, представленному в данном документе, применяется определение термина, представленное в данном документе, а определение термина из ссылочного документа не применяется. Каждое из более узких видов и субродовых группировок, находящихся в пределах родового понятия настоящего изобретения, также образует часть настоящего изобретения. Это подразумевает описание настоящего изобретения в обобщенном виде с оговоркой или отрицательными признаками, удаляющими любой объект из рода, независимо от того, изложен ли исключенный материал конкретно в данном документе или нет. Кроме того в тех случаях, когда характеристики описаны в контексте групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также таким образом описано в контексте любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша. Дополнительные варианты осуществления будут очевидны из прилагаемой формулы изобретения.

Эквиваленты: специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, или с помощью проведения только лишь обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, таким образом включены в описание с помощью ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, отдельный патент или отдельная патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ с помощью ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок для связывания фактора А роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и ангиопоэтина-2 (Ang-2), содержащий первую субъединицу и вторую субъединицу, где первая субъединица состоит из антигенсвязывающей молекулы, специфичной в отношении VEGF-A, где вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов человека (hNGAL), специфичного в отношении Ang-2, где аминокислотная последовательность мутеина hNGAL содержит по меньшей мере шестнадцать из следующих подвергнутых мутации аминокислотных остатков по сравнению с линейной аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL

(SEQ ID NO: 1): Gln 28 →His; Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp, Arg, Glu, Asp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu или Pro; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu, Tyr или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val; и Lys 134 → Ala, Glu или Trp

и где мутеин hNGAL характеризуется по меньшей мере 85% идентичностью аминокислотной по-

следовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 86-97.

2. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

3. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 200 пМ или меньше.

4. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

5. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 250 пМ или меньше.

6. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.

7. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 500 пМ или меньше.

8. Слитый белок по п.1, где слитый белок способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1,5 нМ или меньше.

9. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где мутеин hNGAL предусматривает один или более из следующих подвергнутых мутации аминокислотных остатков по сравнению с линейной аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1): Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

10. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где мутеин hNGAL предусматривает один из следующих наборов подвергнутых мутации аминокислотных остатков по сравнению с линейной аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где каждый из наборов подвергнутых мутации аминокислотных остатков необязательно дополнительно включает подвергнутые мутации аминокислотные остатки Gln 28 → His и Cys 87 → Ser.

11. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где мутеин hNGAL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 86-97 и их функциональных фрагментов.

12. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность мутеина hNGAL характеризуется по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 86-97.

13. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело.

14. Слитый белок по п.13, где антитело содержит области тяжелой цепи, определяющие комплементарность (CDR), которые содержатся в тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8, и CDR легкой цепи, которые содержатся в легкой цепи под SEQ ID NO 9.

15. Слитый белок по п.13, где антитело представляет собой бевацизумаб.

16. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где слитый белок содержит аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 9 и 10, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 8 и 11, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 9 и 12, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 8 и 13, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 9 и 14, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 8 и 15, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 9 и 16, или аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 8 и 17.

17. Слитый белок по любому из предыдущих пунктов, где слитый белок характеризуется по мень-

шей мере 90% идентичностью последовательности с аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 9 и 10, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 8 и 11, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 9 и 12, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 8 и 13, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 9 и 14, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 8 и 15, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 9 и 16, или аминокислотными последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 8 и 17.

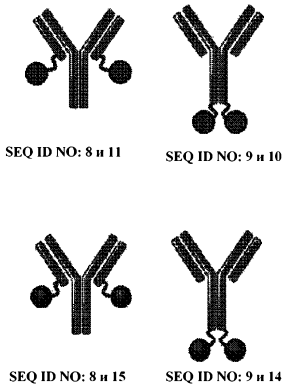
18. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок по любому из предыдущих пунктов.

19. Фармацевтическая композиция для лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта, содержащая слитый белок по любому из пп.1-17.

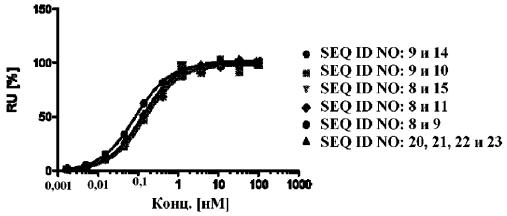
20. Применение одного или более слитых белков по любому из пп.1-17 в способе

a) ингибирования или уменьшения ангиогенеза у субъекта, включающем введение субъекту одного или более слитых белков или одной или более фармацевтических композиций по п.19;

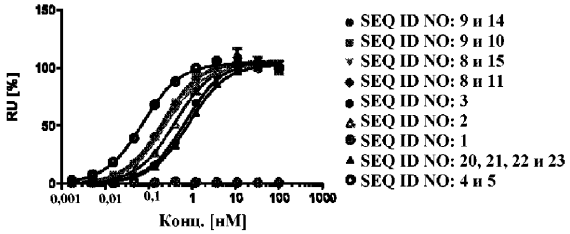
b) лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта, предусматривающем введение субъекту одного или более слитых белков или одной или более фармацевтических композиций по п.19, где заболевание или расстройство выбраны из группы, состоящей из роста опухоли, глазных расстройств, сосудистых заболеваний, воспалительных или инфекционных заболеваний, рака, офтальмологических неоваскулярных заболеваний, артрита и псориаза.



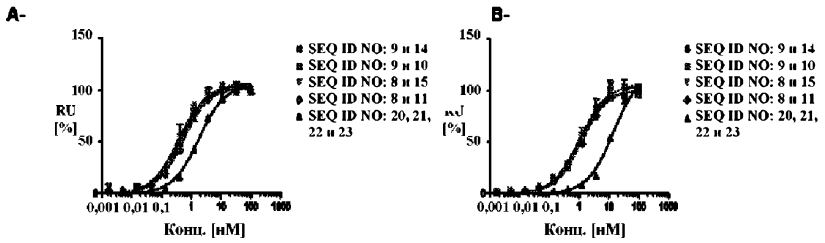
Фиг. 1



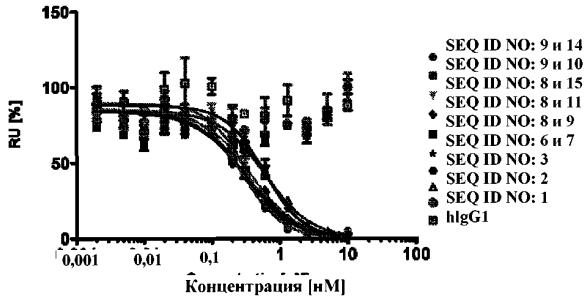
Фиг. 2



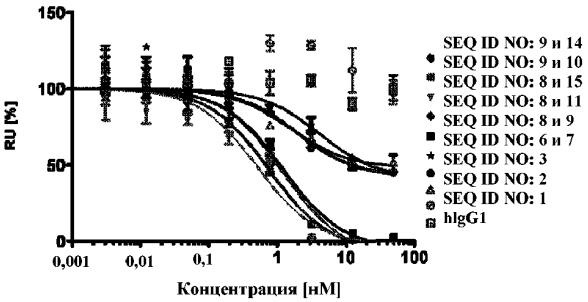
Фиг. 3



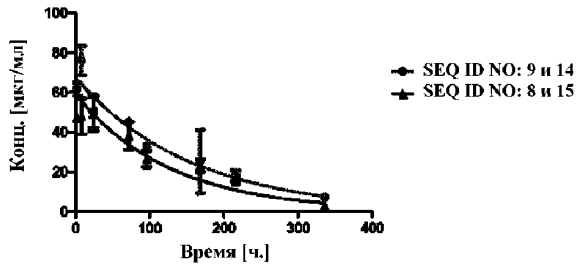
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7