

R U 2 5 6 4 1 2 5 C 2



(19) RU (11) 2 564 125⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
C07K 14/775 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012128586/10, 07.12.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.12.2010

Приоритет(ы):

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

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2014 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 27.09.2015 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KIM H.J. et al., High-Affinity Recognition of Lanthanide(III) Chelate Complexes by a Reprogrammed Human Lipocalin 2, J. Am. Chem. Soc., 2009, vol.131 (10), pp.3565-3576. SKERRA A., Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use, Current Opinion in Molecular Therapeutics, 2007, vol.9, no.4, pp.336-344. WO 2003/029463 A2, 10.04.2003. RU 2260599 C2, 20.09.2005

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.07.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/069028 (07.12.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/069992 (16.06.2011)

Адрес для переписки:
410000, г. Саратов, главпочтamt, а/я 62, ООО
"ПатентВолгаСервис", Романовой Н.В.

(54) МУТЕИНЫ ЛИПОКАЛИНА 2 ЧЕЛОВЕКА (LCN2, HNGAL) С АФФИННОСТЬЮ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕННОЙ МИШЕНИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к способу получения мутеинов липокалина 2 (Lcn2, hNGAL) человека. Способ основан на мутагенезе молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Lcn2 человека. При этом мутагенезу подвергают по меньшей мере нуклеотидный триплет, кодирующий положение 96 в линейной полипептидной последовательности

(72) Автор(ы):

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

(73) Патентообладатель(и):

ПИРИС АГ (DE)

R U 2 5 6 4 1 2 5 C 2

Lcn2 человека. Также заявлены мутеины, полученные указанным способом, которые связываются с заранее определенной мишенью с обнаруживаемой аффинностью, где указанная мишень не связывается с природным hGAL при физиологических условиях. Изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующими такие мутеины, клетке-хозяину, а

R U 2 5 6 4 1 2 5 C 2

также к диагностическому и аналитическому наборам, включающим мутеины по изобретению.

7 н. и 13 з. п. ф-лы, 28 ил., 3 табл., 24 пр.

R U 2 5 6 4 1 2 5 C 2



(51) Int. Cl.
C07K 14/775 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012128586/10, 07.12.2010

(24) Effective date for property rights:
07.12.2010

Priority:

(30) Convention priority:
07.12.2009 US 61/267,098

(43) Application published: 20.01.2014 Bull. № 2

(45) Date of publication: 27.09.2015 Bull. № 27

(85) Commencement of national phase: 09.07.2012

(86) PCT application:
EP 2010/069028 (07.12.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/069992 (16.06.2011)

Mail address:
410000, g. Saratov, glavpochtamt, a/ja 62, OOO
"PatentVolgaServis", Romanovoj N.V.

(72) Inventor(s):

SKERRA Arne (DE),
GEBAUEhR Mikhaehla (DE),
KhINTs Dominik (DE),
RAUT Zabine (DE),
MAChINER Gabriele (DE),
KhJuL'SMEJER Martin (DE)

(73) Proprietor(s):

PIRIS AG (DE)

R U
2 5 6 4 1 2 5
C 2

(54) MUTEINS OF HUMAN LIPOCALIN 2 (LCN2, HNGAL) WITH AFFINITY TO CERTAIN TARGET

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry, in particular to a method of obtaining muteins of human lipocalin 2 (Lcn2, hNGAL). The method is based on the mutagenesis of a molecule of a nucleic acid, coding the human Lcn2 protein. At least a nucleotide triplet, coding position 96 in a linear polypeptide sequence of the human Lcn2 is subjected to the mutagenesis. The muteins, obtained by the

claimed method, which bind with a preliminarily specified target with identifiable affinity, where the said target does not bind with natural hGAL under physiological conditions are also claimed.

EFFECT: invention relates to molecules of nucleic acid, which code such muteins, a host cell, as well as to diagnostic and analytical sets, including the muteins in accordance with the invention.

20 cl, 28 dwg, 3 tbl, 24 ex

C 2
2 5 6 4 1 2 5
R U

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новой библиотеке для получения мутеинов и к новым мутеинам, полученным из липокалина 2 человека (Lcn2, hNGAL), и близким белкам, которые связываются с определенной мишенью с обнаруживаемой

5 аффинностью. Изобретение также относится к соответствующим молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующими такой мутеин и способу их получения. Изобретение также относится к способу получения такого мутеина. Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей такой мутеин липокалина, а также к различным применением мутеина.

10 Мутеины Lcn2 по настоящему изобретению демонстрируют возможность использования в качестве лекарственных и/или диагностических средств для некоторых заболеваний. Например, они могут использоваться для связывания и истощения патологических форм природных биологических молекул, таких как бета-амилоидный пептид при болезни Альцгеймера. В другом примере их можно использовать для 15 специфической направленной доставки различных меток или токсинов к связанным с заболеванием клеточным поверхностным маркерам, таким как экстрадомен В фибронектина, который связан с неоваскуляризацией опухоли. За счет определенных положительных эффектов мутеинов Lcn2, которые можно получить по настоящему изобретению, возможны различные другие применения или примеры.

20 **Уровень техники**

Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее частой формой деменции у пожилых людей. Нарушенный процессинг предшественника амилоидного белка связан с AD, приводя к образованию потенциально нейротоксического белка, содержащего остатки 40-42 бета-амилоидного пептида (A β). Последующая агрегация A β в олигомеры и

25 длинные фибриллы играет ключевую роль в развитии болезни, завершаясь образованием старческих бляшек (Haass and Selkoe, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2007) 8, 101-112). Несмотря на возрастающее значение AD, по-прежнему имеется нерешенная потребность в эффективных лекарственных средствах для профилактики, лечения или замедления данной деменции.

30 Существующие в настоящее время подходы, направленные против амилоида, нацелены на: (i) профилактику образования A β ; (ii) блокирование его агрегации; (iii) снижение уровня растворимого A β в мозге и (iv) разрушение имеющихся амилоидных бляшек. До настоящего времени иммунотерапия, включающая активную и пассивную иммунизацию пациентов с AD, была наиболее перспективной в данной области (Dodel et al. (2003) Lancet Neurology, 2, 215-220; Lichtlen and Mohajeri (2007) J. Neurochem., 104, 859-874; Brody and Holtzman (2008) Annu. Rev. Neurosci., 31, 175-193). Однако недавние клинические испытания активной иммунизации пациентов с AD были приостановлены в результате повышенной частоты возникновения менингоэнцефалита у 6% пациентов. За счет этих возможных побочных эффектов Fc-опосредованных иммунологических 35 функций, не связывающиеся с Ig соединения, такие как антикалины, обеспечивают альтернативу. Обнаружение молекулы аффитела со специфичностью к бета-амилоиду является одним примером потенциальных свойств инженерных белков, не связывающихся с Ig (Gronwall et al. (2007) J. Biotechnol., 128, 162-183; Hoyer et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 5099-5104).

40 45 Однако бактериальная природа аффител может быть нежелательна в связи с иммуногенностью у пациента-человека.

Фибронектин (FN) играет важную роль в адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток. FN представляет собой крупный, модульный, димерный

гликопротеин, содержащий многочисленные домены типа I, II и III. Альтернативные сплайсированные варианты FN, такие как его экстрадомен B (ED-B), который находится между доменами FN^{III}7 и FN^{III}8, экспрессируются со специфичным для ткани и стадии 5 развития характером (Zardi et al. (1987) EMBO J., 6, 2337-2342).

ED-B отсутствует в тканях здоровых взрослых людей, за исключением заживления ран и неопластической васкуляризации. Следовательно, ED-B-содержащий фибронектин экспрессируется на высоком уровне во многих типах опухолей, в которых происходит неоваскуляризация и проходит аномальный ангиогенез. Несмотря на то, что фактическая 10 биологическая роль ED-B в ангиогенезе остается неясной, его присутствие в FN служит превосходным маркером опухолегенеза. В целом, отличие между злокачественными тканями и здоровыми органами является преимущественной терапевтической стратегией избирательной направленной доставки лекарственных препаратов непосредственно в опухолевую ткань, что приводит к повышенной местной концентрации препарата.

Для специфического обнаружения и направленной доставки к ED-B были получены 15 рекомбинантные фрагменты антител с использованием технологии фагового дисплея антител. Одни фрагменты выделенных антител представляют одноцепочечные Fv L19 (Carnemolla et al. (1996) Int. J. Cancer, 68, 397-405; Ebbinghaus et al. (2004) Curr. Pharm. Des., 10, 1537-1549). В настоящее время направление L19 к ED-B в комбинации с эффективным 20 цитотоксическим препаратом является перспективной возможностью для лечения и диагностики рака (Schliemann and Neri (2007) Biochim. Biophys. Acta, 1776, 175-192; Kaspar et al. (2006) Int. J. Cancer, 118, 1331-1339).

Однако фрагмент scFv L19 склонен к олигомеризации.

В результате вышеуказанных существующих проблем для лечения болезни 25 Альцгеймера и диагностики или терапии опухолей целью настоящего изобретения является обеспечение способов и соединений, которые можно использовать для лечения болезни Альцгеймера, а также в диагностике и терапии опухолей.

Подробное описание изобретения

Заявители обнаружили, что специфические мутеины белков, полученные из 30 липокалина 2, являются привлекающими внимание соединениями за счет их более высокой стабильности и меньшего размера. Заявители идентифицировали определенную группу мутеинов липокалина 2 с мутациями в определенных положениях, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью, например, к ED-B. Такие мутеины Lcn2 специфически распознают фибронектин, содержащий ED-B, на клетках человека 35 с высокой чувствительностью и, таким образом, являются перспективными для применения в качестве лекарственных средств для диагностики и лечения опухолевых заболеваний.

Заявители также смогли идентифицировать определенные мутеины Lcn2c с высокой 40 аффинностью и специфичностью для Аβ пептида. Такие мутеины Lcn2 могут даже ингибировать агрегацию Аβ и, таким образом, являются перспективными, возможно после дальнейшего усовершенствования и модификации, в качестве лекарственных средств для лечения AD.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к новым рандомизированным 45 библиотекам, основанным на скэффолде Lcn2 человека, которые позволяют эффективно получать мутеины, такие как мутеины по настоящему изобретению, с высокой аффинностью и специфичностью для определенной мишени в общем. Примеры таких библиотек или их разделов показаны на фигурах 1 и 2.

В одном из аспектов, по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 нуклеотидных триплетах, кодирующих любое из положений

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 hLcn2, проводили случайный мутагенез заменой в данных положениях группой нуклеотидных триплетов. Группа нуклеотидных триплетов может относиться, не ограничиваясь этим, (а) к менее чем 64 возможным триплетам, кодированных нуклеотидами NNN (если N=A, T, G, C, что означает $4 \times 4 \times 4 = 64$ возможных триплетов), (б) к менее чем 32 возможным триплетам, кодированных нуклеотидами NNK или NNS, (с) к менее чем необходимым триплетам для кодирования всех 20 природных протеиногенных аминокислот. В еще одном варианте осуществления нуклеотидные триплеты, кодирующие цистеин, не используются для замены во время мутагенеза. Это означает, что мутагенез не приводит к образованию мутеинов, содержащих новые цистеины, помимо тех цистеинов, которые уже входили в исходную, не мутагенизированную последовательность. Таким образом, в данном аспекте определяется, каким образом нуклеотидные триплеты выглядят, когда не введены в положения, которые подвергаются мутагенезу, как определено в данном разделе (см. пример 1 и фигуру 2).

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения мутеина, полученного из липокалина 2 человека (Lcn2; также известного как липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов, hNGAL, или как сидерокалин). Мутеины, полученные с использованием этого способа, могут связываться с 20 неприродной мишенью с обнаруживаемой аффинностью. Способ включает проведение мутагенеза молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующем липокалин 2 (Lcn2, hNGAL) человека, в нуклеотидном триплете, кодирующем по меньшей мере одно из положений в последовательности, соответствующих положениям 96, 100 и 106 линейной последовательности полипептида липокалина 2 человека, с получением одной или 25 более молекул нуклеиновой кислоты мутеинов.

Согласно вышеуказанному термин «липокалин 2 человека» или «липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (hNGAL)» включает структурные гомологи, уже идентифицированные или которые будут выделены, от других видов, которые обладают гомологией аминокислотных последовательностей или идентичностью 30 последовательностей более чем примерно на 60%. Предпочтительно, чтобы данные липокалины человека, описанные выше, содержали 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 муттированных аминокислотных остатков в любом из положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 35 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности hNGAL. В том смысле, в котором в настоящем документе используется термин «гомология» в его обычном понимании, то он включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые относятся к консервативным заменам (например, замене остатка глютамина на остаток аспартата) в эквивалентных 40 положениях в линейной аминокислотной последовательности двух белков, которые сравниваются друг с другом. В том смысле, в котором в настоящем изобретении используется термин «идентичность последовательностей» или «идентичность», он означает процент парных идентичных остатков - после выравнивания по гомологии последовательности полипептида по настоящему изобретению с интересующей 45 последовательностью - по числу остатков в более длинной из данных двух последовательностей.

Процент гомологии последовательностей или идентичность последовательностей определяется в настоящем документе с использованием программы BLASTP, версия

blastp 2.2.5 (16 ноября, 2002; см. Altschul S.F. et al. (1997) Nucl. Acids Res., 25, 3389-3402).

Процент гомологии основан на выравнивании полных полипептидных последовательностей (матрица: BLOSUM 62; цены гэпов: 11,1; значение порога

установлено на 10^{-3}), включая пропептидные последовательности с использованием липокалина 2 человека в качестве стандарта при парном сравнении. Ее рассчитывают в виде процента числа «позитивов» (гомологичных аминокислот), указанных результатом программы BLASTP, деленное на общее число аминокислот, выбранных программой при выравнивании. В данной связи следует отметить, что общее число выбранных аминокислот может отличаться от длины липокалина 2 человека.

В случае иного белка, чем липокалин 2 человека, используемого в настоящем изобретении, определение мутированных положений последовательности, данное для липокалина 2 человека, можно отнести к другому липокалину с помощью опубликованных выравниваний последовательностей или способов выравнивания, известных специалистам в данной области. Выравнивание последовательностей можно проводить, например, как описано в международной заявке WO 99/16873 (см. фигуру 3 в настоящем документе) с использованием опубликованного выравнивания, такого как приведено на фигуре 1 у Redl. B. (2000) Biochim. Biophys. Acta, 1482, 241-248. Если имеется трехмерная структура липокалинов, то можно использовать структурное наложение для определения положений последовательности, которые должны подвергнуться мутагенезу в настоящем изобретении. Также для данной цели можно использовать другие способы структурного анализа, такие как мультимерная магнитно-резонансная спектроскопия.

Гомолог липокалина 2 человека может также представлять собой белок-мутеин самого липокалина 2 человека, в котором аминокислотные замены вводят в положения, иные чем положения, выбранные в настоящем изобретении. Например, такой мутеин может представлять белок, в котором мутированы положения в подвергаемых воздействию растворителя β -складках, по сравнению с последовательностью дикого типа липокалина 2 человека для повышения растворимости или стабильности белка.

В общем, термин «липокалин 2 человека» включает все белки, обладающие гомологией последовательностей или идентичностью последовательностей более чем на 60, 70, 80, 85, 90 или 95% по отношению к липокалину 2 человека. Предпочтительно, чтобы данные липокалины человека, описанные выше, содержали 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 мутированных аминокислотных остатков в любом из положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности hNGAL.

Таким образом, в дополнительном аспекте настояще изобретение относится к мутеину, полученному из липокалина 2 человека (т.е. мутеину липокалина человека или мутированному липокалину человека, предпочтительно, мутированному зрелому hNGAL, где указанный зрелый hNGAL имеет инвентарный номер P80188 в SWISS-PROT Data Bank, более предпочтительно, указанный зрелый hNGAL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:44). Этот мутеин включает по меньшей мере один или два мутированных аминокислотных остатка в любом из положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 96, 100 и 106 линейной полипептидной последовательности Lcn2 человека, и где мутеин связывается с определенной неприродной мишенью с обнаруживаемой аффинностью.

В том смысле, в котором в настоящем документе используются термины «мутеин»,

«мутированная» молекула (белка или нуклеиновой кислоты) или «мутант», они относятся к замене, делеции или инсерции соответственно одного или более нуклеотидов или аминокислот по сравнению с встречающимся в природе (дикого типа) нуклеиновокислотным или белковым «стандартным» скэффолдам. Предпочтительно, 5 число соответственно нуклеотидов или аминокислот, которое подвергает замене, делеции или инсерции, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, например, 25, 30, 35, 40, 45 или 50.

В том смысле, в котором в настоящем документе используются термины «липокалин человека, связанный с желатиназой нейтрофилов» или «hNGAL», или «липокалин 2» 10 или «Lcn2», все они относятся к зрелому hNGAL с инвентарным номером P80188 в SWISS-PROT Data Bank (приведенная в настоящем документе в качестве примера последовательность SEQ ID NO:44).

В данном контексте отмечается, что изобретение основано на удивительном открытии того, что мутагенез липокалина 2 человека, крысиного белка, связанного с 15 α_2 -микроглобулином (A2m), и 24p3/утерокалина мыши (24p3) в одном или более вышеуказанных 3 положений последовательности обеспечивает мутеины, которые обладают достаточным аффинным связыванием с заранее определенной мишенью, которая может включать, не ограничиваясь этим, пептид, белок, фрагмент или домен белка, и небольшую органическую молекулу.

20 Данная мишень может представлять любую желаемую, неприродную мишень/лиганд. В одном варианте осуществления термин «неприродный лиганд» относится к соединению, которое не связывается с природным зрелым hNGAL в физиологических условиях.

25 В том смысле, в котором в настоящем документе используются термины «органическая молекула» или «небольшая органическая молекула» для неприродной мишени, они означают органическую молекулу, содержащую по меньшей мере 2 атома углерода, но предпочтительно, не более чем 7 или 12 атомов, вращающихся вокруг углеродных связей, имеющую молекулярную массу в пределах между 100 и 2000 дальтон, предпочтительно, между 100 и 1000 дальтон и, необязательно, молекула включает один 30 или более атомов металла.

35 В том смысле, в котором в настоящем документе используется термин «пептид» для неприродной мишени, он относится к дипептиду или олигопептиду с 2-45 аминокислотами. В одном из вариантов осуществления пептид содержит 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15 или 2-10 аминокислотных остатков. Пептид может представлять собой природный или синтетический пептид, и может содержать - помимо 20 природных L-аминокислот - D-аминокислоты, не встречающиеся в природе аминокислоты и аналоги аминокислот. В одном варианте осуществления пептид представляет собой бета-амилоидный пептид (Абета или А β). В еще одном варианте осуществления бета-амилоидный пептид представляет А β 40 пептид или А β 42 пептид.

40 В одном из вариантов осуществления небольшая органическая молекула представляет соединение, проявляющее свойства иммунологического гаптена.

В одном из вариантов осуществления неприродная мишень представляет белок фибронектин или его домен, такой как ЕВ-домен или фрагмент ЕВ-домена.

45 Мутеин липокалина 2 человека по изобретению может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) помимо положений мутированной аминокислотной последовательности. С другой стороны, мутеины липокалина, раскрытые в настоящем документе, также могут содержать аминокислотные мутации помимо положений последовательности, подвергнутых мутагенезу, при условии, что

данные мутации не оказывают отрицательного влияния на связывающую активность и укладку мутеина. Такие мутации можно легко провести на уровне ДНК с использованием общепринятых стандартных методов (Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Возможные изменения аминокислотной последовательности представляют собой инсерции или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т.е. аминокислотный остаток замещается аналогичным в химическом отношении аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замены среди членов следующих групп: 1) аланин, 5 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, 10 тирозин и триптофан. С другой стороны, возможно ввести неконсервативные изменения в аминокислотную последовательность. Кроме того, также вместо замены единичных аминокислотных остатков, также возможно вставить или делецировать одну или более 15 следующих друг за другом аминокислот первичной структуры липокалина 2 человека, при условии, что данные делеции и инсерции проводят к получению стабильно уложенного/функционального мутеина.

Как уже отмечалось, такие модификации аминокислотной последовательности включают направленный мутагенез единичных аминокислотных положений для 20 упрощения субклонирования мутированного гена липокалина или его фрагментов включением сайтов расщепления для некоторых рестриктаз. Кроме того, данные мутации также можно включить для дополнительного повышения аффинности мутеина липокалина для определенной мишени. Кроме того, можно ввести мутации для 25 модуляции некоторых свойств мутеина, например, для повышения стабильности укладки, стабильности в сыворотке, резистентности белка или растворимости в воде, или снижения тенденции к агрегации, если это необходимо. Например, природные остатки цистеина можно мутировать в другие аминокислоты для предупреждения образования дисульфидных мостиков. Однако также возможно преднамеренно мутировать другое 30 положение аминокислотной последовательности в цистеин для введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (HES), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей. Примерные возможности такой мутации для введения остатков цистеина в 35 аминокислотную последовательность мутеина липокалина 2 человека включают введение 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 hNGAL дикого типа. Полученные тиоловые группы на стороне любого из аминокислотных положений 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 и/или 158 можно использовать для ПЭГилирования или НЕСилирования мутеина, 40 например, для повышения периода полураспада соответствующего мутеина липокалина 2 человека.

В одном из вариантов осуществления мутеин по настоящему изобретению содержит 45 мутированные аминокислотные остатки по меньшей мере в любых 2 или всех 3 положениях в последовательности, соответствующих положениям последовательности 96, 100 и 106 линейной полипептидной последовательности липокалина 2 человека.

В дополнительном варианте осуществления мутеин содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 и 17 мутированных аминокислотных остатков в любом из положений последовательности, соответствующих положениям

последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности hNGAL. В дополнительном варианте осуществления мутеин содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 мутированных аминокислотных остатков в любом из положений последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности hNGAL. В еще одном варианте осуществления мутеин содержит 18, 19 или 20 мутированных аминокислотных остатков 10 в любом из положений последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности липокалина 2 человека.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения мутеин содержит

15 мутированные аминокислотные остатки по меньшей мере в любых 10, 14, 15, 20, 22, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35 или всех 45 вышеперечисленных положений последовательности.

Мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать по сравнению с аминокислотной 20 последовательностью зрелого липокалина 2 человека дикого типа, показанного на фигуре 17 (Lcn2), по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 8, 7, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, которые включают, не ограничиваясь этим, Leu36→Val или Cys; Ala40→Tyr или Lys, или Val; Ile41→Thr или Ser, или Leu; Gln49→Leu или Trp; Leu70→Gly; Arg72→Gly или Asp; Lys73→Leu или Trp, или Asp; Asp77→Asn или His, или Leu; Trp79→Lys; Asn96→Ile 25 или Arg; Tyr100→Gln или Arg, или Glu; Leu103→Met или Arg, или Gly; Tyr106→Tyr или Ala, или Trp; Lys125→Thr или Val, или Glu; Ser127→Gly или Gln, или Ala; Tyr132→Met или Ser, или Thr и Lys134→Asn. Было установлено, что такие мутеины могут ингибировать агрегацию А β в условиях *in vitro* и *in vivo*. Предпочтительно, что такой мутеин, описанный в настоящем документе, связывался с и ингибировал агрегацию А β , 30 предпочтительно, А β 40, более предпочтительно, в условиях теста, описанного в примере 11 (предпочтительно, включая соотношение мутеин:А β 40, равное 1:10). Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным выше, обладающим сравнимой биологической функцией по сравнению с мутеином US7. Выражение «сравнимая 35 биологическая функция» означает, что такие мутеины способны связываться с и ингибировать агрегацию А β , предпочтительно, А β 40, с отклонением в ингибирующей агрегацию активности по сравнению с US7 не более чем на 40, 30, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2 или 1%, например, в условиях, которые тождественны или идентичны описанным в примере 11 (предпочтительно включая соотношение мутеин:А β 40, равное 1:10). Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным в настоящем документе, для 40 применения для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

В одном из вариантов осуществления мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать следующие аминокислотные замены Leu36→Val; Ala40→Tyr; Ile41→Thr; Gln49→Leu; 45 Leu70→Gly; Lys73→Leu; Asp77→Asn; Trp79→Lys; Asn96→Ile; Tyr100→Gln; Leu103→Met; Lys125→Thr; Ser127→Gly; Tyr132→Met и Lys134→Asn. Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является S1-A4, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO: 39).

В дополнительном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать следующие аминокислотные замены Leu36→Val; Ala40→Lys; Ile41→Ser; Gln49→Trp; Leu70→Gly; Arg72→Gly; Lys73→Thr; Asp77→His; Trp79→Lys; Asn96→Arg; 5 Tyr100→Arg; Leu103→Arg; Tyr106→Ala; Lys125→Val; Ser127→Gln; Tyr132→Ser и Lys134→Asn. Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является US-7, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO:41).

Изобретение также относится к мутированному зрелому липокалину hNGAL (депозированному под инвентарным номером P80188 в SWISS-PROT Data Bank, 10 предпочтительно, имеющему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:40), содержащему одну или более мутированных аминокислот, описанных в настоящем документе, в положении, соответствующем положению 36, 40, 41, 49, 70, 72, 73, 77, 79, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 линейной полипептидной последовательности hNGAL дикого типа.

15 В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать следующие аминокислотные замены Leu36→Cys; Ala40→Val; Ile41→Leu; Gln49→Leu; Leu70→Gly; Arg72→Asp; Lys73→Asp; Asp77→Leu; Trp79→Lys; Asn96→Arg; Tyr100→Glu; Leu103→Gly; Tyr106→Trp; Lys125→Glu; Ser127→Ala; Tyr132→Thr и Lys134→Asn.

20 Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является H1-G1, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO:43).

В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать следующие аминокислотные замены Leu36→Ala; Ala40→Val; Ile41→Leu; Gln49→Leu; 25 Leu70→Gly; Arg72→Asp; Lys73→Asp; Asp77→Leu; Trp79→Lys; Asn96→Arg; Tyr100→Glu; Leu103→Gly; Tyr106→Trp; Lys125→Glu; Ser127→Ala; Tyr132→Thr и Lys134→Asn.

Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является H1GA показанный в SEQ ID NO:50.

Предпочтительно, чтобы мутеин, описанный в настоящем документе, связывался с 30 и ингибирировал агрегацию А β , предпочтительно, А β 40, более предпочтительно, в условиях теста, описанного в примере 23 (предпочтительно, в соотношении А β 40:H1GA, равным 10:2). Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным выше, обладающим сравнимой биологической функцией при сравнении с мутеином H1GA.

Выражение «сравнимая биологическая функция» означает, что такие мутеины способны 35 связываться с и ингибирировать агрегацию А β , предпочтительно, А β 40, с отклонением в ингибирующей агрегацию активности по сравнению с H1GA не более чем на 40, 30, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2 или 1%, например, в условиях, которые тождественны или идентичны описанным в примере 23 (предпочтительно, в соотношении А β 40:H1GA, равным 10:2). Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным в настоящем

40 документе, для применения для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с бета-амилоидным пептидом, таким как А β 40 пептид и А β 42 пептид, может содержать следующие аминокислотные замены Leu36→Val; Ala40→Val; Ile41→Leu; Gln49→Leu; 45 Leu70→Gly; Arg72→Asp; Lys73→Asp; Asp77→Leu; Trp79→Lys; Asn96→Arg; Tyr100→Glu; Leu103→Gly; Tyr106→Trp; Lys125→Glu; Ser127→Ala; Tyr132→Thr и Lys134→Asn.

Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является H1GV, показанный в SEQ ID NO:52.

Предпочтительно, что мутеин, описанный в настоящем документе, связывается с А β 40 в условиях теста, описанных в примере 21. Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным выше, обладающим сравнимой биологической функцией по сравнению с мутеином H1GV. Выражение «сравнимая биологическая функция» означает,

5 что такие мутеины способны связываться с А β , предпочтительно, с А β 40, с отклонением в ингибирующей агрегацию активности по сравнению с H1GV не более чем 40, 30, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2 или 1%, например, в условиях, которые тождественны или идентичны описанным в примере 21. Настоящее изобретение также относится к мутеинам, описанным в настоящем документе, для применения для лечения или профилактики 10 нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с экстрадоменом В или его фрагментом, содержит следующие аминокислотные замены Leu36→Lys; Ala40→His; Ile41→Asp; Gln49→Arg; Tyr52→Gln; Ser68→Asn; Leu70→Arg; Arg72→Val; Lys73→His; Asp77→Asn; Trp79→Arg; Arg81→Trp; Tyr100→Trp; Tyr106→Trp; 15 Lys125→Arg; Ser127→Tyr; Tyr132→Leu; Lys134→Glu и Ser146→Asn. Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является N7A, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO:20).

В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с экстрадоменом В или его фрагментом, содержит следующие аминокислотные замены 20 Leu36→Arg; Ala40→Met; Ile41→Arg; Gln49→Ala; Tyr52→Val; Ser68→Lys; Leu70→Met; Arg72→Gln; Lys73→Arg; Asp77→Lys; Trp79→Met; Arg81→Asn; Asn96→Ala; Tyr100→Pro; Leu103→Pro, Tyr106→Thr; Lys125→His; Ser127→Phe и Lys134→His. Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является N9B, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO:24).

25 В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с экстрадоменом В или его фрагментом, содержит следующие аминокислотные замены Leu36→Ala; Ala40→Thr; Ile41→Trp; Gln49→Tyr; Tyr52→Gln; Ser68→Asn; Arg72→Met; Lys73→Ser; Asp77→Arg; Trp79→Met; Arg81→His; Asn96→Ser; Tyr100→Trp; Tyr106→Trp; Lys125→Arg; Ser127→Tyr; Tyr132→Phe и Lys134→Gly. Примером мутеина, содержащего 30 такие аминокислотные замены, является N10D, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO: 26).

В еще одном варианте осуществления мутеин по изобретению, который связывается с экстрадоменом В или его фрагментом, содержит следующие аминокислотные замены Leu36→Glu; Ala40→Ser; Ile41→Leu; Gln49→Arg; Leu70→Arg; Lys73→Ser; Asp77→His; 35 Trp79→Leu; Asn96→Leu; Tyr100→Lys; Leu103→His; Tyr106→Phe; Lys125→Thr; Ser127→Ala и Lys134→Phe. Примером мутеина, содержащего такие аминокислотные замены, является N7E, показанный на фигуре 17 (SEQ ID NO:22).

Вышеприведенные мутеины, описанные при обращении к фигуре 17, могут содержать дополнительные аминокислотные замены. Мутеины могут дополнительно содержать 40 аминокислотные замены, которые могут включать, не ограничиваясь этим, Gln28→His или Cys87→Ser. Другие возможные аминокислотные замены включают, не ограничиваясь этим, Tyr52→Gln или Val; Ser68→Lys или Asn или Arg81→Trp или Asn, или His.

Мутеины липокалина по изобретению способны связываться с желаемой неприродной 45 мишенью с обнаруживаемой аффинностью, т.е. константой диссоциации (K_D), составляющей по меньшей мере 200 нМ. В еще одном варианте осуществления мутеин связывается с определенной неприродной мишенью с K_D по меньшей мере 1 мкМ или ниже, или 100 мкМ или ниже, или 1 мкМ или ниже, или 500 нМ, или 200 нМ или ниже, или 100 нМ или ниже, или 50 нМ или ниже, или 10 нМ или ниже, или 1 нМ или ниже. В

еще одном варианте осуществления мутеины липокалина связываются с желаемой мишенью с константой диссоциации для определенной мишени, равной по меньшей мере 100, 20, 1 нМ или даже ниже. Аффинность связывания мутеина с желаемой мишенью можно определить с использованием большого числа методов, таких как титрование с использованием флуоресцентных индикаторов, конкурентный ELISA или поверхностный плазмонный резонанс (Biacore).

Специалистам в данной области, очевидно, понятно, что образование комплекса с мишенью зависит от многих факторов, таких как концентрация партнеров по связыванию, присутствие конкурентов, ионная сила буферной системы и т.д. Отбор и обогащение обычно проводят в условиях, обеспечивающих выделение мутеинов липокалина, обладающих в комплексе с желаемой мишенью, константой диссоциации на уровне, указанном выше. Однако можно провести стадии промывания и элюирования в условиях различной жесткости. Также возможен отбор на основе кинетических характеристик. Например, отбор можно провести в условиях, способствующих образованию комплекса мишени с мутеинами, который показывает медленную диссоциацию от мишени, или другими словами, с низким значением k_{off} . Альтернативно отбор можно осуществить в условиях, способствующих быстрому образованию комплекса между мутеином и мишенью, или другими словами, высоким значением k_{on} .

Мутеин по изобретению, как правило, находится в виде мономерного белка. Однако также возможно, чтобы мутеин липокалина по изобретению был способен к спонтанной димеризации или олигомеризации. Несмотря на то, что применение мутеинов липокалина, которые образуют стабильные мономеры, может быть предпочтительным для некоторых применений, например, за счет более быстрой диффузии и лучшего проникновения в ткани, в других случаях может быть преимущественным применение мутеинов липокалина, которые образуют стабильные гомодимеры или мультимеры, поскольку такие мультимеры могут обеспечить (дополнительное) повышенную аффинность и/или авидность для определенной мишени. Кроме того, олигомерные формы мутеина липокалина могут иметь замедленные скорости диссоциации или более длительный период полураспада.

Также следует отметить, что на образование комплекса между соответствующим мутеином и его лигандом оказывает влияние много различных факторов, таких как концентрации соответствующих партнеров по связыванию, присутствие конкурентов, pH и ионная сила используемой буферной системы, и экспериментальный метод, используемый для определения константы диссоциации K_D (например, титрование с использованием флуоресцентных индикаторов, конкурентный ELISA или поверхностный плазмонный резонанс, и это только, назвав некоторые из них) или даже математический алгоритм, который используют для обработки экспериментальных данных.

Следовательно, специалистам в данной области также понятно, что значения K_D (константы диссоциации комплекса, образованного между соответствующим мутеином и его мишенью/лигандом) могут варьировать в определенных экспериментальных пределах в зависимости от метода и экспериментальной системы, которые используются для определения аффинности конкретного мутеина липокалина для определенного лиганда. Это означает, что может быть незначительное отклонение в установленных значениях K_D или пределах толерантности, в зависимости, например, от того определяли значение K_D с использованием поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) или конкурентного ELISA.

В одном из вариантов осуществления мутеины, раскрытые в настоящем документе,

можно связать через N- или C-конец с аффинной меткой, такой как пентагистидиновая метка, гексагистидиновая метка или Strep-метка[®]. Таким образом, настоящая заявка также включает все подробно и в общих чертах описанные мутеины, содержащие такие метки.

5 В том смысле, в котором в настоящем изобретении используется термин «фрагмент» по отношению к мутеину липокалина, он относится к белкам или пептидам, полученным из полноразмерного зрелого Lcn2, которые укорочены по N- и/или C-концу, т.е. с отсутствием по меньшей мере одной из N- и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты содержат, предпочтительно, по меньшей мере 10, более предпочтительно, 10, 20, наиболее предпочтительно, 30 или более следующих друг за другом аминокислот первичной последовательности зрелого Lcn2, и которые обычно детектируются в иммуноанализе зрелого Lcn2.

Также в объем настоящего изобретения включаются вышеуказанные мутеины, которые изменены в отношении их иммуногенности.

15 Цитотоксические Т-клетки распознают пептидные антигены на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС). Способность пептидов связываться с молекулами МНС является аллель-специфической и коррелирует с их иммуногенностью. Для снижения иммуногенности определенного белка возможность прогнозировать то, какие 20 пептиды в белке обладают потенциальной активностью связываться с определенной молекулой МНС, имеет большое значение. Ранее были описаны подходы, которые использовались для расчетного подхода для идентификации потенциальных эпитопов Т-клеток, для прогноза связывания определенной пептидной последовательности с молекулами МНС класса I (Altuvia et al. (1995) J. Mol. Biol. 249:244-250).

25 Такой подход также можно использовать для идентификации потенциальных эпитопов для Т-клеток в мутеинах по изобретению и сделать выбор в зависимости от предполагаемого применения конкретного мутеина на основе его предполагаемой иммуногенности. Также возможно подвергнуть области пептидов, которые были 30 прогнозированы, как содержащие эпитопы для Т-клеток, дополнительному мутагенезу для снижения или элиминации таких эпитопов для Т-клеток и, таким образом, свести до минимума иммуногенность. Описано удаление амфипатических эпитопов из генно-инженерных антител (Mateo et al. (2000) Hybridoma, 19(6):463-471), и данный протокол можно адаптировать к мутеинам по настоящему изобретению.

Полученные таким образом мутеины могут обладать минимальной иммуногенностью, 35 которая желательна для их использования в терапевтических и диагностических применениях, таких, как описаны ниже.

Для некоторых применений также пригодно использовать мутеины по изобретению в конъюгированной форме. Следовательно, изобретение также относится к мутеинам липокалина, которые конъюгированы с соединением, которое может включать, не 40 ограничиваясь этим, органические молекулы, ферментную метку, метку в окрашенной форме, цитостатический агент, токсин, метку, которую можно фотоактивировать и которая подходит для применения в фотодинамической терапии, флуоресцентную метку, радиоактивную метку, хромогенную метку, люминесцентную метку, комплексы металлов, металл, такой как коллоидное золото, гаптены, дигоксигенин, биотин или 45 химиотерапевтический металл, которые можно упомянуть в качестве только некоторых, приходящих на память, примеров. Мутеин также можно конъюгировать с молекулой органического лекарственного препарата. Конъюгацию можно провести с использованием обычных способов сочетания, известных в данной области.

В общем, возможно ввести метку в мутеин Lcn2, описанный в настоящем документе, с использованием подходящего химического соединения или фермента, который непосредственно или опосредованно образует детектируемое соединение или сигнал в химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Примером 5 физической реакции и одновременно оптической реакции/маркера является эмиссия флуоресценции при облучении. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена или β -галактозидаза являются примерами ферментных меток (и одновременно оптических меток), которые катализируют образование хромогенных продуктов реакции. В общем, для конъюгации с мутеинами по настоящему изобретению можно использовать все 10 метки, которые обычно применяются для антител (за исключением меток, которые используются исключительно с сахарной группой Fc-фрагмента иммуноглобулинов). Мутеины по изобретению также можно конъюгировать с любым подходящим 15 терапевтически активным агентом, например, для направленной доставки таких агентов к конкретной клетке, ткани или органу или для избирательного воздействия на клетки, 20 например, на опухолевые клетки, не оказывая отрицательного влияния на окружающие нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных агентов включают радионуклиды, токсины, небольшие органические молекулы и лекарственные пептиды (такие как пептиды, функционирующие в качестве агонистов/антагонистов рецепторов 25 клеточной поверхности или пептиды, конкурирующие за сайт связывания белка в данной клеточной мишени). Примеры подходящих токсинов включают, не ограничиваясь этим, коклюшный токсин, дифтерийный токсин, рицин, сапорин, эндотоксин *Pseudomonas*, калихеамицин или его производное, таксоид, майтанзиноид, тубулизин или аналог доластина. Аналог доластина может быть ауристатином Е, монометилауристином Е, ауристатином РҮЕ и ауристатином РНЕ. Примеры 30 цитотоксического агента включают, не ограничиваясь этим, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, 5-фторурацил, таксотер (доцетаксел), паклитаксел, антрациклин (доксорубицин), метотрексат, винblastин, винクリстин, виндезин, винорелбин, дакарбазин, циклофосфамид, этопозид, адриамицин, кампотецин, соединения, близкие 35 комбretатастину А-4, сульфонамиды, оксадиазолины, бензо[б]тиофеновые синтетические спирокетальные пираны, производные монотетрагидрофурана, курацин и производные курацина, производные метоксиэстрадиола и лейковорин. Мутеины липокалина по изобретению также можно конъюгировать с терапевтически активными нуклеиновыми 40 кислотами, такими как антисмыловые молекулы нуклеиновой кислоты, малые интерферирующие РНК, микроРНК или рибозимы. Такие конъюгаты можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области.

В одном из вариантов осуществления мутеины по изобретению также можно сочетать с направляющей группой, которая направляет его в определенную область организма, для доставки мутеинов по изобретению в желаемую область или зону организма. Одним примером, в котором может быть желательна такая модификация, является прохождение 45 через гематоэнцефалический барьер. Для прохождения гематоэнцефалического барьера мутеины по изобретению можно сочетать с группами, которые облегчают активный транспорт через данный барьер (см. Gaillard P.J. et al. (2005) International Congress Series, 1277, 185-198 или Gaillard P.J. et al. (2005) Expert Opin. Drug Deliv., 2(2), 299-309). Такие соединения, доступны, например, под торговым названием 2B-TransTM (to-BBB technologies BV, Leiden, NL). Другие молекулы, приведенные в качестве примера направляющих молекул, с которыми можно сочетать мутеины по настоящему изобретению, включают антитела, фрагменты антител или мутеины липокалина с аффинностью к желаемой молекуле-мишени. Молекулой-мишенью для направляющих

групп может быть, например, антиген клеточной поверхности. Антиген клеточной поверхности может быть специфическим для типа клеток или тканей, например, раковых клеток. Показательными примерами таких клеточных поверхностных белков являются HER-2 или протеогликаны, такие как NEU-2.

- 5 Как уже указывалось выше, в некоторых вариантах осуществления мутеин по изобретению может быть конъюгирован с соединением, которое удлиняет период полураспада мутеина (по этому вопросу см. также РСТ публикацию международной заявки WO 2006/56464, в которой описаны такие стратегии конъюгации применительно к мутеинам липокалина человека, связанного с желатиназой нейтрофилов, со 10 связывающей аффинностью для CTLA-4). Соединение, которое удлиняет период полураспада, может представлять молекулу полиалкиленгликоля, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его активированное производное; гидроксиэтилкрахмал, молекулы жирных кислот, таких как пальмитиновая кислота (Vajo&Duckworth (2000) Pharmacol. Rev., 52:1-9), Fc-фрагмент иммуноглобулина, СН3-домен иммуноглобулина, 15 СН4-домен иммуноглобулина, альбумин или его фрагмент, альбумин-связывающий пептид или альбумин-связывающий белок, трансферрин, назвав только некоторые из них. Альбумин-связывающий белок, может представлять собой бактериальный альбумин-связывающий белок, антитело, фрагмент антитела, включая домены антител (см., например, патент США 6696245) или мутеин липокалина со связывающей 20 активностью в отношении альбумина. Следовательно, соединения, подходящие для конъюгации, в целях удлинения периода полураспада мутеина липокалина по изобретению, включают альбумин (Osborn et al. (2002) J. Pharmacol. Exp. Ther., 303:540-548) или альбумин-связывающий белок, например, бактериальный альбумин-связывающий белок, такой как стрептококковый белок G (Konig T. and Skerra A. (1998) 25 J. Immunol. Methods, 218:73-83). Другими примерами альбумин-связывающих пептидов, которые можно использовать в качестве партнера по конъюгации, являются, например, пептиды с консенсусной последовательностью Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, в которой Xaa₁ представляет Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa₂ представляет Asn, Gln, His, Ile, Leu 30 или Lys; Xaa₃ представляет Ala, Asp, Phe, Trp или Тyr; и Xaa₄ представляет Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в заявке на патент США 2003/0069395 или Dennis et al. (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem., 277:35035-35043).

В других вариантах осуществления сам альбумин или биологически активный фрагмент альбумина можно использовать в качестве соединения для мутеина. 35 липокалина согласно изобретению, которое удлиняет период полураспада мутеина. Термин «альбумин» включает все альбумины млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека или бычий сывороточный альбумин, или альбумин крысы. Альбумин или его фрагмент можно получить рекомбинантным способом, как описано в патенте США № 5728553 или заявках на Европейский патент 0330451 и 0361991. Рекомбинантный 40 альбумин человека (Recombumin[®] для применения в качестве белкового стабилизатора, например, доступен от Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Великобритания)).

Если альбумин-связывающий белок представляет фрагмент антитела, то он может 45 представлять доменное антитело. Доменные антитела (dAb) конструируют для точного контроля биофизических свойств и в условиях *in vivo* периода полураспада для обеспечения оптимального профиля препарата по безопасности и эффективности. Доменные антитела являются промышленно доступными, например, от Domantis Ltd. (Cambridge, Великобритания и МА, США).

При использовании трансферрина в качестве группы для увеличения периода

полураспада мутеинов по изобретению можно получить мутеины, генетически слитые по N- или C-концу, или обоими концами, с негликозилированным трансферрином. Негликозилированный трансферрин имеет период полураспада, составляющий 14-17 суток, и слитый белок с трансферрином будет аналогично иметь увеличенный период полураспада. Носитель-трансферрин также обеспечивает высокую биодоступность, биологическое распределение и стабильность в системе кровообращения. Данная технология является промышленно доступной от BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, США). Рекомбинантный трансферрин человека BioRexis (DeltaFerrinTM) для использования в качестве стабилизатора белка также является промышленно доступным от Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Великобритания).

Если Fc-фрагмент иммуноглобулина используют для пролонгирования периода полураспада мутеинов по изобретению в сыворотке, то можно использовать технологию SynFusionTM, промышленно доступную от Syntonix Pharmaceuticals, Inc. (MA, США). Применение данной технологии Fc-слияния позволяет получить более длительно действующие биологические фармацевтические продукты, и они могут состоять, например, из двух копий мутеина, связанного с Fc-фрагментом антитела для улучшения фармакокинетики, повышения растворимости и эффективности получения.

Еще одной альтернативой для пролонгации периода полураспада мутеина по изобретению является сливание мутеина по N- или C-концу по изобретению с длинными неструктурированными, гибкими богатыми глицином последовательностями (например, полиглицином примерно с 20-80 последовательными остатками глицина). Данный подход раскрыт в международной заявке WO 2007/038619, например, имеющей название «rPEG» (рекомбинантный ПЭГ).

В том случае, если используют полиалкиленгликоль в качестве соединения, которое увеличивает период полураспада мутеина, то полиалкиленгликоль может быть замещенным или незамещенным. Он также может представлять активированное производное полиалкилена. Примерами подходящих соединений являются молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), описанные в международной заявке WO 99/64016, в патентах США № 6177074 или 6403564 в отношении интерферона, или как описано для других белков, таких как ПЭГ-модифицированная аспарагиназа, ПЭГ-аденозиндезаминаза (ПЭГ-ADA) или ПЭГ-супероксиддисмутаза (см., например, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release, 11:139-148). Молекулярная масса такого полимера, предпочтительно, полиэтиленгликоля, может находиться в пределах от 300 до примерно 70000 Д, включая, например, полиэтиленгликоль с молекулярной массой примерно 10000, примерно 20000, примерно 30000 или примерно 40000 Д. Кроме того, как, например, описано в патентах США № 6500930 или 6620413, углеводные олигомеры и полимеры, такие как крахмал или гидроксиэтилкрахмал (HES), можно конъюгировать с мутеином по изобретению в целях удлинения периода полураспада в сыворотке.

В еще одном варианте осуществления для обеспечения подходящих аминокислотных боковых цепей для конъюгации одного из вышеуказанных соединений с мутеинами по изобретению можно ввести мутагенезом искусственные аминокислоты. В общем, такие искусственные аминокислоты предназначаются для повышения реакционноспособности мутеина и, таким образом, они способствуют его конъюгации с желаемой группой. Одним примером такой искусственной аминокислоты, которую можно ввести через искусственную tРНК, является пара-ацетилфенилаланин.

Для некоторых применений мутеинов, раскрытых в настоящем документе, может быть преимущественным использовать их в форме слитых белков. В некоторых

вариантах осуществления мутеин по изобретению сливают по его N- или C-концу с белком, доменом белка или пептидом, таким как сигнальная последовательность и/или аффинная метка.

Для фармацевтических применений мутеин по изобретению может быть слит с

5 партнером по слиянию, который удлиняет период полураспада мутеина в сыворотке (вновь см. РСТ публикацию международной заявки WO 2006/56464, в которой описан подходящий партнер по слиянию применительно к мутеинам липокалина человека, связанного с желатиназой нейтрофилов, со связывающей аффинностью для CTLA-4). Аналогично конъюгированным соединениям, описанным выше, партнер по слиянию 10 может представлять Fc-фрагмент иммуноглобулина, СН3-домен иммуноглобулина, СН4-домен иммуноглобулина, альбумин, альбумин-связывающий пептид или альбумин-связывающий белок, назвав только некоторые из них. Вновь, альбумин-связывающий белок может представлять бактериальный альбумин-связывающий белок или мутеин липокалина со связывающей активностью в отношении альбумина. Следовательно, 15 партнеры, подходящие для слияния, в целях удлинения периода полураспада мутеина липокалина по изобретению, включают альбумин (Osborn et al. (2002) см. выше, J. Pharmacol. Exp. Ther., 303:540-548) или альбумин-связывающий белок, например, бактериальный альбумин-связывающий домен, такой как домен стрептококкового белка G (Konig T. and Skerra A. (1998) J. Immunol. Methods, 218:73-83). Альбумин- 20 связывающие пептиды, описанные Dennis et al., (2002) см. выше или в заявке на патент США 2003/0069395, имеющие консенсусную последовательность Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, в которой Xaa₁ представляет Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa₂ представляет Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa₃ представляет Ala, Asp, Phe, Trp или Туг; 25 и Xaa₄ представляет Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, также можно использовать в качестве партнера по слиянию. Также можно использовать сам альбумин или биологически активный фрагмент альбумина в качестве партнера по слиянию с мутеином липокалина по изобретению. Термин «альбумин» включает все альбумины млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека или бычий сывороточный альбумин, или 30 альбумин крысы. В данной области хорошо известно рекомбинантное получение альбумина и его фрагментов и, например, описанное в патенте США № 5728553 или заявках на Европейский патент 0330451 и 0361991.

Партнер по слиянию может придавать новые свойства мутеину липокалина по изобретению, такие как ферментативная активность или аффинность связывания для других молекул. Примерами подходящих белков для слитых конструкций являются 35 щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион-S-трансфераза, альбумин-связывающий домен белка G, белок A, фрагменты антитела, домены олигомеризации, мутеины липокалина с такой же или другой специфичностью связывания (что приводит 40 к образованию «дюокалинов», см. Schlehuber S. and Skerra A. (2001) Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold, Biol. Chem., 382: 1335-1342), или токсины.

В частности, может быть возможным слить мутеин липокалина по изобретению с активным сайтом отдельного фермента, таким образом, что оба «компоненты» 45 полученного слитого белка будут одновременно функционировать на определенной терапевтической мишени. Связывающий домен мутеина липокалина присоединяется к вызывающей заболевание мишени, позволяя домену фермента элиминировать биологическую функцию мишени.

Аффинные метки, такие как Strep-метка® или Strep-метка® II (Schmidt T.G.M. et al.

(1996) *J. Mol. Biol.*, 255:753-766), мус-метка, FLAG-метка, His₆-метка или НА-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, также обеспечивающие простое детектирование и/или выделение рекомбинантных белков, являются еще одними примерами предпочтительных партнеров по слиянию. Наконец, в качестве подходящих 5 партнеров слияния для мутеина липокалина являются белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или желтый флуоресцентный белок (YFP).

В том смысле, в котором в настоящем документе используется термин «слитый 10 белок», он также включает мутеины липокалина по изобретению, содержащие сигнальную последовательность. Сигнальные последовательности на N-конце полипептида направляют данный полипептид в специфический клеточный компартмент, например, периплазму *E. coli* или эндоплазматический ретикулум эукариотических 15 клеток. В данной области известно большое количество сигнальных последовательностей. Предпочтительной сигнальной последовательностью для секреции полипептида в периплазму *E. coli* является сигнальная последовательность OmpA.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины, описанные в настоящем документе. Поскольку вырожденность генетического кода позволяет заменять некоторые кодоны на другие кодоны, определяющие одну и ту же 20 аминокислоту, то изобретение не ограничивается конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин по изобретению, а включает все молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин.

Следовательно, настоящее изобретение также включает последовательность 25 нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин по изобретению, содержащую мутацию по меньшей мере в одном кодоне любого из аминокислотных положений 96, 100 и 106 линейной полипептидной последовательности Lcn2.

Изобретение, раскрытое в настоящем документе, также включает молекулы 30 нуклеиновой кислоты, кодирующие мутеины Lcn2, которые содержат дополнительные мутации помимо указанных положений в последовательности, предназначенных для экспериментального мутагенеза. Часто такие мутации являются толерабельными или даже могут быть преимущественными, например, если они способствуют повышенной эффективности укладки, стабильности в сыворотке, термической стабильности или аффинности связывания с лигандом мутеина.

Молекула нуклеиновой кислоты, описанная в данной заявке, может быть 35 «функционально связана» с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями) для экспрессии данной молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекула нуклеиновой кислоты, такая как ДНК, относится к «молекуле нуклеиновой 40 кислоты, способной экспрессироваться» или «обеспечивающей экспрессию нуклеотидной последовательности», если она содержит элементы последовательности, содержащие информацию относительно транскрипционной и/или трансляционной регуляции, и такие последовательности «функционально связаны» с нуклеотидной последовательностью, 45 кодирующей полипептид. Функциональной связью является связь, при которой регуляторные элементы последовательности и последовательность, предназначенная для экспрессии, связаны таким образом, что вместе они способствуют экспрессии гена. Точная природа регуляторных областей, необходимых для экспрессии гена, может варьировать среди видов, но, в общем, такие области содержат промотор, который у прокариот, включает промотор *per se*, т.е. элементы ДНК, направленные на инициацию

транскрипции, а также элементы ДНК, которые при транскрипции в РНК, будут «сигналить» об инициации трансляции. Такие промоторные области обычно включают 5'-некодирующие последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, такие как -35/-10 boxes и последовательность Шайн-Дальгарно у прокариот

или последовательности ТАТА box, СААТ и 5'-кэппированные элементы у эукариот. Так же такие области могут включать энхансер или репрессор, а также транслированную сигнальную и лидерные последовательности для направления нативных полипептидов в определенный компартмент клетки-хозяина.

Кроме того, 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, принимающие участие в терминации транскрипции, полиаденилировании или тому подобное. Однако, если такие последовательности терминации не являются удовлетворительными в функциональном отношении в конкретной клетке-хозяине, то их можно заменить сигналами, функциональными для этой клетки.

Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению может содержать регуляторную последовательность, предпочтительно, промоторную последовательность. В еще одном предпочтительном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор tet, промотор lacUV5 или промотор T7. Примерами промоторов, подходящих для экспрессии в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор CMV.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению также могут быть фрагментом вектора или любого другого вида клонирующего носителя, такого как плазмида, фагемид, фаг, бакуловирус, космида или искусственная хромосома.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты находится в фазмиде. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область подходящего фага, такого как M13 или f1, или его функциональный фрагмент, слитый с интересующей кДНК. После суперинфицирования бактериальных клеток-хозяев таким фагемидным вектором и соответствующим фагом-хелпером (например, M13K07, VCS-M13 или R408)ируются интактные фаговые частицы, тем самым способствуя физическому сочетанию кодированных гетерологичных кДНК с ее соответствующим полипептидом, экспонированным на поверхности фага (см. обзор, например, Kay B.K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual*, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26:401-424 или Rodi D.J. and Makowski L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10:87-93).

Такие клонирующие векторы включают, помимо регуляторных последовательностей, описанных выше, и нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин липокалина по изобретению, последовательности репликации и контрольные последовательности, происходящие от видов, совместимых с клеткой-хозяином, которую используют для экспрессии, а также селектируемые маркеры, придающие селектируемый фенотип трансформированным и трансфектированным клеткам. В данной области известно большое количество подходящих клонирующих векторов, и они являются промышленно доступными.

ДНК-молекулу, кодирующую мутеины липокалина по изобретению, и, в частности, клонирующий вектор, содержащий кодирующую последовательность такого мутеина липокалина, можно трансформировать в клетку-хозяин, способную к экспрессии гена. Трансформацию можно проводить с использованием стандартных методов (Sambrook J. et al. (1989) см. выше).

Таким образом, изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем документе.

Трансформированные клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок по

изобретению. Подходящими клетками-хозяевами могут быть прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотические клетки, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, клетки насекомых SF9 или High5, иммортализованные клеточные линии млекопитающих (например, клетки HeLa или CHO) или первичные клетки млекопитающих.

Изобретение также относится к способу получения мутеина по изобретению, в котором мутеин, фрагмент мутеина или слитый белок мутеина и другого полипептида получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин с помощью генно-инженерных методов. Способ можно осуществить в условиях *in vivo*, например, мутеин можно получить в бактериальном или эукариотической микроорганизме-хозяине и 15 затем выделить из этого микроорганизма-хозяина или его культуры. Также возможно получить белок в условиях *in vitro*, например, при использовании трансляционной системы в условиях *in vitro*.

При получении мутеина в условиях *in vivo* нуклеиновую кислоту, кодирующую мутеин по изобретению, вводят в подходящий бактериальный или эукариотический 20 микроорганизм-хозяин с использованием технологии рекомбинантной ДНК (уже упомянутой выше). Для данной цели клетку-хозяин вначале трансформируют клонирующим вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин по изобретению, с использованием принятых стандартных методов (Sambrook J. et al., 1989, см. выше). Затем клетку-хозяин культивируют в условиях, обеспечивающих 25 экспрессию гетерологичной ДНК и, таким образом, синтез соответствующего полипептида. Затем полипептид выделяют из клетки или из культуральной среды.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения мутеина по изобретению, включающему:

(а) мутагенез молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей липокалин 2 человека 30 в нуклеотидном триплете, кодирующем по меньшей мере одно из любых положений в последовательности, соответствующих положениям 96, 100 и 106 линейной полипептидной последовательности Lcn2, с получением одной или более молекул нуклеиновой кислоты мутеина.

Способ может дополнительно включать:

35 (б) экспрессию одной или более молекул нуклеиновой кислоты мутеина, полученных на стадии (а) в подходящей экспрессионной системе, и
(с) обогащение одним или более мутеинами, обладающими обнаруживаемой аффинностью связывания для определенной мишени с помощью отбора и/или выделения.

В том смысле, в котором в настоящем документе используется термин «мутагенез», 40 он означает, что выбраны такие экспериментальные условия, когда природная аминокислота в данном положении последовательности Lcn2 (hNGAL; инвентарный номер P80188 в SWISS-PROT Data Bank) может быть замещена по меньшей мере одной аминокислотой, которая отсутствует в данном конкретном положении в соответствующей природной полипептидной последовательности. Термин «мутагенез» 45 также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности с помощью делеции или инсерции одной или более аминокислот. Таким образом, в объем изобретения входит вариант, когда, например, одна аминокислота в выбранном положении последовательности заменяется фрагментом из трех случайных мутаций,

что приводит к инсерции двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента белка дикого типа. Такую инсерцию или делецию можно ввести независимо друг от друга в любом из пептидных сегментов, которые можно подвергнуть мутагенезу по изобретению. В одном приводимом в качестве примера 5 варианте осуществления изобретения инсерцию нескольких мутаций можно ввести в петлю АВ выбранного скэффолда липокалина (см. международную заявку на патент WO 2005/0192256, в полном объеме включенную в данный документ для сведения). Термин «случайный мутагенез» означает, что отсутствует заранее определенная 10 единичная аминокислота (мутация) в определенном положении последовательности, но по меньшей мере две аминокислоты можно включить с определенной вероятностью в заранее определенное положение последовательности во время мутагенеза.

Кодирующую последовательность липокалина 2 человека используют в качестве стартовой точки для мутагенеза пептидных сегментов, выбранных в настоящем изобретении. Для мутагенеза указанных аминокислотных положений в распоряжении 15 специалиста в данной области имеются различные общепринятые стандартные методы для сайт-направленного мутагенеза (Sambrook J. et al., 1989, см. выше). Обычно применяемым методом является введение мутаций с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) с использованием смеси синтетических олигонуклеотидов, которые содержат композицию вырожденных оснований в желаемых положениях 20 последовательности. Например, использование кодона NNK или NNS (где N = аденин, гуанин или цитозин, или тимин; K = гуанин или тимин; S = аденин или цитозин) позволяет включить все 20 аминокислот плюс amber стоп-кодон во время мутагенеза, в то время как кодон VVS ограничивает число возможных для включения аминокислот до 12, поскольку он исключает аминокислоты Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, от включения 25 в выбранное положение полипептидной последовательности; использование кодона NMS (где M = аденин или цитозин), например, ограничивает число возможных аминокислот до 11 в выбранном положении, поскольку он исключает аминокислоты Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val от включения в выбранное положение последовательности. В данном отношении можно отметить, что кодоны для других 30 аминокислот (иных, чем обычные 20 природных аминокислот), таких как селеноцистеин или пирролизин, также можно включить в нуклеиновую кислоту мутеина. Также возможно, как описывает Wang L. et al. (2001) *Science*, 292:498-500 или Wang L. and Schultz P.G. (2002) *Chem. Comm.*, 1:1-11, использовать «искусственные» кодоны, такие как UAG, 35 которые обычно распознаются в качестве стоп-кодонов для инсерции других необычных аминокислот, например, о-метил-L-тирофина или п-аминофенилаланина.

Применение нуклеотидных кирпичиков-блоков с пониженной специфичностью пар оснований, например, инозина, 8-оксо-2'-дезоксигуанозина или 6(2-дезокси- β -D-рибофуранозил)-3,4-дигидро-8Н-пиримино-1,2-оксазин-7-он (Zaccolo et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 255:589-603) является другой возможностью для введения мутаций в выбранный 40 сегмент последовательности.

Дополнительной возможностью является так называемый триплетный мутагенез. В данном способе используются смеси различных нуклеотидных триплетов, где каждый кодирует одну аминокислоту, для включения в кодирующую последовательность (Virnekas B., Ge L., Pluchthun A., Schneider K.C., Wellhofer G., Moroney S.E., 1994, 45 *Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis, Nucleic Acids Res.*, 22:5600-5607).

Одна возможная стратегия для введения мутаций в выбранные области соответствующих полипептидов основана на использовании четырех олигонуклеотидов,

каждый из которых частично происходит из одного из соответствующих сегментов последовательности, предназначенных для мутации. При синтезе данных олигонуклеотидов специалист в данной области может использовать смеси кирпичиков-блоков нукleinовой кислоты для данных нуклеотидных триплетов, которые

5 соответствуют аминокислотным положениям, предназначенным для мутации таким образом, что кодоны, кодирующие все природные аминокислоты, возникают случайно, что в конечном итоге приводит к получению библиотеки пептидов липокалина.

Например, первый олигонуклеотид соответствует по его последовательности - помимо мутированных положений - кодирующей цепи пептидного сегмента, предназначенного

10 для мутирования, в основном в N-концевом положении полипептида липокалина. Следовательно, второй олигонуклеотид соответствует некодирующей цепи второго сегмента последовательности, следующего в полипептидной последовательности.

15 Третий олигонуклеотид, в свою очередь, соответствует кодирующей цепи соответствующего третьего сегмента данной последовательности. Наконец, четвертый

олигонуклеотид соответствует некодирующей цепи четвертого сегмента последовательности. Полимеразную цепную реакцию можно провести с соответствующим первым и вторым олигонуклеотидом и по отдельности, если необходимо, с соответствующим третьим и четвертым олигонуклеотидом.

20 Продукты амплификации обеих данных реакций можно объединить различными известными методами в одну нукleinовую кислоту, содержащую последовательность от первого до четвертого сегментов последовательности, в которые введены мутации в выбранных положениях. После этого оба продукта можно подвергнуть, например, новой полимеразной цепной реакции с использованием фланкирующих олигонуклеотидов, а также одну или более опосредующих молекул нукleinовой

25 кислоты, которые вносят последовательность между вторым и третьим сегментом последовательности. При выборе числа и расположения в последовательности олигонуклеотидов, используемых для мутагенеза, специалист в данной области имеет в своем распоряжении многочисленные альтернативы.

Молекулы нукleinовой кислоты, определенные выше, можно соединить 30 лигированием с пропуском 5'- и 3'-последовательностей нукleinовой кислоты, кодирующей полипептид липокалина и/или вектор, и можно клонировать в известный микроорганизм-хозяин. Для лигирования и клонирования имеется большое число методов (Sambrook J. et al., 1989, см. выше). Например, последовательности узнавания для рестриктаз, также присутствующие в последовательности клонирующего вектора, 35 можно встроить в последовательности синтетических олигонуклеотидов. Таким образом, после амплификации соответствующего продукта ПЦР и ферментативного отщепления полученный фрагмент можно легко клонировать с использованием соответствующих последовательностей распознавания.

Более длинные сегменты последовательности в гене, кодирующем белок, выбранный 40 для мутагенеза, также можно подвергнуть случайному мутагенезу с использованием известных способов, например, применением полимеразной цепной реакции в условиях повышенного показателя ошибки, химическим мутагенезом или с использованием бактериальных штаммов-мутаторов. Такие способы также можно использовать для дополнительной оптимизации аффинности или специфичности мутеина липокалина 45 для мишени. Мутации, возможно, имеющие место вне сегментов экспериментального мутагенеза, часто являются устойчивыми или даже могут быть преимущественными, например, если они вносят свой вклад в повышение эффективности укладки или стабильности укладки мутеина липокалина.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения вышеуказанный способ включает мутагенез молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок липокалина 2 человека по меньшей мере в 2 или 3 триплетах, кодирующих любое из вышеуказанных положений липокалина 2 человека.

5 В еще одном варианте осуществления способа дополнительно включает мутагенез молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одном нуклеотидном триплете, кодирующем любое из положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134,

10 136 и 138 линейной полипептидной последовательности hNGAL.

В еще одном варианте осуществления способа включает мутагенез молекулы нуклеиновой кислоты в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере любые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 положений последовательности, соответствующих положениям последовательности 33, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 59, 65, 68, 70, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 98, 96, 99, 100, 103, 106, 107, 110, 111, 125, 127, 132, 134, 136 и 138 линейной полипептидной последовательности липокалина 2 человека.

Согласно способу по изобретению мутеин получают, начиная с нуклеиновой кислоты, кодирующей hNGAL. Такую нуклеиновую кислоту подвергают мутагенезу и вводят в 20 подходящий бактериальный или эукариотический микроорганизм-хозяин с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Библиотеку нуклеиновых кислот липокалина 2 человека можно получить с использованием любого подходящего метода, который известен в данной области, для получения мутеинов липокалина с 25 антителоподобными свойствами, т.е. мутеинов, которые обладают аффинностью для определенной мишени. Примеры таких комбинаторных методов подробно описаны, например, в международных заявках на патент WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/ 029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256 или WO 2006/56464. Содержание каждой из данных патентных заявок в полном объеме включено в данный документ для сведения. После экспрессии последовательностей 30 нуклеиновой кислоты, которые были подвергнуты мутагенезу в соответствующем хозяине, из полученной библиотеки можно отобрать клоны, несущие генетическую информацию для множества соответствующих мутеинов липокалина, которые связываются с определенной мишенью. Можно использовать хорошо известные методы для отбора данных клонов, такие как фаговый дисплей (см. обзоры Kay B.K. et al., 1996, выше; Lowman H.B., 1997, выше или Rodi D.J. and Makowski L., 1999, выше), скрининг колоний (см. обзоры Pini A. et al. (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen., 5:503-510), рибосомный дисплей (см. обзоры Amstutz P. et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol., 12:400- 405) или дисплей мРНК у Wilson D.S. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:3750-3755 или способы, конкретно описанные в международных заявках WO 99/16873, WO 00/ 35 75309, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256 или WO 2006/56464.

Согласно данному раскрытию стадия (с) дополнительно включает в другом варианте осуществления вышеуказанного способа:

(i) обеспечение в качестве определенной мишени/лиганда соединения, выбранного 45 из группы, состоящей из химического соединения в свободной или конъюгированной форме, которое обладает свойствами, например, иммунологического гаптена, пептида, белка или другой макромолекулы, такой как полисахарид, молекула нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), или целой вирусной частицы или вириона;

(ii) контактирование множества мутеинов с указанной мишенью/лигандом с образованием комплексов указанного лиганда и мутеинов, обладающих аффинностью связывания для указанной мишени/лиганда; и

5 (iii) удаление мутеинов, не обладающих или обладающих недостаточной аффинностью связывания.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мишень/лиганд представляет неприродную мишень, которая включает, не ограничиваясь этим, пептид, белок, фрагмент или домен белка, и небольшую органическую молекулу. В одном варианте осуществления небольшая органическая молекула представляет соединение,

10 проявляющее свойства иммунологического гаптена. В еще одном варианте осуществления пептид представляет бета-амилоидный пептид, такой как А β 40 пептид или А β 42 пептид. В еще одном варианте осуществления неприродная мишень представляет белок фибронектин или его домен, такой как ЕВ-домен или фрагмент ЕВ-домена.

15 В одном варианте осуществления способов по изобретению отбор на стадии (с) проводят в конкурентных условиях. В том смысле, в котором в настоящем документе используется выражение «конкурентные условия», оно означает, что отбор мутеинов включает по меньшей мере одну стадию, в которой мутеины и определенный неприродный лиганд липокалина 2 человека (мишени) приводят в контакт в присутствии 20 дополнительного лиганда, который конкурирует за связывание мутеинов с мишенью. Такой дополнительный лиганд может представлять физиологический лиганд мишени, избыток самой мишени или любой другой нефизиологический лиганд мишени, который связывается по меньшей мере с перекрывающимся эпитопом с эпитопом, распознающимся мутеинами по изобретению, и таким образом, мешает связыванию 25 мутеинов с мишенью. Альтернативно, дополнительный лиганд конкурирует за связывание мутеинов посредством образования комплекса с эпитопом, отличным от сайта связывания мутеинов с мишенью, под действием аллостерических эффектов.

30 Вариант осуществления метода фагового дисплея (см. обзор Kay B.K. et al. (1996) выше; Lowman H.B. (1997) и Makowski L. (1999) выше) с использованием подходящего фага M13 приведен в качестве примера метода отбора, который можно использовать в настоящем изобретении. Еще одним вариантом осуществления технологии фагового дисплея, который можно использовать для отбора мутеинов по изобретению, является технология гиперфага фага, описанная Broders et al. (Broders et al. (2003) «Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display». Methods Mol. Biol., 205:295-302). Также 35 можно использовать другой нитчатый фаг, такой как f1, или литический фаг, такой как T7. В приведенном в качестве примера методе отбора производятся фагемиды M13, обеспечивающие экспрессию мутированной последовательности нуклеиновой кислоты липокалина в виде слитого белка с сигнальной последовательностью на N-конце, предпочтительно, сигнальной последовательностью OmpA, и с капсидным белком pIII 40 фага M13 или его фрагментами, способными включаться в капсиду фага на C-конце. С-концевой фрагмент ΔpIII белка капсидного фага, содержащего аминокислотные 217-406 последовательности дикого типа, предпочтительно, используют для получения слитых белков. В одном варианте осуществления особенно предпочтительным является С-концевой фрагмент pIII, в котором цистeinовый остаток в положении 201 отсутствует 45 или замещен другой аминокислотой.

Следовательно, дополнительный вариант осуществления способов по изобретению включает функциональное слияние нуклеиновой кислоты, кодирующую множество мутеинов липокалина 2 человека и возникающих в результате мутагенеза на 3'-конце,

с геном, кодирующим белок оболочки рШ нитчатого бактериофага, относящегося к семейству M13, или фрагмент белка данной оболочки, для отбора по меньшей мере одного мутеина по связыванию с определенным лигандом.

Слитый белок может содержать дополнительные компоненты, такие как аффинная метка, которая обеспечивает иммобилизацию, детектирование и/или выделение слитого белка или его фрагментов. Кроме того, стоп-кодон можно расположить между областями последовательности, кодирующими липокалин или его мутеины, и геном капсиды фага или его фрагментами, где стоп-кодон, предпочтительно, amber стоп-кодон по меньшей мере частично транслируется в аминокислоту во время трансляции в подходящем штамме-супрессоре.

Например, плазмидный вектор pTLPc27, в настоящее время названный pTlc27, который описан в настоящем документе, используется для получения фагемидной библиотеки, кодирующей мутеины липокалина 2 человека. Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующие мутеины hNGAL, вставляют в вектор с использованием двух сайтов рестрикции BstXI. После лигирования подходящий штамм-хозяин, такой как *E. coli* XL1-Blue, трансформируют с получением смеси нуклеиновых кислот с получением большого числа независимых клонов. Если желательно, то можно приготовить соответствующий вектор для получения гиперфагемидной библиотеки.

Затем полученную библиотеку суперинфицируют в жидкой культуре соответствующим фагом-хелпером M13 или гиперфагом для получения функциональных фагемид. Рекомбинантный фагемид экспонирует мутеин липокалина на своей поверхности в виде слитого белка с белком оболочки рШ или его фрагментом, в то время как N-концевая сигнальная последовательность слитого белка обычно отщепляется. С другой стороны, она также несет одну или более копий нативного капсидного белка рШ, поставляемого фагом-хелпером, и таким образом способна инфицировать реципиента, в основном бактериальный штамм, несущий F- или F'-плазмиду. В случае гиперфагового дисплея гиперфагемиды экспонируют мутеины липокалина на своей поверхности в виде слитого белка с инфекционным белком оболочки рШ, но не с нативным капсидным белком. Во время или после инфицирования фагом-хелпером или гиперфагом экспрессию гена слитого белка из мутеина липокалина и капсидного белка рШ можно индуцировать, например, добавлением ангидротетрациклина. Выбирают такие условия индукции, что значительная фракция полученных фагемид экспонирует по меньшей мере один мутеин липокалина на своей поверхности. В случае гиперфагового дисплея условия индукции обеспечивают популяцию гиперфагемид, несущих между третьим и пятым слитыми белками, состоящими из мутеина липокалина и капсидного белка рШ. Известны различные методы выделения фагемид, такие как преципитация полизиленгликолем. Как правило, выделение имеет место после инкубационного периода, составляющего 6-8 ч.

Затем выделенные плазмиды можно подвергнуть отбору при инкубации с желаемой мишенью, где мишень представлена в форме, обеспечивающей по меньшей мере временную иммобилизацию таких фагемид, которые несут мутеины с желаемой связывающей активностью, как слитые белки в их оболочке. Среди различных вариантов осуществления, известных специалистам в данной области, мишень можно конъюгировать, например, с белком-носителем, таким как сывороточный альбумин, и можно связать через такой белок-носитель с белком связывающей поверхности, например, полистиролом. Предпочтительно, можно использовать микротитрационные планшеты, подходящие для постановки ELISA, или так называемые «иммуно-стик» для иммобилизации мишени. Альтернативно, можно использовать конъюгаты мишени

с другими связывающими группами, такими как биотин. Затем мишень можно иммобилизовать на поверхности, которая селективно связывает данную группу, например, микротитрационные планшеты или парамагнитные частицы, покрытые стрептавидином, нейтравидином или авидином. Если мишень сливают с Fc-фрагментом иммуноглобулина, то иммобилизацию также можно провести с поверхностями, например, микротитрационными планшетами или парамагнитными частицами, которые покрыты белком А или белком G.

Неспецифические фагемид-связывающие сайты, находящиеся на поверхностях, можно насытить блокирующими растворами, известными для способов ELISA. Затем, как правило, фагемиды приводят в контакт с мишенью, иммобилизованной на поверхности в присутствии физиологического буфера. Несвязанные фагемиды удаляют многократным промыванием. Фагемидные частицы, оставшиеся на поверхности, затем элюируют. Для элюирования возможно несколько способов. Например, фагемиды можно элюировать добавлением протеаз или в присутствии кислот, оснований, дeterгентов или хаотропных солей, или в умеренно денатурирующих условиях. Предпочтительным способом является элюирование с использованием буферов с pH 2,2, в таком случае затем элюят нейтрализуют. Альтернативно, можно добавить раствор свободной мишени для конкуренции с иммобилизованной мишенью для связывания с фагемидами, или мишень-специфические фагемиды можно элюировать конкуренцией с иммуноглобулинами или природными белками-лигандами, которые специфически связываются с интересующей мишенью.

Затем клетки *E. coli* инфицируют элюированными фагемидами. Альтернативно, нуклеиновые кислоты можно экстрагировать из элюированных фагемид и использовать для анализа последовательности, амплификации или трансформации клеток иным способом. Начиная с клонов *E. coli*, полученных таким образом, вновь получают свежие фагемиды или гиперфагемиды суперинфицированием фагами-хелперами M13 или гиперфагом с использованием способа, описанного выше, и амплифицированные таким образом фагемиды вновь подвергают отбору на иммобилизованной мишени. Часто требуются многочисленные циклы отбора для получения фагемид с мутеинами по изобретению в достаточно обогащенной форме. Число циклов отбора, предпочтительно, выбирают таким образом, чтобы в последующем функциональном анализе по меньшей мере 0,1% испытуемых клонов продуцировал мутеины с обнаруживаемой аффинностью для определенной мишени. В зависимости от размера, т.е. сложности используемой библиотеки, как правило, для этой цели необходимо 2-8 циклов.

Для функционального анализа отобранных мутеинов штамм *E. coli* инфицируют фагемидами, полученными из циклов отбора, и выделяют соответствующую двухцепочечную плазмидную ДНК. Начиная с этой плазмидной ДНК или также с одноцепочечной ДНК, экстрагированной из фагемид, последовательности нуклеиновой кислоты отобранных мутеинов по изобретению можно определить с использованием способов, известных в данной области, и на этой основе вывести аминокислотную последовательность. Мутированную область или последовательность полного мутеина hNGAL можно субклонировать в другой вектор экспрессии и экспрессировать в подходящем микроорганизме-хозяине. Например, вектор pTLC26, в настоящее время названный pTlc26, можно использовать для экспрессии штаммов *E. coli*, таких как *E. coli*TG1. Полученные таким образом мутеины липокалина 2 человека можно выделить различными биохимическими способами. Мутеины hNGAL, полученные, например, с pTlc26, несут аффинный пептид Strep-метку II (Schmidt et al., выше) на их С-концах и, следовательно, предпочтительно, их можно выделить аффинной хроматографией со

стрептавидином.

Также отбор можно проводить с помощью других методов. Многие соответствующие варианты осуществления известны специалистам в данной области, или они описаны в литературе. Однако можно использовать комбинацию методов. Например, отобранные 5 клоны или по меньшей мере обогащенные с использованием “фагового дисплея”, можно дополнительно подвергнуть «скринингу колоний». Данный метод обладает тем преимуществом, что индивидуальные клоны можно непосредственно выделить по отношению к получению мутеина липокалина 2 человека с обнаруживаемой аффинностью связывания для мишени.

10 В дополнении к применению *E. coli* в качестве микроорганизма-хозяина в способе «фаговый дисплей» или способе «скрининг колоний», для этой цели можно использовать другие бактериальные штаммы, дрожжи или также клетки насекомых или клетки млекопитающих. После отбора мутеина липокалина 2 человека из произвольной библиотеки, как описано выше, также можно использовать разрабатывающиеся 15 способы, в том числе, ограниченный мутагенез, для оптимизации мутеина, который уже обладает некоторой связывающей активностью для мишени в отношении аффинности или специфичности мишени.

После отбора мутеина с аффинностью к данной мишени можно дополнительно 20 подвергнуть такой мутеин другому мутагенезу для последующего отбора вариантов с еще более высокой аффинностью или вариантов с улучшенными свойствами, такими как более высокая термостабильность, повышенная стабильность в сыворотке, термодинамическая стабильность, повышенная растворимость, улучшенный мономерный профиль, повышенная резистентность к термической денатурации, химической денатурации, протеолизу или воздействию детергентов и т.д. Такой 25 дополнительный мутагенез, в то случае, если он направлен на обеспечение более высокой аффинности, может рассматриваться в качестве «созревания аффинности» *in vitro*, его можно достичь сайт-специфической мутацией, основанной на рациональном дизайне или случайной мутации. Другим возможным подходом для получения более высокой аффинности или улучшенных свойств является применение подверженной ошибкам 30 ПЦР, что приводит к точечным мутациям в выбранном ряду положений последовательности мутеина липокалина. Подверженную ошибкам ПЦР можно осуществить, следуя любому известному протоколу, такому как описан Zaccolo et al. (1996) *J. Mol. Biol.*, 255:589-603. Другие способы случайного мутагенеза *thatare*, подходящие для таких целей, включают случайный инсерционный/делеционный 35 мутагенез (RID), описанный Murakami et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20, 76-81, или негомологичную случайную рекомбинацию (NRR), описанную Bittker et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20, 1024-1029. Если желательно, то созревание аффинности можно провести согласно процедуре, описанной в международной заявке WO 00/75308 или Schlehuber et al. (2000) *J. Mol. Biol.*, 297, 1105-1120, где получали мутеины билин-связывающего 40 белка, обладающего высокой аффинностью к дигоксигенину. Дополнительным подходом для повышения аффинности является проведение позиционного мутагенеза с насыщением. При таком подходе можно создать «небольшие» библиотеки нуклеиновых кислот, в которые вводят аминокислотные замены/мутации только в отдельных положениях в любом из четырех петлей-сегментов. Затем данные библиотеки 45 непосредственно подвергают стадии отбора (скрининг аффинности) без дополнительных раундов пэннинга. Такой подход позволяет идентифицировать остатки, вносящие вклад в повышенное связывание желаемой мишени, и позволяет идентифицировать «горячие пятна», имеющие значение для связывания.

В одном варианте осуществления вышеуказанный способ модификации мутеина дополнительно включает введение остатка Cys по меньшей мере в одно из любых положений последовательности, которые соответствуют положениям последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности 5 липокалина 2 человека дикого типа и присоединение группы, которая способна модифицировать период полураспада в сыворотке указанного мутеина через тиоловую группу остатка Cys, введенного по меньшей мере в одно из любых положений последовательности, которые соответствуют положениям последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности hNGAL дикого типа. Группу, 10 которая способна модифицировать период полураспада указанного мутеина, можно выбрать из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля и гидроксиэтилкрахмала.

В дополнительном аспекте настояще изобретение относится к мутеину липокалина 2 человека, обладающего обнаруживаемой аффинностью связывания, к определенному 15 неприродному лиганду липокалина 2 человека, который можно получить или получен подробно описанными способами по изобретению.

В некоторых мутеинах липокалина 2 человека по изобретению природная дисульфидная связь между Cys 76 и Cys 175 удаляется. Следовательно, такие мутеины (или любой другой мутеин липокалина 2 человека, который не содержит 20 внутримолекулярной дисульфидной связи) можно получить в клеточном компартменте, имеющем восстановительный потенциал среды, например, в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

В том случае, когда мутеин липокалина по изобретению содержит 25 внутримолекулярные дисульфидные связи, то может быть предпочтительным направить синтезирующийся полипептид в клеточный компартмент, имеющий окислительный потенциал среды с использованием соответствующей сигнальной последовательности. Такую окислительную среду можно обеспечить в периплазме грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или 30 в просвете эндоплазматического ретикулюма в эукариотических клетках, и обычно он способствует образованию структурных дисульфидных связей.

Однако также возможно получить мутеин по изобретению в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно, *E. coli*. В этом случае полипептид можно получить непосредственно в растворимом и уложенном состоянии или выделить в форме телец включения с 35 последующей ренатурацией в условиях *in vitro*. Дополнительной возможностью является применение специфических штаммов-хозяев, имеющих окислительную внутриклеточную среду, которая может таким образом способствовать образованию дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) *J. Mol.Biol.*, 315, 1-8).

Однако мутеин по изобретению необязательно можно получить или продуцировать 40 только с использованием генной инженерии. Предпочтительнее мутеин липокалина также можно получить химическим синтезом, таким как твердофазный синтез полипептидов Меррифилда, или транскрипцией или трансляцией в условиях *in vitro*. Например, возможно, что многообещающие мутации идентифицируют с использованием молекулярного моделирования и затем синтезируют желаемый (планируемый) 45 полипептид в условиях *in vitro* и исследуют активность связывания с определенной мишенью. Способы твердофазного и/или синтеза белков в растворе хорошо известны в данной области (см. обзор Lloyd-Williams et al. (1997), *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Fields, GB and Colowick (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego or Bruckdorfer et al. (2004) *Curr. Pharm.*

Biotechnol., 5, 29-43).

В еще одном варианте осуществления мутеины по изобретению можно получить трансляцией/транскрипцией в условиях *in vitro* с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области.

5 Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один мутеин по изобретению, указанный в формуле изобретения, или слитый белок или его конъюгат, и необязательно фармацевтически приемлемый наполнитель.

Мутеины липокалина по изобретению можно вводить любым парентеральным или 10 непарентеральным (энтеральным) путем, который эффективен для белковых препаратов. Парентеральные способы применения включают, например, внутрикожную, подкожную, внутримышечную или внутривенную инъекцию или инфузии, например, в виде инъекционных растворов, инфузионных растворов или настоек, а также инстилляцию или ингаляцию аэрозоля, например, в виде аэрозольных смесей, спреев или порошков. 15 Непарентеральные способы доставки представляют, например, пероральный путь, например, в форме пилюль, таблеток, капсул, растворов или супспензий, или ректальный путь, например, в виде суппозиториев. Мутеины по изобретению можно вводить системно или местно в композициях, содержащих обычные нетоксичные 20 фармацевтически приемлемые наполнители или носители, добавки и растворители, как это желательно.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический препарат вводят парентерально млекопитающему и, в частности, людям. Соответствующие способы введения включают, не ограничиваясь этим, например, внутрикожную, подкожную, внутримышечную или внутривенную инъекцию или 25 инфузии, например, в виде инъекционных растворов, инфузионных растворов или настоек, а также инстилляцию или ингаляцию аэрозолей, например, в виде аэрозольных смесей, спреев или порошков. Комбинация внутривенной и подкожной инфузии и/или инъекции может быть наиболее подходящей в случае соединений с относительно коротким периодом полураспада в сыворотке. Фармацевтическая композиция может 30 представлять водный раствор, эмульсию масло-в-воде или эмульсию вода-в-масле.

В этом отношении следует отметить, что трансдермальные способы доставки, например, ионофорез, сонофорез или усиленная доставка с помощью микроиглы, описанная Meidan and Michniak (2004) Am. J. Ther., 11(4), 312-316, также можно использовать для трансдермальной доставки мутеинов, описанных в настоящем 35 документе. Непарентеральные пути введения представляют, например, пероральное введение в форме пилюль, таблеток, капсул, растворов или супспензий, или ректальное введение, например, в виде суппозиториев. Мутеины по изобретению можно вводить системно или местно в композициях, содержащих обычные нетоксичные фармацевтически приемлемые наполнители или носители, добавки и растворители.

40 Дозировка используемого мутеина может варьировать в широких пределах для достижения желаемого профилактического или терапевтического ответа. Она будет зависеть, например, от аффинности соединения для выбранного лиганда, а также от периода полураспада комплекса мутеина и лиганда в условиях *in vivo*. Кроме того, оптимальная доза будет зависеть от биологического распределения мутеина или его 45 слитого белка, или его конъюгата, способа введения, тяжести заболевания/расстройства, которое подвергается лечению, а также общего состояния пациента. Например, при использовании в виде мази для местного применения, можно использовать высокую концентрацию мутеина липокалина человека. Однако, если желательно, то мутеин

также можно вводить в композиции с замедленным высвобождением, например, липосомальной дисперсии или полимерных микросферах на основе геля, таких как PolyActiveTM или OctoDEXTM (см. Bos et al., Business Briefing:Pharmatech., 2003:1-6).

Следовательно, мутеины по настоящему изобретению можно формулировать в композиции с использованием фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также общепринятых методов получения (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно использовать фармацевтически инертные неорганические и органические наполнители. Например, для приготовления пиллюль, порошков, желатиновых капсул или суппозиториев, можно использовать лактозу, тальк, стеариновую кислоту и ее соли, жиры, воски, твердые или жидкие полиолы, природные и отверждаемые масла. Подходящие наполнители для приготовления растворов, суспензий, эмульсий, аэрозольных смесей или порошков для восстановления в растворы или аэрозольные смеси перед использованием включают воду, спирты, глицерин, полиолы и их подходящие смеси, а также растительные масла.

Фармацевтическая композиция также может содержать добавки, например, такие как наполнители, связующие вещества, смачивающее вещество, скользящие вещества, стабилизаторы, консерванты, эмульгаторы, и, кроме того, растворители или солюбилизаторы, или агенты для достижения депо-эффекта. Последнее представляет собой вариант, когда слитые белки могут аккумулироваться с медленным или замедленным высвобождением, или системы направленной доставки, такие как липосомы или микрокапсулы.

Композиции можно стерилизовать многочисленными способами, включая фильтрование через задерживающий бактерии фильтр, или включение стерилизующих агентов в виде стерильных твердых композиций, которые можно растворить в стерильной воде или другой стерильной среде непосредственно перед применением.

Мутеин по настоящему изобретению или слитый белок, или его коньюгат можно использовать во многих применениях. В общем, такой мутеин можно использовать во всех применениях, в которых используются антитела, за исключением таковых со специфичностью, основанной на гликозилировании Fc-фрагмента.

Следовательно, в еще одном аспекте изобретения мутеины по изобретению липокалина 2 человека используют для связывания и/или детектирования определенного неприродного лиганда липокалина человека. Такое применение может включать стадии приведения в контакт мутеина с образцом, в котором предположительно находится определенный лиганд, в подходящих условиях, обеспечивая тем самым образование комплекса мутеина и определенного лиганда, и детектирование мутеина в виде комплекса соответствующим сигналом.

Детектируемый сигнал можно обеспечить с помощью метки, как уже пояснялось выше, или изменением физических свойств за счет связывания, т.е. образования самого комплекса. Одним примером является поверхностный плазмонный резонанс, показатель, который изменяется во время связывания партнеров по связыванию, из которых один иммобилизован на поверхности, такой как золотая фольга.

Мутеины липокалина 2 человека, раскрытие в настоящем документе, также можно использовать для выделения определенного неприродного лиганда липокалина 2 человека. Такое применение может включать стадии приведения в контакт мутеина с образцом, в котором предположительно находится указанный лиганд, в подходящих условиях, с обеспечением тем самым образования комплекса мутеина и определенного лиганда, и выделение комплекса мутеин/лиганд из образца.

В обоих случаях при использовании мутеина для детектирования определенного неприродного лиганда, а также выделения определенного лиганда, мутеин и/или мишень можно иммобилизовать на подходящей твердой фазе.

Мутеины липокалина 2 человека по изобретению также можно использовать для

5 направленной доставки соединения в заранее выбранное место. В одном таком варианте осуществления мутеин липокалина 2 человека используют для направленной доставки фармацевтически активного соединения в заранее выбранное место в организме или ткань, включающей:

(а) конъюгацию мутеина с указанным соединением и

10 (б) доставку комплекса мутеин/соединение в заранее определенное место.

Для этой цели мутеин приводят в контакт с интересующим соединением для обеспечения образования комплекса. Затем комплекс, содержащий мутеин и интересующее соединение, доставляется в заранее определенное место. Этого можно достичь, например, сочетанием мутеина с направляющей группой, такой как антитело, 15 фрагмент антитела или мутеин липокалина или фрагмент мутеина липокалина с аффинностью связывания для выбранной мишени.

Данное применение, в частности, подходит, но не ограничивается этим, для доставки лекарственного препарата (избирательно) в заранее определенное место в организме, такое как инфицированная область, ткань или орган тела, которые предположительно 20 лечатся лекарственным препаратом. Помимо образования комплекса мутеина и интересующего соединения мутеин также можно подвергнуть взаимодействию с определенным соединением с получением конъюгата мутеина и соединения. Аналогично вышеуказанному комплексу, такой конъюгат может подходить для доставки соединения в заранее выбранное место-мишень. Такой конъюгат мутеина и соединения также 25 может содержать линкер, ковалентно связывающий мутеин и соединение друг с другом. Необязательно такой линкер является стабильным в кровяном русле, но расщепляется в клеточной среде.

Мутеины, раскрытие в настоящем документе, и его производные можно использовать таким образом во многих областях аналогично антителам или их фрагментам. В 30 дополнении к их применению для связывания с подложкой, что позволяет иммобилизовать или выделить мишень данного мутеина или конъюгата, или слитого белка данной мишени, мутеины можно использовать для мечения ферментом, антителом, радиоактивным соединением или любой другой группой, обладающей биохимической активностью или определенной способностью к связыванию. При этом их 35 соответствующие мишени или конъюгаты, или слитые белки можно детектировать или приводить в контакт с ними. Например, мутеины по изобретению могут служить для детектирования химических структур с помощью общепринятых аналитических методов (например, ELISA или вестерн-блоттинг), или микроскопией или иммunoсенсорными методами. В данном случае детектирующий сигнал можно получить непосредственно 40 с использованием подходящего конъюгата мутеина или слитого белка, или опосредованно, например, иммунохимическим детектированием связанного мутеина через антитело.

Многочисленные возможные применения мутеинов по изобретению также имеются в медицине. В дополнении к их применению в диагностике и доставке лекарственных 45 препаратов можно получить мутантный полипептид по изобретению, который связывается, например, с тканеспецифическими или опухольспецифическими молекулами клеточной поверхности. Такой мутеин может, например, использоваться в конъюгированной форме или в виде слитого белка для «визуализации опухолей» или

непосредственно для терапии рака.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению мутеинов липокалина 2 человека по изобретению для образования комплекса с определенным неприродным лигандом или мишенью.

- 5 В дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к применению мутеина по изобретению для производства фармацевтической композиции. Полученная таким образом композиция может быть пригодной для лечения нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера. Фармацевтическую композицию также можно использовать для лечения рака, лечения фиброза или лечения воспаления.
- 10 Фармацевтическую композицию можно использовать в качестве монотерапии или комбинированной терапии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к диагностическому или аналитическому набору, содержащему мутеин по настоящему изобретению.

- 15 Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения индивида, страдающего нейродегенеративным заболеванием, или раком, или фиброзом, или воспалением, включающему введение соответствующего мутеина по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей мутеин по изобретению, индивиду, нуждающемуся в этом.

- 20 Индивид, нуждающийся в таком лечении, может быть, если назвать только показательные примеры, человеком, собакой, мышью, крысой, свиньей, обезьяной, такой как *symologous* обезьяны.

- 25 В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу визуализации в условиях *in vivo* у индивида, включающему введение указанному индивиду мутеина по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей мутеин по изобретению.
- Индивид можно определить, как приведено выше.

Изобретение также дополнительно иллюстрируется последующими неограничивающими примерами и прилагаемыми фигурами, где:

- На фигуре 1 показана стратегия сборки ПЦР для одновременного случайного мутагенеза в 20 аминокислотных положениях 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 30 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 (подчеркнуты и пронумерованы) в аминокислотной последовательности зрелого Lcn2. Данные 20 положений разделены на четыре подгруппы последовательностей. Для рандомизации аминокислот в каждой подгруппе синтезировали олигодезоксинуклеотид (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4), где использовали смеси NNK нуклеотидов в мутированных кодонах. N означает смесь всех четырех оснований А, С, Г и Т, в то время как К означает смесь только двух оснований Г и Т; следовательно, такой триплет кодирует все 20 природных аминокислот, а также amber стоп-кодон TAG, который транслируется в глутамин в supE-штаммах *E. coli* XL1-blue (Bullock et al. (1987), BioTechniques, 5, 376-378) или TG1 (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Press), которые 35 использовали для получения фагемида и экспрессии гена. Также в реакции сборки использовали четыре дополнительных олигодезоксинуклеотида (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8) с фиксированными нуклеотидными последовательностями, соответствующими некодирующей цепи (показана ниже последовательности двухцепочечной ДНК в 3'-5'-направлении) и заполнение гэпов 40 между вышеуказанными олигодезоксинуклеотидами. Два более коротких фланкирующих олигодезоксинуклеотида (SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10), которые добавляли в избытке 45 и содержали группы биотина, служили в качестве праймеров для амплификации ПЦР собранного, полностью синтетического фрагмента гена. Два фланкирующих праймера,

каждый включал сайт рестрикции BstXI (CCANNNNNNTGG), образуя взаимно несовместимые выступы при ферментативном расщеплении. Такое специфическое расположение сайтов рестрикции способствовало особенно эффективному лигированию и клонированию синтетического гена. Замена аминокислоты Gln28 на His по сравнению с исходной последовательностью Lcn2 была необходима для введения первого сайта BstXI, в то время как второй сайт имелся изначально в кДНК Lcn2. Кроме того, неспаренный остаток Cys87 замещали на Ser во время сборки гена. После одного раунда ПЦР полученный фрагмент гена вставляли в вектор, обеспечивая отсутствующие фрагменты структурного гена Lcn2. На данной фигуре также показаны два коротких праймера (SEQ ID NO:45 и SEQ ID NO:46), соответственно, слева и справа кассеты, фланкированной двумя сайтами рестрикции BstXI, которые служили для секвенирования двухцепочечной ДНК.

На фигуре 2 приведена нуклеотидная последовательность библиотеки синтетических генов Lcn2 (только центральная кассета, фланкированная двумя сайтами рестрикции BstXI, как показано на фигуре 1). Данный фрагмент гена готовили в Sloning BioTechnology GmbH. По сравнению с ДНК-библиотекой, представленной на фигуре 1, имеется два различия. Первое, там, где это было возможным, использовали кодоны, оптимизированные для экспрессии в *E. coli*, для немутированных аминокислотных положений. Второе, использовали смесь 19 различных триплетов (GAC, TTC, CTG, CAC, AAT, AGC, ACC, GCA, ATG, CCT, GTT, TGG, GAG, CAA, ATC, GGA, GGT, GCA, TAC), где каждый кодировал разную аминокислоту, за исключением Cys, в 20 рандомизированных положениях, которые идентичны положениям, представленным на фигуре 1. Нумерация аминокислот соответствует внутренней схеме, использованной Sloning BioTechnology GmbH, где Gly 1 является кодоном первой аминокислоты, непосредственно следующей слева от сайта рестрикции BstXI.

На фигуре 3 показаны профили SEC элюирования рекомбинантных Аβ слитых белков Trx-Аβ28 (А) и MBP-Аβ40 (В) после экспрессии в *E. coli*. В обоих случаях чистоту синтетического Аβ40 и рекомбинантного слитого Аβ белка оценивали SDS-PAGE (С). Оба слитых белка экспрессировали в цитоплазме *E. coli* JM83. После разделения клеток с помощью клеточного френч-пресса белки очищали аффинной хроматографией с His₆-меткой и затем наносили на колонку Superdex 75 HR 10/30 в случае Trx-Аβ28 и Superdex 200 HR 10/30 в случае MBP-Аβ40. Оба белка элюировались в основном в виде мономера в эксклюзионной хроматографии и в основном были гомогенными после очистки. Аβ40 получали от Keck Foundation, обрабатывали HFIP, выпаривали в SpeedVac и, наконец, растворяли в дистиллированной H₂O. Анализ в 15% геле показывает образцы Аβ40 после обработки HFIP и Trx-Аβ28 и MBP-Аβ40 после очистки IMAC и SEC. М представляет маркер молекулярной массы с соответствующим размером полос в кДа, расположенный в левой стороне геля.

На фигуре 4 показано перекрывание профилей элюирования SEC мутеинов Lcn2 H1-G1, S1-A4 и US7 (А) и анализ очищенных белков с использованием 15% SDS-PAGE (В). Три мутеина Lcn2 H1-G1, S1-A4 и US7 экспрессировали в периплазме *E. coli* JM83 или TG1-F (как показано) и очищали аффинной хроматографией со Strep-меткой II. Все три мутеина элюировались в основном в виде мономерных белков с колонки Superdex 75 HR 10/30 с объемом удерживания 10-11 мл. Максимальные интенсивности различались в зависимости от выхода экспрессии конкретного мутеина. (В) Показаны результаты анализа 15% SDS-PAGE рекомбинантного Lcn2 дикого типа (дорожки 1, 5) и мутеинов US7 (дорожки 2, 6), H1-G1 (дорожки 3, 7) и S1-A4 (дорожки 4, 8) после аффинной хроматографии со Strep-меткой II и SEC. Дорожки 1-4 показывают, что мутеины Lcn2

восстанавливались под действием 2-меркаптоэтанола, дорожки 5-8 показывают белки в нередуцирующих условиях. М представляет маркер молекулярной массы с соответствующим размером полос в кДа, расположенный в левой стороне геля.

На фигуре 5 показана активность связывания мутеинов Lcn2 H1-G1, S1-A4 и US7 в

5 ELISA с иммунным захватом с различными биотинилированными Аβ-мишениями.

StrepMAB-Immo в концентрации 10 мкг/мл иммобилизовали на микротитрационных планшетах и использовали для захвата 1 мкМ мутеинов Lcn2 через Strep-метку II. На фигуре А-С показано связывание мутеинов Lcn2 S1-A4 и US7 с (А) биотинилированным Аβ-40, (В) биотинилированным Trx-Аβ28 и (С) биотинилированным MBP-Аβ40.

10 Связывание детектировали при инкубации с ExtrAvidin/AP и последующей хромогенной реакцией с pNPP. Овальбумин (Ova), тиоредоксин (Trx) и мальтоза-связывающий белок (MBP) использовали в качестве отрицательных контролей. Дополнительно тестировали связывание липокалина дикого типа (wt). По данным был построен график на основе

15 модели моновалентного связывания. На фигуре D показана та же постановка ELISA с Lcn2 H1-G1 и биотинилированными Аβ-40 и Trx-Аβ28 в качестве мишеней. Определенные значения K_D для Аβ-40 составили 2,7 нМ для S1-A4, 6,8 нМ для US7 и 16,2 нМ для H1-G1, соответствующие значения для Trx-Аβ28 равнялись 1,9 нМ, 2,4 нМ и 24,3 нМ.

Связывание с MBP-Аβ40 показало значения K_D , равные 4,7 нМ для S1-A4 и 11,4 нМ

20 для US7. Следовательно, значения K_D для Аβ16-27 составили 2,6 нМ и 2,1 нМ.

На фигуре 6 показана связывающая активность мутеинов Lcn2 S1-A4 и US7 в прямом ELISA. Аβ-мишени Trx-Аβ28 и MBP-Аβ40, а также контрольный мальтоза-связывающий белок (MBP) иммобилизовали в концентрации 2 мкМ в PBS в течение ночи. Связанные мутеины Lcn2 детектировали с помощью Strep-метки II с использованием стрептавидин/

25 AP с последующей хромогенной реакцией с pNPP. В качестве контроля тестировали связывание липокалина дикого типа (wt). По данным был построен график на основе модели моновалентного связывания. Значения K_D для Trx-Аβ28 составили 16,2 нМ для S1-A4 и 9,6 нМ для US7, соответствующие значения для MBP-Аβ40 равнялись 149 нМ и 49,7 нМ.

30 На фигуре 7 показана связывающая активность мутеинов Lcn2 S1-A4 (А) и US7 (В) в конкурентном ELISA. StrepMAB-Immo в концентрации 10 мкг/мл иммобилизовали на микротитрационных планшетах и использовали для захвата 1 мкМ мутеина Lcn2 через Strep-метку II. В конкурентном анализе биотинилированный Trx-Аβ28 в качестве маркера

35 в постоянной концентрации смешивали с различными концентрациями немеченого Trx-Аβ28. Затем связанный биотинилированный Trx-Аβ28 детектировали при инкубации с ExtrAvidin/AP с последующей хромогенной реакцией с pNPP. По данным был построен график с использованием симмоидального уравнения. Значения K_D составили 21,7 нМ

для S1-A4 и 76,9 нМ для US7.

На фигуре 8 показан кинетический анализ в режиме реального времени мутеинов

40 Lcn2 S1-A4 (А) и US7 (В) на аппарате Biacore со скоростью потока 10 мкл/мин. Слитый белок MBP-Аβ40 присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к чипу CMD 200I ($\Delta RU=1455$) и каждый из очищенных мутеинов Lcn 2 наносили последовательно в различных концентрациях. В каждом случае анализированный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Значения k_{on} и k_{off} обоих

45 мутеинов достоверно различались (k_{on} (S1-A4)= $0,48 \cdot 10^5$ М⁻¹сек⁻¹, k_{on} (US7)= $2,02 \cdot 10^5$

М⁻¹сек⁻¹, k_{off} (S1-A4)= $8,36 \cdot 10^5$ сек⁻¹, k_{off} (US7)= $25,2 \cdot 10^5$ сек⁻¹). Однако общие значения

К_D были очень схожими и составили 1,74 нМ для S1-A4 и 1,25 нМ для US7.

На фигуре 9 показана функциональная активность мутеинов Lcn2 S1-A4 и US7, анализированных в тесте агрегации тиофлавина Т. 100 мкМ Аβ40 инкубировали с 10 мкМ US7, S1-A4, липокалина дикого типа (wt) или с PBS при 37°C без встряхивания. На указанные временные интервалы 20 мкл каждой пробы смешивали с 180 мкл 5 мкМ 5 раствора тиофлавина Т и определяли флуоресценцию при длине волны возбуждения 450 нм и волне эмиссии 482 нм. Мутеин Lcn2 US7 существенно ингибировал агрегацию в соотношении 1:10 (US7:Аβ40). S1-A4 был не способен достоверно ингибировать агрегацию при данном соотношении, но проявлял четкое ингибирование при соотношении 1:2 (S1-A4:Аβ40) (данные не приводятся). Lcn2 дикого типа не оказывал 10 ингибирующего эффекта на агрегацию Аβ.

На фигуре 10 показаны результаты анализа SDS-PAGE, после окрашивания кумасси бриллиантовым синим, рекомбинантного ED-B (дорожка 1), FN7B8 (дорожка 2) и FN789 (дорожка 3) после ионообменной хроматографии. Все образцы восстанавливали 2-меркаптоэтанолом. М: маркер молекулярной массы (Fermentas, St. Leon-Rot, Германия).

15 На фигуре 11 показаны результаты анализа SDS-PAGE, после окрашивания кумасси бриллиантовым синим, Lcn2 мутеинов N7A (дорожка 1), N7E (дорожка 2), N9B (дорожка 3) и N10D (дорожка 4) после очистки аффинной хроматографией со Strep-меткой II. Все образцы восстанавливали 2-меркаптоэтанолом. М: маркер молекулярной массы (Fermentas, St. Leon-Rot, Германия).

20 На фигуре 12 представлены результаты оценки связывающей активности в ELISA. Микротитрационный планшет был покрыт серией разведений отобранных Lcn2 мутеинов с последующим детектированием с помощью конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и субстратом pNPP. Рекомбинантные Lcn2 мутеины N7A, N9B и N10D демонстрировали низкие сигналы в данном тесте для FN789, в котором 25 отсутствовал ED-B и служили в качестве отрицательного контроля.

На фигуре 13 приведены результаты кинетического анализа в режиме реального времени Lcn2 мутеина N9B, полученные на аппарате Bicore. FN7B8 присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к сенсорному чипу CMD 200 m ($\Delta RU=500$) и очищенный мутеин Lcn2 наносили в различных концентрациях. В каждом случае 30 определенный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Кинетические константы, установленные по данной серии кривых, приведены в таблице 2 (пример 17).

На фигуре 14 приведены результаты кинетического анализа в режиме реального времени Lcn2 мутеина N7E, определенные на аппарате Bicore. FN7B8 присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к сенсорному чипу CMD 200 m ($\Delta RU=500$) и очищенный мутеин Lcn2 наносили в различных концентрациях. В каждом случае 35 определенный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Кинетические константы, установленные по данной серии кривых, приведены в таблице 2 (пример 17).

40 На фигуре 15 приведены результаты кинетического анализа в режиме реального времени Lcn2 мутеина N7A, определенные на аппарате Bicore. FN7B8 присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к сенсорному чипу CMD 200 m ($\Delta RU=500$) и очищенный мутеин Lcn2 наносили в различных концентрациях. В каждом случае 45 определенный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Кинетические константы, установленные по данной серии кривых, приведены в таблице 2 (пример 17).

На фигуре 16 приведены результаты кинетического анализа в режиме реального времени Lcn2 мутеина N10D, определенные на аппарате Bicore. FN7B8 присоединяли с

использованием реакции сочетания аминов к сенсорному чипу CMD 200 m ($\Delta RU = 500$) и очищенный мутеин Lcn2 наносили в различных концентрациях. В каждом случае анализированный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Кинетические константы, установленные по данной серии кривых, 5 приведены в таблице 2 (пример 17).

На фигуре 17 показано выравнивание последовательностей мутеинов Lcn2 человека, обозначенных S1-A4 (SEQ ID NO:39); US-7 (SEQ ID NO:41); H1-G1 (SEQ ID NO:43); N7A (SEQ ID NO:20); N7E (SEQ ID NO:22); N9B (SEQ ID NO:24) и N10D (SEQ ID NO:26) с Lcn2. Последняя линия ниже последовательностей указывает вторичные структурные признаки 10 липокалина (Schonfeld et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 8198-8203).

На фигуре 18 показано перекрывания профилей SEC элюирования мутеинов Lcn2 H1GA и H1GV (A), и анализ очищенных белков с использованием 15% SDS-PAGE (B). Мутеины Lcn2 H1GA и H1GV экспрессировали в периплазме *E. coli* JM83 и очищали аффинной хроматографией со Strep-меткой II. Оба мутеина преимущественно 15 элюировались в виде мономерных белков с колонки Superdex 75 HR 10/30 с объемом удерживания 10-11 мл. Максимальные интенсивности различались в зависимости от выхода экспрессии конкретного мутеина. (B) Показаны результаты анализа 15% SDS-PAGE рекомбинантных мутеинов Lcn2 H1-G1, H1GA и H1GV после очистки аффинной хроматографией со Strep-меткой II и SEC. Все мутеины Lcn2 показаны в 20 восстанавливающих условиях с использованием 2-меркаптоэтанола. M представляет маркер молекулярной массы.

На фигуре 19 показана связывающая активность мутеинов Lcn2 H1GA, H1GV и H1-G1 в ELISA с иммунным захватом с биотинилированными $\text{A}\beta$ -мишениями $\text{A}\beta40$ (A) и Trx- $\text{A}\beta28$ (B). StrepMAB-Immobilized в концентрации 10 мкг/мл иммобилизовали на 25 микротитрационных планшетах и использовали для захвата 1 мкМ мутеинов Lcn2 через Strep-метку II. Затем детектировали связывание биотинилированных мишеней, нанесенных серией разведений, при инкубации с ExtrAvidin/AP и последующей хромогенной реакцией с pNPP. Биотинилированный овальбумин (Ova) и тиоредоксин (Trx) использовали в качестве отрицательных контролей, и они не показывали 30 связывания с мутеинами Lcn2 (не показано). По данным был построен график на основе модели моновалентного связывания. Определенные значения K_D для $\text{A}\beta40$ составили 4,2 нМ для H1GA, 4,9 нМ для H1GV и 21,5 нМ для H1-G1, соответствующие значения для Trx- $\text{A}\beta28$ равнялись 3,8 нМ, 4,2 нМ и 24,4 нМ, соответственно.

На фигуре 20 показан кинетический анализ в режиме реального времени мутеинов 35 Lcn2 H1GA (A) и H1GV (B) на аппарате Biacore со скоростью потока 20 мкл/мин. Слитый белок MBP- $\text{A}\beta40$ присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к чипу CMD 2001 ($\Delta RU=1316$) и каждый из очищенных мутеинов наносили последовательно в различных концентрациях. В каждом случае анализированный сигнал показан в виде серой линии, в то время кривая показана в виде черной линии. Значения k_{on} и k_{off} обоих 40 мутеинов были следующими $k_{on}(\text{H1GA})=5,77 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $k_{on}(\text{H1GV})=6,84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $k_{off}(\text{H1GA})=2,75 \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$, $k_{off}(\text{H1GV})=7,26 \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$). Общие значения K_D составили 0,476 нМ для H1GA и 1,06 нМ для H1GV.

На фигуре 21 показан кинетический анализ в режиме реального времени мутеина 45 Lcn2 H1GA на аппарате Biacore T100 с иммобилизованным $\text{A}\beta40$ с использованием увеличенного времени диссоциации для кривой, записанной при высокой концентрации. Пептид-мишень $\text{A}\beta40$ присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к чипу Biacore CM5 ($\Delta RU=325$) и очищенный мутеин Lcn2 H1GA наносили со скоростью

потока 30 мкл/мин. Для точного определения значения k_{off} диссоциацию проводили в течение 7200 сек при самой высокой тестиированной концентрации. Значения k_{on} определяли с использованием серии разведений мутеина Lcn2 H1GA при одинаковом времени ассоциации и диссоциации, равном 300 сек. Определенные кинетические значения H1GA равнялись: $k_{\text{on}}=1,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{сек}^{-1}$, $k_{\text{off}}=1,18 \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$ и $K_D=0,095 \text{ нМ}$.

На фигуре 22 (А) показана функциональная активность мутеина Lcn2 H1GA, тестиированного в teste агрегации тиофлавина T. 500 мкл мономера А β с концентрацией 1 мг/мл инкубировали при отсутствии или в присутствии различных молярных соотношений мутеина Lcn2 H1GA в 0,5 \times PBS при 37°C при перемешивании. Реакции агрегации проводили в трех параллелях. Для определения флуоресценции 20 мкл образца, отобранные через периодические интервалы времени, в каждом случае смешивали с 180 мкл ThT до конечной концентрации 50 мкМ в 0,5 \times PBS и анализировали при длине волны возбуждения 450 нм и волне эмиссии 482 нм. Мутеин Lcn2 H1GA существенно ингибировал агрегацию в эквимолярном соотношении. При субэквимолярном соотношении 10:2 (A β 40:H1GA) агрегация также была достоверно ниже. (В) В противоположность эквимолярные количества BSA и Lcn2, которые использовали в качестве отрицательных контролей, не оказывали ингибирующего действия на агрегацию A β 40.

На фигуре 23 обобщены результаты определения значений K_D , определенные при различной постановке ELISA, а также по данным поверхностного плазмонного резонанса для мутеинов Lcn2 H1GA и H1GV.

На фигуре 24 показано выравнивание последовательностей мутеинов Lcn2 S1-A4 (SEQ ID NO:39); US-7 (SEQ ID NO:41); H1-G1 (SEQ ID NO:43); H1GA (SEQ ID NO:50); H1GV (SEQ ID NO:52); N7A (SEQ ID NO:20); N7E (SEQ ID NO:22); N9B (SEQ ID NO:24) и N10D (SEQ ID NO:26) с Lcn2 (SEQ ID NO:44).

На фигуре 25 показано взаимное выравнивание последовательностей мутеинов H1-G1 (SEQ ID NO:50) и H1GV (SEQ ID NO:52) с их предшественником H1-G1 (SEQ ID NO:43) и Lcn2 дикого типа (SEQ ID NO:44).

На фигуре 26 показана специфическая связывающая активность варианта Lcn2 N7E для FN7B8 в ELISA. Микротитрационные планшеты покрывали FN7B8, FN789, BSA или овальбумином и инкубировали с серийными разведениями N7E с последующим детектированием с использованием конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и субстрата pNPP. Вариант Lcn2 N7E проявил незначительные сигналы в данном teste для FN789, BSA или овальбумина.

На фигуре 27 приведены результаты кинетического анализа в режиме реального времени вариантов Lcn2 N7A (А), N7E (Б), N9B (С) и N10D (Д), определенные на аппарате Bicore X. Единичный домен фибронектина ED-B присоединяли с использованием реакции сочетания аминов к сенсорному чипу CMD 200 m ($\Delta RU=180$) и очищенные варианты Lcn2 наносили в различных концентрациях. Анализированные сигналы показаны в виде кривых вместе с графиками. Кинетические константы, установленные по данным сенсограммам, приведены в таблице 3 (пример 24).

На фигуре 28 показана аналитическая эксклюзионная хроматография вариантов Lcn2 N7A (А), N10D (Б), N9B (С) и N7E (Д). Очищенный аффинной хроматографией белок наносили на колонку Superdex S75 10/30, уравновешенную TBS. Стрелки указывают эксклюзионный объем колонки (6,7 мл). Аналитическая гель-фильтрация давала большой пик каждого из четырех вариантов Lcn2. Средняя молекулярная масса белков равнялась 21,0 кДа для N7A, 21,3 кДа для N10D, 21,7 кДа для N9B и 21,7 кДа

для N7E, указывая на присутствие только мономерных форм.

Пример 1. Конструирование библиотеки мутантных Lcn2 в формате фагового дисплея

Готовили комбинаторную библиотеку вариантов Lcn2 на основе клонированной кДНК (Breustedt et al. (2006) *Biochim Biophys. Acta*, 1764, 161-173), которая несла

- 5 аминокислотные замены Cys87Ser для удаления одной непарной тиоловой боковой цепи (Goetz et al. (2000) *Biochemistry*, 39, 1935-1941), а также Gln28His для введения второго сайта рестрикции BstXI. Мутагенез и сборку полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в данной области в основном проводили согласно опубликованной стратегии (Beste et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1898-1903; Skerra, J. (2001) *Biotechnol.*, 74, 10, 257-275), используя одну реакцию амплификации с олигодезоксинуклеотидами (SEQ ID NO:1-10), как показано на фигуре 1. Олигодезоксинуклеотиды конструировали таким образом, что праймеры с последовательностями SEQ ID NO:1-4 соответствовали кодирующей цепи и несли вырожденные кодоны в аминокислотных положениях 36, 40, 41, 49, 52, или 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, или 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134
- 15 соответственно, в то время как праймеры с последовательностями SEQ ID NO:5-8 соответствовали некодирующей цепи и не содержали вырожденных кодонов или антикодонов. Два фланкирующих праймера с последовательностями SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10 использовали в избытке, и они служили для амплификации собранного 20 рандомизированного фрагмента гена. Все стадии ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Go-Taq Hot Start (Promega, Mannheim, Германия), как описано (Schlehuber et al., *J. Mol. Biol.*, (2000), 297, 1105-1120).

Олигодезоксинуклеотиды, которые не несли вырожденных кодонов, получали от Metabion с чистотой для ВЭЖХ (Munich, Германия). NNK-содержащие олигодезоксинуклеотиды получали обессоленными от того же поставщика и затем 25 очищали PAGE с мочевиной. Полученную ДНК-библиотеку расщепляли с использованием BstXI (Promega, Mannheim, Германия) и клонировали в фагемидный вектор phNGAL102 (SEQ ID NO:11), который основан на общем векторе экспрессии pASK111 (Vogt and Skerra, *J. Mol. Recognit.*, 2001, 14(1), 79-86), и кодирует слитый белок, состоящий из сигнального пептида OmpA, модифицированного зрелого Lcn2 с 30 последующим amber-кодоном и C-концевым фрагментом белка оболочки гена III нитчата бактериофага M13, т.е. аналогичный описанному для билин-связывающего белка (Beste et al., выше; Skerra, выше). После электропорации *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., *Biotechniques*, 1987, 5, 376-378) со смесью для лигирования, состоящей из 8,4 мкг 35 расщепленного продукта ПЦР и 94 мкг расщепленной ДНК-плазиды, получали 1×10^{10} трансформантов.

Альтернативно, клонированную синтетическую произвольную библиотеку Lcn2, приведенную на фигуре 2, получали от Sloning BioTechnology GmbH (Puchheim, Германия). Центральную генную кассету, фланкированную двумя сайтами рестрикции BstXI, амплифицировали ПЦР в 20 циклах с использованием соответствующих праймеров (SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10) и субклонировали в phNGAL108 (SEQ ID NO:12) с 40 получением библиотеки со сложностью, соответствующей $1,7 \times 10^{10}$ независимых трансформантов. phNGAL108, который основан на общем векторе экспрессии pASK75 (Skerra., *Gene*, 1994, 151, 131-135), кодирует слитый белок, состоящий из сигнального пептида OmpA, модифицированного зрелого Lcn2, Strep-метки с последующим amber-кодоном и полноразмерным белком оболочки гена III нитчата бактериофага M13 (Vogt and Skerra (2004) *ChemBioChem*, 5, 191-199).

Последующие стадии получения библиотеки проводили одинаково для обеих библиотек Lcn2. 100 мкл культуры, содержащей клетки, которые трансформировали

фазмидными векторами на основе pHNGAL102 или pHNGAL108, соответственно, кодирующих библиотеку мутеинов липокалина в виде слитых белков фага pIII, переносили в стерильную колбу Эрленмейера и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 160 об/мин в среде 2Y без селекционного давления антибиотиков. Перед инфицированием 5 фагом-хелпером VCS-M13 культуру разводили средой 2Y до оптической плотности, составляющей OD550 0,1, с добавлением соответствующего антибиотика и затем культивировали в идентичных условиях, пока значение OD550 не достигало 0,6. После инфицирования фагом-хелпером VCS-M13 (Agilent Technologies, La Jolla, США) при множественности инфекции, равной примерно 10, культуру встряхивали еще в течение 10 30 мин при 37°C, 100 об/мин. Затем температуру термостата снижали до 26°C и скорость шейкера вновь увеличивали до 160 об/мин, через 10 мин добавляли канамицин (70 мкг/мл) с последующей индукцией экспрессии гена добавлением ангидротетрациклина (ACROS Organics, Geel, Бельгия) в концентрации 25 мкг/мл (125 мкл стокового раствора с концентрацией 200 мкг/мл в диметилформамиде, ДМФА на литр культуры). Инкубацию 15 продолжали еще в течение 12-15 ч при 26°, 160 об/мин.

Клетки из полной культуры осаждали центрифугированием (30 мин, 18000 g, 4°C). Супернатант, содержащий фагемидные частицы, стерилизовали фильтрованием (0,45 мкм), смешивали с 1/4 объема 20% масс./об. ПЭГ 8000, 15% масс./об. NaCl и инкубировали на льду по меньшей мере в течение 2 ч. После центрифугирования (30 20 мин, 18000 g, 4°C) осажденные фагемидные частицы из 1 л культуры растворяли в 30 мл холодного BBS/E (200 мМ Na-бората, 160 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), содержащего 50 мМ бензамидина (Sigma) и Pefabloc 1 мкг/мл (Roth, Karlsruhe, Германия). Раствор инкубировали на льду в течение 1 ч. После осаждения нерастворенных компонентов центрифугированием (10 мин, 43000 g, 4°C), каждый супернатант 25 переносили в новый реакционный сосуд.

Добавление 1/4 объема 20% масс./об. ПЭГ 8000, 15% масс./об. NaCl и инкубация в течение 60 мин на льду служили для репликации фагемидных частиц до того, как фагемиды разливали на аликовтные порции и замораживали при -80°C для хранения. Для первого цикла отбора фагемиды оттаивали и центрифугировали (30 мин, 34000 g, 30 4°C), супернатант удаляли и осажденные фагемидные частицы растворяли и объединяли в общем объеме 400 мкл PBS, содержащем 50 мМ бензамидина. После инкубации в течение 30 мин на льду раствор центрифугировали (5 мин, 18500 g, 4°C) для удаления остаточных агрегатов и супернатант непосредственно использовали для отбора фаговым дисплеем.

35 Пример 2. Приготовление Аβ мишеней в различных форматах

Аβ40 пептид (SEQ ID NO:29), соответствующий аминокислотам 1-40 зрелой бета-амилоидной последовательности (Dodel et al. (2003) Lancet Neurology, 2, 215-220) получали в виде синтетического, лиофилизованного пептида с С-концевой группой биотина, присоединенной через лизиновый спейсер (Peptide Speciality Laboratory, Heidelberg, 40 Германия), или в форме без метки (W. M. Keck Laboratory, New Haven, США). Гомогенно мономерный Аβ40 получали растворением 5 мг пептида в 0,5 мл 1,1,1,3,3-гексафтор-2-пропанола (HFIP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) при комнатной температуре по меньшей мере в течение 0,5 ч. Затем HFIP выпаривали в SpeeVac концентраторе и Аβ40 растворяли в соответствующем объеме дистиллированной H₂O с последующей 45 обработкой ультразвуком (Bandelin, Sonorex, RK100, Германия) в холодной воде в течение 15 мин. После фильтрования на фильтре с размером пор 0,22 мкм (Spin-X Centrifuge Tube Filter, Corning, США) определяли концентрацию белка по поглощению при 280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции, равного 1490

$M^{-1}cm^{-1}$ (Gasteiger et al., (2003) ExPASy: the proteomics server for in depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res., 31, 3784-3788, <http://www.expasy.ch/tools/proparam.html>).

Более короткие варианты бета-амилоидного пептида, такие как N-концевой А β 1-11 пептид (SEQ ID NO:30) и центральный А β 16-27 пептид (SEQ ID NO:31) также получали от Peptide Speciality Laboratory. Более короткие варианты непосредственно растворяли в выбранном буфере без предварительной обработки HFIP.

В дополнении к синтетическим пептидам конструировали два вектора, кодирующих различные рекомбинантные А β слитые белки, для экспрессии в бактериях. Вначале конструировали слитый белок с мальтоза-связывающим белком (MBP, pMBP-His, SEQ ID NO:32) по методу Hortscansky et al. ((2005) Protein Sci., 14, 1753-1759) с получением pASK75-MBP-Abeta40 (SEQ ID NO:33). Затем конструировали pASK75-TrxAbeta28H6 (SEQ ID NO:34), в который вставляли аминокислоты 1-28 зрелого амилоидного пептида в петлю активного сайта тиоредоксина (Trx, pASK75-TrxH6, SEQ ID NO:35), по методу Moretto et al. ((2007) J. Biol. Chem., 282, 11436-11445).

Последующее клонирование А β 40 человека, несущего приращенный N-конец в рамке считывания с геном мальтоза-связывающего белка, давало новую плазмиду pASK75-MBP-А β 40, производное вектора pASK75 (Scerra, Gene, 1994, 151, 131-135). Данный вектор кодирует слитый белок из мальтоза-связывающего белка с последующей His₆-меткой для легкой очистки белка, сайта узнавания вируса гравировки табака etch (TEV) для расщепления слитого белка, а также последовательность А β 40 человека. Вектор находится под тесным контролем тетрациклиновой системы промотор/оператор и позволяет экспрессировать слитые белки с высокими выходами в цитоплазме *E. coli*.

Последовательность, кодирующую аминокислоты 1-28 зрелого амилоидного пептида (А β 28), вставляли в петлю тиоредоксина через уникальный сайт CрoI, находящийся в петле активного сайта тиоредоксина (нуклеотидные положения 99-105, соответствующие аминокислотным остаткам 34 и 35) с получением вектора pASK75-Trx-Abeta28H6.

Оба А β слитых белка, Trx-А β 28 и MBP-А β 40, а также неслитые контрольные белки Trx и MBP экспрессировали в *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene, 1985, 33, 103-119) при 37°C. Экспрессию белка индуцировали при оптической плотности OD₅₅₀, равной 0,5, добавлением 200 мкг/л ангидротетрациклина (aTc; Acros, Geel, Бельгия), растворенного в несодержащем воды диметилформамиде (ДМФА; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия), и постоянной инкубации со встряхиванием в течение 3 ч. Клетки собирали центрифугированием при 4200g при 4°C в течение 20 мин. Клеточный осадок после центрифугирования из 2 л культуры ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера (100 мМ Трис/HCl буфер, pH 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА) и полученную суспензию гомогенизировали трехкратным пропусканием через клеточный френч-пресс. Нерастворенное вещество удаляли центрифугированием (34500 g, 4°C, 20 мин), супернатант фильтровали на фильтре с размером пор 0,45 мкм (Filtpour S 0,45; Sarstedt, Nuembrecht, Германия) и использовали для аффинной хроматографии через His₆-метку каждого белка. После аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла (IMAC) слитые белки дополнительно очищали эксклюзионной хроматографией (SEC).

Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с использованием расчетных коэффициентов экстинкции 66350 $M^{-1}cm^{-1}$ для MBP (SEQ ID NO:32), 69330 $M^{-1}cm^{-1}$ для MBP-А β 40 (SEQ ID NO:33), 15470 $M^{-1}cm^{-1}$ для Trx-А β 28 (SEQ ID NO:34) и 13980 $M^{-1}cm^{-1}$ для Trx (SEQ ID NO:35) (Gasteiger et al., выше).

Для последующих опытов оба А β слитых белка, Trx-А β 28 и MBP-А β 40, а также

овальбумин (Ova; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия), Trx и МВР, которые служили в качестве контрольных белков, метили биотином или дигоксигенином (DIG) при молярном соотношении 2:1 (реагент для введения метки: белок-мишень).

Для этого N-гидроксисукцинимидный эфир D-биотиноил-ε-аминокапроновой кислоты

5 или N-гидроксисукцинимидный эфир дигоксигенин-3-O-метилкарбонил-ε-аминокапроновой кислоты (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия), растворенные в несодержащем воды диметилформамиде (ДМФА; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) или диметилсульфоксида (ДМСО; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия), добавляли в 2-кратном молярном соотношении к белку в PBS (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115

10 мМ NaCl, pH 7,4). Смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 1 М Трис/HCl буфер, pH 8,0 до конечной концентрации 10 мМ и инкубировали в течение 10 мин для насыщения оставшихся активных NHS-эфирных групп и меченные белки очищали SEC или на колонке Superdex 75 HR 10/30 (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Германия). Для применения в качестве мишени при отборе фаговым дисплеем Trx-Αβ28 15 вначале метили дигоксигенином в течение 1 ч, затем - блокировали неспаренные остатки Cys - добавляли 50-молярный избыток иodoацетамида (Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) с последующей инкубацией в течение 1 ч. Затем модифицированный белок обрабатывали 1 М Трис/HCl буфером, pH 8,0 и очищали, как описано выше.

Пример 3. Отбор мутеинов Lcn2 с аффинностью к Αβ40 пептиду фаговым дисплеем

20 Для каждого цикла пэннинга примерно 10¹² рекомбинантных фагемид в PBS (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4) блокировали 2% (масс./об.) BSA в PBS/T (PBS, содержащем 0,1% (об./об.) твина 20 [полиоксиэтиленсорбитан монолаурат; AppliChem, Darmstadt, Германия]) в течение 1 ч. Порции 50 и 25 мкл супензии покрытых 25 стрептавидином магнитных шариков (Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal Biotech, Invitrogen, Karlsruhe, Германия и Streptavidin Magnetic Particles; Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) по отдельности промывали PBS/T и блокировали 2% (масс./об.) BSA в течение 1 ч. 25 мкл блокированных шариков использовали для предварительной адсорбции блокированных фагемид для удаления фагемид, специфичных для шариков, и 50 мкл 30 использовали позднее для отборочного цикла.

Блокированные фагемиды инкубировали в течение 30 мин с 25 мкл отмытыми и блокированными магнитными шариками, покрытыми стрептавидином. Затем шарики опускали с помощью одной магнитной трубчатой подставки (Promega, Mannheim, Германия) в течение 2 мин, и супернатант, содержащий фагемиды, не связанные с 35 шариками, инкубировали в течение 1-2 ч с 100 нМ биотинилированного Αβ40 из примера 2 в общем объеме 400 мкл. Затем смесь фагемид и мишени-пептида инкубировали в течение 0,5 ч с 50 мкл блокированных шариков и затем опускали с помощью одной магнитной трубчатой подставки в течение 2 мин. Супернатант, содержащий несвязанные 40 фагемиды, отбрасывали. Комплексы мишень/фагемиды, связанные с магнитными шариками, промывали 10 раз 400 мкл PBS/T и затем связанные фагемиды элюировали при вращении в течение 10 мин 350 мкл смеси 0,1 М глицин/HCl, pH 2,2 с последующей немедленной нейтрализацией 55 мкл 0,5 М Трис-основания. Альтернативно элюирование проводили в денатурирующих условиях с 400 мкл 4 М мочевины в PBS в течение 30 мин с последующим разведением 1 мл PBS. Элюирование в денатурирующих условиях 45 проводили с использованием кислоты или мочевины для циклов отбора 1 и 2, в то время как элюирование в циклах 3 и 4 проводили в конкурентных условиях при добавлении 400 мкл 10 мкМ небиотинилированного Αβ40 к шарикам со связанными фагемидами и вращением в течение 1 ч. В целом проводили 4 цикла отбора.

Для амплификации элюированных фагемид культуры *E. coli* XL-1 Blue в фазе экспоненциального роста инфицировали в течение 30 мин при 37°C. Оставшиеся связанные с шариками фагемиды элюировали добавлением *E. coli* XL-1 Blue в фазе экспоненциального роста непосредственно к шарикам. После центрифугирования при 5 4°C бактериальный осадок ресуспендировали в подходящем объеме среды 2× YT (16 г/л триптона Bacto, 10 г/л дрожжевого экстракта Bacto, 5 г/л NaCl, pH 7,5), высевали на чашки с LB-Cam (10 г/л триптона Bacto, 5 г/л дрожжевого экстракта Bacto, 5 г/л NaCl, 15 г/л агара Bacto, 35 мг/л хлорамфеникола, pH 7,5) и инкубировали в течение 14-16 ч при 32°C. Затем клетки сокребали с чашек и использовали для высвобождения и 10 повторной амплификации рекомбинантных фагемид.

Скрининг обогащенных пулов фагемид проводили скринингом ELISA (пример 5) после четвертой стадии пэннинга.

Пример 4. Отбор мутеинов Lcn2 с аффинностью к слитому белку Trx-Αβ28 фаговым дисплеем

15 Для каждого цикла пэннинга примерно 10¹² рекомбинантных фагемид в PBS (4 мМ K₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4) вначале блокировали в течение 1 ч 2% (масс./об.) BSA в PBS/T (PBS, содержащем 0,1% (об./об.) твина 20) для циклов 1 и 2. Начиная с цикла отбора 3, в качестве блокирующего реагента использовали 2% (масс./ 20 об.) снятое молоко (Sucofin, TSI, Zeven, Германия). Порции 50 и 25 мкл суспензии покрытых анти-DIG-IgG магнитных шариков (Europa Bioproducts Ltd., Cambridge, Великобритания), промывали PBS/T и по отдельности блокировали 2% (масс./об.) BSA в течение 1 ч или снятым молоком.

Блокированные фагемиды инкубировали в течение 30 мин с 25 мкл отмытыми и 25 блокированными магнитными шариками, покрытыми анти-DIG-IgG. Затем шарики опускали с помощью одной магнитной трубчатой подставки (Promega, Mannheim, Германия) в течение 2 мин и супернатант, содержащий фагемиды, не связанные с шариками, инкубировали в течение 30 мин с 15 мКМ немеченого Trx из примера 2 для удаления фагемид, специфичных для Trx. Затем добавляли дигоксигенированный и 30 карбоксиметилированный Trx-Αβ28 из примера 2 до конечной концентрации 100 нМ и смесь инкубировали в течение 1-2 ч в общем объеме 400 мкл. Затем смесь фагемид, Trx и Trx-Αβ28 инкубировали с высушенными, блокированными шариками из порции в 50 мкл в течение 0,5 ч. Затем шарики опускали с помощью одной магнитной трубчатой подставки в течение 2 мин. Супернатант, содержащий несвязанные фагемиды, отбрасывали. Магнитные шарики со связанными фагемидами промывали 10 раз 500 мкл PBS/T. Затем связанные фагемиды элюировали при вращении в течение 30 мин 400 мкл 4 М мочевины в PBS в течение 30 мин с последующим разведением 1 мл PBS. В 35 целом проводили 6 циклов отбора.

Для амплификации элюированных фагемид культуры *E. coli* XL-1 Blue в фазе экспоненциального роста инфицировали в течение 30 мин при 37°C. Оставшиеся 40 связанные с шариками фагемиды элюировали добавлением *E. coli* XL-1 Blue в фазе экспоненциального роста непосредственно к шарикам. После центрифугирования при 4°C бактериальный осадок ресуспендировали в подходящем объеме среды 2× YT (16 г/л триптона Bacto, 10 г/л дрожжевого экстракта Bacto, 5 г/л NaCl, pH 7,5), высевали на чашки с LB-Cam (10 г/л триптона Bacto, 5 г/л дрожжевого экстракта Bacto, 5 г/л NaCl, 15 г/л агара Bacto, 35 мг/л хлорамфеникола, pH 7,5) и инкубировали в течение 14-16 ч при 32°C. Затем клетки сокребали с чашек и использовали для высвобождения и 45 повторной амплификации рекомбинантных фагемид.

Скрининг обогащенных пулов фагемид проводили скрининговым анализом колоний

с фильтром-сэндвичем (пример 6) после шестой стадии пэннинга.

Пример 5. Идентификация мутеинов Lcn2, специфичных для Аβ, скрининговым ELISA

После четырех циклов отбора фагемид с Аβ40, как описано в примере 3, обогащенный пул мутеинов Lcn2 субклонировали в pHNGAL98 (SEQ ID NO:27), использованный для трансформации штамма TG1-F⁻ E. coli (производное E. coli K12 TG1 (Kim et al. (2009) J. Am. Chem. Soc., 131, 3565-3576) и подвергали скрининговым ELISA.

Для данной цели единичные колонии из обогащенного пула культивировали в 96-луночных планшетах (мультилуночный планшет 96 с круглым дном с крышкой; Sarstedt, Nuembrecht, Германия) в 10 мкл среды TB-Amp (12 г/л триптона Bacto, 24 г/л дрожжевого экстракта Bacto, 55 мМ глицерина, 17 мМ KH₂PO₄, 72 мМ K₂HPO₄, 100 мг/л ампциллина) при 37°C в течение ночи. В новый планшет вносили 100 мкл среды TB-Amp с ночных культурами и культивировали до фазы экспоненциального роста при 22°C или 37°C. Экспрессию мутеинов Lcn2 в перiplазме индуцировали 20 мкл 0,2 мкг/мл ангидротетраклина (aTc; Acros, Geel, Бельгия), растворенного в несодержащем воде диметилформамиде (ДМФА; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) в течение 13-17 ч при 20°C. Перiplазматические белки высвобождали 40 мкл BBS (800 мМ Na-бората, 640 мМ NaCl, 8 мМ ЭДТА, pH 8,0), содержащем 1 мг/мл лизоцима при инкубации в течение 1 ч при 4°C и с встряхиванием при 750 об/мин (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Германия). После блокирования 40 мкл 10% (масс./об.) BSA в PBS/T (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4 с 0,05% (об./об.) твина 20) в течение 1 ч при 4°C и 750 об/мин планшеты центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 3000 g. Супернатант использовали для ELISA.

Для селективного захвата мутеинов Lcn2, содержащих С-концевую Strep-метку II (Schidt and Skerra, Nat. Protocol., 2007, 2, 1528-1535), 96-луночный микротитрационный планшет MaxiSorp из полистирола (Nunc, Langenselbold, Германия) покрывали 10 мкг/мл StrepMAB-Imm (IBA, Gottingen, Германия) в PBS течение ночи при 4°C и блокировали 3% (масс./об.) BSA в PBS/T (PBS с 0,1% (об./об.) твина 20) при комнатной температуре в течение 1 ч. После 3 стадий отмычки PBS/T, 120 мкл клеточного экстракта из вышеуказанной смеси вносили в лунку инкубировали в течение 1,5 ч при 300 об/мин. После отмычки биотинилированный Аβ40 из примера 2 вносили в концентрации 0,5 мкМ и инкубировали в течение 1 ч. В качестве контроля использовали биотинилированный Ova вместо Аβ40. Лунки вновь промывали и биотинилированный пептид или белок детектировали с использованием 50 мкл конъюгата ExtrAvidin/AP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) в разведении 1:5000 в PBS/T в течение 1 ч с последующим развитием сигнала в присутствии 100 мкл 0,5 мг/мл п-нитрофенилфосфата (AppliChem, Darmstadt, Германия) в 100 мМ Трис/HCl буфера, pH 8,8, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ в течение 1 ч. Определяли поглощение при длине волны 405 нм на ридере SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, США).

Альтернативно 0,5 мкМ небиотинилированного Аβ40 из примера 2 непосредственно иммобилизовали на 96-луночном микротитрационном планшете из полистирола MaxiSorp (Nunc, Langenselbold, Германия) с последующим блокированием. После инкубации с клеточным экстрактом, как описано выше, и отмычки связанные мутеины Lcn2 детектировали по Strep-метке II с использованием разведения 1:1500 конъюгата стрептактин/AP (IBA, Gottingen, Германия). В качестве контроля 0,5 мкМ Ova иммобилизовали на планшете для постановки ELISA.

Пример 6. Идентификация мутеинов Lcn2, специфичных для Trx-Аβ28 с

использованием скринингового анализа колоний с фильтром-сэндвичем

После шести циклов отбора фагемид с Trx- $\text{A}\beta$ 28, как описано в примере 4, мутированную кассету гена Lcn2 субклонировали с помощью BstXI (Fermentas, St. Leon-Rot, Германия) в плазмиду phNGAL124 (SEQ ID NO:42), которая кодирует слитый белок из сигнального пептида OmpA, Lcn2-кодирующей области с C-концевой Strep-меткой II (Schmidt and Skerra (2007) Nat. Protoc., 2, 1528-1535), и последующего amber стоп-кодона, а также гена альбумин-связывающей области (ABD) из стрептококкового альбумин-связывающего белка G (Schlehuber et al., J. Mol. Biol., 2000, 297, 1105-1120).

Затем проводили скрининговый анализ колоний с фильтром-сэндвичем, посредством

которого из колоний высвобождались слитые белки Lcn2-ABD, высеванные на гидрофильную фильтровальную мембрану (PVDF типа GVWP, 0,22 мкм; Millipore, Schwalbach, Германия) и функционально захватывались низлежащей второй мембраной (Immobilon-P, 0,45 мкм; Millipore, Schwalbach, Германия), покрытой сывороточным альбумином человека (HSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия), следуя протоколу, подробно описанному Schlehuber et al., J. Mol. Biol., 2000, 297, 1105-1120). Эту мембрану зондировали 100 нМ DIG-меченного Trx- $\text{A}\beta$ 28 из примера 2 в PBS/T в течение 1 ч. Коньюгат связанный мишени детектировали с использованием коньюгата анти-DIG Fab/щелочная фосфатаза (AP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) с последующим проведением хромогенной реакции с 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом, солью 4-толуидина (BCIP; AppliChem, Darmstadt, Германия) и нитротетразолием синим (NBT; AppliChem, Darmstadt, Германия). Имея идентифицированные пятна с интенсивными окрашенными сигналами на этой мембране, собирали соответствующие колонии с первого фильтра и размножали рядом в сравнении во вторичном скрининге колоний.

Для данной цели выделенные бактерии, а также бактерии, экспрессирующие

контрольные мутеины Lcn2, такие как липокалин дикого типа, наносили на свежую гидрофильную мембрану и культивировали до того, как небольшие колонии становились видимыми. Связывание тестировали для DIG-меченного $\text{A}\beta$ 28, а также для DIG-меченных контрольных белков Trx и Ova. Мутеины Lcn2, которые давали специфические сигналы для мишени Trx- $\text{A}\beta$ 28 в данном вторичном скрининге, дополнительно размножали для выделения плазмиды и последующего анализа последовательности.

Пример 7. Продукция в растворимом виде и очистка мутеинов Lcn2, специфичных для $\text{A}\beta$ и ED-B

Рекомбинантный Lcn2 и его мутеины получали секрецией в *E. coli* BL21 (Studer and Moffat, J. Mol. Biol., 1986, 189, 113-130), *E. coli* W3110 (Bachmann, Microbiol. Rev., 1990, 54, 130-197), *E. coli* JM83 (Yanish-Perron et al., Gene, 1985, 33, 103-119) или

штамм TG1-F⁻ *E. coli* (производное *E. coli* K12 TG1 [Kim et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 3565-3576], который освобождали от его эпизомы с использованием акридинового оранжевого). Для экспрессии белка в растворимом виде использовали плазмиду phNGAL98 (SEQ ID NO:27), кодирующую слитый белок из сигнального пептида OmpA со зрелым белком Lcn2 (SEQ ID NO:28) и C-концевой Strep-меткой II, посредством чего плазмида несла два несовместимых сайта рестрикции BstXI для ненаправленного субклонирования мутированной генной кассеты.

Растворимый белок очищали аффинной хроматографией с использованием Strep-метки II (Schmidt and Skerra, Natl. Proc., 2007, 2, 1528-1535) с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) на колонке Superdex 75 HR 10/30 (Amerhsham-Pharmacia, Freiburg, Германия) с использованием PBS буфера. Чистоту белка проверяли с использованием SDS-PAGE (Fling and Gregerson, Anal. Biochem, 1986, 155, 83-88). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с использованием расчетных коэффициентов

экстинкции $31400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Lcn2 дикого типа (SEQ ID NO:44) и $26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для А β -специфических мутеинов H1-G1 (SEQ ID NO:43), $24410 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для S1-A4 (SEQ ID NO:38) и $26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для US7 (SEQ ID NO:41). Расчетные коэффициенты экстинкции для 5 ED-B-специфических мутеинов Lcn2 составили $37930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для мутеина N7A (SEQ ID NO:20), $22920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для N7E (SEQ ID NO:22), $21430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для N9B (SEQ ID NO:24) и $39420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для N10D (SEQ ID NO:26) (Gasteiger et al., выше).

Пример 8. Определение связывающей активности для различных А β мишней в опытах

10 с ELISA

Для селективного захвата мутеинов Lcn2, содержащих С-концевую Strep-метку II (Schidt and Skerra (2007) Nat. Protocol., 2, 1528-1535), 96-луночный микротитрационный планшет MaxiSorp из полистирола (Nunc, Langenselbold, Германия) покрывали 10 мкг/мл StrepMAB-Immo (IBA, Gottingen, Германия) в PBS в течение ночи при 4°C и 15 блокировали 3% (масс./об.) BSA в PBS/T при комнатной температуре в течение 1 ч. После 3 стадий отмычки PBS/T, 50 мкл 1 мкМ раствора очищенных мутеинов Lcn2 из примера 7 вносили во все лунки на 1 ч. После отмычки по 50 мкл серии разведений биотинилированных мишней А β 40, MBP-А β 40 или Trx-А β 28 из примера 2 вносили и инкубировали в течение 1 ч, при этом биотинилированные формы Ova, MBP и Trx из 20 примера 2 служили в качестве отрицательных контрольных белков. Лунки вновь промывали и связанный коньюгат детектировали с 50 мкл коньюгата ExtrAvidin/AP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) в разведении 1:5000 в PBS/T в течение 1 ч с 25 последующим развитием сигнала в присутствии 100 мкл 0,5 мг/мл п-нитрофенилфосфата (AppliChem, Darmstadt, Германия) в 100 мМ Трис/HCl буфера, pH 8,8, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Поглощение во времени $\Delta A/\Delta t$ определяли при длине волны 405 нм на ридере SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, США) и строили график с использованием 30 программного обеспечения KaleidaGraph (программное обеспечение Synergy, Reading, PA) по уравнению:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \times [L]_{\text{tot}} / (K_D + [L]_{\text{tot}})$$

где [L]_{tot} представляет концентрацию использованного коньюгата лиганда, и K_D 35 представляет константу диссоциации (Voss and Skerra, Protein Eng., 1997, 10, 975-982).

Альтернативно, для «прямой» ELISA 2 мкМ немеченой мишени А β 40 из примера 2 адсорбировали на 96-луночном микротитрационном планшете MaxiSorp из полистирола (Nunc, Langenselbold, Германия) и инкубировали с очищенным мутеином Lcn2, который 40 детектировали по Strep-метке II с использованием разведения 1:1500 коньюгата стрептавидин/AP (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, Великобритания). В качестве контроля 2 мкМ MBP из примера 2 адсорбировали на планшет для постановки ELISA. Определяли поглощение при длине волны 405 нм на ридере SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, Великобритания).

Альтернативно «конкурентный» ELISA проводили аналогичным путем, как ELISA с «иммунным захватом», который описан выше. Вновь, после иммобилизации StrepMAB-Immo и отмычки 50 мкл 1 мкМ раствора очищенного мутеина Lcn2 из примера 7 вносили 45 во все лунки на 1 ч. После отмычки биотинилированную мишень Trx-А β 28 из примера 2 вносили в постоянной концентрации, составляющей 5 нМ (для S1-A4) или 40 нМ (для US7), в присутствии различных концентраций свободного немеченой мишени Trx-А β 28 в качестве конкурента. Начиная с 100-кратного избытка, концентрацию конкурента снижали в 3 раза на каждой стадии. В данном случае график строили с использованием сигмоидального уравнения:

$$\Delta A = (\Delta A_{\max} - \Delta A_{\min}) / (1 + [L]_{\text{tot}}^{\text{свобод}} / (K_D)^P) + \Delta A_{\min}$$

с наклоном кривой P (коэффициент Хилла) в качестве дополнительного параметра.

В последующей таблице 1 обобщены значения K_D , определенные ELISA в различных

5 форматах, а также с использованием поверхностного плазмонного резонанса (см. пример 9).

Таблица 1

	K _D [нМ]		
	S1-A4	US7	H1-G1
10 А β 40 (ELISA с иммунным захватом, см. фиг.5)	2,7±0,1	6,8±0,4	16,2±1,9
Trx-А β 28 (ELISA с иммунным захватом, см. фиг.5)	1,9±0,1	2,4±0,2	24,3±3,8
MBP-А β 40 (ELISA с иммунным захватом, см. фиг.5)	4,7±0,1	11,4±0,6	n.d.
А β 16-27 (ELISA с иммунным захватом ELISA, см. фиг.5)	2,6±0,3	2,1±0,1	n.d.
Trx-А β 28 (Прямой ELISA, см. фиг.6)	16,2±4,4	9,6±1,7	290±62
15 MBP-А β 40 (Прямой ELISA, см. фиг.6)	149±31	49,7±8,1	n.d.
Trx-А β 28 (Конкурентный ELISA, см. фиг.7)	21,7±1,5	76,9±4,5	n.d.
MBP-А β 40 (SPR, см. фиг.8, Пример 9)	1,7	1,3	n.d.

Пример 9. Определение связывающей активности для А β с использованием поверхностного плазмонного резонанса

Анализ мутеинов Lcn2 в режиме реального времени проводили в системе Biacore X

20 (Biacore, Uppsala, Швеция) с использованием PBS/T (PBS, содержащий 0,005% (об./об.) твина 20) в качестве буфера для анализа. Раствор MBP-А β 40 с концентрацией 50 мкг/мл из примера 2 в 10 мМ Na-ацетате с pH 4,5 иммобилизовали на чипе CMD 200I (Xantec, Dusseldorf, Германия) с использованием обычной реакции сочетания аминов с получением плотности лиганда, равной 1455 резонансных единиц (RU). Очищенные мутеины Lcn2 25 S1-A4 и US7 из примера 7 наносили в концентрациях в пределах от 2 нМ до 125 нМ со скоростью потока 10 мкл/мин. Сенсограммы корректировали вычитанием соответствующих сигналов, определенных для контрольного канала, который активировали и блокировали этаноламином. Кинетическую оценку данных проводили 30 при построении графика с использованием программного обеспечения BIAevalution V 3.0 (Karlsson et al. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229-240). Во время данной стадии в общем определяли значения k_{on} и k_{off} , в то время как различие в максимальном отклике R_{max} получали локально для каждой кривой.

Пример 10. Определение эпитопа для А β с использованием эпитопного картирования на мембране SPOT

35 Мембрану SPOT (Amino-PEG500-UC540 sheet, 100×150 мм, Intavis, Koln, Германия) для картирования эпитопа А β в мутеинах Lcn2 S1-A4 и US7 готовили автоматическим методом, как описано Frank, J. Immunol. Methods, 2002, 262, 13-26) с использованием аппарата MultiPep (Intavis, Koln, Германия), и активированные аминокислоты получали от того же поставщика. Аминокислотную последовательность А β 40 (SEQ ID NO:29) 40 синтезировали на мембране в виде последовательных гексамеров, декамеров и пентадекамеров, каждый с дислокацией 1 аминокислоты, покрывая, таким образом, полную последовательность. С-концы данных пептидов ковалентно связывались с мембраной, в то время как N-концы подвергались ацетилированию. Иммобилизованная 45 Strep-метка II служила в качестве положительного контроля для метода детектирования.

Снятие защиты с боковых цепей проводили 95% трифторуксусной кислотой (Sigma-Aldrich, Stennheim, Германия), 3% триизопропилсиланом (Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) и 2% дистиллированной H₂O в течение 2 ч. После четырехкратной отмычки

мембранны дихлорметаном (Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия), дважды диметилформамицом (Sigma-Aldrich, Stennheim, Германия) и дважды этанолом мембранны высушивали на воздухе.

Перед использованием мембранны один раз промывали этанолом, 3 раза - PBS (4 мМ

5 KH_2PO_4 , 16 мМ Na_2HPO_4 , 115 мМ NaCl , pH 7,4) и блокировали 3% (масс./об.) BSA в PBS/T (PBS, содержащий 0,1% (об./об.) твина 20) в течение 1 ч. После трехкратного промывания PBS/T мембранны инкубировали с мутеином Lcn2 S1-A4 (50 нМ), US7 (100 нМ) или Lcn2 дикого типа (100 нМ) в PBS/T в течение 1 ч и промывали 3 раза PBS/T. Затем мембранны инкубировали с конъюгатом стрептавидин/AP в разведении 1:1500 10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Великобритания) в PBS/T в течение 1 ч для детектирования белка посредством Strep-метки II. Затем мембранны промывали 3 раза PBS/T и один раз буфером AP (100 мМ Трис/HCl, pH 8,8, 100 мМ NaCl , 5 мМ MgCl_2) с последующей постановкой хромогенной реакции с 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом, солью 4-толуидина (BCIP; AppliChem, Darmstadt, Германия) и нитротетразолием синим (NBT; AppliChem, Darmstadt, Германия) в буфере AP, как описано Schlehuber et al., J. Mol. Biol. (2000) 297, 1105-1120).

Сравнение мембранны, инкубированных с S1-A4 и Lcn2 дикого типа, соответственно, давало отчетливые пятна, которые появлялись при инкубации мембранны с S1-A4, но не с Lcn2 дикого типа. Оказалось, что с пентадекамерными фрагментами $\text{A}\beta$ 40 мотив 20 LVFFAED был важен для связывания S1-A4. С более короткими гексамерными и декамерными пептидными последовательностями наблюдали связывание S1-A4C с минимальными мотивами VFFAED и FFAEDV. Мутеин Lcn2 US7 показал аналогичный эпитопный профиль в данном тесте.

25 **Пример 11. Функциональный анализ мутеинов Lcn2 с аффинностью для $\text{A}\beta$ в тесте агрегации ThT**

Солубилизованный и гомогенно мономерный, небиотинилированный $\text{A}\beta$ 40 из Примера 2 подвергали анализу в тесте агрегации тиофлавина Т в присутствии или отсутствии различных мутеинов Lcn2. Тиофлавин Т (ThT; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) специфически связывается с богатыми β -складками амилоидными фибриллами и олигомерными предшественниками, но не с мономерным $\text{A}\beta$ пептидом, что выражается в повышении флуоресценции ThT (Khurana et al., J. Struc. Biol., 2005, 151, 229-238).

Для этого ThT растворяли в дистиллированной H_2O в концентрации 1 мМ. Рабочий раствор готовили разведением 1 мМ стокового раствора до конечной концентрации 5 мкМ с использованием 5 мМ глицина/NaOH, pH 8,5. 500 мкл смеси 1:1 из 200 мкМ $\text{A}\beta$ 40 35 в дистиллированной H_2O (растворенный, как в примере 2) и 20 мкМ мутеина Lcn2 из примера 7 в PBS инкубировали при 37°C без вращения. Перед каждым определением флуоресценции на различные временные точки пробы быстро обрабатывали на Vortex 10 раз и 20 мкл соответствующей пробы смешивали с 180 мкл рабочего раствора ThT. 40 Интенсивность флуоресценции определяли при длине волны экстинкции 450 нм и волне эмиссии 482 нм в люминесцентном спектрофотометре (LS 50 B, Perkin Elmer, Waltham, США).

Как показано на фигуре 9, мутеин Lcn2 US7 вызывал сильное ингибиование агрегации $\text{A}\beta$ 40 в соотношении 1:10.

45 **Пример 12. Получение фрагментов рекомбинантного фибронектина, содержащих экстрадомен B (ED-B)**

Три различных рекомбинантных фрагмента фибронектина человека использовали в качестве мишеней для отбора: один экстрадомен B (называемый ED-B; Zardi et al.

(1987) EMBO Journal, 6, 2337-2342), тот же домен в контексте его смежных доменов 7 и 8 (относится в настоящем документе к FN7B8) и FN7B89, содержащий обычные домены 7, 8 и 9, таким образом, с отсутствием ED-B (Carnemolla et al. (1996) Int. J. Cancer 68, 397-405; Leahy et al. (1994) Proteins, 19, 48-54).

5 Кодирующие последовательности FN7B8, FN7B89 и ED-B клонировали в вектор pASK75 (Skerra (1994) Gene, 151, 131-135) и его производное pASG-IBA-33 (IBA, Gottingen, Германия) с получением pASK75-FN7B8 (SEQ ID NO:13), pASK75-FN789 (SEQ ID NO: 17) и pASG-IBA-33-EDB (SEQ ID NO:15), соответственно. Все конструкции содержали His₆-метку на карбоксиконце для очистки аффинной хроматографией с
10 иммобилизованным ионом металлом (IMAC) и получали в виде растворимых белков в цитоплазме *E. coli* TG1/F [производное *E. coli* K12 TG1 9 (Gibson (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome, Cambridge University, Англия] или BL21 (Studier and Moffatt (1986) 189, 113-130). Следовательно, культивировали 2 л культуры *E. coli*, несущей экспрессионную плазмиду, до фазы серединного логарифмического роста при 37°C в
15 среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. После добавления 200 мкг/л ангидротетрациклина (Acros, Geel, Бельгия) культивирование продолжали течение 5-7 ч при 37°C. Клетки концентрировали центрифугированием, ресуспенсировали в 35 мл охлажденного на льду буфера для хроматографии (40 мМ Hepes/NaOH, 1 М NaCl, pH 7,5) и лизировали обработкой ультразвуком (S250D, Branson, Danbury CT, США).

20 Проколол выделения, описанный ниже, был одинаковым для всех трех рекомбинантных фрагментов фибронектина. Очищенный лизат наносили на колонку с Zn²⁺/IDA-сепарозой (GE Healthcare, Munich, Германия), заряженной 10 мМ ZnSO₄ и уравновешивали 40 мМ Hepes/NaOH, 1 М NaCl, pH 7,5). Связанный белок элюировали
25 пологим градиентом от 0 до 300 мМ имидазола (pH доводили HCl) в буфере для хроматографии. Фракции, содержащие рекомбинантный белок, идентифицировали с помощью SDS-PAGE, смешанным с ЭДТА, до конечной концентрации 1 мМ и диализовали против 20 мМ Hepes/NaOH, pH 7,4 в течение ночи. Затем белок наносили на колонку для ионообменной хроматографии (Resource Q, GE Healthcare, Munich, Германия), уравновешенной 20 или 40 мМ Hepes/NaOH, pH 7,4. Для элюирования
30 связанных фрагментов фибронектина использовали градиент от 0 до 300 NaCl.

Наконец, чистоту белков подтверждали анализом SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографией. Для определения концентрации белков по поглощению при длине волн 280 нм использовали следующие расчетные коэффициенты экстинкции (Gasteiger
35 et al. (2003) Nuclei Acids Res., 31, 3784-3788): 31400 M⁻¹cm⁻¹ для FN7B8, 28420 M⁻¹cm⁻¹ для FN789 и 11460 M⁻¹cm⁻¹ для ED-B. Как правило, получали примерно 10-20 мг на 2 л культуры в колбе для встряхивания. Очищенные белки хранили при 4°C и использовали для всех опытов.

40 Очищенные фрагменты фибронектина метили дигоксигенином, с использованием избытка (молярное соотношение 4:1) N-гидроксисукцинимидного эфира дигоксигенин-3-О-метилкарбонил-ε-аминокапроновой кислоты (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) в течение 1 ч при комнатной температуре, следуя указаниям изготовителя. Для удаления свободного дигоксигенина раствор белка наносили на колонку для обессоливания PD-10 (GE Healthcare, Munich, Германия), уравновешенную 40 мМ Трис/HCl буфер, 115 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7,5. Эффективность дигоксигенирования и целостность белка определяли SDS-PAGE, ESI масс-спектрометрией или дот-блотом с окрашиванием анти-дигоксигенин-Ар, Fab-фрагмент (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия).

45 Пример 13. Отбор вариантов Lcn2 с аффинностью к ED-B фаговым дисплеем

В целом проводили четыре цикла отбора фагемидным дисплеем с использованием 5 рандомизированной фагемидной библиотеки Lcn2, основанной на коллекции синтетических генов, исходно синтезированной Sloning BioTechnology GmbH, как описано в примере 1. Для первого цикла отбора примерно 5×10^{12} рекомбинантных фагемид, растворенных в 300 мкл TBS/E (40 мМ Нерес/HCl, 115 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4) с добавлением 50 мМ бензамидина, блокировали в течение 30 мин 100 мкл 8% (масс./об.) BSA (Sigma-Aldrich, Munich, Германия) в TBS, содержащем 0,4% (об./об.) твина 20 [полиоксиэтиленсорбитана монолаурата; AppliChem, Darmstadt, Германия]. Затем данный раствор инкубировали в течение 1 ч с магнитными шариками с анти-DIG-IgG (Europa Bioproducts, Cambridge, Великобритания), которые блокировали в течение 1 ч 2% (масс./об.) BSA в TBS/T (TBS, содержащем 0,1% (об./об.) твина 20) и заряжали 400 мкл 0,1 мкМ дигоксигенин-меченым рекомбинантным FN7B8 (см. пример 12).

После сбора шариков с помощью магнита и отбрасывания супернатанта проводили 10 стадий отмычки с TBS/T и оставшиеся связанные фагемиды вначале элюировали 400 мкл 0,1 М триэтиламина (рН не доводили) в течение 6 мин с последующим вторым элюированием 350 мкл 0,1 М глицином/HCl, рН 2,2 в течение 8 мин. Элюаты собирали и сразу же нейтрализовали соответствующим количеством 2 М уксусной кислоты или 50 мкл 0,5% Трис-основания, соответственно, объединяли и использовали для заражения E. coli XL1-Blue, которые находились в фазе экспоненциального роста. Фагемиды 15 титровали и повторно амплифицировали до следующего цикла пэннинга, следуя опубликованным протоколам (Beste et al. (1999) PNAS, 96, 1898-1903; Schlehuber et al. 20 (2000) J. Mol. Biol., 297, 1109-1120).

Для второго раунда отбора использовали примерно 2×10^{12} амплифицированных фагемид и элюирование связанных фагемид проводили конкуренцией с 400 мкл 231 нмоль/мл свободного рекомбинантного ED-B в течение 75 мин.

В третьем и четвертом циклах отбора примерно 2×10^{12} амплифицированных фагемид инкубировали примерно в течение 1 ч с 100 нМ меченым дигоксигенином FN7B8. Затем 30 комплексы фагемид-антитела сажали на магнитные шарики с анти-DIG-IgG в течение 20 мин. После отмычки шариков десять раз TBS/T связанные фагемиды элюировали конкуренцией с 400 мкл свободного рекомбинантного ED-B в концентрации 140-231 нмоль/мл в течение 75 мин при комнатной температуре.

Пример 14. Отбор вариантов Lcn2 с аффинностью к ED-B скринингом ELISA

Обогащение мутеинами Lcn2 в результате отбора, описанного в примере 13, которые 35 специфически связываются с белком-мишенью ED-B, проводили скрининговым ELISA. С использованием объединенного плазмидного препарата с последней стадии пэннинга кассету мутантных генов субклонировали через BstXI в экспрессионную плазмиду phNGAL98, которая кодирует слитый белок из сигнального пептида OmpA для продукции 40 в периплазме E. coli и кодирующей области Lcn2 с C-концевой Strep-меткой II (Schimdt and Skerra (2007) Nat. Protoc., 2, 1528-1535). Экспрессию отдельных мутеинов Lcn2 в растворенном виде в 96-луночных планшетах проводили следующим образом: 100 мкл среды TB (Tartof and Hobbs (1987) Bethesda Research Laboratory Focus, 9, 12), содержащей 100 мкг/мл ампциллина, инокулировали одной, произвольно взятой колонией и инкубировали в течение 5 ч при 37°C со встряхиванием (500-800 об/мин; Thermomixer 45 comfort; Eppendorf, Hamburg, Германия). Каждый клон высевали в 100 мкл свежей среды с 10 мкл этой культуры и инкубировали 1-2 ч при 37°C со встряхиванием с последующим снижением температуры до 22°C. После дополнительной инкубации в течение 2-4 ч экспрессию мутеинов Lcn2 индуцировали в клетках, находящихся в фазе

экспоненциального роста, в течение 12-14 ч добавлением 0,2 мкг/мл ангидротетраклина (Acros, Geel, Бельгия). Высвобождение белков в периплазму проводили при добавлении 4 мкл 2×BBS (0,2 М борат/NaOH, 160 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0), содержащем 1 мг/мл лизоцима (Roche Diagnostics, Mannheim, Бельгия) в течение 5 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Лизаты блокировали 40 мл 10% BSA (масс./об.) BSA (AppliChem, Darmstadt, Германия) в TBS и 0,5% твине 20 в течение 1 ч и клеточный дебрис удаляли из сырого экстракта центрифугированием в течение 10 мин.

Для адсорбции FN7B8 или FN7B89 на поверхности 96-луночного планшета Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Германия) 50 мкл раствора белка с концентрацией 100 мкг/мл в TBS вносили в лунку и инкубировали в течение ночи при 10 4°C. После трех стадий отмычки с TBS/T лунки блокировали 2% (масс./об.) BSA в TBS/T в течение 3 ч при комнатной температуре и последовательно промывали перед экспозицией сырого экстракта из *E. coli*. Для постановки ELISA 50 мкл осветленного лизата вносили в каждую лунку, инкубировали в течение 1 ч с последующим 15 трехкратным промыванием TBS/T. Связанные мутеины Lcn2 детектировали с использованием конъюгата стрептавидин/щелочная фосфатаза (1:1500 в TBS/T; GE Healthcare, Munich, Германия) с использованием субстрата 4-нитрофенилфосфата (pNpp, 0,5 мг/мл; AppliChem GmbH, Darmstadt, Германия) в 0,1 Трис/HCl буфере, 0,1 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, pH 8,8 (см. пример 16).

20 В результате проведения скринингового ELISA идентифицировали четыре клона. В последующих экспериментах (см. примеры 16-18) было установлено, что данные четыре мутеина Lcn2 обладают специфической активностью связывания с FN7B8 в ELISA, SPR-анализе и при иммунофлуоресцентной микроскопии положительных на ED-B клеток злокачественной опухоли ободочной кишки человека. Данные мутеины Lcn2 обозначали, 25 как N7A (SEQ ID NO:20), N7E (SEQ ID NO:22), N9B (SEQ ID NO:24) и N10D (SEQ ID NO: 26).

Пример 15. Получение растворимого белка и выделение Lcn2 и его вариантов

Подробное описание см. в примере 7.

Пример 16. Определение связывающей активности для ED-B в ELISA

30 Для адсорбции FN7B8 или FN7B89 на поверхности 96-луночного планшета Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Германия) 50 мкл раствора белка с концентрацией 100 мкг/мл в TBS/E вносили в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Кроме того, для включения контрольных белков в пустые лунки вносили 120 мкл 2% (масс./об.) BSA (AppliChem, Darmstadt, Германия) 35 в TBS/E. После трех стадий отмычки лунки блокировали 120 мкл 2% (масс./об.) BSA (AppliChem, Darmstadt, Германия) в TBS/ET в течение 2 ч при комнатной температуре и последовательно промывали перед внесением 50 мкл серии разведений очищенного мутеина Lcn2 и инкубировали в течение 1 ч. Лунки вновь промывали и связанные мутеины Lcn2 детектировали с использованием 50 мкл конъюгата стрептавидин/щелочная фосфатаза (GE Healthcare, Munich, Германия) в разведении 1:1500 в TBS/T в 40 течение 1 ч с последующим развитием сигнала в присутствии 50 мкл 0,5 мг/мл 4-нитрофенилфосфата в 100 мМ Трис/HCl буфера, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, pH 8,8.

Поглощение во времени $\Delta A/\Delta t$ определяли при длине волны 405 нм на ридере SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) и строили график с использованием программного обеспечения KaleidaGraph (программное обеспечение Synergy, Reading, PA) по уравнению:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \times [L]_{\text{tot}} / (K_D + [L]_{\text{tot}})$$

где [L]_{tot} представляет концентрацию использованного конъюгата лиганда, и K_D

представляет константу диссоциации (Voss and Scera (1997) Protein Eng., 10, 975-982). Было установлено, что варианты Lcn2 N7A, N9B и N10D, соответственно, специфически связываются с FN7B8 со значениями K_D , равными 14,8 нМ (N7A), 40,1 нМ (N9B), 30,0 нМ (N7E) и 51,2 нМ (N10D), но не с FN7B9 или BSA.

⁵ **Пример 17. Определение связывающей активности для рекомбинантного фибронектина FN7B8 поверхностным плазмонным резонансом (SPR)**

Анализ мутеинов Lcn2 в режиме реального времени проводили в системе Biacore X (Biacore, Uppsala, Швеция) с использованием HBS/ET (20 мМ Нерес, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, содержащий 0,005% (об./об.) твина 20) в качестве буфера для анализа. 200 мкг/мл раствора рекомбинантного FN7B8 в 10 мМ Na-ацетате, pH 4,0 иммобилизовали на чипе CMD 200 m Sensorchip (Xantec bioanalytics, Dusseldorf, Германия) с использованием обычной реакции сочетания аминов с получением плотности лиганда, равной 500 резонансных единиц (RU). Очищенный мутеин Lcn2 наносили со скоростью потока 25 мкл/мин в концентрациях в пределах от 2,5 нМ до 160 нМ. Сенсограммы корректировали ¹⁰ вычитанием соответствующих сигналов, определенных для контрольного канала, который активировали и блокировали этаноламином. Кинетическую оценку данных проводили при построении графика с использованием программного обеспечения BIAevaluation V 4.1 (Karlsson et al. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229-240). ¹⁵

Таблица 2

Кинетические данные по связыванию для отобранных мутеинов Lcn2 FN7B8, полученные поверхностным плазмонным резонансом

вариант Lcn2	k_{on} [М ⁻¹ сек ⁻¹]	k_{off} [сек ⁻¹]	K_D [М]
N7A	4.6×10^6	2.6×10^{-2}	5.8×10^{-9}
N7E	4.1×10^6	3.0×10^{-2}	7.2×10^{-9}
N9B	2.1×10^6	7.5×10^{-2}	3.6×10^{-8}
N10D	1.5×10^6	5.8×10^{-2}	3.8×10^{-8}

³⁰ **Пример 18. Иммуноокрашивание положительных на ED-B клеток CaCo2**

Клетки злокачественной опухоли ободочной кишки человека (клетки CaCo2 были любезно предоставлены H. Daniel, Technische Universität München, Германия; Puiguet et al., Am. J. Pathol., 148, 579-592) культивировали в системе Nunc Lab-TekTM II chamber slideTM (4 камеры на предметное стекло; Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Германия) ²⁵ в среде MEM с солями Игла и L-глутамином с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1× MEM заменимых аминокислот и 50 мкг/мл гентамицина (PAA Laboratories, Pasching, Австрия) при 37°C во влажной атмосфере до достижения клеточного слияния на уровне примерно 50-70%. Клеточные слои, прикрепленные к покровному стеклу, промывали PBS (среда Дульбекко без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} ; PAA Laboratories, Pasching, ⁴⁰ Австрия), затем дистиллированной водой и затем фиксировали и противоокрашивали охлажденным на льду метанолом, содержащим 5 мкг/мл DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол; Sigma-Aldrich, Munich, Германия) в течение 5 мин.

Все последующие инкубации проводили в темноте. Фиксированные клетки промывали и инкубировали с 500 мкл 1 мкМ Lcn2 дикого типа, мутеина Lcn2, PBS или специфического для ED-B антитела scFv-L19 (Pini et al. (1998) J. Biol. Chem., 273, 21769-21776) в течение 1 ч. Все эти продукты выделяли в виде слитых белков с Strep-меткой II (Schmidt and Skerra, выше). Клетки промывали PBS и инкубировали немеченым антителом StrepMAbimmo (5 мкг/мл в PBS; IBA, Göttingen, Германия) в течение 1 ч с

последующими двумя стадиями отмычки. Наконец, специфическое связывание с клетками CaCo2 детектировали с использованием меченного флуоресцентной меткой коньюгата антимышиного IgG (H+L) F(ab')₂-фрагмента Dylight-488 (Cell Signaling Technology, Danvers, США), разведенных 1:200 PBS, в качестве вторичного антитела.

5 Для всех вариантов Lcn2 и также антитела scFv-L19 отмечали специфическое окрашивание клеток, которое наблюдали под микроскопом Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Gottingen, Германия), в то время как рекомбинантный Lcn2 дикого типа и PBS демонстрировали незначительные сигналы в данном тесте.

10 Пример 19. Получение Аβ-специфических мутеинов Lcn2 H1GA и H1GV посредством замены остатка свободного цистеина в H1-G1 в положении 36

Cys36 заменяли на Ala или Val сайт-направленным мутагенезом. После этого проводили ПЦР с вырожденным олигодезоксинуклеотидом DH-4 (SEQ ID NO:45) и вторым олигодезоксинуклеотидом J08rev (SEQ ID NO:48), а также плазмидной ДНК, кодирующей Lcn2 мутеин H1-G1 в качестве матрицы (SEQ ID NO:37).

15 Амплифицированные фрагменты субклонировали через BstXI в экспрессионную плазмиду pHNGAL98 и секвенировали для идентификации отдельных вариантов замен. В зависимости от введенной аминокислотной замены полученные варианты Lcn2 обозначали H1GA (SEQ ID NO:49, 50) и H1GV (SEQ ID NO:51, 52).

20 Пример 20. Продукция в растворимом виде и очистка новых Аβ-специфических мутеинов Lcn2 H1GA и H1GV с использованием культур *E. coli* с высокой оптической плотностью

Рекомбинантный Lcn2 и его мутеины получали секрецией в периплазму *E. coli* JM83. Для экспрессии растворимого белка использовали плазмиду pHNGAL98 с соответствующей вставкой BstXI, кодирующую H1GA (SEQ ID NO:49) или H1GV (SEQ ID NO:51).

25 Культуры выращивали с вращением при 22°C в 2 л среды LB, содержащей 100 мг/л ампициллина (Amp). Экспрессию гена индуцировали при плотности клеток OD₅₅₀=2,5 добавлением ангидротетраклицина (aTc) до конечной концентрации 0,2 мг/л. После инкубации в течение 5 ч клетки собирали центрифугированием, ресуспенсировали в 40 мл охлажденного на льду периплазматического фракционного буфера (0,5 М сахарозы, 30 1 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-HCl буфера с pH 8,0), содержащего 0,1 мг/мл лизозима и инкубировали на льду в течение 30 мин. Полученные сферопласты осаждали повторным центрифугированием и получали супернатант, содержащий растворимый рекомбинантный белок.

35 Растворимый белок очищали аффинной хроматографией с использованием Strep-метки II с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) на колонке Superdex 75 HR 10/30 с использованием PBS буфера (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4). Чистоту белка проверяли с использованием SDS-PAGE. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с использованием расчетных коэффициентов 40 экстинкции 27055 M⁻¹cm⁻¹ для Аβ-специфических мутеинов H1GA (SEQ ID NO:50) и H1GV (SEQ ID NO:52).

Пример 21. Определение связывающей активности для MBP-Аβ40 с использованием 45 поверхности плазмонного резонанса на приборе Biacore X

Анализ взаимодействия Lcn2 мутеинов H1GA или H1GV и MBP-Аβ40 (SEQ ID NO:33) в режиме реального времени проводили в системе Biacore X с использованием PBS/T (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4, содержащем 0,005% (об./об.) твина 20) в качестве буфера для анализа. Раствор MBP-Аβ40 с концентрацией 15 мкг/мл из примера 2 в 10 мМ Na-ацетате с pH 4,5 иммобилизовали на чипе CMD 200I (Xantec,

Dusseldorf, Германия) с использованием обычной реакции сочетания аминов с получением плотности лиганда, равной 1316 резонансных единиц (RU). Очищенные мутеины Lcn2 H1GA или H1GV из примера 20 наносили в концентрациях в пределах от 4 нМ до 128 нМ со скоростью потока 20 мкл/мин. Данные подвергали двойной обработке

5 вычитанием соответствующих сигналов, определенных для контрольного канала, который активировали и блокировали этаноламином, а также вычитанием определенных сигналов для среднего при введении буфера. Кинетическую оценку данных в общем проводили с использованием программного обеспечения BIAevaluation V 3.0 (Karlsson et al. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229-240).

10 **Пример 22. Определение связывающей активности для Аβ40 с использованием поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T100**

Анализ взаимодействия мутеина Lcn2 H1GA и Аβ40 (SEQ ID NO:29) в режиме реального времени проводили в системе Biacore T100 (Biacore, Uppsala, Швеция) с использованием PBS/T (4 мМ KH₂PO₄, 16 мМ Na₂HPO₄, 115 мМ NaCl, pH 7,4, содержащем

15 0,005% (об./об.) поверхностно-активного вещества P20) в качестве буфера для анализа. Раствор Аβ40 с концентрацией 10 мкг/мл из примера 2 в 10 мМ Na-ацетате с pH 4,5 иммобилизовали на чипе CM5 (Biacore, Uppsala, Швеция) с использованием обычной реакции сочетания аминов с получением плотности лиганда, равной 325 резонансных единиц (RU). Очищенный мутеин Lcn2 H1GA из примера 20 наносили в концентрациях 20 в пределах от 1 нМ до 32 нМ со скоростью потока 30 мкл/мин. Серии разведений H1GA наносили со временем ассоциации и диссоциации 300 сек для получения информации по k_{on} . Для точного определения нижнего значения k_{off} анализировали самую высокую концентрацию с использованием времени диссоциации 7200 сек. Данные подвергали 25 двойной обработке, как описано в примере 21. Значения k_{on} и k_{off} для реакции связывания определяли по полной совокупности данных с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation V 2.0.3. для обработки данных и построения кинетического графика. Строили общий график с использованием модели связывания 1:1.

30 **Пример 23. Функциональный анализ мутеина Lcn2 H1GA в тесте агрегации ThT**

Для постановки теста агрегации тиофлавина Т (ThT) синтетический Аβ пептид (SEQ ID NO:29) растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле (HFIP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Германия) в течение 12 ч. HFIP выпаривали в вакууме и Аβ растворяли в

35 соответствующем объеме дистиллированной H₂O, обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при 4°C и фильтровали (центрифужная трубчатая мембрана для фильтрации из целлюлозы ацетата, 0,45 мкм; Costar Spin-X; Corning Inc., Corning, NY). Затем солюбилизированный мономерный Аβ немедленно использовали для постановки тестов по агрегации.

500 мкл раствора Аβ с концентрацией 1 мг/мл инкубировали при отсутствии и в 40 присутствии различных мутеинов Lcn2 в различных молярных соотношениях или BSA в 0,5× PBS при 37°C с перемешиванием. Реакции агрегации проводили в трех параллелях. Для определения флуоресценции периодически отбирали порции объемом 20 мкл и смешивали с 180 мкл ThT при конечной концентрации 50 мкМ в 0,5× PBS и анализировали при волне экстинкции 450 нм и волне эмиссии 482 нм с использованием 45 спектрофлуориметра FluoroMax-3 (HORIBA Jobin Yvon, Grabrue, Германия).

Пример 24. Определение связывающей активности для одного домена ED-B рекомбинантного фибронектина с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Анализ взаимодействия Lcn2 мутеинов в режиме реального времени проводили в системе Biacore X с использованием HBS/ET (20 мМ Нерес, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, содержащем 0,005% (об./об.) твина 20) в качестве буфера для анализа. Раствор рекомбинантного ED-B с концентрацией 100 мкг/мл в 10 мМ Na-ацетате, pH 4,0

- 5 иммобилизовали на чипе CMD 200 m Sensorchip с использованием обычной реакции сочетания аминов с получением плотности лиганда, равной 180 резонансных единиц (RU). Очищенный мутеин Lcn2 наносили со скоростью потока 25 мкл/мин в концентрациях в пределах от 2,5 нМ до 160 нМ. Сенсограммы корректировали вычитанием соответствующих сигналов, определенных для контрольного канала, который
- 10 активировали и блокировали этианоламином. Кинетическую оценку данных проводили построением общего графика с использованием программного обеспечения BIAevaluation V 4.1 (Karlsson et al. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229-240). В случае N10D использовали конкурирующую модель с гетерогенным аналитом для построения графика с получением двух групп кинетических констант.

15

Таблица 3

Кинетические данные по связыванию мутеинов Lcn2 с ED-B, определенные поверхностным плазмонным резонансом

вариант Lcn2	k_{on} [M ⁻¹ сек ⁻¹]	k_{off} [сек ⁻¹]	K_D [M]
N7A	$1,8 \times 10^6$	0,138	$1,27 \times 10^{-7}$
N7E	$3,1 \times 10^6$	0,054	$1,73 \times 10^{-8}$
N9B	$1,45 \times 10^6$	$7,62 \times 10^{-3}$	$5,26 \times 10^{-9}$
N10D	$k_1 = 6,21 \times 10^5$ $k_2 = 2,94 \times 10^4$	$k_{-1} = 0,064$ $k_{-2} = 3,35 \times 10^{-3}$	

25

Формула изобретения

1. Способ получения мутеина, полученного из липокалина 2 человека (Lcn2, hNGAL), в котором указанный мутеин связывается с заранее определенной мишенью с обнаруживаемой аффинностью, где указанная мишень не связывается с природным hGAL при физиологических условиях, где способ включает:

(а) стадию, на которой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Lcn2 человека, подвергают мутагенезу в, по меньшей мере, нуклеотидном триплете, кодирующем положение в последовательности, соответствующее положению 96 в последовательности линейной полипептидной последовательности Lcn2 человека, и в, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 нуклеотидных триплетах, кодирующих любое положение в последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности Lcn2 человека, с получением 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 одним или более мутеинами, обладающими обнаруживаемой аффинностью связывания для определенной мишени с помощью отбора и выделения.

2. Мутеин, полученный из белка Lcn2, который получают способом по п.1,

содержащий, по меньшей мере, один мутированный аминокислотный остаток в положении в последовательности, соответствующем положению 96, и, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 мутированных аминокислотных остатков в любом положении в последовательности, соответствующей

положениям в последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности Lcn2, и где мутеин связывается с заранее определенной мишенью с обнаруживаемой аффинностью, где указанная мишень не связывается с природным зрелым Lcn2 при физиологических

5 условиях.

3. Мутеин по п.2, содержащий 15, 16 или 17 мутированных аминокислотных остатков в любом из положений 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 103, 125, 127, 132 или 134 в последовательности линейной полипептидной последовательности hLcn2.

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

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

6. Мутеин по п.5, где бета-амилоидный пептид является А β 40 пептидом или А β 42 пептидом.

7. Мутеин по п.5, где мутеин содержит по сравнению со зрелой аминокислотной 15 последовательностью hLcn2 дикого типа, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из Leu36→Val или Cys; Ala40→Tyr или Lys, или Val; Ile41→Thr или Ser, или Leu; Gln49→Leu или Trp; Leu70→Gly; Arg72→Gly или Asp; Lys73→Leu или Trp, или Asp; Asp77→Asn или His, или Leu; Trp79→Lys; Asn96→Ile или Arg; Tyr100→Gln или Arg, или Glu; Leu103→Met или Arg, или 20 Gly; Tyr106→Ala, или Trp; Lys125→Thr или Val, или Glu; Ser127→Gly или Gln, или Ala; Tyr132→Met или Ser, или Thr и Lys134→Asn.

8. Мутеин по п.7 с последовательностью SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43.

9. Мутеин по п.4, где белок является фибронектином или его доменом.

25 10. Мутеин по п.9, где домен фибронектина является экстрадоменом В или его фрагментом.

11. Мутеин по п.9, где мутеин содержит по сравнению со зрелой аминокислотной последовательностью hLcn2 дикого типа, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из Leu36→Lys или Glu, 30 или Arg, или Ala; Ala40→His или Met, или Thr, или Ser; Ile41→Asp или Arg, или Trp, или Leu; Gln49→Arg или Ala, или Tyr; Leu70→Arg, или Met; Arg72→Val, или Gln, или Met; Lys73→His или Arg, или Ser; Asp77→Asn или His, или Lys, или Arg; Trp79→Arg или Met, или Leu; Asn96→Lys или Ala, или Ser; Tyr100→Trp или Pro, или Lys; Leu103→His или Pro; Tyr106→Phe или Trp, или Thr; Lys125→Arg или His, или Thr; Ser127→Tyr или Phe, или Ala; Tyr132→Leu или Phe; Lys134→Glu или His, или Gly, или Phe и Ser146→Asn.

35 12. Мутеин по п.11 с последовательностью SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

13. Мутеин по любому из пп.2-12, где мутеин дополнительно содержит по сравнению со зрелой аминокислотной последовательностью hLcn2 дикого типа аминокислотные 40 замены, выбранные из группы, состоящей из Gln28→His и Cys87→Ser.

14. Мутеин по любому из пп.2-12, где мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из органических молекул, ферментных меток, радиоактивных меток, меток в окрашенной форме, флуоресцентных меток, хромогенных меток, люминесцентных меток, гаптенов, дигоксигенина, биотина, цитостатических 45 агентов, токсинов, комплексов металлов, металлов, коллоидного золота, и соединения, которое увеличивает период полураспада мутеина, или где мутеин слит на своем N-конце и/или C-конце с партнером по слиянию, который является белком или доменом белка, или пептидом.

15. Мутеин по любому из пп.2-12, где мутеин связывается с определенной неприродной мишенью с K_D , равной по меньшей мере 1 мкМ или ниже, или 100 мкМ или ниже, или 1 мкМ или ниже, или 500 нМ, или 200 нМ или ниже, или 100 нМ или ниже, или 50 нМ или ниже, или 10 нМ или ниже, или 1 нМ или ниже.

⁵ 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.

¹⁰ 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 и выделение мутеина из клетки или культуральной среды.

19. Диагностический набор для связывания заранее определенной мишени, содержащий в качестве одного из компонентов набора мутеин по любому из пп.2-15.

¹⁵ 20. Аналитический набор для связывания заранее определенной мишени, содержащий в качестве одного из компонентов набора мутеин по любому из пп.2-15.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Pieris AG

<120> МУТЕИНЫ ЛИПОКАЛИНА 2 ЧЕЛОВЕКА (Lcn2, hNGAL) С АФФИННОСТЬЮ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕННОЙ МИШЕНИ

<130> PIE13932PCT

<140> PCT/EP2010/069028

<141> 2010-12-07

<150> US 61/267,098

<151> 2009-12-07

<160> 52

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 88

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> NNK олигомер для положений 36, 40, 41, 49, 52

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> k представляет собой g или t

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> k представляет собой g или t

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> k представляет собой g или t

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (59)..(60)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(69)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(70)
<223> k представляет собой г или т

<400> 1

gaagtggat gtggtaggtn nkgcagggaa tnnknnkctc agagaagaca aagacccgnn      60
kaagatgnnk gccaccatct atgagctg                                         88

<210> 2
<211> 79
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> NNK олигомер для положений 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(27)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(33)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> k представляет собой г или т

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(36)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(48)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(54)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> k представляет собой г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(60)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> k представляет собой г или т

<400> 2

саагагтак аатгтсакн нкгтснкtt тннкннкааг аагтгтннкт асннкактснн 60
кактттгтт ccаггттcc 79

<210> 3
<211> 68
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> NNK олигомер для положений 96, 100, 103, 106

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature

```

```

<222> (21)..(21)
<223> k представляет собой g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> k представляет собой g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(41)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> k представляет собой g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(50)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> k представляет собой g или t

<400> 3

```

ggcgagttca cgctgggcnn kattaagagt nnkcctggan nkacgagtnn kctcgtccga	60
gtggtgag	68

```

<210> 4
<211> 68
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> NNK олигомер для положений 125, 127, 132, 134

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> k представляет собой g или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> n представляет собой a, c, g или t

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> к представляет собой с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(41)
<223> н представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> к представляет собой с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> н представляет собой а, с, г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)..(48)
<223> к представляет собой с или т

<400> 4

gctatggtgt tcttcaagnn kgttnnkcaa aacagggagn nkttcnkcat caccctctac      60
gggagaac                                         68

<210> 5
<211> 45
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> ПЦР-праймер с фиксированной последовательностью, соответствующий некодирующей цепи

<400> 5

ggtgacattg tagctttgt cttcttcag ctcatagatg gtggc      45
                                         45

<210> 6
<211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> ПЦР-праймер с фиксированной последовательностью, соответствующий некодирующей цепи

<400> 6

gcccagcgtg aactcgctg gctggaaacc tgaaacaaaa gt      42
                                         42

<210> 7
<211> 54
<212> ДНК
<213> Искусственная

```

<220>
 <223> ПЦР-праймер с фиксированной последовательностью, соответствующий некодирующей цепи

<400> 7
 cttgaagaac accatagcat gctggttgta gttggtgctc accactcgga cgag 54

<210> 8
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> ПЦР-праймер с фиксированной последовательностью, соответствующий некодирующей цепи

<400> 8
 ggagaagcgg atgaagttct ccttagttc cgaagtcagc tccttggttc tcccgtagag 60
 ggtg 64

<210> 9
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> 5' фланкированный ПЦР-олигомер биотинилированный

<400> 9
 ccaggacaac caattccatg ggaagtggta tgtggtaggt 40

<210> 10
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> 3' фланкированный ПЦР-олигомер биотинилированный

<400> 10
 ttcagggagg cccagagatt tggagaagcg gatgaagttc 40

<210> 11
 <211> 4746
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Вектор phNGAL102 с CamR в фаговом дисплее, использованный в качестве основы для NNL-библиотеки

<400> 11
 ccataaacgt cggttgcgc cgggcgtttt ttattggcca gatgattaat tcctaatttt 60

tgttgacact ctatcattgg tagagttatt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaaag	120
tgaaatgaat agttcgacaa aaatctagat aacgagggca aaaaatgaaa aagacagcta	180
tcgcgattgc agtggctctg gctggctcg ctaccgtac gcaggcccag gactccacct	240
cagacctgat cccagccccca cctctgagca aggtccctct gcagcagaac ttccaggaca	300
accaattcca tggaaagtgg tatgtggtag gtctcgagg gaatgcaatt ctcagagaag	360
acaaagaccc gcaaaagatg tatgccacca tctatgagct gaaagaagac aagagctaca	420
atgtcacctc cgtcctgttt aggaaaaaga agtgtgacta ctggatcagg acttttgttc	480
caggttccca gccaggcgag ttcacgctgg gcaacattaa gagttaccct ggattaacga	540
gttacccctgtt ccgagtggtg agcaccaact acaaccagca tgctatggtg ttcttcaaga	600
aagtttctca aaacagggag tacttcaaga tcaccctcta cgggagaacc aaggagctga	660
cttcggaact aaaggagaac ttcatccgct tctccaaatc tctgggcctc cctgaaaacc	720
acatcgcttt ccctgtccca atcgaccagt gtatcgacgg cagcgctggt ggggcctaga	780
ctgttcaaag ttgttagca aaacccata cagaaaattc atttactaac gtctggaaag	840
acgacaaaac tttagatcgt tacgctaact atgagggctg tctgtggat gctacaggcg	900
ttgttagttt tactggtgac gaaactcagt gttacggtagc atgggttcct attgggcttg	960
ctatccctga aaatgaggggt ggtggctctg aggggtggcgg ttctgagggt ggcgggtctg	1020
aggggtggcgg tactaaacct cctgagtagc gtgatacacc tattccggc tatacttata	1080
tcaaccctct cgacggcact tatccgcctg gtactgagca aaaccccgct aatcctaatac	1140
cttcttttga ggagtctcag cctcttaata ctttcatgtt tcagaataat aggttccgaa	1200
ataggcaggg ggcattaact gtttatacgg gcactgttac tcaaggcact gaccccgtaa	1260
aaacttatta ccagtagact cctgtatcat caaaagccat gtatgacgct tactggaaacg	1320
gtaaattcag agactgcgc ttcattctg gcttaatga ggatccattc gtttgtgaat	1380
atcaaggcca atcgcttgac ctgcctcaac ctccctgtcaa tgctggcggc ggctctggtg	1440
gtggttctgg tggcggtct gagggtggtg gctctgtggg tggcggtct gagggtggcg	1500
gctctgaggg aggcggttcc ggtgggtggct ctgggtccgg tgattttgtat tatgaaaaga	1560
tggcaaacgc taataagggg gctatgaccg aaaatgccga tgaaaacgcg ctacagtctg	1620
acgctaaagg caaacttgc tctgtcgcta ctgattacgg tgctgtatc gatggttca	1680
ttggtgacgt ttccggcctt gctaattggta atgggtctac tggtgatttt gctggctcta	1740
attcccaaatt ggctcaagtc ggtgacggtg ataattcacc tttaatgaat aatttccgtc	1800
aatatttacc ttccctccct caatcggtt aatgtcgccc tttgtcttt ggcgctggta	1860
aaccatatga attttctatt gattgtgaca aaataaaactt attccgtgg gtccttgcgt	1920
ttcttttata tggccacc tttatgtatg tattttctac gtttgctaact atactgcgt	1980

ataaggagtc ttaataagct tgacctgtga agtgaaaaat ggcgcacatt gtgcgacatt	2040
tttttgtct gccgtttacc gctactgcgt cacggatctc cacgcgcct gtgcggcgc	2100
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct	2160
agcgcgcgt ccttcgctt tttcccttc ctttcgcgc acgttcgccg gctttccccg	2220
tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgcatttac ggcacctcga	2280
ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgttagtggg ccatgcgcct gatagacgg	2340
tttcgcgcct ttgacgttgg agtccacgtt cttaatagt ggactcttgc tccaaactgg	2400
aacaacactc aaccctatct cggtctattc tttgattta taaggattt tgccgatttc	2460
ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta aaaaaattt aacgcattt ttaacaaaat	2520
ttggcgaaaa tgagacgttg atcggcacgt aagaggttcc aacttcacc ataatgaaat	2580
aagatcacta cccggcgtat ttttgagtt atcgagattt tcaggagcta aggaagctaa	2640
aatggagaaa aaaatcactg gatataccac cgttgatata tcccaatggc atcgtaaaga	2700
acattttgag gcatttcagt cagttgctca atgtacctat aaccagaccg ttcagctgga	2760
tattacggcc ttttaaaga ccgtaaagaa aaataagcac aagtttatac cggcctttat	2820
tcacattctt gcccgcctga tgaatgctca tccggaattt cgtatggca taaaagacgg	2880
tgagctggtg atatggata gtgttcaccc ttgttacacc gttttccatg agcaaactga	2940
aacgtttca tcgctctgga gtgaatacca cgacgatttc cggcagttt tacacatata	3000
ttcgcaagat gtggcgtgtt acggtaaaaa cctggcctat ttccctaaag gtttattga	3060
gaatatgttt ttctgtctcag ccaatccctg ggtgagttt accagtttgc atttaaacgt	3120
ggccaatatg gacaacttct tcgccccgt tttcactatg ggcaaatatt atacgcaagg	3180
cgacaagggtg ctgatgccgc tggcgattca ggttcatcat gccgttgcg atggcttcca	3240
tgtcggcaga atgcttaatg aattacaaca gtactgcgt gagtggcagg gcggggcgta	3300
ataggaatta atgatgtctc gtttagataa aagtaaagtg attaacagcg cattagagct	3360
gcttaatgag gtcggaatcg aaggttaac aacccgtaaa ctcgcccaga agcttaggtgt	3420
agagcagcct acattgtatt ggcattgtaaa aaataagcg gctttgcgt acgccttagc	3480
cattgagatg tttagataggc accatactca ctttgcgcct tttagaaggaa aaagctggca	3540
agatttttta cgtataaacg ctaaaagttt tagatgtgct ttactaagtc atcgatgg	3600
agcaaaagta catttaggtt cacggcctac agaaaaacag tatgaaactc tcgaaaatca	3660
attagccttt ttatgccaac aaggtttttcaactagagaat gcattatatg cactcagcgc	3720
agtggggcat ttacttttag gttgcgtatt ggaagatcaa gagcatcaag tcgctaaaga	3780
agaaaggaa acacctacta ctgatagttt gccgcattt ttacgacaag ctatcgaaatt	3840
atttgcac caagggtcag agccagcctt cttattcggc cttgaattga tcatatcg	3900

attagaaaaa caacttaaat gtgaaagtgg gtcttaaaag cagcataacc ttttccgtg	3960
atggtaactt cactagttt aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgcata atctcatgac	4020
caaaaatccct taacgtgagt ttgcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa	4080
aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc	4140
accgctacca gcgggtggttt gtttgcggta tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt	4200
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgttagc cgtagttagg	4260
ccaccaccc aagaactctg tagcaccgc tacataccctc gctctgctaa tcctgttacc	4320
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	4380
accggataag ggcgcagcggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgg	4440
gcgaacgacc tacaccgaac tgagataacct acagcgttag ctatgagaaa gcgccacgct	4500
tcccgaaagg agaaaggcgg acaggtatcc ggttaagcggc agggtcggaa caggagagcg	4560
cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggttcggca	4620
cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa	4680
cggccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccctttgc tggccttttgc ttcacatgac	4740
ccgaca	4746

<210> 12

<211> 4963

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Вектор phNGAL108 с AmpR в фаговом дисплее, использованный в качестве основы для Slonning библиотеки

<400> 12

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt	60
tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttcg aaaaaatct	120
agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgcga ttgcagtggc tctggctggc	180
ttcgctaccg tagcgcaggc ccaggactcc acctcagacc tgatcccagc cccacctctg	240
agcaagggtcc ctctgcagca gaacttccag gacaaccaat tccatggaa gtggtatgtg	300
gttaggtctcg cagggaatgc aattctcaga gaagacaaag acccgcaaaa gatgtatgcc	360
accatctatg agctgaaaga agacaagagc tacaatgtca cctccgtcct gtttagaaaa	420
aagaagtgtg actactggat caggactttt gttccagggtt cccagccagg cgagttcacc	480
ctgggcaaca ttaagagttt ccctggatta acgagttacc tgcgtccgagt ggtgagcacc	540
aactacaacc agcatgctat ggtgttctt aagaaagttt ctcaaaacag ggagtacttc	600
aagatcaccc tctacggag aaccaaggag ctgacttcgg aactaaagga gaacttcac	660

cgcttctcca aatctctggg cctccctgaa aaccacatcg tcttcctgt cccaatcgac	720
cagtgatcg acggcagcgc ttggcgtcac cccgagttcg gtggggccta gactgttcaa	780
agttgttag caaaacccca tacagaaaat tcatttacta acgtctggaa agacgacaaa	840
acttagatc gttacgctaa ctatgagggc tgtctgtgga atgctacagg cggttagtt	900
tgtactggtg acgaaactca gtgttacggt acatgggttc ctattggct tgctatccct	960
gaaaatgagg gtggcggcgc tgagggcgc ggttctgagg gtggcggttc tgagggcgc	1020
ggtaactaaac ctcctgagta cggtgataca cctattccgg gctatactta tatcaaccct	1080
ctcgacggca cttatccgccc tggtaactgag caaaaccccg ctaatcctaa tccttctt	1140
gaggagtctc agcctcttaa tactttcatg tttcagaata ataggttccg aaataggcag	1200
ggggcattaa ctgtttatac gggcactgtt actcaaggca ctgacccgt taaaacttat	1260
taccagtaca ctccctgtatc atcaaaagcc atgtatgacg cttactggaa cggtaaattc	1320
agagactgcg cttccatttc tggcttaat gaggatccat tcggttgtga atatcaaggc	1380
caatcgctcg acctgcctca acctccgtc aatgctggcg gcggctctgg tggcggttct	1440
ggcggcggct ctgaggggtgg tggctctgag ggtggcggtt ctgaggggtgg cggctctgag	1500
ggagggcggtt cccgtgggtgg ctctgggtcc ggtgattttg attatgaaaa gatggcaaacc	1560
gctaataagg gggctatgac cgaaaatgcc gatgaaaacg cgctacagtc tgacgctaaa	1620
ggcaaaacttg attctgtcgc tactgattac ggtgctgcta tcgatggttt cattggtgac	1680
gtttccggcc ttgctaattgg taatggtgct actggtgatt ttgctggctc taattcccaa	1740
atggctcaag tcggtgacgg tgataattca ccttaatga ataatttccg tcaatattta	1800
ccttcctcc ctcaatcggt tgaatgtcgc cctttgtct ttggcgctgg taaaccatata	1860
gaattttcta ttgattgtga caaaataaaac ttattccgtg gtgtcttgc gtttctttta	1920
tatgttgcca cctttatgta tgtattttct acgtttgcta acataactgcg taataaggag	1980
tcttaataag ctgacctgt gaagtgaaaa atggcgcaca ttgtgcgaca tttttttgt	2040
ctgccgttta ccgctactgc gtcacggatc tccacgcgc ctgtacggc gcattaagcg	2100
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc ctagcgcccg	2160
ctccttcgc ttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc cggcttcccc cgtcaagctc	2220
taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa	2280
aacttgatta gggtgatggt tcacgttagt ggcacatgcgc ctgatagacg gttttcgcc	2340
ctttgacgtt ggagtccacg ttcttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	2400
tcaaccctat ctccgtctat tctttgatt tataaggat tttgccgatt tcggcctatt	2460
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc	2520
ttacaatttc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt	2580

tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat	2640
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacattccg tgccgcctt attcccttt	2700
ttgcgcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaa gtaaaagatg	2760
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac agcggtaa	2820
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggtt ttccaatgat gagcacttt aaagttctgc	2880
tatgtggcgc ggtattatcc cgatttgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac	2940
actattctca gaatgacttg gttgagttt caccagtcac agaaaagcat cttacggatg	3000
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca	3060
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg	3120
gggatcatgt aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	3180
acgagcgtga caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg	3240
gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattgataga ctggatggag gcggataaag	3300
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	3360
gagccggtga gcgtggctct cgccgtatca ttgcagcact gggccagat ggtaagccct	3420
cccgatcgatgt agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	3480
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta ggaattaatg atgtctcggt	3540
tagataaaag taaagtgatt aacagcgcat tagagctgct taatgaggta ggaatcgaag	3600
gtttaacaac ccgtaaactc gcccagaagc taggtgtaga gcagcctaca ttgtattggc	3660
atgtaaaaaa taagcgggct ttgctcgacg ccttagccat tgagatgtta gataggcacc	3720
atactcactt ttgccttta gaagggaaa gctggcaaga tttttacgt aataacgcta	3780
aaagtttttag atgtgcttta ctaagtcatc gcgtggagc aaaagtacat ttaggtacac	3840
ggcctacaga aaaacagtat gaaactctcg aaaatcaatt agcctttta tgccaacaag	3900
gtttttcact agagaatgca ttatatgcac tcagcgcagt gggcatttt actttaggtt	3960
gcgtattgga agatcaagag catcaagtcg ctaaagaaga aagggaaaca cctactactg	4020
atagtagtgcc gccatttta cgacaagcta tcgaattatt tgatcacca ggtgcagagc	4080
cagccttctt attcggcctt gaattgatca tatgcggatt agaaaaacaa cttaaatgtg	4140
aaagtgggtc taaaaagcag cataaccctt ttccgtgatg gtaacttcac tagttaaaa	4200
ggatcttaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatccctaa cgtgagttt	4260
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcctttt	4320
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaacaa aaaaaccacc gtcaccagcg gtggttgtt	4380
tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga	4440
taccaaatac tgccttcta gtgttagccgt agtaggcac ccacttcaag aactctgttag	4500

caccgcctac atacctcgct ctgctaattcc tggtaaccgt ggctgctgcc agtggcgata	4560
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg	4620
gctgaacggg ggggtcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga	4680
gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca	4740
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa	4800
acgcctggta tctttatagt cctgtcggtt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt	4860
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac	4920
ggttcctggc ctttgctgg cctttgctc acatgacccg aca	4963

<210> 13
 <211> 907
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Кассета XbaI-HindIII; старт-ATG: положение 43; FN7B8: рекомбинантный
 домен ED-B, фланкированный гомологичными повторами типа III FN, кодированными
 в виде кассеты, клонированной в pASK75

<400> 13

tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac atatgccatt gtctccacca	60
acaaaacttgc atctggaggc aaaccctgac actggagtgc tcacagtctc ctggagagg	120
agcaccaccc cagacattac tggttataga attaccacaa cccctacaaa cggccagcag	180
ggaaattttt tggagaagt ggtccatgct gatcagagct cctgcacttt tgataacctg	240
agtcccgcc tggagtacaa tgcgtgtt tacactgtca aggtgacaa ggaaagtgtc	300
cctatctctg ataccatcat cccagaagtt ccgcagctga cagatctgtc cttcggtac	360
atcaccgaca gtcacatcggtctgcgttgg accccgctga attcctccac catcatcggt	420
tatcgatca ccgttgcgttgc tgctggtaaa gggatcccgatctttgaaga cttcggtac	480
tccctcggtt gttactacac cgttaccgtt ctggaaacccg ggatcgacta cgacatctcc	540
gttatcaccc tgcgttacgg tggtaatcc gtcggacca ctttacccca gcagaccgcg	600
gttcctccctc ccactgaccc gcgattcacc aacattggtc cagacacccat gcgtgtcacc	660
tgggctccac ccccatccat tgatttaacc aacttccgttgcgttactc acctgtgaaa	720
aatgaggaag atgttgcaga gttgtcaatt tctccttcag acaatgcagt ggtcttaaca	780
aatctcctgc ctggtaacaa atatgttagtg agtgcgttccatgttctacga acaacatgag	840
agcacacaccc ttagaggaag acagaaaaca ggtacgcgttccatcacca tcaccattaa	900
taagctt	907

<210> 14
 <211> 298
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Кассета XbaI-HindIII; старт-MET: положение 13; FN7B8: рекомбинантный
 домен ED-B, flankirovannyy homologichnymi povtora mi tipa III FN, kodirovannymi
 v vide kassety, klonirovannoy v pASK75

<400> 14

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile His Met Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu
 20 25 30

Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 35 40 45

Ile Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu
 50 55 60

Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu
 85 90 95

Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile Pro Glu Val Pro Gln Leu Thr
 100 105 110

Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp
 115 120 125

Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly Tyr Arg Ile Thr Val Val
 130 135 140

Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu Asp Phe Val Asp Ser Ser
 145 150 155 160

Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp
 165 170 175

Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly Glu Ser Ala Pro Thr Thr
 180 185 190

Leu Thr Gln Gln Thr Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr
 195 200 205

Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser
 210 215 220

Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu
 225 230 235 240

Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val
 245 250 255

Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser
 260 265 270

Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr
 275 280 285

Gly Ser Ala His His His His His Ala
 290 295

<210> 15

<211> 379

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Кассета XbaI-HindIII; старт-ATG: положение 43; ED-B: рекомбинантный домен ED-B, самостоятельно кодируемый в виде кассеты, клонированной в pASK75

<400> 15

tctagaaata atttgttta actttaagaa ggagatatac aaatgcgtgg ttccgaagtt 60
 ccgcagctga cagatctgtc cttcggtgac atcaccgaca gctccatcg tctgcgttgg 120
 accccgctga attcctccac catcatcggt tatcgtatca ccgttggc tgctggtaa 180
 gggatcccgta tctttgaaga cttcggtgac tcctccgttg gttactacac cgttaccgg 240
 ctggAACCCG ggatcgacta cgacatctcc gttatcaccc tggatcaacgg tggtaatcc 300
 gctccgacca ccttaaccca gcagaccgct gggagcgctc accatcacca tcaccattaa 360
 gggagccacc cgcaagctt 379

<210> 16

<211> 123

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Кассета XbaI-HindIII; старт-MET: положение 13; ED-B: рекомбинантный домен ED-B, самостоятельно кодируемый в виде кассеты, клонированной в pASK75

<400> 16

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile Gln Met Arg Gly Ser
1 5 10 15

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser
20 25 30

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly
35 40 45

Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu
50 55 60

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu
65 70 75 80

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly
85 90 95

Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr Ala Gly Ser Ala His
100 105 110

His His His His Gly Ser His Pro Gln Ala
115 120

<210> 17

<211> 904

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Кассета XbaI-HindIII; старт-ATG: положение 43; FN789: гомологичные повторы рекомбинантного типа III FN без ED-B, кодируемого как кассета, клонируемая на pASK75

<400> 17

tctagaaata	attttgttta	actttaagaa	ggagatatac	atatgccatt	gtctccacca	60
acaaaacttgc	atctggaggc	aaaccctgac	actggagtgc	tcacagtctc	ctgggagagg	120
agcaccaccc	cagacattac	tggttataga	attaccacaa	cccctacaaa	cggccagcag	180
ggaaattctt	tggaagaagt	ggtccatgct	gatcagagct	cctgcacttt	tgataacctg	240
agtcccggcc	tggagtacaa	tgtcagtgtt	tacactgtca	aggatgacaa	ggaaagtgtc	300
cctatctctg	ataccatcat	cccagctgtt	cctcctccca	ctgacctgcg	attcaccaac	360
attggtccag	acaccatgct	tgtcacctgg	gctccaccc	catccattga	tttaaccaac	420

ttcctggtgc gttactcacc tgtgaaaaat gaggaagatg ttgcagagtt gtcaatttct	480
ccttcagaca atgcagtggt cttaacaaat ctccgcctg gtacagaata tgtagtggat	540
gtctccagtg tctacgaaca acatgagagc acacctctta gaggaagaca gaaaacaggt	600
cttgattccc caactggcat tgactttct gatattactg ccaactctt tactgtgcac	660
tggattgctc ctcgagccac catcaactggc tacaggatcc gccatcatcc cgagcacttc	720
agtgggagac ctcgagaaga tcgggtgcc cactctcgga attccatcac cctcaccaac	780
ctcaactccag gcacagagta tgtggtcagc atcggtgctc ttaatggcag agaggaaagt	840
cccttattga ttggccaaca atcaacagtt agcgctcacc atcaccatca ccattaataa	900
gctt	904

<210> 18
 <211> 297
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Кассета XbaI-HindIII; старт-MET: положение 13; FN789: гомологичные повторы рекомбинантного типа III FN без ED-B, кодируемого как кассета, клонируемая на pASK75

<400> 18

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile His Met Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly Val Leu
 20 25 30

Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 35 40 45

Ile Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Asn Ser Leu Glu Glu
 50 55 60

Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe Asp Asn Leu Ser Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu
 85 90 95

Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr
 100 105 110

Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp
 115 120 125

Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser
 130 135 140

Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val
 165 170 175

Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg
 180 185 190

Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser
 195 200 205

Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala
 210 215 220

Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu
 245 250 255

Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu
 260 265 270

Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val
 275 280 285

Ser Ala His His His His His Ala
 290 295

<210> 19

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> N7A: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 19

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatggaaa tggtatgtcg tgggcaaagc cgaaatcac 120
 gacctgcgtg aggataagga tccgcgtaaa atgcaagcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac caatgtgcgt tttgttcaca agaaaatgcaa ttaccgtatt 240

tggaccttg	tgccggggag	ccagccggc	gagttactt	taggcaatat	taaaagttgg	300
ccgggcctga	catcatggtt	ggtccgcgtc	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg	360
gtgttcttca	agcgtgtgta	ccagaaccgc	gagctgttg	agatcacact	gtacgggcgc	420
acgaaagaac	tgacaaacga	gctgaaggaa	aatttatcc	gctttccaa	atctctggc	480
ctccctgaaa	accacatcgt	cttccctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cgcc	534

<210> 20

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> N7A: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 20

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

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

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

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

Asn	Val	Thr	Asn	Val	Arg	Phe	Val	His	Lys	Lys	Cys	Asn	Tyr	Arg	Ile
65					70				75			80			

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

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

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

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

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

Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

165

170

175

Asp Gly

<210> 21
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> N7E: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 21

caggactcca	cotcagaccc	gatcccagcc	ccacacctctga	gcaagggtccc	tctgcagcag	60
aacttccagg	acaaccaatt	ccatggaaa	tggtatgtcg	tgggcgaggc	cgaaaaatagc	120
ctgctgcgtg	aggataagga	tccgcgtaaa	atgtacgcga	ccatttacga	gttcaaagaa	180
gataaatcat	ataacgtcac	cagcgtgcgt	tttcgttagca	agaaatgcca	ctacctgatt	240
cgtacctttg	tgccggggag	ccagccgggc	gagtttactt	taggcctgat	taaaagtaaa	300
ccggggccaca	catcattctt	ggtccgcgtt	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg	360
gtgttcttca	agaccgtggc	acagaaccgc	gagttttttt	tcatcacact	gtacgggcgc	420
acgaaagaac	tgacaagcga	gctgaaggaa	aatttttatcc	gctttccaa	atctctgggc	480
ctccctgaaa	accacatcgt	cttccctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cggc	534

<210> 22
<211> 178
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> N7E: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 22

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Arg Phe Arg Ser Lys Lys Cys His Tyr Leu Ile
 65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Lys Pro Gly His Thr Ser Phe Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 23

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> N9B: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 23

caggactcca cctcagaccc gatccccagcc ccacccctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatggggaaa tggtatgtcg tggccgtgc cgaaatatg 120
 cgtctgcgtg aggataagga tccggcaaaa atgggtgcga ccatttacga gttgaaagaa 180
 gataaatcat ataacgtcac caaagtgatg tttcaacgta agaaatgcaa atacatgatt 240
 aatacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtct 300
 ccggggcccta catcaacccctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
 gtgttcttca agcacgtgtt ccagaaccgc gagtactttc acatcacact gtacgggcgc 420
 acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt ctteccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 24

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> N9B: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 24

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

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

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

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

Asn	Val	Thr	Lys	Val	Met	Phe	Gln	Arg	Lys	Lys	Cys	Lys	Tyr	Met	Ile
65					70				75					80	

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

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

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

Asn	Arg	Glu	Tyr	Phe	His	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu
						130		135				140			

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

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

Asp Gly

<210> 25

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> N10D: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного

в phNGAL98

<400> 25

caggactcca	cctcagac	ctt gatccc	ccac	cgtctga	gcaagg	gtccc	tctgc	agcag	60
aacttccagg	acaaccaatt	ccatggaaa	tggtatgtcg	tgggcgc	cgaaatacc				120
tggctgcgtg	aggataagga	tccgtacaaa	atgcaagcga	ccatttacga	gtt	gaaagaa			180
gataaatcat	ataacgtcac	caatgtgc	tttatgagca	agaaatgccc	tt	acatgatt			240
cacac	cgtt	tgccggggag	ccagccgggc	gagttactt	taggcagcat	taaaagttgg			300
ccgggc	cgtt	catcatggtt	ggtccgcgtc	gtgagcacca	actacaacca	gcatgccatg			360
gtgttcttca	agcgtgtgt	ccagaaccgc	gagttttt	gaatcacact	gtacgggcgc				420
acgaaagaac	tgacaaggcga	gctgaaggaa	aattttatcc	gctttccaa	atctctgggc				480
ctccctgaaa	accacatcgt	cttccctgtc	ccaatcgacc	agtgtatcga	cg	gc			534

<210> 26

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> N10D: мутеины hNGAL, специфичные для ED-B фибронектина, клонированного в phNGAL98

<400> 26

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

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

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

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

Asn	Val	Thr	Asn	Val	Leu	Phe	Met	Ser	Lys	Lys	Cys	Arg	Tyr	Met	Ile
65					70				75			80			

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 27

<211> 3745

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Вектор экспрессии phNGAL98 с AmpR, кодирующий Lcn2 дикого типа с C-концевой Strep-меткой II

<400> 27

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60

tatTTTACCA ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttcg acaaaaaatct 120

agataacgag ggcaaaaaat gaaaaagaca gctatcgca ttgcagtggc tctggctggc 180

tTCGCTACCG tagcgcaggc ccaggactcc acctcagacc tgatcccagc cccacctctg 240

agcaaggTcc ctctgcagca gaacttccag gacaaccaat tccatggaa gtggtatgtg 300

gtaggtctcg cagggaatgc aattctcaga gaagacaaag acccgcaaaa gatgtatgcc 360

accatctatg agctgaaaga agacaagagc tacaatgtca cctccgtcct gtttaggaaa 420

aagaagtgtg actactggat caggactttt gttccagggtt cccagccagg cgagttcacg 480

ctgggcaaca ttaagagtta ccctggatta acgagttacc tcgtccgagt ggtgagcacc 540

aactacaacc agcatgctat ggtgttcttc aagaaagttt ctc当地acag ggagtacttc 600

aagatcaccc tctacgggag aaccaaggag ctgacttcgg aactaaagga gaacttcac 660

cgcttctcca aatctctggg cctccctgaa aaccacatcg tcttccctgt cccaatcgac 720

cagtgtatcg acggcagcgc ttggctcac ccgcagttcg aaaaataata agcttgacct 780
 gtgaagtgaa aaatggcgca cattgtgcga cattttttt gtctgccgtt taccgctact 840
 gcgtcacgga tctccacgca ccctgtacgc gcgcattaaag cgccgggggt gtggtggtta 900
 cgccgcacgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcccttc gctttcttcc 960
 ctccctttat cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 1020
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 1080
 gttcacgtag tggccatcg ccctgataga cggttttcg cccttgacg ttggagtcca 1140
 cgttcttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct 1200
 attctttga ttataaaggg attttgcga tttcggccta ttggtaaaaa aatgagctga 1260
 tttaacaaaa atttaacgcg aattttaca aaatattaac gtttacaatt tcaggtggca 1320
 cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata 1380
 tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga 1440
 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc 1500
 ctgttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 1560
 cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agtttcgcc 1620
 ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat 1680
 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcccgt acactattct cagaatgact 1740
 tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 1800
 tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga 1860
 tcggaggacc gaaggagcta accgcgtttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc 1920
 ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga 1980

tgcctgttagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttaactctag 2040
 cttccggca acaattgata gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc 2100
 gctcgccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatac tggagccggt gagcgtggct 2160
 ctcgcgtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct 2220
 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 2280
 cctcactgat taagcattgg taggaattaa ttagtgcctcg tttagataaa agtaaagtga 2340
 ttaacagcgc attagagctg cttaatgagg tcggaatcga aggttaaca acccgtaaac 2400
 tcgcccagaa gctaggtgta gagcagccta cattgttattg gcatgtaaaa aataagcggg 2460
 ctttgctcga cgccttagcc attgagatgt tagataggca ccataactcac tttgcccct 2520
 tagaaggggaa aagctggcaa gatTTTTac gtaataacgc taaaagttt agatgtgctt 2580
 tactaagtca tcgcgtatggc gcaaaagtac atttaggtac acggcctaca gaaaaacagt 2640
 atgaaactct cgaaaatcaa ttagccttt tatgccaaca aggttttca ctagagaatg 2700
 cattatatgc actcagcgcgtatggc gtcgggcatt ttacttttagg ttgcgttattg gaagatcaag 2760
 agcatcaagt cgctaaagaa gaaaggaaa cacctactac tgatagtatg ccgccattat 2820
 tacgacaagc tatcgaatta tttgatcacc aaggtgcaga gccagccttc ttattcggcc 2880
 ttgaattgat catatgcggtatggc ttagaaaaac aacttaatg tgaaagtggg tcttaaaagc 2940
 agcataacct tttccgtgtatggc tggtaacttc actagttaa aaggatctag gtgaagatcc 3000
 ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttgcgttccac tgagcgtcag 3060
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct 3120
 gcttgcaaac aaaaaaaccacccgcgtaccatgggggttttgcgttccac tgagcgtcag 3180
 caactctttt tccgtatggc actggcttca gcaagagcgcataccatgactgttccac 3240
 tagttagcc gtagtttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 3300

ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	3360
tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt	3420
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	3480
tatgagaaag cgcacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca	3540
gggtcggAAC aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata	3600
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtatgc tcgtcagggg	3660
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttcctg gcctttgct	3720
ggcctttgc tcacatgacc cgaca	3745

<210> 28

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> Lcn2 дикого типа, клонированный в phNGAL98 без сигнального пептида OmpA и Strep-метки II

<400> 28

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

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

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

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

Asn	Val	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Arg	Lys	Lys	Cys	Asp	Tyr	Trp	Ile
													80	
65				70					75					

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

Ile	Lys	Ser	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Ser	Tyr	Leu	Val	Arg	Val	Val	Ser
100								105				110			

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 29
 <211> 40
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> пептидная последовательность бета-амилода 40
 <400> 29

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 30
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> пептидная последовательность бета-амилода 1-11
 <400> 30

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
 1 5 10

<210> 31
 <211> 12
 <212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> пептидная последовательность бета-амилода 16-27

<400> 31

Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn
1				5					10		

<210> 32

<211> 1182

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Фрагмент ДНК pMBP-His, полученный с рестриктазами XbaI HindIII. Рамка считывания начинается с положения 27 с atg

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> с может быть т

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> т может быть с

<400> 32

tctagaacca acaaggacca tagcatatga aaactgaaga aggtaaactg gtaatctgga	60
ttaacggcga taaaggctat aacggtctcg ctgaagtcgg taagaaattc gagaaagata	120
ccggaattaa agtcaccgtt gagcatccgg ataaaactgga agagaaattc ccacaggttg	180
cggcaactgg cgatggccct gacattatct tctgggcaca cgaccgctt ggtggctacg	240
ctcaatctgg cctgttggct gaaatcaccc cggacaaagc gttccaggac aagctgtatc	300
cgtttacctg ggatgccgta cgttacaacg gcaagctgat tgcttaccgg atcgctgttg	360
aagcgttatc gctgatttat aacaaagatc tgctgccgaa cccgccaaaa acctggaaag	420
agatcccgcc gctggataaa gaactgaaag cggaaaggtaa gagcgcgcgtg atgttcaacc	480
tgcaagaacc gtacttcacc tggccgctga ttgctgctga cgggggttat gcgttcaagt	540
atgaaaacgg caagtacgac attaaagacg tggcggtgga taacgctggc gcgaaagcgg	600
gtctgaccc ttctgggtgac ctgattaaaa acaaacacat gaatgcagac accgattact	660
ccatcgccaga agctgcctt aataaaggcg aaacagcgat gaccatcaac ggcccgtggg	720
catggtccaa catcgacacc agcaaagtga attatggtgt aacggtactg ccgacccatca	780
agggtcaacc atccaaaccg ttctggcg tgctgagcgc aggtattaac gccgcccagtc	840
cgaacaaaga gctggcgaaa gagttcctcg aaaactatct gctgactgat gaaggcttgg	900

aagcggttaa taaagacaaa ccgctgggtg ccgtacgcgt gaagtcttac gaggaagagt	960
tggcgaaaga tccacgtatt gccgccacca tggaaaacgc ccagaaaggt gaaatcatgc	1020
cgaacatccc gcagatgtcc gctttctggc atgccgtgcg tactgcggcgt atcaacgccc	1080
ccagcggtcg tcagactgtc gatgaagccc taaaagacgc gcagactcgt atcaccagg	1140
gatccctcga gatcaaacat caccaccatc accattaagc tt	1182

<210> 33
 <211> 1308
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Фрагмент ДНК pASK75-MBP-Abeta40, полученный с рестриктазами XbaI HindIII. Рамка считывания начинается с положения 27 с atg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> с может быть

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> t может быть с

<400> 33

tctagaacca acaaggacca tagcatatga aaactgaaga aggtaaactg gtaatctgga	60
ttaacggcga taaaggctat aacggtctcg ctgaagtcgg taagaaattc gagaaagata	120
ccggaattaa agtcaccgtt gagcatccgg ataaactgga agagaaattc ccacagggtt	180
cgccaactgg cgatggccct gacattatct tctgggcaca cgaccgttt ggtggctacg	240
ctcaatctgg cctgttggct gaaatcaccc cgacaaagc gttccaggac aagctgtatc	300
cgttacctg ggatgccgta cgttacaacg gcaagctgat tgcttacccg atcgctgttg	360
aagcgttatac gctgatttat aacaaagatc tgctgccaa cccgccaaaa acctggaaag	420
agatcccgcc gctggataaa gaactgaaag cgaaaggtaa gagcgcgctg atgttcaacc	480
tgcaagaacc gtacttcacc tggccgctga ttgctgctga cgggggttat gcgttcaagt	540
atgaaaacgg caagtacgac attaaagacg tggcgtgga taacgctggc gcgaaagcgg	600
gtctgacctt cctgggttgc acgttataaa acaaacacat gaatgcagac accgattact	660
ccatcgacaga agctgcctt aataaaggcg aaacagcgt gaccatcaac ggcccggtgg	720
catggtccaa catcgacacc agcaaagtga attatgggtgt aacggtactg ccgaccttca	780
agggtcaacc atccaaaccc ttcgttggcg tgctgagcgc aggtattaac gccggcagtc	840
cgaacaaaga gctggcgaaa gagttcctcg aaaactatct gctgactgat gaaggtctgg	900

aagcggttaa	taaagacaaa	ccgctgggtg	ccgtacgcgt	gaagtcttac	gaggaagagt	960
tggcgaaga	gtccacgtatt	gccgcacca	tggaaaacgc	ccagaaagg	gaaatcatgc	1020
cgaacatccc	gcagatgtcc	gctttctgg	atgccgtcg	tactgcgg	atcaacgcgg	1080
ccagcggtcg	tcagactgtc	gatgaagccc	tgaaagacgc	gcagactcgt	atcacccagg	1140
gatcccatca	ccaccatcat	cacgagaact	tgtacttcca	ggacgctgaa	ttccgtcacc	1200
actccggta	cgaagttcac	caccagaagc	tggtttctt	cgctgaagac	gttgggttcca	1260
acaaggtgc	tatcatcggt	ctgatggttg	gtgggtgtgt	ttaagctt		1308

<210> 34
 <211> 488
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Фрагмент ДНК pASK75-TrxAbeta28N6, полученный с рестриктазами XbaI HindIII. Рамка считывания начинается с положения 23 с atg

<400> 34

tctagatact	gtggagttat	atatgagcga	taaaattatt	cacctgactg	acgacagttt	60
tgacacggat	gtactcaaag	cgacggggc	gatcctcg	gatttctgg	cagagtgg	120
cggccgggt	ggtgtgacg	ctgaattcc	tcacgactcc	ggttacgaag	ttcaccacca	180
gaaactgg	ttcttcgct	aagacgttgg	ttccaacaaa	ggtggccgtc	cgtcaaaat	240
gatcgcccc	attctggat	aaatcgctga	cgaatatcag	ggcaaactga	ccgttgcaaa	300
actgaacatc	gatcaaaacc	ctggactgc	gccgaaat	ggcatccgt	gtatccgac	360
tctgctgct	ttcaaaaacg	gtgaagtgg	ggcaacaaa	gtgggtgcac	tgtctaaagg	420
tcagttgaaa	gagttcctcg	acgctaacct	ggccagcg	caccatcacc	atcaccatt	480
ataagctt						488

<210> 35
 <211> 383
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Фрагмент ДНК pASK75-TrxN6, полученный с рестриктазами XbaI HindIII. Рамка считывания начинается с положения 23 с atg

<400> 35

tctagatact	gtggagttat	atatgagcga	taaaattatt	cacctgactg	acgacagttt	60
tgacacggat	gtactcaaag	cgacggggc	gatcctcg	gatttctgg	cagagtgg	120
cggccgtc	aaaatgatcg	ccccgattct	ggatgaaatc	gctgacgaat	atcagggcaa	180
actgaccgtt	gcaaaactga	acatcgatca	aaaccctggc	actgcgccga	aatatggcat	240

ccgtggtatac ccgactctgc tgctgttcaa aaacggtaa gtggcggcaa ccaaagtggg	300
tgcaactgtct aaaggtaagt tgaaagagtt cctcgacgct aacctggcca gcgcacca	360
tcaccatcac catataataag ctt	383
<210> 36	
<211> 534	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> ДНК-последовательность зрелого белка Lcn2 дикого типа без Strep-метки II. Рамка считываания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности	
<400> 36	
caaggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggatgtgg taggtctcgc agggaatgca	120
attctcagag aagacaaaga cccgcaaaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa	180
gacaagagct acaatgtcac ctccgtcctg ttttagaaaa agaagtgtga ctactggatc	240
aggacttttgc ttccaggttc ccagccaggg gagttcacgc tggcaacat taagagttac	300
cctggattaa cgagttaccc cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg	360
gtgttcttca agaaagtttc tcaaaacagg gagtacttca agatcaccct ctacgggaga	420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc	534
<210> 37	
<211> 534	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> ДНК-последовательность зрелого белка H1-G1 без Strep-метки II. Рамка считываания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности	
<400> 37	
caaggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggatgtgg taggtgtgc agggaatgtg	120
ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa	180
gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggt tttgtatgata agaagtgttt gtacaagatc	240
cggacttttgc ttccaggttc ccagccaggg gagttcacgc tggcaggat taagagttag	300
cctggaggta cgagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg	360
gtgttcttca aggaggttgc gcaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga	420
accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc	480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 38

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ДНК-последовательность зрелого белка S1-A4 без Strep-метки II. Рамка считываания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности

<400> 38

caggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggtatgtgg taggtgttgc aggaaattat 120
 acgctcagag aagacaaaga cccgctgaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 180
 gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg ttaggttga agaagtgtaa ttacaagatc 240
 cggacttttgc ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tggcattat taagagtcag 300
 cctggaatga cgagttatct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360
 gtgttcttca agacgggtgg gcaaaacagg gagatgttca atatcaccct ctacgggaga 420
 accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 39

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> S1-A4 (Abeta)

<400> 39

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Gly Phe Arg Leu Lys Lys Cys Asn Tyr Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Gln Pro Gly Met Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

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

Asn Arg Glu Met Phe Asn Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

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

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

Asp Gly

<210> 40

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ДНК-последовательность зрелого белка US7 без Strep-метки II. Рамка считывания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности

<400> 40

caggactcca cctcagacacct gatcccagcc ccacacctga gcaaggccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggtatgtgg taggtgttgc aggaaataag 120
 tctctcagag aagacaaaga cccgtgaaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 180
 gacaagagct acaatgtcac ctgggtcggg tttggacta agaagtgtca ttacaagatc 240
 aggacttttgc ttccaggttc ccagccaggg gagttcacgc tggcaggat taagagtgg 300
 cctggaagga cgagtgtct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360
 gtgttcttca aggtggttca gcaaaacagg gagtcgttca atatcacccct ctacgggaga 420
 accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 41

<211> 178

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> US7 (Abeta)

<400> 41

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

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

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

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

Asn	Val	Thr	Ser	Val	Gly	Phe	Gly	Thr	Lys	Lys	Cys	His	Tyr	Lys	Ile
					65			70			75		80		

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

Ile	Lys	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Arg	Val	Val	Ser
					100			105				110			

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

Asn	Arg	Glu	Ser	Phe	Asn	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu
					130			135			140				

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

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

Asp Gly

<210>	42
<211>	805
<212>	ДНК
<213>	Искусственная

<220>

<223> Фрагмент phNAGL124, полученный с рестриктазами *Xba*I/*Hind*III, который кодирует Lcn2 дикого типа в виде слитого белка с альбумин-связывающим доменом, клонированным в pASK75. Рамка считывания начинается с положения 22 с атг

<400> 42

tctagataac	gagggcaaaa	aataaaaaag	acagctatcg	cgattgcagt	ggctctggct	60
ggcttcgcta	ccgttagcgca	ggcccaggac	tccacctca	acctgatccc	agccccac	120
ctgagaagg	tccctctgca	gcagaacttc	caggacaacc	aattccatgg	gaagtggat	180
gtggtaggtc	tcgcagggaa	tgcaattctc	agagaagaca	aagacccgca	aaagatgtat	240
gccaccatct	atgagctgaa	agaagacaag	agctacaatg	tcacccgt	cctgtttagg	300
aaaaagaagt	gtgactactg	gatcaggact	tttgttccag	gttcccagcc	aggcgagttc	360
acgctggca	acattaagag	ttaccctgga	ttaacgagtt	acctcgtccg	agtggtgagc	420
accaactaca	accagcatgc	tatgggttc	ttcaagaaag	tttctcaaaa	cagggagtac	480
ttcaagatca	ccctctacgg	gagaaccaag	gagctgactt	cggaactaaa	ggagaacttc	540
atccgcttct	ccaaatctct	gggcctccct	gaaaaccaca	tcgtcttccc	tgtcccaatc	600
gaccagtgt	tcgacggcag	cgcttggtcc	cacccgcagt	tcgaaaaata	ggcccacctg	660
gctgaagcta	aagttctggc	taaccgtgaa	ctggacaaat	acggtgttcc	cgactactac	720
aaaaacctca	tcaacaacgc	taaaaccgtt	gaaggtgtta	aagctctgat	cgacgaaatt	780
ctcgcagcac	tgccgtaata	agctt				805

<210> 43
 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> H1-G1 (Abeta)
 <400> 43

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Gly Phe Asp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 44
 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> wt Lcn2

<400> 44

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile
 65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 45
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер

<400> 45

cccaaggactc cacctcagac c

21

<210> 46
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер

<400> 46

actgcgggtg ggaccaagcg ctgccgt

27

<210> 47
 <211> 58
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> вырожденный олигонуклеотид DH-4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> У представляет собой с или т

<400> 47
 ggacaaccaa ttccatggga agtggtatgt ggttaggtgt gcaggaaatg tggtgctc 58

<210> 48
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Праймер J08rev

<400> 48
 gctgccgtcg atacactg

18

<210> 49
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>

<223> ДНК-последовательность зрелого белка H1GA без Strep-метки II. Рамка считывания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности

<400> 49
 caggactcca cctcagaccc gatcccaagcc ccacccctctga gcaaggccc tctgcagcag 60
 aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggatgtgg taggtgctgc aggaaatgtg 120
 ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcc acatctatga gctgaaagaa 180
 gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg ttgtatgata agaagtgttt gtacaagatc 240
 cggacttttgc ttccagggttc ccagccaggc gagttcacgc tggcaggat taagagttag 300
 cctggaggtt cagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360
 gtgttcttca aggagggttgc gcaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga 420
 accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 480
 ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cgcc 534

<210> 50
 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> H1GA (Abeta)

<400> 50

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Gly Phe Asp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 51

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> ДНК-последовательность зрелого белка H1GV без Strep-метки II. Рамка считывания начинается с первого нуклеотида следующей последовательности

<400> 51

caggactccca cctcagacacct gatcccagcc ccacacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60

aacttccagg acaaccaatt ccatggaaag tggtatgtgg taggtgttgc aggaaatgtg 120

ttgctcagag aagacaaaga cccgcttaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 180

gacaagagct acaatgtcac cagtgtcggg tttgatgata agaagtgttt gtacaagatc 240

cggacttttg ttccaggttc ccagccaggc gagttcacgc tgggcaggat taagagttag 300

cctggaggta cgagttggct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 360

gtgttcttca aggagggtgc gcaaaaacagg gagacgttca atatcaccct ctacgggaga 420

accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 480

ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc

534

<210> 52
 <211> 178
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> H1GV (A beta)
 <400> 52

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

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

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

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

Asn Val Thr Ser Val Gly Phe Asp Asp Lys Lys Cys Leu Tyr Lys Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

CCCAGGACTCCACCTCAGACC Bio-CCAGGACAACCAATTCCATGGGAAGTGGTATGTGGTAGGT
 CAGACTCCACCTCAGACCTGATCCCAGCCCCACCTCTGAGCAAGGTCCCTCTGAGCAGAACACTCCAGGACAACCAATTCCatGGRAAGTGGTATGTGGTAGGTCTCCGAGGGAAATGCAATTCTC
 GTCTCTGAGGTGGACTCTGGACTAGGGTGGGGAGACTCGCTTCAGGGAGACGTGCTTGAAGGTCTGTGGTTAAGGTACCCCTCACCATACACCATCCAGACCGTCCCCTACGGTTAAGAG
 GlnAspSerThrSerAspLeuIleProAlaProLeuSerLysValProLeuGlnGlnAsnPheGlnAsnAsnPheHisGlyLysTrpTyrValValGlyLeuAlaGlyAsnAlalleLeu
 1 10 20 28 30 36 40 41

AGAGAAGACAACAGACCCGNNKAAGATGNKGNCCACCATCTAIGACCTG CAAAGCTACAATGTCACANNKTCNNKTTNNKNAAGAAGTGTNNKTACNNKATCNNKACTTTGTT
 AGAGAAGACAACAGACCCGAAAGATCTATGCCACCATCTATGACCTGAAAGAACAGACACTAACATGTCACCTCCCGTCTGTGTTAGGAAAAGAAGTGTGACTACTGGATCAGGACTTTGTT
 TCTCTCTGTTCTGGGCTTTCTACATACGGTGGTAGACTCGACTTCTCTGCTGATGTTACACTGGAGGACAGGAAATCTTTCTCACACTGATGACCTAGTCCCTGAAAACAA
 CGGTGGTAGATACTCGACTTCTCTATTCGATGTTACAGTGG TGAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAAAGACAA
 ArgGluAspLysAspProGlnLysMetTyrAlaThrIleTyrGluLeuLysGluAspLysSerTyrAsnValThrSerValLeuPheArgLysLysCysAspTyrTrpIleArgThrPheVal
 49 50 52 60 68 70 72 73 77 79 80 81

CCAGGTTCC GGCAGGTTCACCGCTGGGNNKATTAAAGAGTNKCCCTGGANNKACGAGTNKCTCGTCCGAGTGGTGA GCTATGGTGTCTCAAGNNKGTT
 CCAGGTTcCCAGGCAAGGCGAGTTCACCGCTGGCACACATTAAAGAGTTACCCCTGGATTAAAGCTTACCTCGTCCGAGTGGTGAAGCACCACCTAACACCAGCATGCTATGGTCTTCAGAAGGTT
 GGTCAGGGTCGGCTCGCTCAAGTGGACCCGGTTGTAATTCTCAATGGGACCTAATTGCTCAATGGAGCAGGCTCACCACCTCGTGGTGTGATGTTGGTGTGACGATACCCAAAGAAGTCTTTCAA
 GGTCAGGGTCGGCTCGCTCAAGTGGACCCGGTTGTAATTCTCAATGGGACCTAATTGCTCAATGGAGCAGGCTCACCACCTCGTGGTGTGATGTTGGTGTGACGATACCCAAAGAAGTCT
 ProGlySerGlnProGlyGluPheThrLeuGlyAsnIleLysSerTyrProGlyLeuThrSerTyrLeuValArgValSerThrAsnTyrAsnGlnHisAlaMetValPhePheLysLysVal
 87 90 96 100 103 106 110 120 125

NNKCAAAACAGGGAGNNKTTCNNKATCACCCCTACGGGAGAAC
 TCTCAAAACAGGGAGTACTTCAGATCACCCCTACGGGAGAACAGGAGCTGACTTCGGAACTAAAGGAGAACTTCATCCGCTTCTCCAAATCTGGGCTCCCTGAAAACCACATCGTCTTC
 AGAGTTTGTCCTCATGAAGTTCTAGTGGAGATGCCCTTCTGGTTCTGACCGGAAGCCCTGATTTCCCTCTGAAGTGGCAGAGGGTTTAAAGACCCGGAGGGACTTTGGTGTAGCAGAAG
 GTGGGAGATGCCCTTCTGGTTCTGACCGGAAGCCCTGATTTCCCTCTGAAGTGGCAGAGGG
 CTGAAGTAGGGAGAGGGTTAGAGACCCGGAGGGACTT-Bio
 SerGlnAsnArgGluTyrPheLysIleThrLeuTyrGlyThrLysGluLeuThrSerGluLeuLysGluAsnPhiIleArgPheSerLysSerLeuGlyLeuProGluAsnHisIleValPhe
 127 130 132 134 140 150 160

CCTGTCCCAATCGACCAAGTGTATCGACGGCAGCGCTGGTCCACCCGAGTTCGAAAAATAA
 GGACAGGGTTAGCTGGTCACATAGCTGGCGTCGCGAACCCAGGGTGGCGCTCAAGCTTTTATT
 TGCCGTGGCGAACCAAGGGTGGCGTCA
 ProValProIleAspGlnCysIleAspGlySerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
 170 180 Strep-tagII 188

ФИГ.1

1 CCAATTCCATGGGAAATGGTATGCGTGGGChnnnGCCGAAATnnnnnnCTGCGTGAGGATAAGGATCCGnnnAAAATGnnnGCGACCAT 90
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTAAAGGTACCCCTTACCATACAGCACCCGGACCGCCCTTACGGTAAGACGCACTCCTATTCCCTAGGCGCTTTTACATACGCTGGTA
 GlnPheHisGlyLysTrpTyrValValGlyXaaAlaGlyAsnXaaXaaLeuArgGluAspLysAspProXaaLysMetXaaAlaThrIle
 8 12 13 21 24

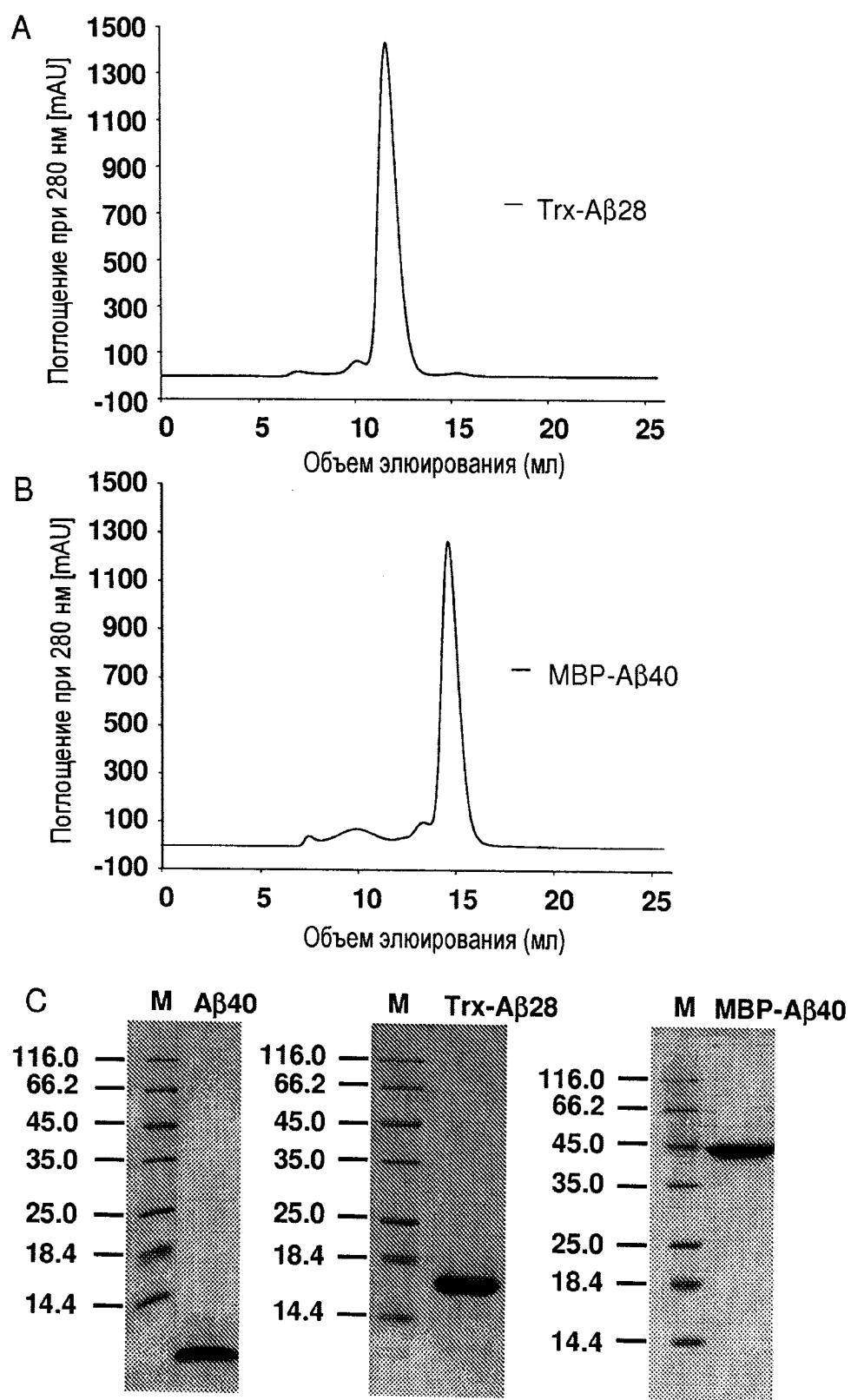
91 TTACGAGTTGAAAGAAGATAAAATCATATAACGTCACCnnnGTGnnnTTTnnnnnnAAGAAATGCnnnTACnnnATTnnnACCTTGTGCC 180
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATGCTCAACTTCTCTATTTAGTATATTGCGAGTGGAGGACAAACAAAGCTTTTCTTACGCTGATGACCTAACGCTAGAAACACGG
 TyrGluLeuLysGluAspLysSerTyrAsnValThrXaaValXaaPheXaaXaaLysLysCysXaaTyrXaaIleXaaThrPheValPro
 40 42 44 45 49 51 53

181 GGGGAGCCAGCCGGCGAGTTACTTTAGGChnnnATTAAAAGTnnnCCGGGChnnnACATCnnnTTGGTCCCGCTCGTGAGCACCAACTA 270
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCCTCGGTGGCCCGCTCAATGAAATCCGTTGTAATTTCATGGGCGGACTGTAGTATGAAACCGCGCAGCAGTCTGGTTGAT
 GlySerGlnProGlyGluPheThrLeuGlyXaaIleLysSerXaaProGlyXaaThrSerXaaLeuValArgValSerThrAsnTyr
 68 72 75 78

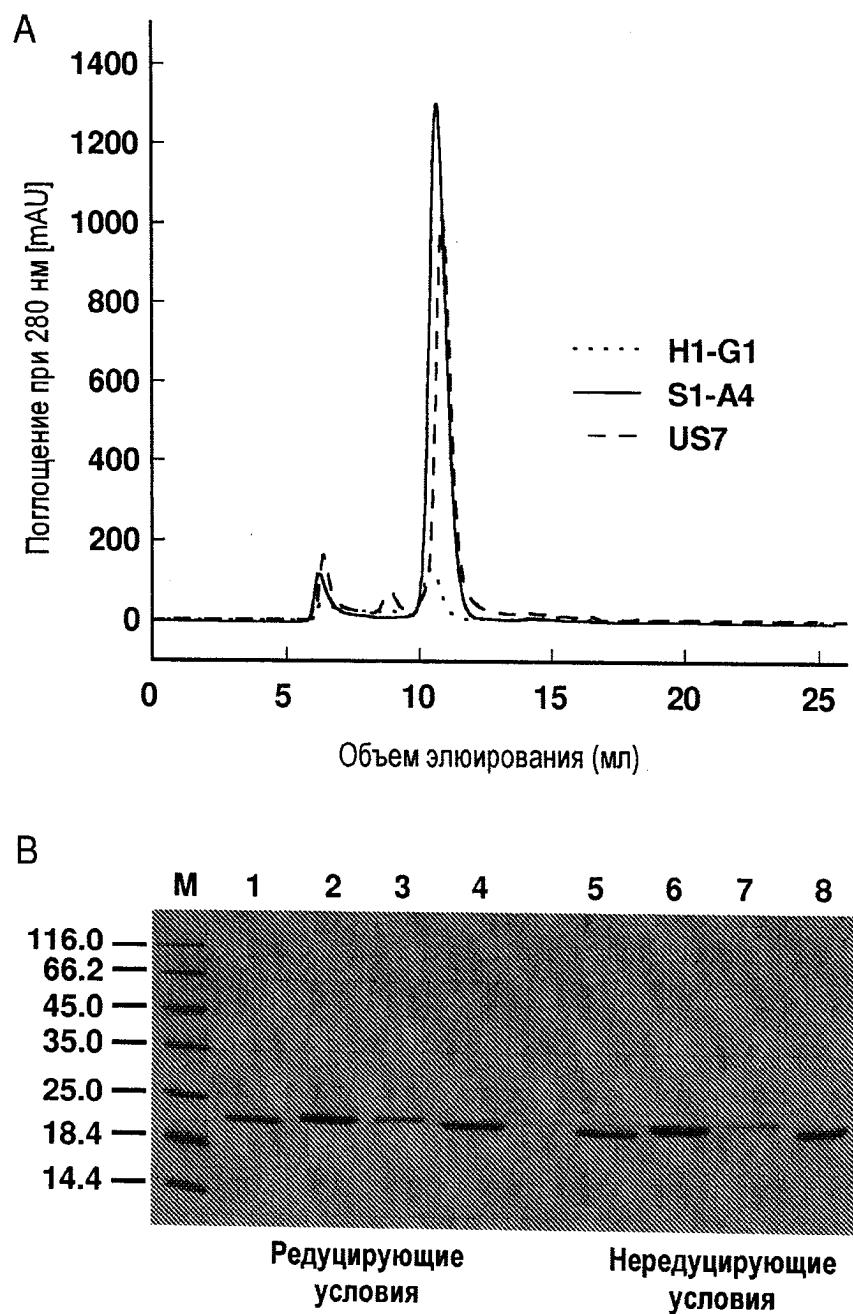
271 CAACCAGCATGCCATGGTGTCTCAAGnnnGTGnnnCAGAACCGCGAGnnnTTTnnnATCACACTGTACGGGCGCACGAAAGAACTGAC 360
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGTCTGACGGTACCGAACAGAGTTCTTACAGGGCTTGGCGCTCATGAAATTCTAGTGTGACATGCCCGCGTGTCTTGACTG
 AsnGlnHisAlaMetValPhePheLysXaaValXaaGlnAsnArgGluXaaPheXaaIleThrLeuTyrGlyArgThrLysGluLeuThr
 97 99 104 106

361 AAGCGAGCTGAAGGAAATTTATCCGCTTTCCAAATCTCTGG 404
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGCTCGACTCCCTTAAATAGGCGAAAGGTTAGAGACCC
 SerGluLeuLysGluAsnPheIleArgPheSerLysSerLeu

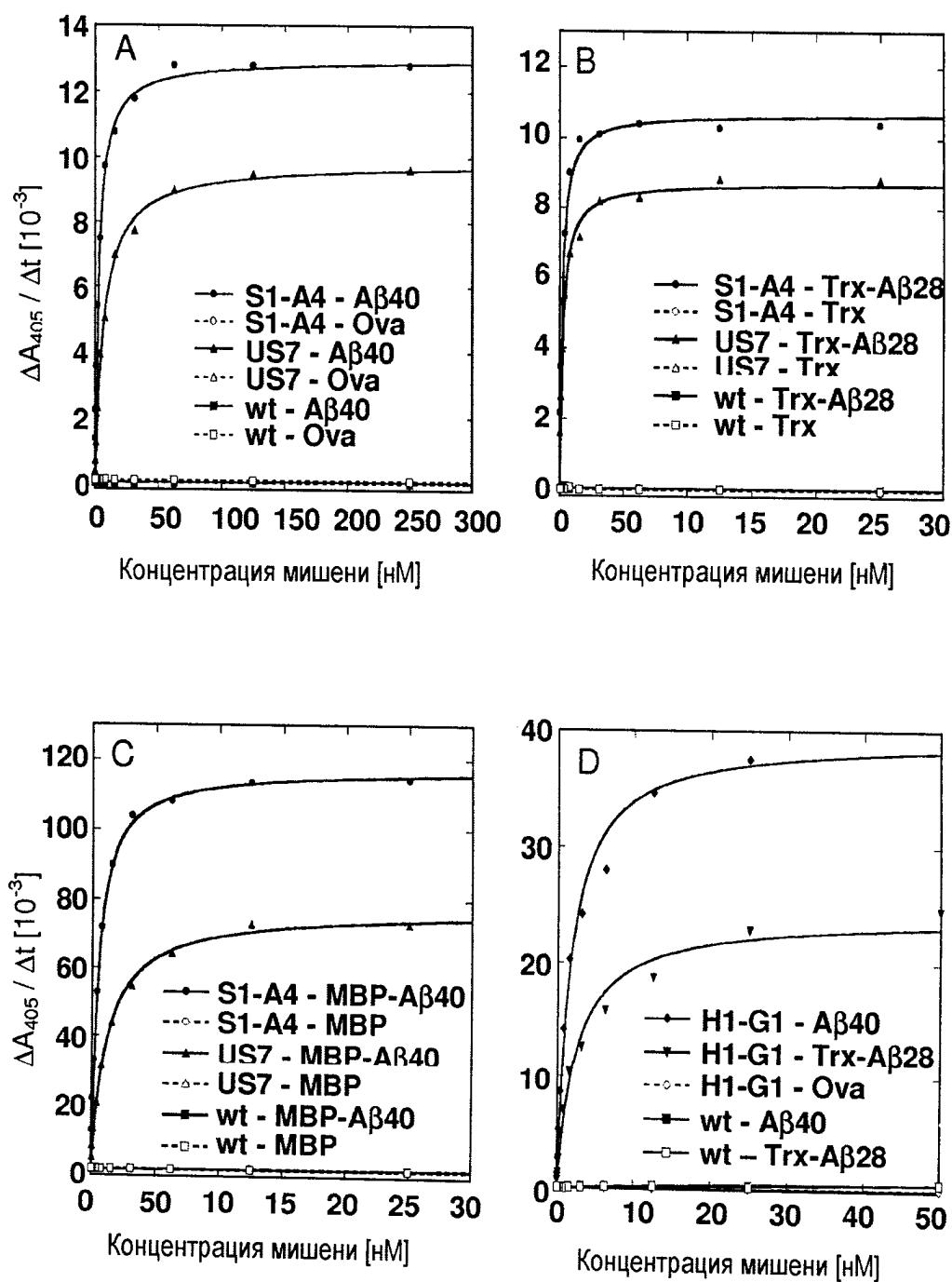
ФИГ.2



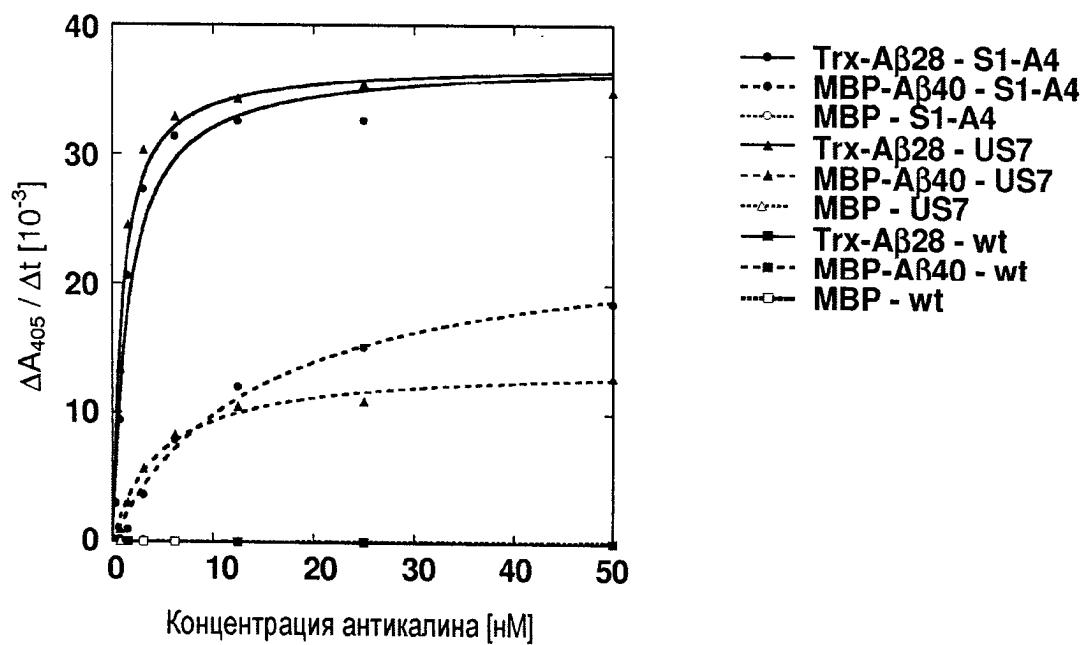
ФИГ.3



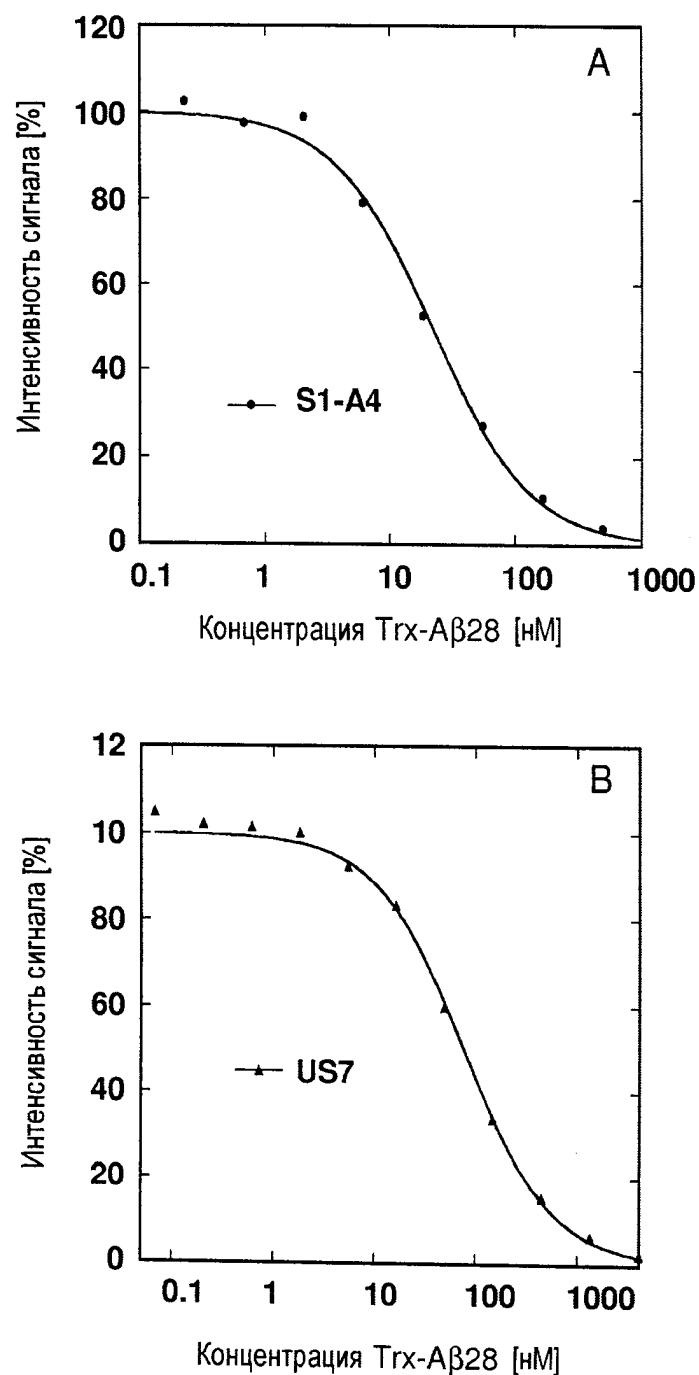
ФИГ.4



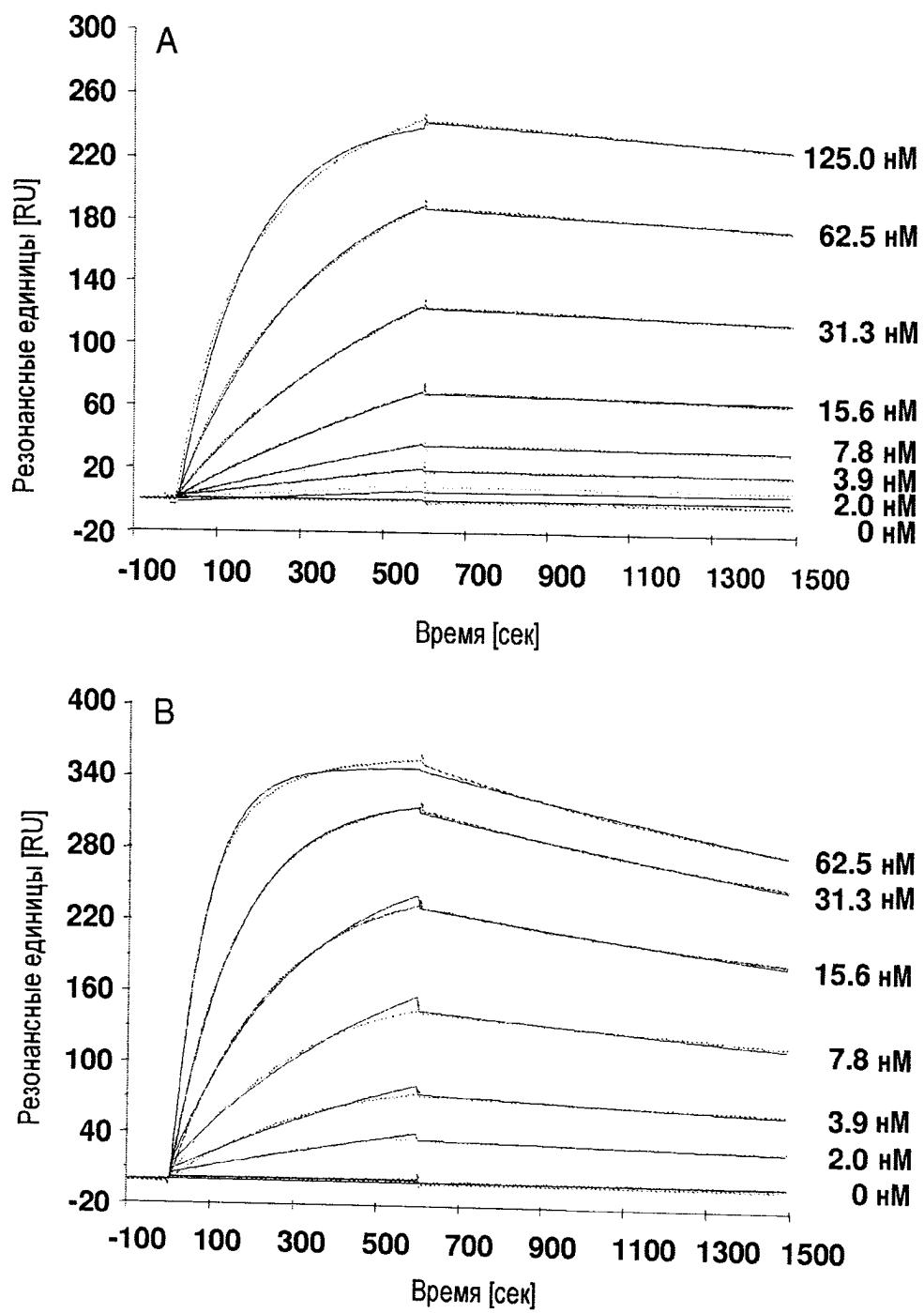
ФИГ.5



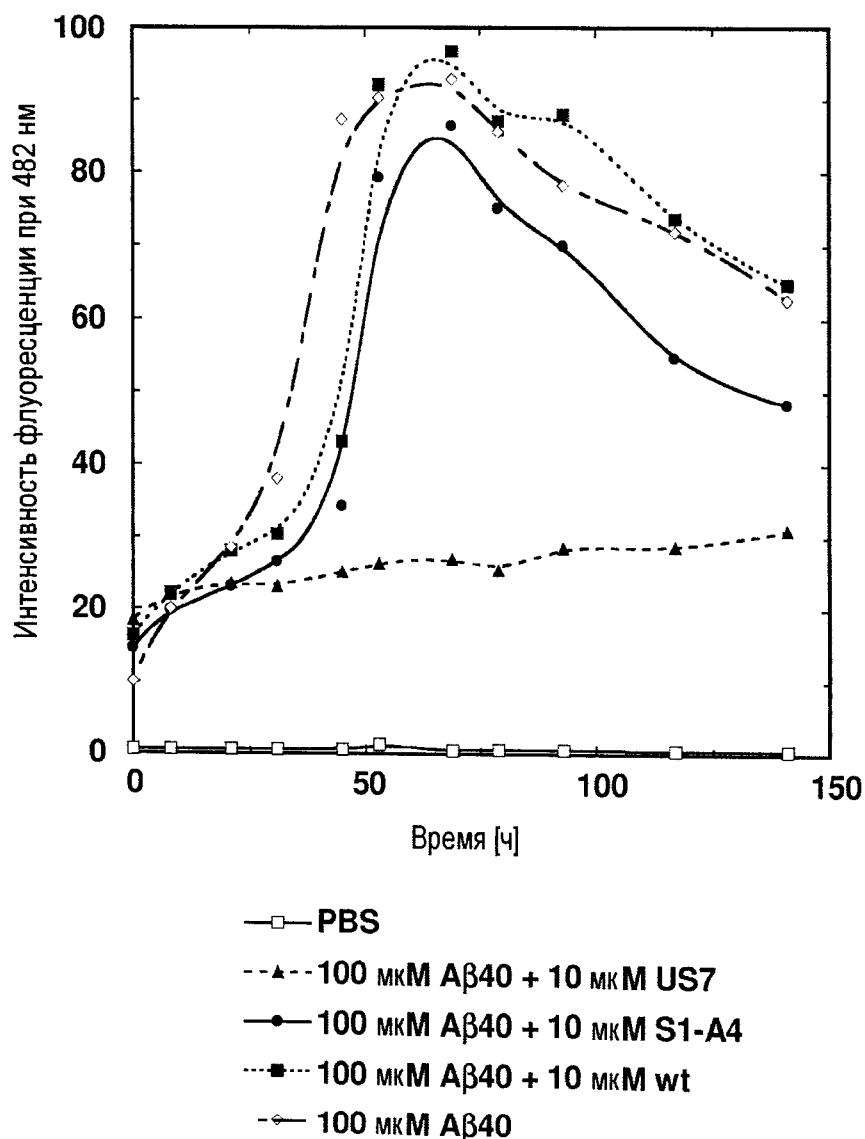
ФИГ.6



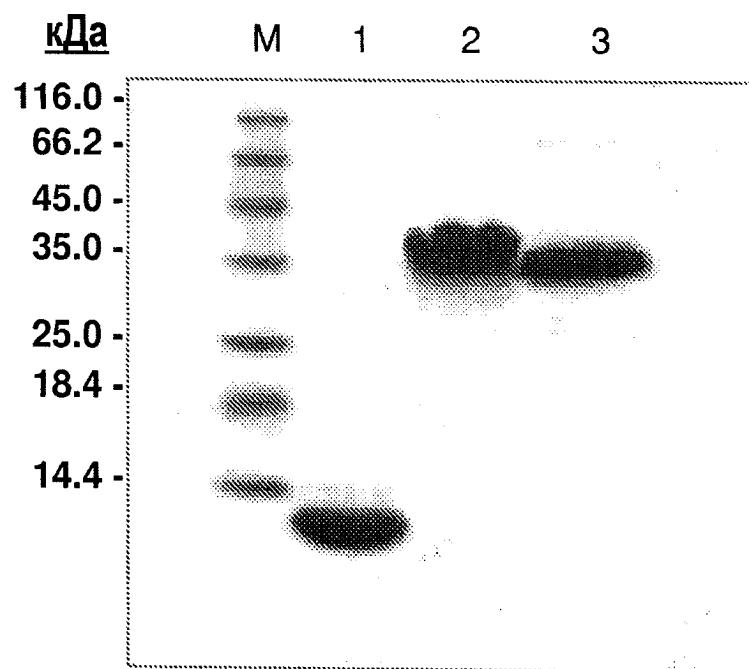
ФИГ.7



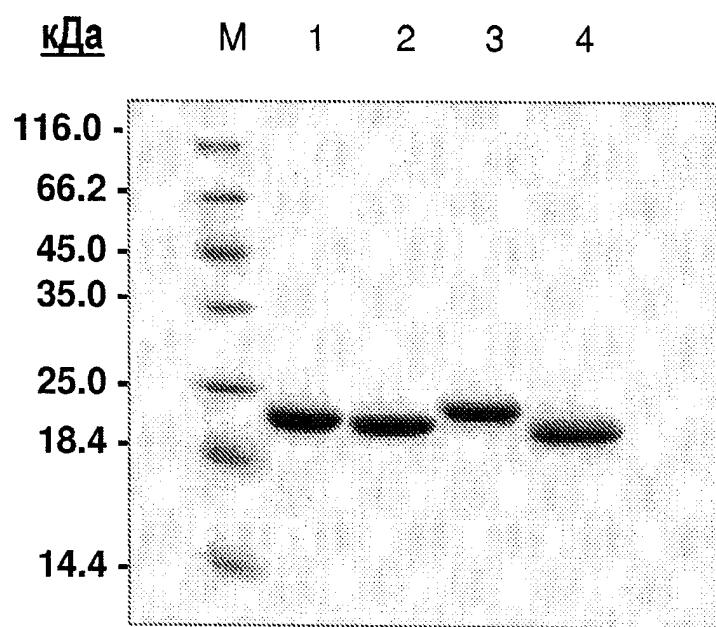
ФИГ.8



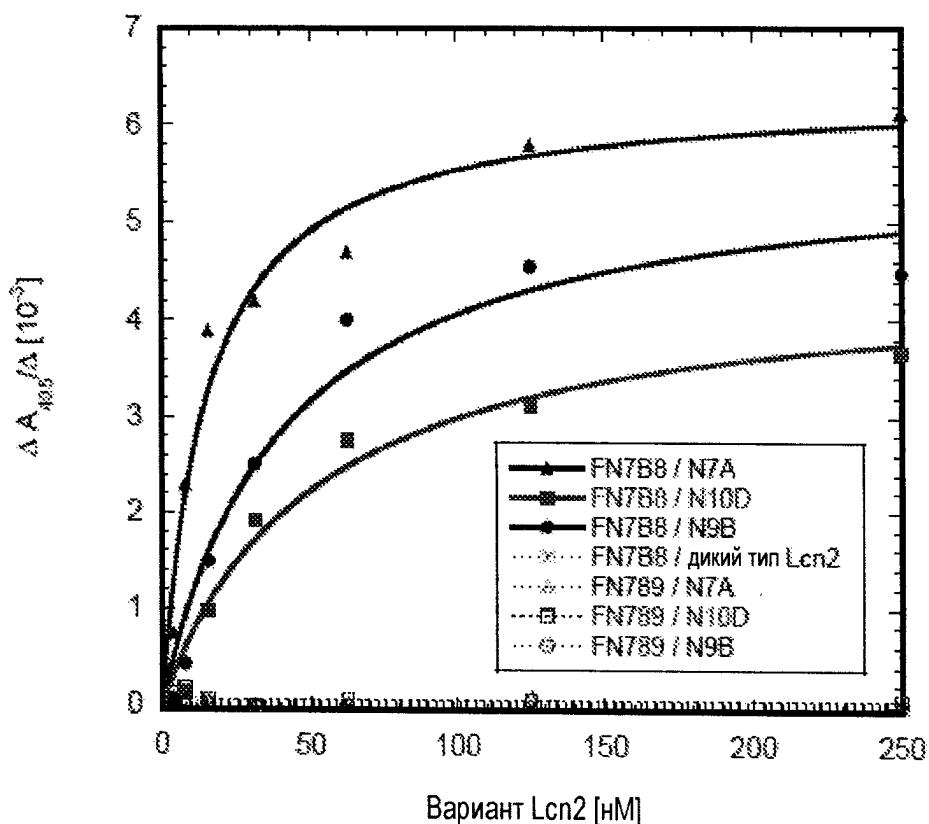
ФИГ.9



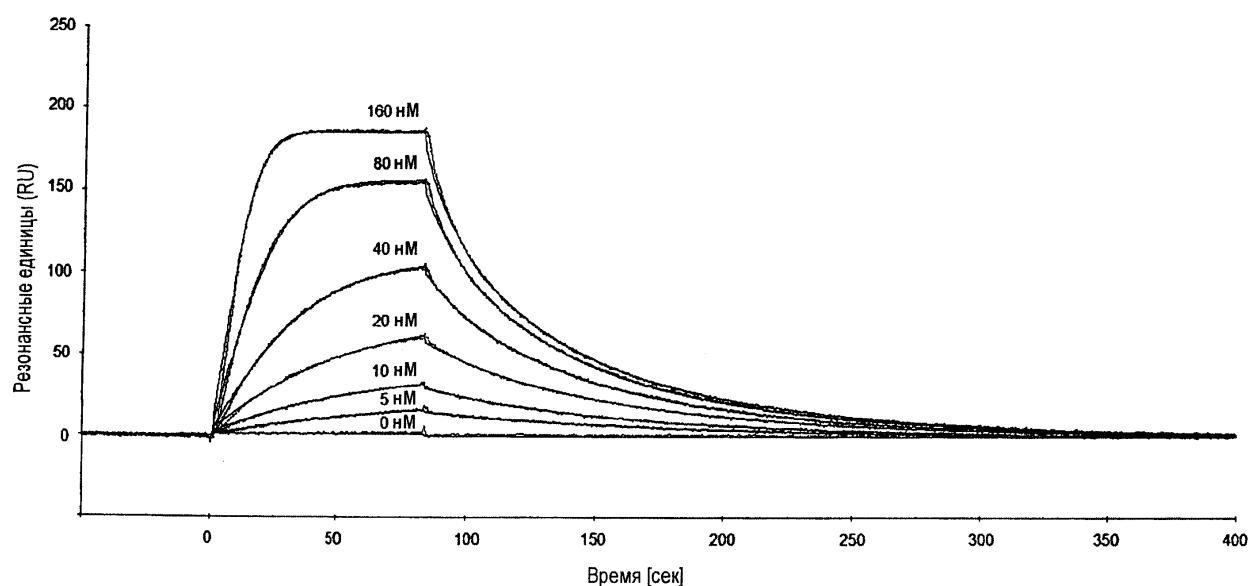
ФИГ.10



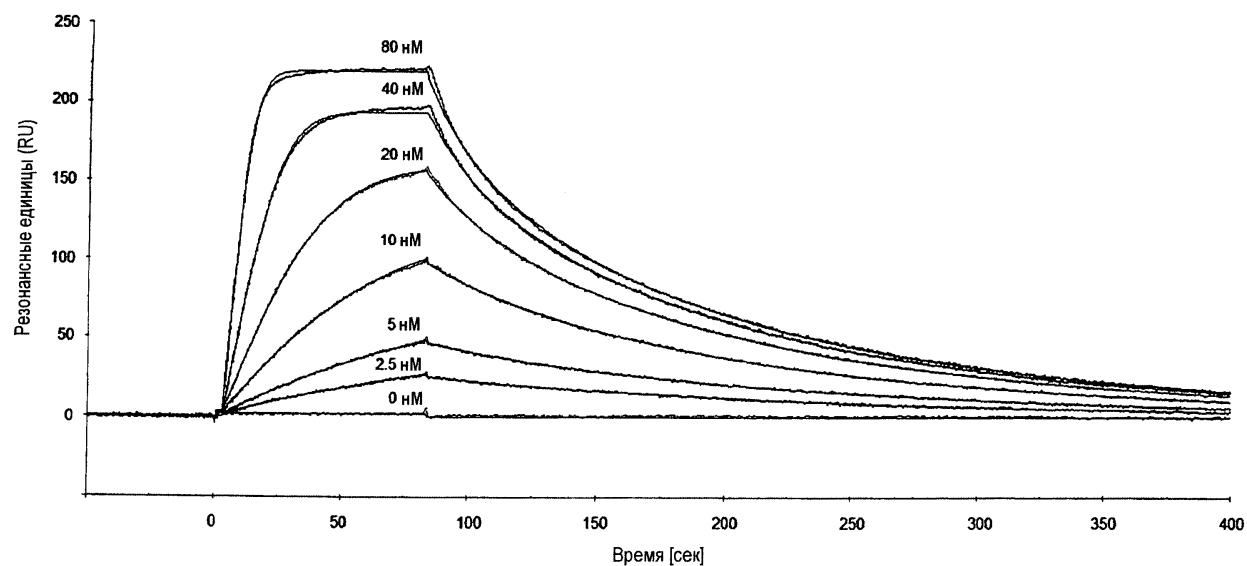
ФИГ.11



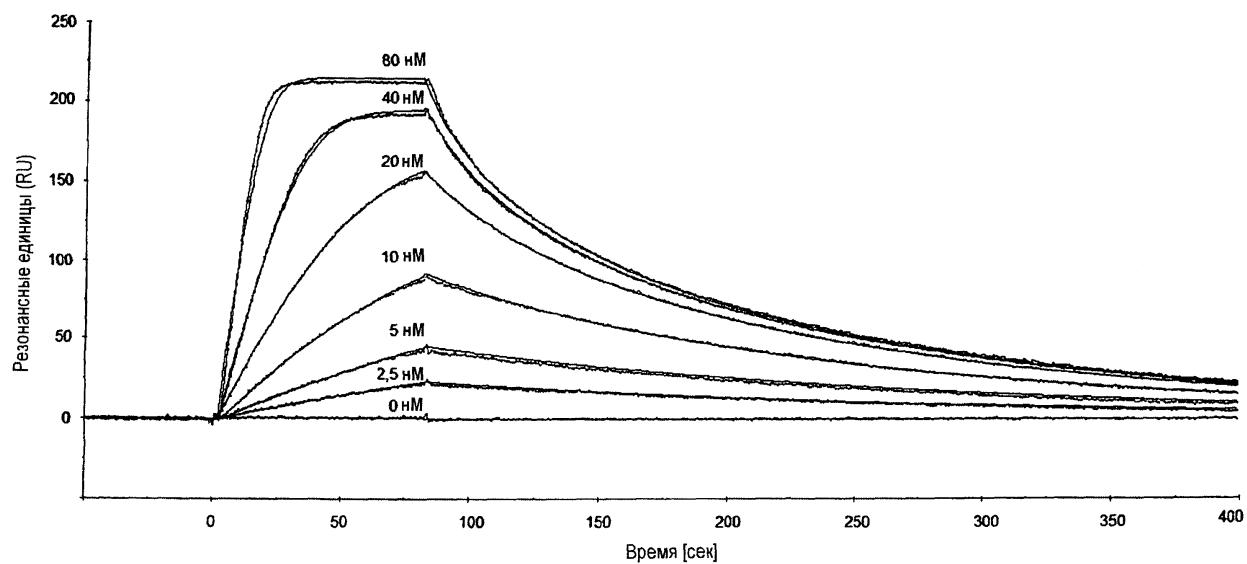
ФИГ.12



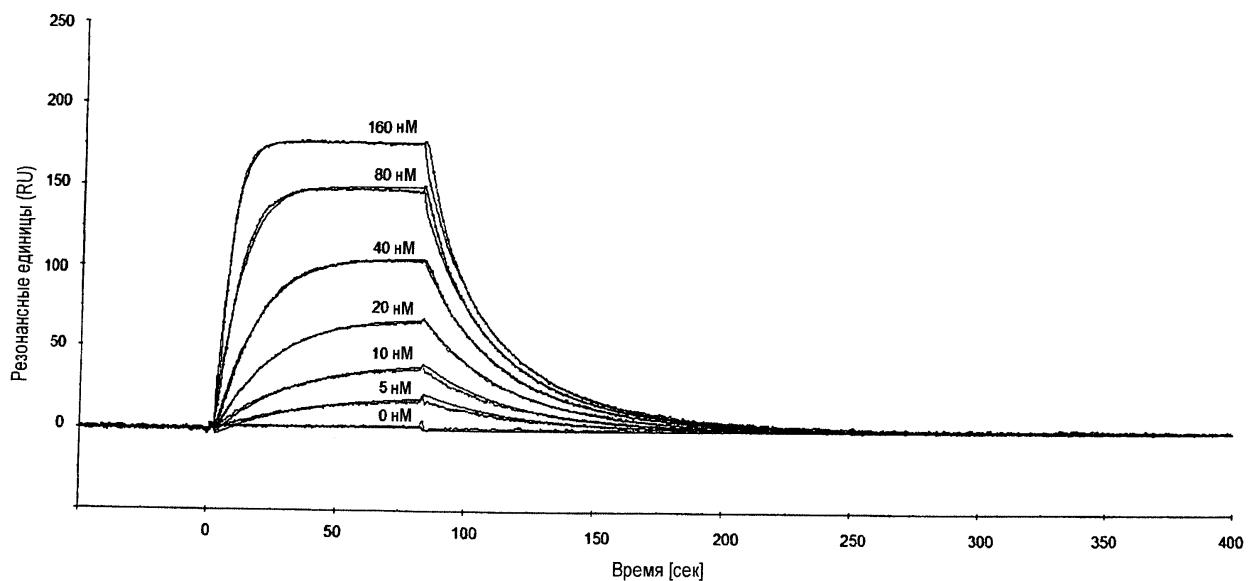
ФИГ.13



ФИГ.14



ФИГ.15



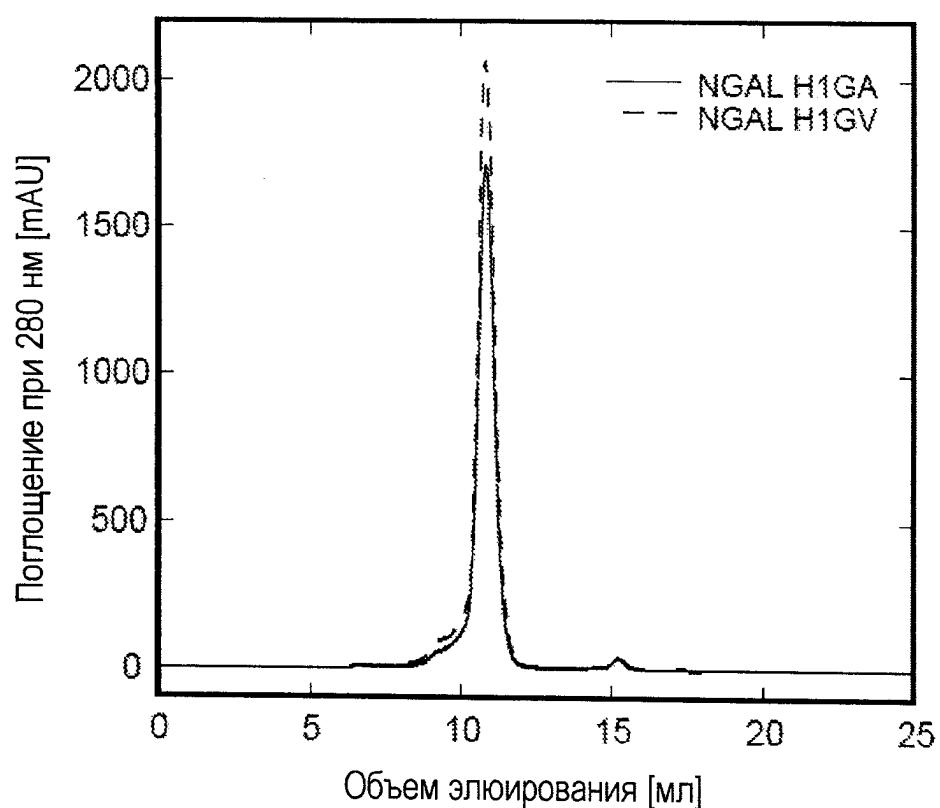
ФИГ.16

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90				
Lcn2	QDSTS	DLIPAPPLSKVPLQ	QDNFQ	QGK	WVVG	LAGNAIL	REDKDPQ	KMYATIY	YELKEDK	SYNVT	SVLFRKK	CDY	WIRTF	VPGCQPG
Lib	.	.	.	h.	.	x...xx	.	x...x.	.	x...xx	.	x...x.	.	s...
S1-A4 (Abeta)	.	.	.	h.	.	V...YT	.	L...Y	.	S.G.RL	.	N.K.R	.	s...
US7 (Abeta)	.	.	.	h.	.	V...KS	.	W...Y	.	S.G.GT	.	H.K.R	.	s...
H1-G1 (Abeta)	.	.	.	h.	.	C...VL	.	L...Y	.	S.G.DD	.	L.K.R	.	s...
N7A (ED-B)	.	.	.	h.	.	K...HD	.	R...Q	.	N.R.VH	.	N.R.W	.	s...
N7E (ED-B)	.	.	.	h.	.	E...SL	.	R...Y	.	S.R.RS	.	H.L.R	.	s...
N9B (ED-B)	.	.	.	h.	.	R...MR	.	A...V	.	K.M.QR	.	K.M.N	.	s...
N10D (ED-B)	.	.	.	h.	.	A...TW	.	Y...Q	.	N.L.MS	.	R.M.H	.	s...
	====A=====	=====#1=====	=====B=====							====C=====	=====#2=====	=====D=====		

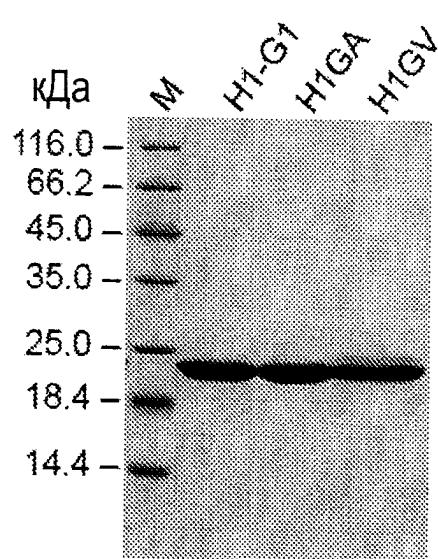
	100	110	120	130	140	150	160	170
Lcn2	EFTLGNIKSYPGLTSYLV	RV	VST	NYNQHAMVFFKKV	SQNREYFKITLYGRT	KELTSELKENFIRFSK	SLGLPENHIVFPV	PIDQCIDG
Libx...x...x...x...x...x...
S1-A4I...Q...M...Y...T.G...M.N...
US7R...R...R...A...V.Q...S.N...
H1-G1R...E...G...W...E.A...T.N...
N7AN...W...L...W...R.Y...L.E...N...
N7EL...K...H...F...T.A...Y.F...
N9BA...P...P...T...H.F...Y.H...
N10DS...W...L...W...R.Y...F.G...
	==E=====	=====#3=====	=====F=====			==G=====	=====#4=====	=====H=====

ФИГ.17

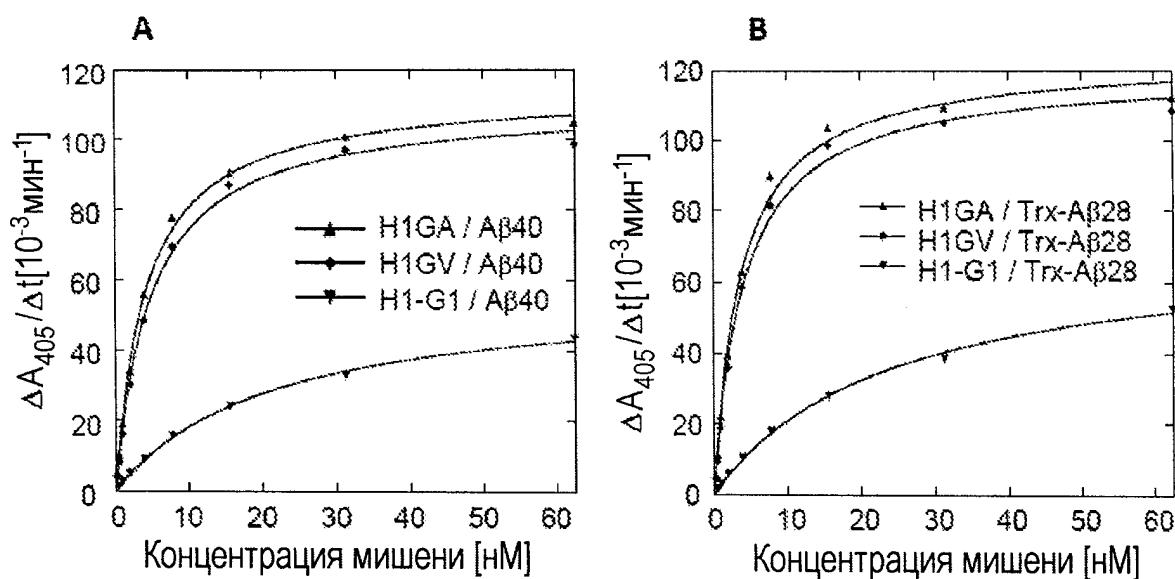
A



B

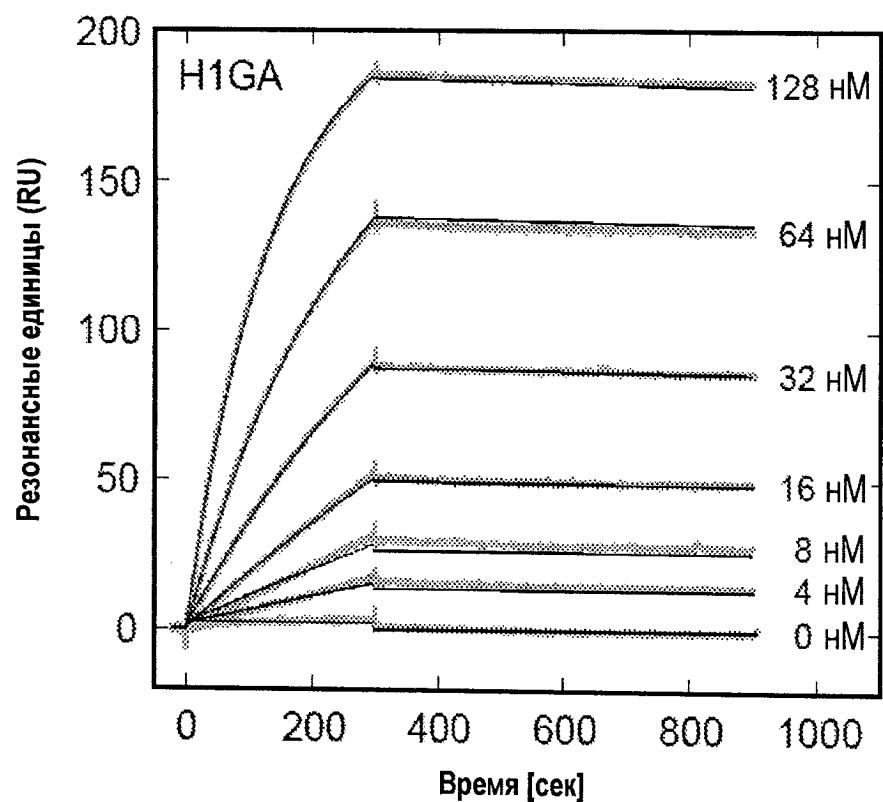


ФИГ.18

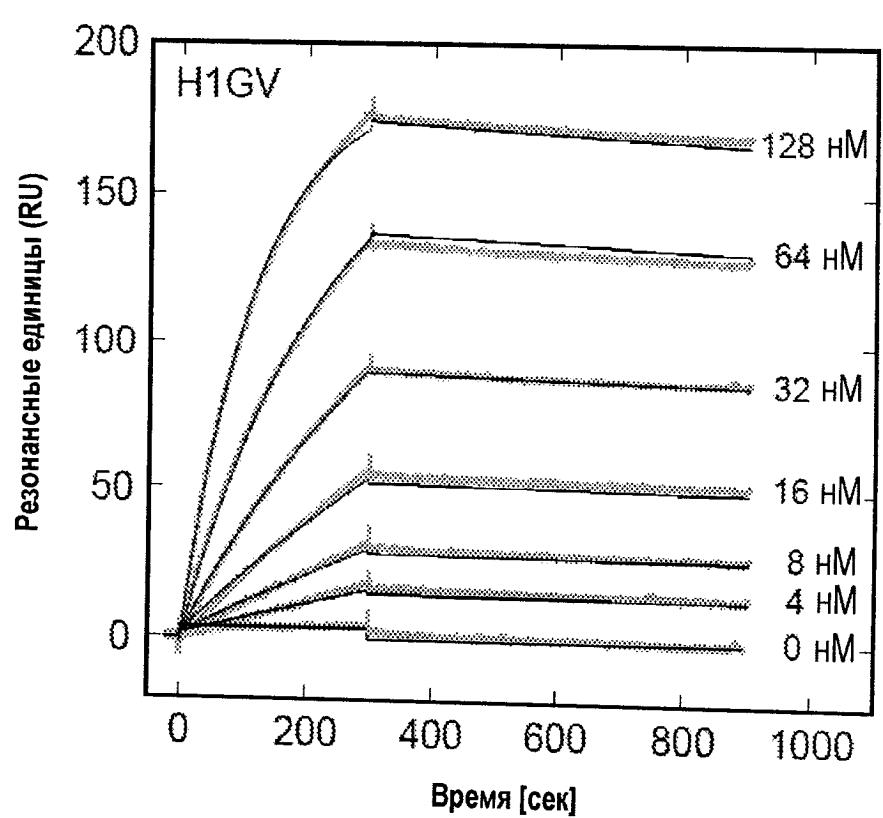


ФИГ.19

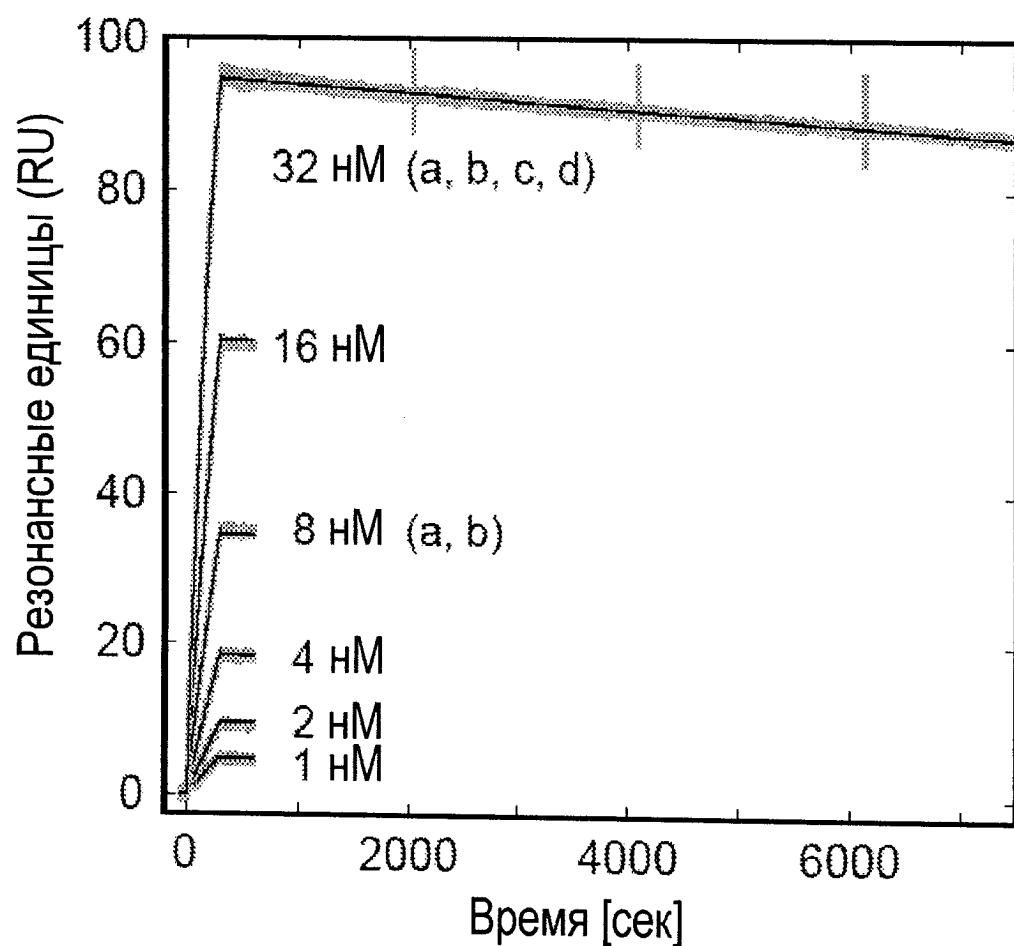
A



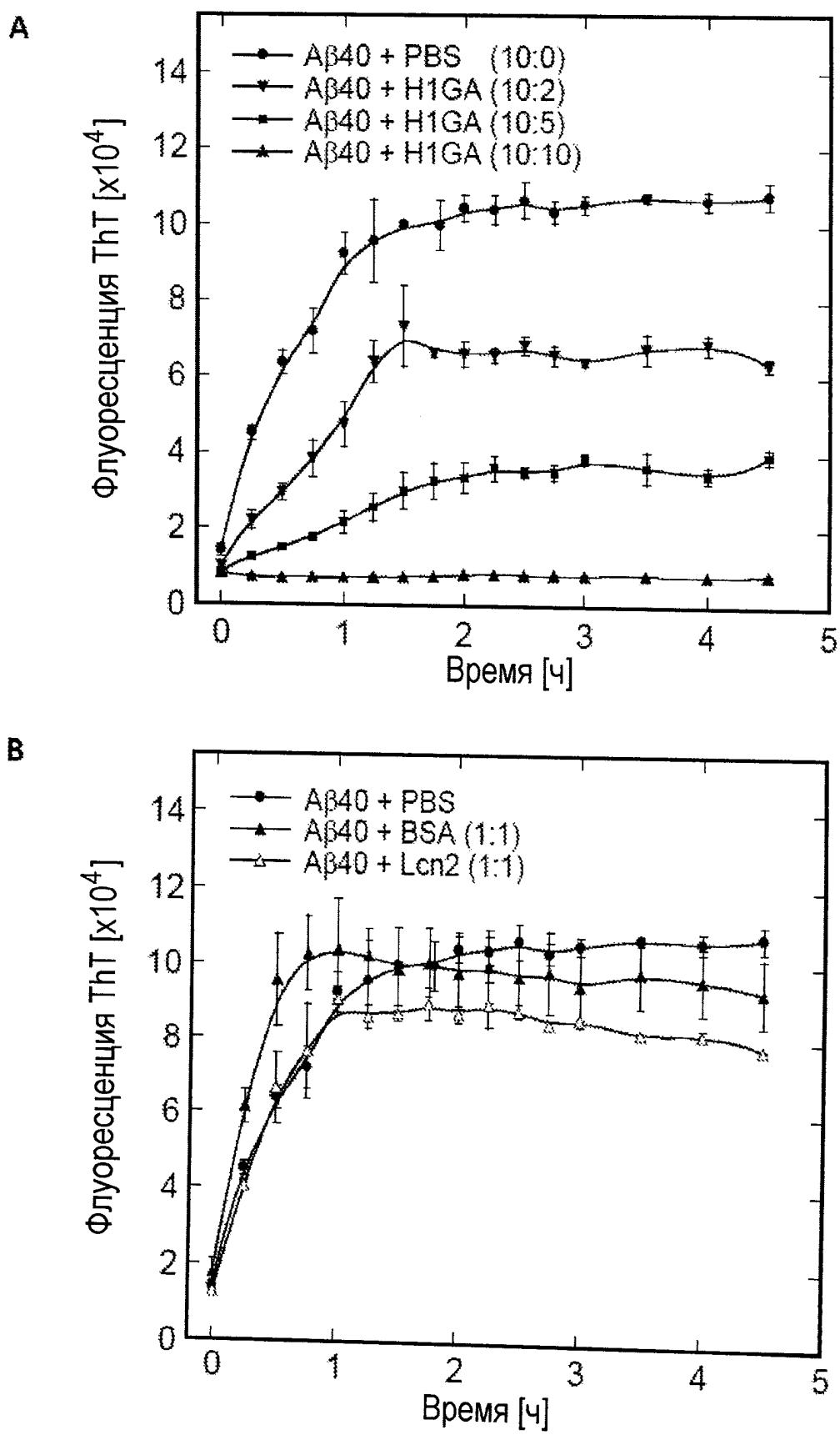
B



ФИГ.20



ФИГ.21



ФИГ.22

	K_D [нМ]	
	H1GA	H1GV
Аβ40 (ELISA с иммунным захватом, фиг.19)	4.2 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Trx-Аβ (ELISA с иммунным захватом, фиг.19)	3.8 ± 0.4	4.2 ± 0.4
MBP-Аβ40 (SPR, фиг.20) *	0.48	1.1
Аβ40 (SPR, фиг.21) **	0.095	-

* время диссоциации не достаточно велико

** значение более надежно, поскольку время диссоциации достаточно велико

ФИГ.23

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Lcn2	QDSTS	DLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGK	WVGLAGNAILREDKDPQKMYATIYEL	KEDKS	YNVT	SVLFR	KKKCDY	WIRT	FVPGCQPG	
Lib
S1-A4
US7
H1-G1
H1GA
H1GV
N7A
N7E
N9B
N10D
	====A====	====#1====	====B====		====C====	====#2====	====D====			

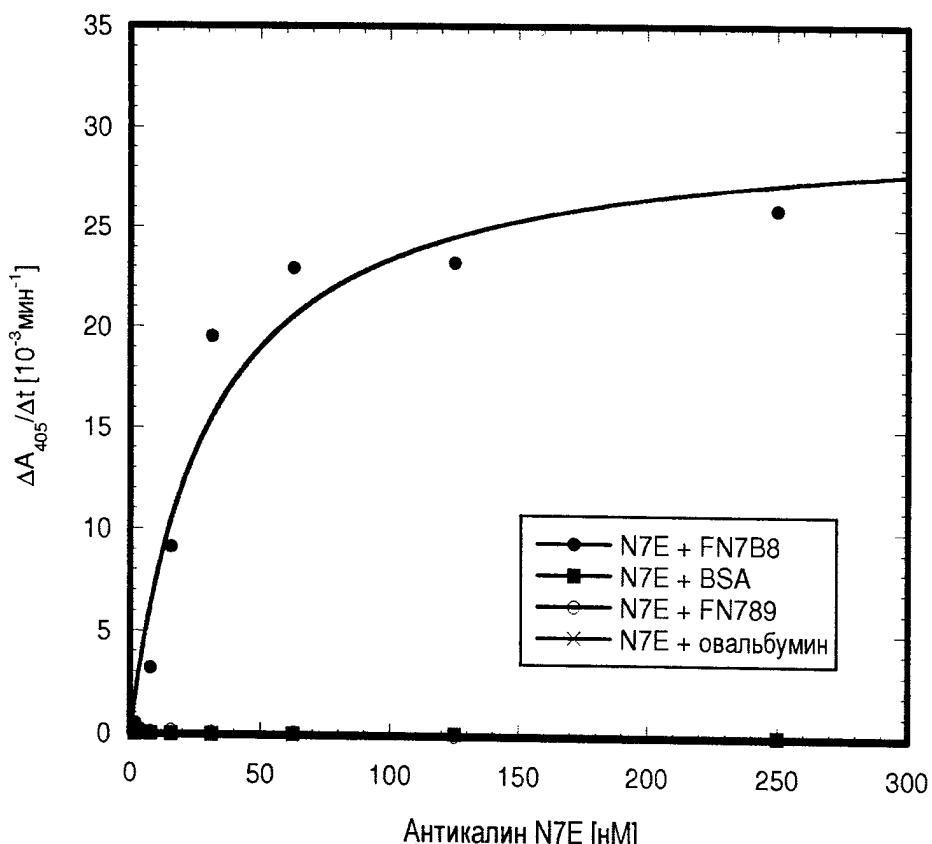
	100	110	120	130	140	150	160	170															
Lcn2	EFTLGN	IKSY	PGLT	SYL	VRVV	ST	NYNQ	HAMV	FFKKV	SQNREY	FKITLY	GR	TKEL	TSEL	KENFIR	FSK	SLGLP	ENHIV	FV	PV	IDQ	CIDG	
Lib	
S1-A4	I	
US7	R	R	A	
H1-G1	R	E	G	
H1GA	R	E	G	
H1GV	R	E	G	
N7A	N	W	L	
N7E	L	K	H	F	
N9B	A	P	P	T	
N10D	S	W	L	W	
	==E==	====#3====	====F====		====G====	====#4====	====H====																

ФИГ.24

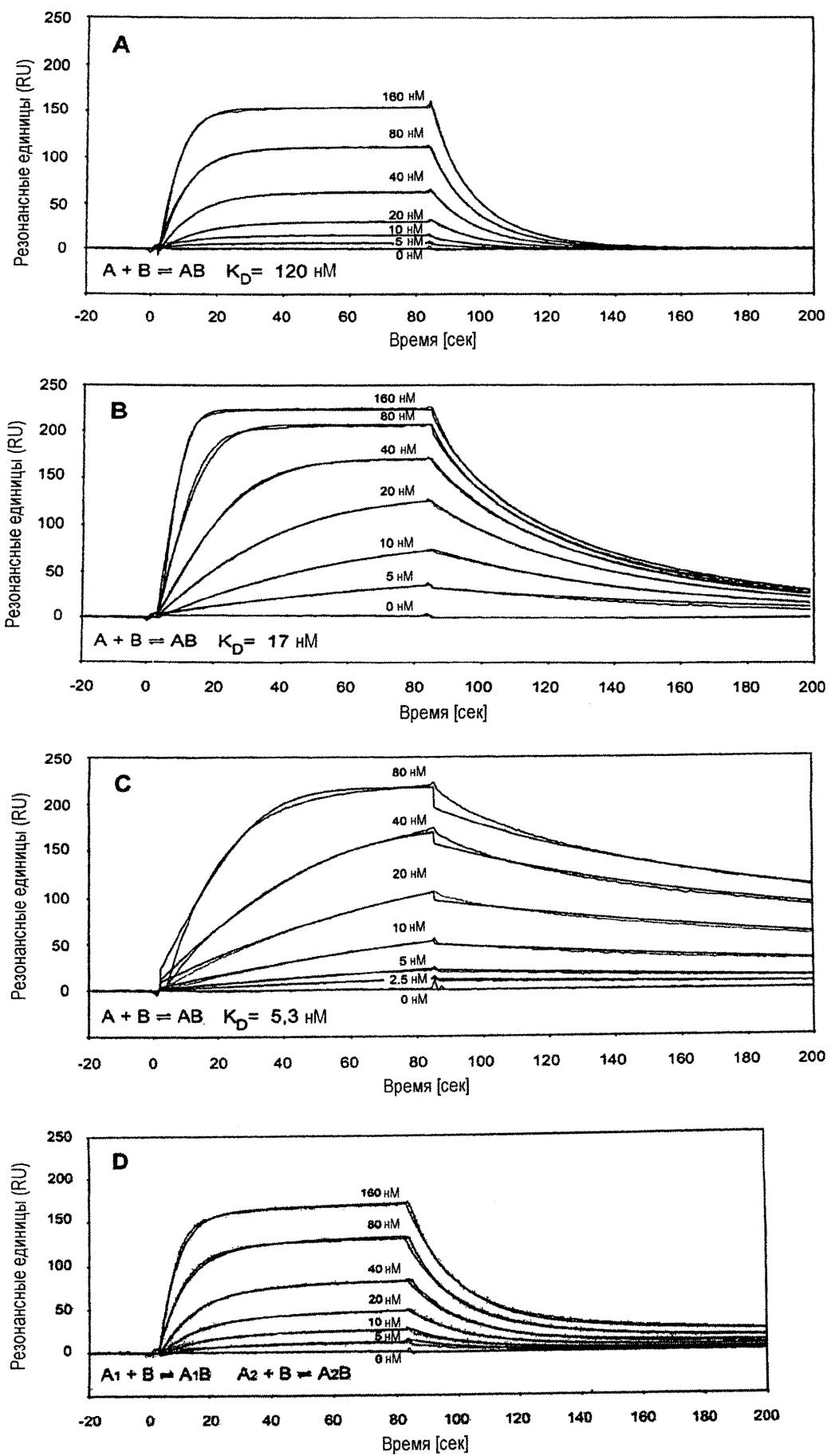
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90					
Lcn2	QDSTS	DLIPAPPLSKV	PLOQN	FQDNQ	FQGK	WVVG	LAGNAIL	REDKDPQ	KMYATI	YELKE	DSYNVT	SVLFRKK	CDY	WIRTFVPGC	QPG
Lib
H1-G1
H1GA
H1GV
	====A====	=====#1=====	====B====					====C====	=====#2=====	====D====					

	100	110	120	130	140	150	160	170							
Lcn2	EFTLGN	IKSY	PGPLTSY	LVRVV	STNY	NQHAMV	FFKKVSQN	REYFKITLY	GRTKEL	TSLENK	FIRFSK	SGLPENHIV	FVFPV	PIDQC	IDG
Lib
H1-G1
H1GA
H1GV
	====E====	=====#3=====	====F====			====G====	=====#4=====	====H====							

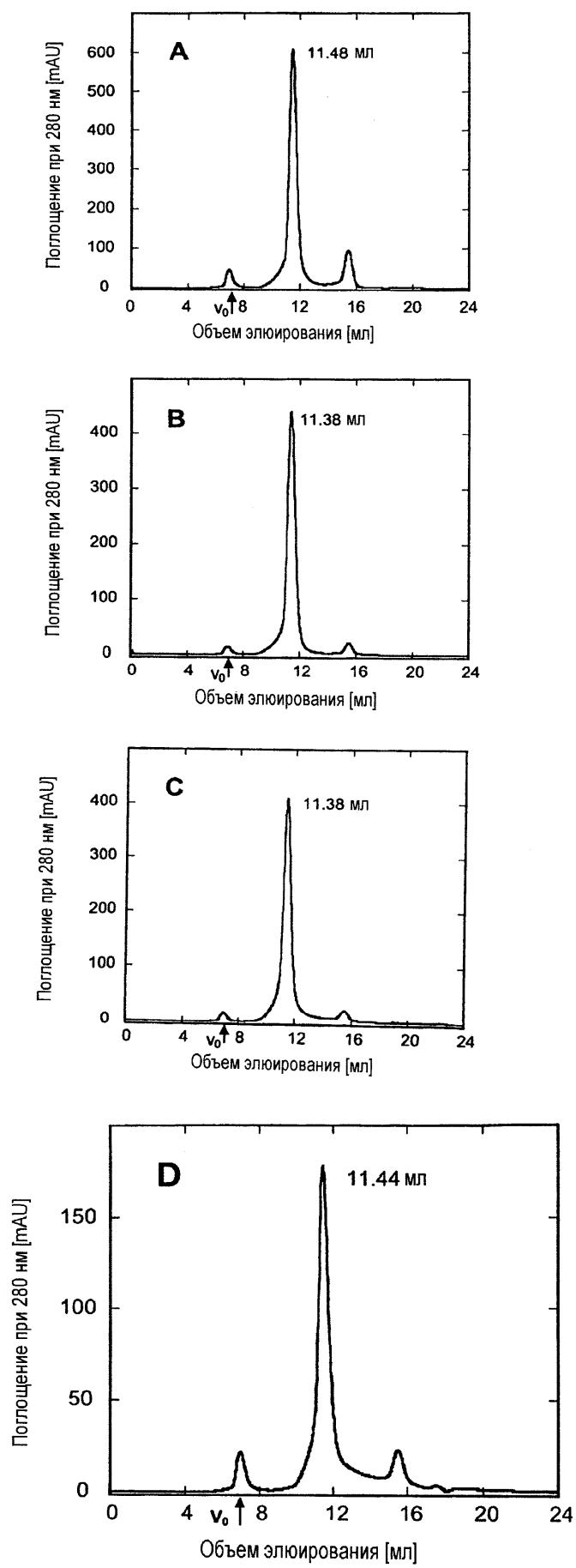
ФИГ.25



ФИГ.26



ФИГ.27



ФИГ.28