



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C07K 14/775 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(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;

(b) 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 различной аффинностью,

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 A β 40 пептидом или пептидом A 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 \rightarrow Val or Cys; Ala40 \rightarrow Tyr or Lys or Val; Ile41 \rightarrow Thr or Ser or Leu; Gln49 \rightarrow Leu or Trp; Leu70 \rightarrow Gly; Arg72 \rightarrow Gly or Asp; Lys73 \rightarrow Leu or Thr or Asp; Asp77 \rightarrow Asn or His or Leu; Trp79 \rightarrow Lys; Asn96 \rightarrow Ile or Arg; Tyr100 \rightarrow Gln or Arg or Glu; Leu103 \rightarrow Met or Arg or Gly; Tyr106 \rightarrow Tyr or Ala or Trp; Lys125 \rightarrow Thr or Val or Glu; Ser127 \rightarrow Gly or Gln or Ala; Tyr132 \rightarrow Met or Ser or Thr; and Lys134 \rightarrow 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 (HI-GI).

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 \rightarrow Lys or Glu or Arg or Ala; Ala40 \rightarrow His or Met or Thr or Ser; Ile41 \rightarrow Asp or Arg or Trp or Leu; Gln49 \rightarrow Arg or Ala or Tyr; Leu70 \rightarrow Leu or Arg or Met; Arg72 \rightarrow Val or Arg or Gln or Met; Lys73 \rightarrow His or Arg or Ser; Asp77 \rightarrow Asn or His or Lys or Arg; Trp79 \rightarrow Arg or Met or Leu; Asn96 \rightarrow Lys or Ala or Ser; Tyr100 \rightarrow Trp or Pro or Lys; Leu103 \rightarrow His or Pro; Tyr106 \rightarrow Phe or Trp or Thr; Lys125 \rightarrow Arg or His or Thr; Ser127 \rightarrow Tyr or Phe Ala; Tyr132 \rightarrow Leu or Phe; Lys134 \rightarrow Glu or His or Gly or Phe; and Ser146 \rightarrow 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 \rightarrow His and Cys87 \rightarrow Ser.

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

15. Мутеин по любому из п.п. 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 п.п. 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.

R U 2 0 1 5 1 3 7 1 5 8 A

R U 2 0 1 5 1 3 7 1 5 8 A