



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2015137158, 07.12.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.12.2009 US 61/267,098

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2012128586 06.07.2012

(43) Дата публикации заявки: 25.12.2018 Бюл. №
36

Адрес для переписки:

410000, г. Саратов, ул. Главпочтамт, а/я 62,
ООО "ПатентВолгаСервис", пат.пов.
Романовой Н.В.

(71) Заявитель(и):

ПИРИС АГ (DE)

(72) Автор(ы):

СКЕРРА Арне (DE),
ГЕБАУЭР Михаэла (DE),
ХИНЦ Доминик (DE),
РАУТ Забине (DE),
МАЧИНЕР Габриэле (DE),
ХЮЛЬСМЕЙЕР Мартин (DE)

**(54) МУТЕИНЫ ЛИПОКАЛИНА 2 ЧЕЛОВЕКА (Lcn2,hNGAL) С АФФИННОСТЬЮ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕННОЙ МИШЕНИ**

(57) Формула изобретения

1. Способ продуцирования мутеина из липокалина 2 человека (Lcn2, hNGAL), при котором указанный мутеин связывается с заранее определенной мишенью с обнаруживаемой аффинностью, не связывающуюся с нативным зрелым hNGAL в физиологических условиях, включающий:

(а) мутагенез молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Lcn2 человека, по меньшей мере, в кодирующем триплете нуклеотидов в позициях 100 и/или 106 линейной полипептидной последовательности Lcn2 человека и по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 триплетах нуклеотидов, кодирующих любую из позиций 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 103, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности Lcn2 человека с получением в результате одной или более молекул нуклеиновой кислоты мутеина;

(б) экспрессию одной или более молекул нуклеиновой кислоты, полученных на стадии (а), в подходящей экспрессионной системе; и

(с) обогащение данного одного или более мутеинами с обнаруживаемой аффинностью связывания для определённой мишени посредством отбора и/или выделения.

2. Мутеин, продуцированный из белка Lcn2 способом по п. 1, включающий, по меньшей мере, один мутированный аминокислотный остаток в любой позиции 100 и/или 106 и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 мутированных аминокислотных остатков в любой из позиций 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 103, 125, 127, 132, и 134 линейной полипептидной последовательности Lcn2 и связывающий предварительно выбранную мишень с различимой аффинностью,

RU 2015137158 A

RU 2015137158 A

не связывающуюся с нативным зрелым Lcn2 при физиологических условиях.

3. Мутеин по п. 2, содержащий 18, 19 или 20 мутированных аминокислотных остатков в любом из положений 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 в линейной полипептидной последовательности Lcn2.

4. Мутеин по п. 2, где указанная мишень выбрана из группы, состоящей из пептида, белка, фрагмента или домена белка, и небольшой органической молекулы.

5. Мутеин по п. 4, где пептид является бета-амилоидным пептидом.

6. Мутеин по п. 5, где бета-амилоидный пептид является Ap40 пептидом или пептидом А β 42.

7. Мутеин по п. 5, содержащий по сравнению со зрелой аминокислотной последовательностью hLcn2 дикого типа, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замещений, выбранных из группы, состоящей из Leu36 → Val or Cys; Ala40 → Tyr or Lys or Val; Ile41 → Thr or Ser or Leu; Gln49 → Leu or Trp; Leu70 → Gly; Arg72 → Gly or Asp; Lys73 → Leu or Thr or Asp; Asp77 → Asn or His or Leu; Trp79 → Lys; Asn96 → Ile or Arg; Tyr100 → Gln or Arg or Glu; Leu103 → Met or Arg or Gly; Tyr106 → Tyr or Ala or Trp; Lys125 → Thr or Val or Glu; Ser127 → Gly or Gln or Ala; Tyr132 → Met or Ser or Thr; and Lys134 → Asn

8. Мутеин по п. 7, имеющий последовательность SEQ ID N0: 39 (S1-A4) или SEQ ID N0: 41 (US7) или SEQ ID N0: 43 (H1-G1).

9. Мутеин по п. 4, где белком является фибронектин или его домен.

10. Мутеин по п. 9, где доменом фибронектина является экстрадомен В или его фрагмент.

11. Мутеин по п. 9, содержащий по сравнению со зрелой аминокислотной последовательностью hLcn2 дикого типа по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замещений, выбранных из группы, состоящей из Leu36 → Lys or Glu or Arg or Ala; Ala40 → His or Met or Thr or Ser; Ile41 → Asp or Arg or Trp or Leu; Gln49 → Arg or Ala or Tyr; Leu70 → Leu or Arg or Met; Arg72 → Val or Arg or Gln or Met; Lys73 → His or Arg or Ser; Asp77 → Asn or His or Lys or Arg; Trp79 → Arg or Met or Leu; Asn96 → Lys or Ala or Ser; Tyr100 → Trp or Pro or Lys; Leu103 → His or Pro; Tyr106 → Phe or Trp or Thr; Lys125 → Arg or His or Thr; Ser127 → Tyr or Phe Ala; Tyr132 → Leu or Phe; Lys134 → Glu or His or Gly or Phe; and Ser146 → Asn.

12. Мутеин по п. 11, имеющий последовательность SEQ ID N0: 22 (N7E) или SEQ ID N0: 24 (N9B) или SEQ ID N0: 26 (N10D).

13. Мутеин по любому из п.п. 2 – 12, далее содержащий по сравнению со зрелой аминокислотной последовательностью hLcn2 дикого типа аминокислотные замещения, выбранные из группы, состоящей из Gln28 → His and Cys87 → Ser.

14. Мутеин по любому из пп. 2 – 12, конъюгирующий с соединением, выбранным из группы, состоящей из органических молекул, ферментных меток, радиоактивных меток, цветовых меток, флуоресцентных меток, хромогенных меток, люминесцентных меток, гаптенов, дигоксигенина, биотина, цитостатических агентов, токсинов, металлических комплексов, металлов и коллоидного золота, и с соединением, продlevающим серологический период полураспада мутеина, или сопряжённый своим N-терминалом и/или С-терминалом с элементом слияния, представляющим собой белок или домен белка или пептид.

15. Мутеин по любому из пп. 2 – 12, связывающий данную неприродную мишень с КД 1 μ M или менее, или 100 μ M или менее, или 1 μ M или менее, или 500 нм, или 200 нм или менее, или 100 нм или менее, или 50 нм или менее, или 10 нм или менее, или 1 нм или менее.

16. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин по любому из пп. 2 – 15.

17. Клетка-хозяин для экспрессии мутеина по любому из пп. 2 – 15, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16.

18. Способ получения мутеина по любому из пп. 2 – 15, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 17 для экспрессии мутеина по любому из пп. 2 – 15.

19. Диагностический набор для связывания предварительно выбранной мишени, включающий в качестве одного из компонентов набора мутеин по любому из пп. 2 – 15.

20. Аналитический набор для связывания предварительно выбранной мишени, включающий в качестве одного из компонентов набора мутеин по любому из пп. 2 – 15.