

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392579** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.05**

(51) Int. Cl. **C07K 14/435** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.04.08**

---

(54) **НОВЫЕ МУТЕИНЫ ЛИПОКАЛИНА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ФАКТОРУ РОСТА  
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (CTGF)**

---

(31) **21167385.0; 21192311.5**

(32) **2021.04.08; 2021.08.20**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/059406**

(87) **WO 2022/214649 2022.10.13**

(71) Заявитель:  
**ПИРИС ФАРМАСЬЮТИКАЛС  
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Павлиду Марина, Найенс Ванесса,  
Хансбауэр Эва-Мария, Вурценбергер  
Клаудиа, Жакин Томас, Херрманн  
Таня, Грюнер Штефан, Матшинер  
Габриэле (DE)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложены мутеины липокалина, способные связывать CTGF (фактор роста соединительной ткани), а также слитые белки, содержащие указанные мутеины, которые пригодны для применения для аналитических, диагностических или терапевтических целей, например для лечения фиброзного заболевания, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания. Настоящее изобретение также относится к способам получения мутеинов липокалина или слитых белков, описанных в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим такие мутеины липокалина или слитые белки. Кроме того, настоящее изобретение относится к терапевтическому и/или диагностическому применению таких мутеинов липокалина или слитых белков, а также к композициям, содержащим один или более таких мутеинов липокалина или слитых белков.

---

**A1**

**202392579**

**202392579**

**A1**

## НОВЫЕ МУТЕИНЫ ЛИПОКАЛИНА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ФАКТОРУ РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (CTGF)

### I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CTGF (UniProt P29279), также известный как фактор роста соединительной ткани или CCN2, является представителем семейства белков CCN, семейства матрицеллюлярных белков, связанных с внеклеточным матриксом (ECM), вовлеченных в межклеточную передачу сигналов (Ramazani et al., *Matrix Biol.* 68–69, 44–66 (2018), Holbourn et al., *Trends Biochem. Sci.* 33, 461–473 (2008)). Структура CTGF является типичной для представителей семейства CCN и включает четыре функционально различных домена: домен, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста (IGFBP), домен повтора фактора фон Виллебранда типа C (VWFC), повтор тромбоспондина типа 1 (TSP типа-1) и содержащий цистеиновые узлы домен (CTCK) (Holbourn et al., *Trends Biochem. Sci.* 33, 461–473 (2008)). Тогда как домен, подобный белку, связывающему инсулиноподобный фактор роста, и повтор фактора фон Виллебранда типа C образуют N-концевой фрагмент, повтор тромбоспондина типа 1 и содержащий цистеиновые узлы домен образуют C-концевой фрагмент CTGF. Шарнирная область между N-концевым и C-концевым фрагментами подвержена протеолитическому расщеплению металлопротеазами. Ген *CTGF* (6q23.2) состоит из 5 экзонов и кодирует белок из 349 аминокислот. CTGF высококонсервативен у позвоночных: идентичность CTGF человека и мыши на уровне генов составляет 91%, и идентичность на уровне белка составляет 95% (Ramazani et al., *Matrix Biol.* 68–69, 44–66 (2018)).

CTGF выражено экспрессируется на эмбриональной стадии и опосредует процессы развития скелета, сердечно-сосудистой системы или почек. Во взрослом возрасте экспрессия CTGF является довольно низкой, однако она подвержена сильной индукции под действием определенных стимулов, таких как стимуляция цитокинами или факторами роста и механическая нагрузка (Kubota et al., *Clin. Sci.* 128, 181–196 (2014); Leask, *J. Cell Commun. Signal.* 7(3): 203–205 (2013)). Экспрессия CTGF также описана либо на уровне мРНК, либо на уровне белка во многих тканях, включая гладкие мышцы, щитовидную железу, селезенку, почки, предстательную железу, эндометрий, кору головного мозга, лимфатические узлы, легкие, печень, желудочно-кишечный тракт и кожу (Uhlén et al., *Science* 347(6220):1260419 (2015)). Первоначально сообщалось, что CTGF экспрессируется в эндотелиальных клетках и фибробластах, где он связан с регенерацией

тканей, заживлением ран и ангиогенезом (Bradham et al., J. Cell Biol. 114, 1285–1294 (1991); Igarashi et al., Mol. Biol. Cell 4, 637–645 (1993)). CTGF играет важную роль в нескольких биологических процессах, таких как клеточная адгезия, ремоделирование внеклеточного матрикса, развитие скелета, хондрогенез, ангиогенез, заживление ран и пролиферация. Функция CTGF, которая включает активацию сигнальных путей, регуляцию обновления матрикса, регуляцию цитокинов и факторов роста, зависит от соответствующего клеточного окружения и взаимодействующих с ним белков.

Имеются данные, что различные белки, такие как рецепторы, цитокины и белки ECM, взаимодействуют с CTGF. Рецепторами клеточной поверхности, взаимодействующими с CTGF, являются интегрины (например,  $\alpha 5\beta 3$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ), гепарансульфат-протеоглики (например, синдекан 4), белки, родственные рецептору липопротеинов (например, LRP1, LRP6), и тирозинкиназные рецепторы (например, ТК-рецептор A) (Lau, J. Cell Commun. Signal. 10, 121–127 (2016)). Среди различных цитокинов и факторов роста, взаимодействующих с CTGF, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) имеет решающее значение в развитии фиброзных заболеваний, как описано ниже (Abreu et al., Nat. Cell Biol. 4, 599–604 (2002)). CTGF также связывается с другими цитокинами и факторами роста, такими как факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), костный морфогенетический белок 4 (BMP4), тромбоцитарный фактор роста B (PDGFB) и другие (Chen et al., Front. Cell Dev. Biol. 8, 1–17 (2020)). Для опосредования функции клеточной адгезии, подвижности и ремоделирования тканей CTGF взаимодействует с компонентами ECM, такими как фибронектин, агрекан и гепарансульфат-протеоглики. В контексте клеточной адгезии CTGF рассматривается как молекула, соединяющая компоненты ECM с интегральными белками клеточной поверхности, и блокирование CTGF *in vitro* приводит к ингибированию прикрепления клеток к поверхности.

Патогенез фиброза рассматривается как нарушение регуляции процесса заживления ран в качестве реакции на повторяющиеся микротравмы в различных органах, таких как легкие или почки (Wynn, J. Exp. Med. 208, 1339–1350 (2011)). CTGF является основным компонентом в регуляции процессов от заживления ран до фиброза за счет его взаимодействия с несколькими факторами, обуславливающими пролиферацию, дифференцировку, подвижность, адгезию клеток и обновление матрикса. При повреждении антифибринолитический каскад коагуляции и циркулирующие тромбоциты активируются медиаторами воспаления, высвобождаемыми из поврежденного эпителия или эндотелия. Эти активированные тромбоциты индуцируют рекрутинг иммунных

клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы и Т-клетки, секретирующих TGF- $\beta$  и другие цитокины, которые усиливают воспалительный ответ, а также активацию, пролиферацию и миграцию миофибробластов. Миофибробласты индуцируют закрытие раны благодаря их сократительной функции и секретируют компоненты ECM, опосредующие реэпителизацию и восстановление тканей. В нормальных условиях этот процесс прекращается путем элиминации эффекторных клеток и компонентов ECM. Однако при повторяющемся повреждении регуляция процесса заживления нарушается, что приводит к избыточному отложению ECM и необратимому фиброзу ремоделированию ткани. Миофибробласты при идиопатическом фиброзе легких (IPF), по-видимому, резистентны к апоптотическим процессам, и вместо того, чтобы погибнуть, эти клетки сохраняются и способствуют дальнейшему фиброгенезу, внося свой вклад в избыточное отложение ECM (Shimbori et al., *Curr. Opin. Pulm. Med.* 19, 446–452 (2013)). TGF- $\beta$  и CTGF в широком смысле рассматриваются как универсальные медиаторы фиброгенеза, хотя точные механизмы, лежащие в основе их координированного действия, остаются неясными (A. Leask et al., *J. Biol. Chem.* 278, 13008–13015 (2003)).

Обнаружена сверхэкспрессия CTGF в фиброзной ткани пациентов с идиопатическим фиброзом легких (IPF), фиброзом сердца, фиброзом печени и фиброзом почек (Pan et al., *Eur. Respir. J.* 17, 1220–1227 (2001); Chen et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–17 (2020)). Роль экспрессии CTGF также была описана в моделях индуцированного блеомицином фиброза легких у мышей и в модели индуцированного излучением фиброза легких у крыс (Ponticos et al., *Arthritis Rheum.* 60, 2142–2155 (2009); Wang et al., *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 4 (2011); Bickelhaupt, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 109, 1–11 (2017)). В указанном случае блокирование CTGF моноклональным антителом приводило к обращению процесса индуцированного излучением ремоделирования легких у крыс (Bickelhaupt, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 109, 1–11 (2017)).

В клиническом исследовании фазы 2 моноклональное антитело к CTGF FG-3019/памревлумаб ослабляло прогрессирование заболевания у пациентов с IPF, что свидетельствует о том, что нацеливание на CTGF потенциально может стать возможным методом лечения IPF (Richeldi et al., *Lancet Respir. Med.* 8, 25–33 (2020)). IPF представляет собой тяжелое заболевание неясной этиологии со смертельным исходом, медианная выживаемость после постановки диагноза составляет 3-5 лет (Lederer et al., *N. Engl. J. Med.* 378, 1811–1823 (2018)). У пациентов наблюдается фиброзное ремоделирование архитектуры легких и чрезмерное отложение ECM, что приводит к снижению эластичности легких, нарушению газообмена и, в итоге, к органной недостаточности.

Варианты лечения ограничены, и единственные два одобренных FDA лекарственных средства для лечения IPF, нинтеданиб и пирфенидон, хотя и способны замедлить снижение функции легких, не являются хорошо переносимыми пациентами вследствие желудочно-кишечных расстройств и других связанных с лекарственным средством проблем переносимости, что во многих случаях приводит к прекращению лечения (Galli et al., *Respirology* 22, 1171–1178 (2017)). Таким образом, существует сильная потребность медицины в альтернативных вариантах лечения IPF, которые обеспечивают эффективное ослабление снижения функции легких и при этом имеют улучшенный профиль безопасности с меньшим количеством побочных эффектов, наблюдаемых при современных стандартах медицинской помощи.

Помимо IPF, CTGF также играет роль в канцерогенезе и, в зависимости от взаимодействия с другими белками CCN и молекулами в микроокружении опухоли, положительно или отрицательно коррелирует с развитием опухолей и метастазов (Shen et al., *Trends in Cancer*, doi:10.1016/j.trecan.2020.12.001 (2020)). CTGF в возрастающей степени экспрессируется при некоторых типах рака, таких как рак молочной железы, хондросаркома, энхондрома, глиома, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, внутривенная холангиокарцинома, нейроэндокринные опухоли и плоскоклеточная карцинома языка. Явная роль CTGF в образовании метастазов была показана путем демонстрации того, что лишённые CTGF линии клеток меланомы, будучи введенными мышам, не способны образовывать метастазы в легких (Hutchenreuther et al., *J. Invest. Dermatol.* 135, 2805–2813 (2015)), а также того, что моноклональное антитело к CTGF FG-3019 вызывает ингибирование миграции линий клеток меланомы человека (Finger et al., *Oncogene* 33, 1093–1100 (2014)).

CTGF также вовлечен в патологический процесс при заболеваниях глаз, таких как диабетическая ретинопатия и глаукома. Также описана роль CTGF при мышечной дистрофии Дюшенна и системном склерозе, аутоиммунном заболевании (Chen et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–17 (2020)).

CTGF также может играть роль в патологических процессах в легких при остром заболевании COVID-19. Исследования показали, что гистопатологические изменения легких при серьезном заболевании COVID-19 связаны с диффузным альвеолярным повреждением (DAD), а также тяжелым повреждением существующего эндотелия легких, а также фиброзными изменениями в ткани легких (Wang et al., *JAMA - J Am Med Assoc.* 323(11):1061-1069 (2020); Mo et al, *Eur Respir J.* 2020. doi:10.1183/13993003.01217-2020). CTGF может быть непосредственно вовлечен в некоторые из этих процессов на основании

его очевидной профибротической функции, а также его участия в регуляции функции эндотелиальных клеток и ангиогенеза (Brigstock, *Angiogenesis* 5, 153–165 (2002)). Более того, применение регенеративных противифиброзных агентов для лечения острого заболевания COVID-19 может играть важную роль, поскольку у пациентов с тяжелым заболеванием наблюдаются различные признаки фиброзных изменений ткани, от связанной с фиброзом организующейся пневмонии до острого повреждения легких в качестве предшественника фиброза (Shi et al., *Lancet Infect Dis.* 20(4):425-434 (2020)).

Антитело к CTGF памревлумаб в настоящее время также проходит испытания в двух клинических исследованиях у пациентов с острым COVID-19. В исследовании фазы 2 исследуют влияние системного введения указанного антитела на необходимость искусственной вентиляции легких у госпитализированных пациентов (NCT04432298). В дальнейшем исследовании фазы 3 исследуют влияние на оксигенацию крови и необходимость инвазивной искусственной вентиляции легких у госпитализированных пациентов (номер EudraCT: 2020-001472-14). Кроме того, планируется провести еще одно клиническое исследование фазы 2 у пациентов с признаками интерстициального заболевания легких после острого заболевания COVID-19 с целью изучения долгосрочного влияния на дальнейшее восстановление после повреждения ткани легких.

Вследствие роли CTGF в качестве компонента внеклеточного матрикса существует давно испытываемая неудовлетворенная потребность в соединениях, которые связываются с CTGF человека и блокируют опосредованные CTGF ответы, обеспечивая потенциальные терапевтические средства для лечения различных заболеваний, включая фиброзные заболевания и рак. Кроме того, существует неудовлетворенная потребность в соединениях для ингаляционного введения, которые применяются для лечения интерстициальных заболеваний легких, таких как фиброз легких. Поскольку обнаружено, что CTGF выражено экспрессируется в фиброзированных легких, существует потребность в нацеленных на CTGF соединениях, которые являются подходящими для доставки в легкие посредством ингаляционного пути введения.

## **II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

В следующем перечне определены термины, фразы и сокращения, используемые в настоящем описании. Предполагается, что все термины, перечисленные и определенные в настоящем документе, охватывают все грамматические формы.

Если не указано иное, в настоящем документе «*фактор роста соединительной ткани*» или «CTGF» означает CTGF человека (huCTGF). CTGF человека означает полноразмерный белок, определенный в UniProt идентификатором P29279 (версия 197 от

10 февраля 2021 г.), его фрагмент или его вариант. CTGF человека кодируется геном *CTGF*. CTGF также известен как фактор 2 сети межклеточной коммуникации (CCN2). В некоторых конкретных воплощениях применяют CTGF видов, отличных от человека, например, CTGF яванского макака и CTGF мыши.

В настоящем документе «аффинность связывания» описывает способность биомолекулы (например, полипептида или белка) согласно настоящему изобретению (например, мутеина липокалина, антитела, слитого белка или любого другого пептида или белка) связывать выбранную мишень (и образовывать комплекс). Аффинность связывания определяют с помощью ряда способов, известных специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, флуоресцентное титрование, методы на основе твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), включая прямой и конкурентный ELISA, калориметрические методы, такие как изотермическая калориметрия титрования (ИТК), и поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Эти способы хорошо известны в данной области техники, и некоторые примеры таких способов дополнительно описаны в настоящем документе. При этом аффинность связывания выражают в виде значения константы диссоциации ( $K_D$ ), половинной максимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) или половинной максимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ), определенных с применением таких способов. Более низкое значение  $K_D$ ,  $EC_{50}$  или  $IC_{50}$  отражает лучшую (более высокую) способность к связыванию (аффинность).

В настоящем документе термин «обнаруживать», «обнаружение», «обнаруживаемый» или «осуществление обнаружения» следует понимать как на количественном, так и на качественном уровне, а также их комбинации. Таким образом, он включает количественные, полуколичественные и качественные методы определения, применяемые к биомолекуле согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе «обнаруживаемая аффинность» обычно означает способность к связыванию между биомолекулой и ее мишенью, определяемую значением  $K_D$ ,  $EC_{50}$  или  $IC_{50}$ , составляющим не более примерно  $10^{-5}$  М или менее. Аффинность связывания, определяемая значением  $K_D$ ,  $EC_{50}$  или  $IC_{50}$  выше  $10^{-5}$  М, как правило, уже не поддается определению с помощью обычных методов, таких как ELISA и SPR, и поэтому имеет второстепенное значение. Таким образом, «обнаруживаемая аффинность» может относиться к значению  $K_D$  примерно  $10^{-5}$  М или менее, определяемому с помощью ELISA или SPR, предпочтительно SPR.

Отмечается, что на образование комплекса между биомолекулой согласно настоящему изобретению и ее мишенью влияет множество различных факторов, таких как концентрации соответствующей мишени, присутствие конкурентов, pH и ионная сила применяемой буферной системы, экспериментальный метод, применяемый для определения аффинности связывания (например, флуоресцентное титрование, конкурентный ELISA (также называемый ELISA конкуренции) и поверхностный плазмонный резонанс), и даже математический алгоритм, применяемый для оценки экспериментальных данных.

Таким образом, специалисту в данной области техники будет очевидно, что аффинность связывания, определяемая значением  $K_D$ ,  $EC_{50}$  или  $IC_{50}$ , может быть различной в пределах определенного экспериментального диапазона в зависимости от метода и модели эксперимента. Это означает, что может наблюдаться небольшое отклонение определенных значений  $K_D$ ,  $EC_{50}$  или  $IC_{50}$  или диапазона допустимых значений в зависимости, например, от того, были ли такие значения определены с помощью ELISA (включая прямой или конкурентный ELISA), SPR или другого способа.

В настоящем документе термины «специфичный к», «специфичное связывание», «специфично связывает» или «специфичность связывания» относятся к способности биомолекулы различать желаемую мишень (например, CTGF) и одну или более эталонных мишеней (например, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов липокалин человека). Следует понимать, что такая специфичность является не абсолютным, а относительным свойством и может быть определена, например, с помощью SPR, вестерн-блоттинга, ELISA, сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), радиоиммуноанализа (RIA), электрохемилюминесценции (ECL), иммунорадиометрического анализа (IRMA), иммуногистохимии (ИНС) и сканирования пептидов.

В настоящем документе в контексте мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению, которые связываются с CTGF, термин «специфичный к», «специфичное связывание», «специфично связывает» или «специфичность связывания» означает, что мутеин липокалина связывается, взаимодействует или нацелен на CTGF, как описано в настоящем документе, но по существу не связывает другой белок. Термин «другой белок» включает любые белки, которые не являются CTGF или белками, близкородственными или гомологичными CTGF. Однако CTGF видов, отличных от человека, а также фрагменты и/или варианты CTGF не исключаются термином «другой белок». Термин «по существу не связывает» означает, что мутеины липокалина согласно настоящему изобретению связывают другой белок с более низкой аффинностью связывания, чем



CTGF, то есть проявляют перекрестную реактивность, составляющую менее 30%, предпочтительно 20%, более предпочтительно 10%, особенно предпочтительно менее 9, 8, 7, 6 или 5%. Взаимодействует ли мутеин липокалина специфично, как определено выше, можно легко проверить, среди прочего, путем сравнения реакции мутеина липокалина согласно настоящему изобретению с CTGF и реакции указанного липокалина с другим белком (белками).

В настоящем документе термин «липокалин» относится к мономерному белку массой приблизительно 18–20 кДа, имеющему супервторичную структурную область в виде цилиндрического  $\beta$ -складчатого слоя, содержащего несколько  $\beta$ -цепей (предпочтительно восемь  $\beta$ -цепей, обозначенных от А до Н), попарно соединенных несколькими (предпочтительно четырьмя) петлями с одного конца, которые образуют лигандсвязывающий карман и определяют вход в лигандсвязывающий карман. Предпочтительно образующие лигандсвязывающий карман петли, применяемые в настоящем изобретении, представляют собой петли, соединяющие открытые концы  $\beta$ -цепей А и В, С и D, Е и F, а также G и Н, и обозначены как петли АВ, CD, EF и GH. Точно установлено, что разнообразие указанных петель в стабильном в остальной части каркасе липокалина приводит к появлению множества различных способов связывания среди представителей семейства липокалинов, каждый из которых способен адаптироваться к мишеням различного размера, формы и химической природы (что рассматривается, например, в источниках Skerra, *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50 (2000), Flower et al., *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24 (2000), Flower, *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14 (1996)). Следует понимать, что семейство белков липокалинов в природных условиях приобрело способность связывать широкий спектр лигандов, его представители имеют необычайно низкие уровни общей консервативности последовательностей (часто с идентичностью последовательностей менее 20%), сохраняя при этом высококонсервативный общий характер укладки. Соответствие между положениями в различных липокалинах также хорошо известно специалистам в данной области техники (см., например, патент США № 7250297). Белки, подпадающие под определение «липокалин», используемое в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, липокалин слезной жидкости, липокалин-2 или ассоциированный с желатиназой нейтрофилов липокалин, аполипопротеин D и белок железы фон Эбнера.

В настоящем документе, если не указано иное, «липокалин-2» или «ассоциированный с желатиназой нейтрофилов липокалин» относится к липокалину-2 человека (hLcn2) или ассоциированному с желатиназой нейтрофилов липокалину человека

(hNGAL), а также относится к зрелому липокалину-2 человека или зрелому ассоциированному с желатиназой нейтрофилов липокалину человека. Термин «зрелый» при использовании для характеристики белка означает белок, по существу не содержащий сигнального пептида. «Зрелый hNGAL» согласно настоящему изобретению относится к зрелой форме ассоциированного с желатиназой нейтрофилов липокалина человека, которая не содержит сигнального пептида. Зрелый hNGAL определяется остатками 21-198 последовательности, депонированной в базе данных SWISS-PROT под идентификационным номером P80188, и его аминокислотная последовательность представлена SEQ ID NO: 1.

В настоящем документе «нативная последовательность» относится к белку или полипептиду, имеющему последовательность, которая встречается в природе, или имеющему последовательность дикого типа независимо от способа его получения. Такой белок или полипептид с нативной последовательностью может быть выделен из природных источников или может быть получен другими способами, например с помощью рекомбинантных или синтетических способов.

«Липокалин с нативной последовательностью» относится к липокалину, имеющему ту же аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид, полученный из природных источников. Таким образом, липокалин с нативной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность соответствующего встречающегося в природе липокалина (дикого типа) любого организма, в частности, млекопитающего. Термин «нативная последовательность» при использовании в контексте липокалина конкретно охватывает встречающиеся в природе укороченные или секретируемые формы липокалина, встречающиеся в природе варианты формы, такие как формы альтернативного сплайсинга, и встречающиеся в природе аллельные варианты липокалина. Термины «липокалин с нативной последовательностью» и «липокалин дикого типа» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин «мутеин», «мутантный» объект (будь то белок или нуклеиновая кислота) или «мутант» относится к замене, делеции или вставке одной или более аминокислот или нуклеотидов по сравнению с встречающимися в природе белком (дикого типа) или нуклеиновой кислотой. Указанный термин также включает фрагменты мутеина, описанные в настоящем документе. Настоящее изобретение явным образом охватывает мутеины липокалина, описанные в настоящем документе, имеющие супервторичную структурную область в виде цилиндрического  $\beta$ -складчатого слоя,

содержащую восемь  $\beta$ -цепей, попарно соединенных четырьмя петлями с одного конца, тем самым образующих лигандсвязывающий карман и определяющих вход в лигандсвязывающий карман, где по меньшей мере одна аминокислота из каждой из по меньшей мере трех из указанных четырех петель была подвергнута мутации по сравнению с липокалином с нативной последовательностью. Мутеины липокалина согласно настоящему изобретению предпочтительно обладают функцией связывания CTGF, описанного в настоящем документе.

В настоящем документе термин «фрагмент» в связи с мутеинами липокалина согласно настоящему изобретению относится к белкам или полипептидам, полученным из полноразмерного зрелого hNGAL или мутеинов липокалина, которые являются укороченными с N-конца и/или C-конца, то есть в них отсутствует по меньшей мере одна из N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Такие фрагменты могут содержать по меньшей мере 10 или более, например 20 или 30 или более, последовательно соединенных аминокислот первичной последовательности зрелого hNGAL или мутеина липокалина, из которой они получены, и обычно обнаруживаются при иммунологическом анализе зрелого hNGAL. В таком фрагменте может отсутствовать до 2, до 3, до 4, до 5, до 10, до 15, до 20, до 25 или до 30 (включая все промежуточные значения между указанными) N-концевых и/или C-концевых аминокислот. Следует понимать, что указанный фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент зрелого hNGAL или мутеина липокалина, из которого он получен, что означает, что он предпочтительно сохраняет специфичность связывания, предпочтительно в отношении CTGF, зрелого hNGAL или мутеина липокалина, из которого он получен. В качестве иллюстративного примера такой функциональный фрагмент может содержать по меньшей мере аминокислоты в положениях 28-136, предпочтительно по меньшей мере аминокислоты в положениях 13-157, соответствующие линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL.

«Фрагмент» в отношении соответствующего CTGF, являющегося мишенью мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, относится к укороченному с N-конца и/или C-конца CTGF или белковым доменам CTGF. Фрагменты CTGF, описанные в настоящем документе, сохраняют способность полноразмерного CTGF распознаваться и/или связываться мутеином липокалина согласно настоящему изобретению. В качестве иллюстративного примера указанный фрагмент может содержать, по существу состоять или состоять из одного или более доменов CTGF. Такой домен может содержать аминокислоты доменов CTGF, такие как отдельные или комбинированные

аминокислотные последовательности домена 1 (IGFBP, остатки 27-98, ID белка в UniProt P29279), домена 2 (VWFC, остатки 101-167), домена 3 (TSP типа 1, 198-243) и домена 4 (СТСК, остатки 256-330).

В настоящем документе термин «вариант» относится к производным белка или полипептида, которые содержат мутации, например, введенные путем замен, делеций, вставок и/или химических модификаций аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности. В некоторых воплощениях такие мутации и/или химические модификации не снижают функциональную активность белка или пептида. Такие замены могут быть консервативными, то есть аминокислотный остаток заменяют на близкий по химическим свойствам аминокислотный остаток. Примерами консервативных замен являются замены из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. Такие варианты включают белки или полипептиды, в которых одна или более аминокислот заменены на соответствующие D-стереоизомеры или на аминокислоты, отличные от встречающихся в природе 20 аминокислот, такие как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Такие варианты также включают, например, белки или полипептиды, в которых добавлены или удалены один или более аминокислотных остатков с N-конца и/или C-конца. Как правило, вариант имеет по меньшей мере примерно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% или по меньшей мере примерно 98% идентичности аминокислотных последовательностей с белком или полипептидом, имеющим нативную последовательность. Вариант предпочтительно сохраняет биологическую активность, например, способность к связыванию с той же мишенью, что и мишень белка или полипептида, из которого он получен.

В настоящем документе термин «вариант» в отношении соответствующего белкового лиганда мутина липокалина согласно настоящему изобретению, СТGF, относится к СТGF или его фрагменту, соответственно, который содержит одну или более, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с нативной последовательностью СТGF (СТGF дикого типа), такого как СТGF, депонированный в UniProt с ID белка P29279, описанный в настоящем документе. Вариант СТGF, соответственно, предпочтительно имеет составляющую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность аминокислотных последовательностей с СТGF дикого типа, таким как СТGF, депонированный в UniProt с ID белка P29279, описанный в

настоящем документе. Вариант CTGF, описанный в настоящем документе, сохраняет способность связывать мутеины липокалина, специфичные к CTGF, описанные в настоящем документе.

В настоящем документе термин «вариант» в отношении мутеина липокалина относится к мутеину липокалина или его фрагменту согласно настоящему изобретению, последовательность которого имеет мутации, включая замены, делеции и вставки, и/или химические модификации. Описанный в настоящем документе вариант мутеина липокалина сохраняет биологическую активность мутеина липокалина, из которого он получен, например, способность к связыванию с CTGF. Как правило, вариант мутеина липокалина имеет по меньшей мере примерно 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% идентичности аминокислотных последовательностей с мутеином липокалина, из которого он получен.

В настоящем документе термин «мутагенез» относится к введению мутаций в полинуклеотидную или аминокислотную последовательность. Мутации предпочтительно вводят в экспериментальных условиях таким образом, что аминокислота, встречающаяся в природе в данном положении последовательности белка или полипептида, может быть изменена, например, заменена по меньшей мере на одну аминокислоту. Термин «мутагенез» также включает (дополнительную) модификацию длины сегментов последовательности путем делеции или вставки одной или более аминокислот. Таким образом, в объем настоящего изобретения входит, например, замена одной аминокислоты в выбранном положении последовательности на фрагмент из трех аминокислот, что приводит к добавлению двух аминокислотных остатков по сравнению с длиной соответствующего сегмента в нативной аминокислотной последовательности белка или полипептида. Такая вставка или делеция могут быть введены независимо друг от друга в любой из сегментов последовательности, которые могут быть подвергнуты мутагенезу согласно настоящему изобретению. В одном из иллюстративных воплощений настоящего изобретения вставка может быть введена в сегмент аминокислотной последовательности, соответствующий петле АВ липокалина, имеющего нативную последовательность (см. Международную патентную публикацию № WO 2005/019256, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

В настоящем документе термин «случайный мутагенез» означает, что в определенном положении последовательности не присутствует предварительно определенной мутации (изменения аминокислоты), но что в предварительно определенное положение последовательности в ходе мутагенеза с определенной вероятностью могут

быть введены по меньшей мере две аминокислоты.

В настоящем документе термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» обозначает свойство последовательностей, которое определяет их сходство или родство. В настоящем изобретении термин «идентичность последовательностей» или «идентичность» означает процент попарно идентичных остатков – после (гомологичного) выравнивания последовательности полипептида согласно настоящему изобретению с исследуемой последовательностью – по отношению к количеству остатков в более длинной из этих двух последовательностей. Идентичность последовательности определяют путем деления количества идентичных аминокислотных остатков на общее количество остатков и умножения полученного результата на 100.

В настоящем документе термин «гомология последовательностей» или «гомология» имеет свое обычное значение, и гомологичная аминокислота включает идентичные аминокислоты, а также аминокислоты, которые считаются консервативными заменами в эквивалентных положениях в линейной аминокислотной последовательности белка или полипептида согласно настоящему изобретению (например, любых мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению).

Специалисту в данной области техники известны доступные компьютерные программы, например BLAST (Altschul et al., *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 3389-402), BLAST2 (Altschul et al., *J Mol Biol*, 1990, 215, 403-10), и Smith-Waterman (Smith and Waterman, *J Mol Biol*, 1981, 147, 195-7) для определения гомологии или идентичности последовательностей с использованием стандартных параметров. Процент гомологии последовательностей или идентичности последовательностей может быть, например, определен в настоящем документе с помощью программы BLASTP версии 2.2.5 от 16 ноября 2002 г. (Altschul et al., 1997). В этом воплощении определение процента гомологии основано на выравнивании полных последовательностей белка или полипептида (матрица: BLOSUM 62; штраф за пропуск: 11,1; пороговое значение установлено на  $10^{-3}$ ), включая пропептидные последовательности, предпочтительно с применением каркаса белка дикого типа в качестве эталона при парном сравнении. Он рассчитывается как процент количества «положительных результатов» (гомологичных аминокислот), указанных в качестве результата в выходных данных программы BLASTP, деленный на общее количество аминокислот, выбранных программой для выравнивания.

В частности, чтобы определить, отличается ли аминокислотная последовательность (мутеина) липокалина от таковой липокалина дикого типа в отношении определенного положения в аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, специалист в

данной области техники может применить средства и способы, хорошо известные в данной области техники, например, выравнивание, либо вручную, либо с помощью компьютерных программ, таких как BLAST 2.0, что означает Basic Local Alignment Search Tool, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая применима для выравнивания последовательностей. Соответственно, последовательность липокалина дикого типа может служить «исследуемой последовательностью» или «эталонной последовательностью», тогда как аминокислотная последовательность (мутеина) липокалина, отличная от липокалина дикого типа, описанного в настоящем документе, служит «искомой последовательностью». Термины «последовательность дикого типа», «эталонная последовательность» и «исследуемая последовательность» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Предпочтительной последовательностью липокалина дикого типа является последовательность hNGAL, представленная SEQ ID NO: 1.

«Пропуски» представляют собой пробелы в выравнивании, возникающие в результате вставки или делеции аминокислот. Таким образом, две копии одной и той же последовательности имеют 100% идентичности, однако последовательности, которые менее высококонсервативны и содержат делеции, вставки или замены, могут иметь более низкую степень идентичности последовательностей.

В настоящем документе, термин «положение» означает либо положение аминокислоты в аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе, либо положение нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе. Следует понимать, что когда термин «соответствует» или «соответствующий» используется в настоящем документе в контексте положений аминокислотной последовательности одного или более мутеинов липокалина, соответствующее положение определяется не только количеством предшествующих нуклеотидов или аминокислот. Соответственно, абсолютное положение данной аминокислоты в соответствии с настоящим изобретением может отличаться от соответствующего положения вследствие делеции или вставки аминокислот в другой части липокалина (мутантного или дикого типа). Подобным образом, абсолютное положение данного нуклеотида в соответствии с настоящим изобретением может отличаться от соответствующего положения вследствие делеций или дополнительных нуклеотидов в другой части 5'-нетранслируемой области (UTR) мутеина липокалина или липокалина дикого типа, включая промотор и/или любые другие регуляторные последовательности или области генов (включая экзоны и интроны).

Таким образом, в случае «соответствующего положения» в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно следует понимать, что абсолютные положения нуклеотидов или аминокислот могут отличаться от соседних нуклеотидов или аминокислот, но указанные соседние нуклеотиды или аминокислоты, которые могли быть заменены, удалены или добавлены, могут содержаться в одном или более из тех же «соответствующих положений».

Кроме того, в случае соответствующего положения в мутеине липокалина относительно эталонной последовательности в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно следует понимать, что положения нуклеотидов или аминокислот мутеина липокалина могут структурно соответствовать положениям в другой части эталонного липокалина (липокалина дикого типа) или другого мутеина липокалина, даже если они могут отличаться по номерам абсолютных положений, что будет понятно специалисту с учетом высококонсервативного общего характера укладки липокалинов.

Взаимозаменяемо используемые в настоящем документе термины «конъюгат», «конъюгирование», «продукт слияния», «слияние» или «связанный» относятся к объединению двух или более субъединиц посредством всех форм ковалентных или нековалентных связей, включая, но не ограничиваясь ими, генетическое слияние, химическое конъюгирование, связывание через линкер или сшивающий агент, а также нековалентную ассоциацию.

Взаимозаменяемо используемые в настоящем документе термины «слитый полипептид» или «слитый белок» относятся к полипептиду или белку, содержащему две или более субъединицы. В некоторых воплощениях слитый полипептид, описанный в настоящем документе, содержит две или более субъединицы, при этом по меньшей мере одна из этих субъединиц связывается с CTGF. В некоторых воплощениях по меньшей мере две из этих субъединиц связываются с CTGF. В слитом полипептиде эти субъединицы могут быть соединены ковалентной или нековалентной связью. Предпочтительно слитый полипептид представляет собой продукт трансляционного слияния двух или более субъединиц. Трансляционное слияние может быть осуществлено путем генетического конструирования кодирующей последовательности одной субъединицы в рамке считывания с кодирующей последовательностью дополнительной субъединицы. Обе субъединицы могут иметь вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей линкер. Однако субъединицы слитого полипептида согласно настоящему изобретению также могут быть соединены путем химического конъюгирования. Субъединицы, образующие слитый полипептид, как правило, соединены одна с другой



следующим образом: С-конец одной субъединицы с N-концом другой субъединицы, или С-конец одной субъединицы с С-концом другой субъединицы, или N-конец одной субъединицы с N-концом другой субъединицы, или N-конец одной субъединицы с С-концом другой субъединицы. Субъединицы слитого полипептида могут быть соединены в любом порядке и могут включать более одной любой из составляющих субъединиц. Если одна или более субъединиц являются частью белка (комплекса), который состоит из более чем одной полипептидной цепи, термин «слитый полипептид» также может относиться к полипептиду, содержащему слитые последовательности и все другие полипептидные цепи указанного белка (комплекса).

В настоящем документе термин «субъединица» слитого белка/полипептида, раскрытый в настоящем документе, относится к одному белку или отдельной полипептидной цепи, которые сами по себе могут образовывать стабильную уложенную в пространстве структуру и определяют специфичную функцию обеспечения связывающего мотива в отношении мишени. В некоторых воплощениях предпочтительной субъединицей согласно настоящему изобретению является мутеин липокалина.

«Линкер», который может содержаться в слитом белке или полипептиде согласно настоящему изобретению, соединяет две или более субъединицы слитого полипептида, описанного в настоящем документе. Указанная связь может быть ковалентной или нековалентной. Предпочтительная ковалентная связь обеспечивается посредством пептидной связи, например, пептидной связи между аминокислотами. Предпочтительным линкером является пептидный линкер. Соответственно, в предпочтительном воплощении указанный линкер содержит одну или более аминокислот, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот. В настоящем документе описаны предпочтительные пептидные линкеры, включающие глицин-сериновые (GS) линкеры, гликозилированные GS-линкеры и линкеры из полимера пролина-аланина-серина (PAS). В некоторых предпочтительных воплощениях GS-линкер представляет собой  $(G_4S)_3$ , представленный SEQ ID NO: 42, и применяется для соединения субъединиц слитого полипептида. Другие предпочтительные линкеры включают химические линкеры.

В настоящем документе термин «альбумин» включает все альбумины млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин или сывороточный альбумин крысы.

«Образец» определен как биологический образец, взятый у любого субъекта. Биологические образцы включают, но не ограничиваются ими, кровь, сыворотку, мочу, кал, сперму или ткань, включая опухолевую ткань.

«Субъект» представляет собой позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека. В настоящем документе термин «млекопитающее» предназначен для обозначения любого животного, относящегося к млекопитающим, включая, но не ограничиваясь ими, людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных для спорта или животных-компаньонов, таких как овцы, собаки, лошади, кошки, коровы, крысы, свиньи, человекообразные обезьяны, такие как яванские макаки, и это лишь несколько иллюстративных примеров. В настоящем документе «млекопитающее» предпочтительно представляет собой человека.

«Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено в виде одной или более доз.

В настоящем документе термин «антитело» включает полноразмерные антитела, или любой антигенсвязывающий фрагмент антитела (то есть «антигенсвязывающую часть»), или его одиночную цепь. Полноразмерное антитело относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых цепи (HC) и две легких цепи (LC), соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена тяжелой цепи ( $V_H$  или HCVR) и константной области тяжелой цепи ( $C_H$ ). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь состоит из переменного домена легкой цепи ( $V_L$  или LCVR) и константной области легкой цепи ( $C_L$ ). Константная область легкой цепи состоит из одного домена,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в следующем порядке от аминного конца к карбоксильному концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном (например, CTGF). Константные области антител, возможно, могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В настоящем документе «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, CTGF). Показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры

связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают (i) Fab-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ; (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fab'-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$  и области между доменами  $C_{H1}$  и  $C_{H2}$ ; (iv) Fd-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; (v) одноцепочечный Fv-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и  $V_L$  одного плеча антитела, (vi) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature, 1989, 341, 544–546), состоящий из домена  $V_H$ ; и (vii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или комбинацию двух или более выделенных CDR, которые, возможно, могут быть соединены синтетическим линкером; (viii) диатело, содержащее  $V_H$  и  $V_L$ , соединенные в одну полипептидную цепь с помощью короткого линкера (см., например, патентные документы EP 404097; WO 93/11161; и Holliger et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90 (14) 6444-6448); (ix) «фрагмент доменного антитела», содержащий только  $V_H$  или  $V_L$ , где в некоторых случаях две или более области  $V_H$  ковалентно соединены.

Антитела могут быть поликлональными или моноклональными; ксеногенными, аллогенными или сингенными; или представлять собой их модифицированные формы (например, гуманизированные, химерные или полиспецифичные). Антитела также могут быть полностью человеческими.

В настоящем документе термин «каркас» или «FR» относится к остаткам варибельной области, отличным от остатков гиперварибельной области (CDR).

«Область кристаллизуемого фрагмента» или «Fc-область» относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области нативной последовательности и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут быть различными, обычно определяют, что Fc-область тяжелой цепи IgG человека расположена от аминокислотного остатка в положении Cys226 или Pro230 до ее карбоксильного конца (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Kabat (Johnson and Wu, Nucleic Acids Res, 2000, 28, 214-8). C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с индексом EU согласно Kabat) Fc-области может быть удален, например, во время получения или очистки антитела или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать популяции антител с удалением всех остатков K447, популяции антител без удаления остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и без него. Подходящие Fc-области с нативной

последовательностью для применения в антителах согласно настоящему изобретению включают IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4 человека.

«Fc-рецептор » или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела.

В настоящем документе «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит своего природного окружения. Например, выделенное антитело по существу не содержит клеточного материала и других белков из клеточного или тканевого источника, из которого оно получено. «Выделенное антитело» также относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность. В иллюстративном примере выделенное антитело, которое специфично связывает CTGF, по существу не содержит антител, которые специфично связывают антигены, отличные от CTGF. Однако выделенное антитело, которое специфично связывает CTGF, может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы CTGF других видов.

В настоящем документе «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антител одного молекулярного состава. Состав моноклональных антител демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

В настоящем документе «гуманизованное антитело» относится к антителу, которое состоит из CDR антител, полученных от млекопитающих, отличных от человека, а также области FR и константной области антитела человека. Гуманизованное антитело пригодно для применения в качестве эффективного компонента терапевтического агента благодаря сниженной антигенности.

В настоящем документе «антитело человека» включает антитела, содержащие переменные области, в которых как каркасная область, так и области CDR получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, указанная константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, в случае мутаций, введенных путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако не предполагается, что в настоящем документе термин «антитело человека» включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида

млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

### III. ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**Фигура 1:** Иллюстрирует противофиброзную активность нацеленного на CTGF мутеина липокалина, доставленного в легкие посредством местного введения, по сравнению с моноклональным антителом к CTGF, доставленным внутривенно, на 14 день после введения блеомицина *in vivo*. На панели (А) показана оценка по шкале Эшкрофта в виде медианного балла для каждого животного, полученная при гистопатологическом анализе 10 отдельных срезов ткани для каждого субъекта. На графиках также указано медианное значение для каждой группы лечения. Средний процент снижения балла по шкале Эшкрофта рассчитывали для каждой группы лечения путем нормирования к среднему баллу по шкале Эшкрофта соответствующей контрольной группы носителя. Статистический анализ проводили, как описано на фигуре. На панели (В) показано отложение белка коллагена 1a1 (Colla1) в виде % Colla1-положительной поверхности от площади легких для каждого животного, определенное с помощью иммуногистохимического анализа срезов ткани легких и последующего количественного анализа. На графике также указано медианное значение для всех исследованных животных в каждой группе лечения. Эффект лечения обозначен в виде снижения % Colla1-положительной поверхности по сравнению со средним значением для соответствующих животных, получавших контрольный носитель при том же пути введения. Статистический анализ проводили, как описано на фигуре.

**Фигура 2:** Иллюстрирует действие нацеленных на CTGF мутеинов липокалина на нарушенное под действием TGF- $\beta$ 1 образование органоидов. Фибробласты легких CCL-206 обрабатывали TGF- $\beta$ 1 в течение 48 ч, и затем культивировали совместно с первичными Ersam<sup>+</sup>-положительными клетками-предшественниками мыши в течение 14 дней. Для анализа действия на образование органоидов совместно культивируемые клетки обрабатывали нинтеданибом (100 нМ) в качестве положительного контроля, контролем каркасной последовательности мутеина липокалина, который не связывается с CTGF (100 нМ), слитым белком SEQ ID NO: 74 (10 и 100 нМ) и моноклональным антителом к CTGF (SEQ ID NO: 60 и 61) в течение всего периода времени. На фигуре представлено образование органоидов в %, нормированное к контролю, обработанному носителем. Отдельные точки данных представляют собой биологические повторности, полученные с применением Ersam<sup>+</sup>-положительных клеток, выделенных от разных мышей (n=8, +/- SEM).

**Фигура 3:** Выравнивание последовательностей мутеинов hNGAL.

**Фигура 4:** Показано связывание иллюстративного мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 и иллюстративного слитого белка SEQ ID NO: 74 с активированными TGF $\beta$  нормальными фибробластами легких человека (NHLF), определенное путем обнаружения каркаса липокалина с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания. Сигналы нормировали к сигналам соответствующих контролей (NGAL или слитого NGAL-NGAL).

**Фигура 5:** Показано распределение по размерам капель нацеленного на CTGF мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 (**A**) и слитого белка SEQ ID NO: 74 (**B**) при распылении с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой в сочетании с анализатором Malvern Spraytec и ингаляционной ячейкой. В случае (**A**) 10% полученных капель имеют размер менее 1,4 мкм ( $D_v(10)$ ), 50% имеют размер менее 3,5 мкм ( $D_v(50)$ ), и 90% имеют размер менее 8,6 мкм ( $D_v(90)$ ). В случае (**B**) 10% полученных капель имеют размер менее 1,8 мкм ( $D_v(10)$ ), 50% имеют размер менее 4,6 мкм ( $D_v(50)$ ), и 90% имеют размер менее 10,5 мкм ( $D_v(90)$ ).

**Фигура 6:** Иллюстрирует эффективное нацеливание на фиброзную ткань легких у мышей с индуцированным блеомицином фиброзом легких при применении нацеленных на CTGF мутеинов липокалина и содержащих их слитых белков. На панели (**A**) представлены иллюстративные обзорные 3D-изображения, где сигналы указанных флуоресцентно-меченых соединений показаны на шкале свечения (масштабные отрезки: 500 мкм). На панели (**B**) представлены увеличенные 2D-срезы 3D-изображений легких, где сигналы указанных флуоресцентно-меченых соединений показаны на шкале свечения (масштабные отрезки: 150 мкм). На панели (**C**) представлен общий флуоресцентный сигнал соединения для указанных соединений в фиброзных областях легких (3D количественная оценка интенсивности сигнала). На панели (**D**) представлена объемная доля фиброзной области, являющаяся мишенью указанных соединений (3D количественная оценка фиброзной области легких со специфичным для соединения сигналом).

**Фигура 7:** Показано сравнение фармакокинетических (ФК) профилей иллюстративного мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 и моноклонального антитела к CTGF SEQ ID NO: 60 и 61. На панели (**A**) представлен ФК-анализ мутеина липокалина в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF), ткани легких и плазме. Мутеин липокалина (100 мкг/мышь) вводили в легкие мышей и определяли экспозицию в различных компартментах через 2, 4, 8 и 24 ч с помощью ELISA. На панели (**B**) показан ФК-профиль антитела в BALF, ткани легких и плазме. 100 мкг антитела вводили мышам

путем внутривенной инфузии и определяли экспозицию через 1, 8, 24 и 96 ч с помощью ELISA.

#### **IV. ПОДРОБНОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В одном из аспектов настоящего изобретения предложены мутеины липокалина человека, которые связывают CTGF, и их полезные применения. В настоящем изобретении также предложены способы получения CTGF-связывающих белков, описанных в настоящем документе, а также композиции, содержащие такие белки. CTGF-связывающие белки согласно настоящему изобретению, а также их композиции могут быть применены в способах обнаружения CTGF в образце или в способах связывания CTGF у субъекта. Ранее не были описаны подобные мутеины липокалина человека, обладающие такими признаками, связанными с применениями, предложенными в настоящем изобретении.

##### **Мутеины липокалина согласно настоящему изобретению.**

Липокалины представляют собой белковые связывающие молекулы, которые в природных условиях приобрели способность связывать лиганды. Липокалины встречаются во многих организмах, включая позвоночных, насекомых, растения и бактерии. Представители семейства белков липокалинов (Pervaiz and Brew, 1987, FASEB J 1(3):209-14), как правило, представляют собой небольшие секретируемые белки и имеют одну полипептидную цепь. Они характеризуются рядом различных свойств молекулярного распознавания: их связыванием с различными, прежде всего гидрофобными малыми молекулами (такими как ретиноиды, жирные кислоты, производные холестерина, простагландины, биливердины, феромоны, вкусовые вещества и ароматические вещества), а также связыванием со специфичными рецепторами клеточной поверхности и образованием ими макромолекулярных комплексов. Хотя в прошлом их относили в первую очередь к транспортным белкам, в настоящее время очевидно, что липокалины выполняют различные физиологические функции. К ним относятся роль в транспорте ретинола, обонянии, передаче сигналов феромонов и синтезе простагландинов. Липокалины также связывают с регуляцией иммунного ответа и опосредованием клеточного гомеостаза (что рассматривается, например, в источниках Flower et al., 2000 Biochim Biophys Acta, 1482, 9-24, Flower, 1996 Biochem J, 318 (Pt 1), 1-14).

Липокалины имеют необычайно низкие уровни общей консервативности последовательностей, часто с идентичностью последовательностей менее 20%. Напротив, общий характер их укладки высококонсервативен. Центральная часть структуры

липокалина состоит из одного восьмицепочечного антипараллельного  $\beta$ -слоя, замкнутого вокруг своей оси с образованием  $\beta$ -цилиндра с непрерывными водородными связями. Этот  $\beta$ -цилиндр образует центральную полость. Один конец цилиндра стерически заблокирован N-концевым пептидным сегментом, проходящим через его дно, а также тремя пептидными петлями, соединяющими  $\beta$ -цепи. Другой конец  $\beta$ -цилиндра открыт для растворителя и включает сайт связывания мишени, который образован четырьмя гибкими пептидными петлями (AB, CD, EF и GH). Именно разнообразие петель в стабильном в остальной части каркасе липокалина приводит к появлению множества различных способов связывания, каждый из которых способен адаптироваться к мишеням различного размера, формы и химической природы (что рассматривается, например, в источниках Skerra, 2000 *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50, Flower et al., 2000, *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24, Flower, 1996 *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14).

Мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может представлять собой мутеин любого липокалина. Примеры подходящих липокалинов (также иногда обозначаемых как «эталонный липокалин», «липокалин дикого типа», «каркасы эталонного белка» или просто «каркасы»), мутеин которых может быть применен, включают, но не ограничиваются ими, липокалин слезной жидкости (липокалин-1, T1c или белок железы фон Эбнера), ретинолсвязывающий белок, простагландин D-синтазу типа липокалина нейтрофилов,  $\beta$ -лактоглобулин, билинсвязывающий белок (BBP), аполипопротеин D (APOD), ассоциированный с желатиназой нейтрофилов липокалин (NGAL), родственной  $\alpha$ 2-микроглобулину белок (A2m), 24p3/утерокалин (24p3), белок 1 железы фон Эбнера (VEGP 1), белок 2 железы фон Эбнера (VEGP 2) и основной аллерген Can f 1 (ALL-1). В конкретных воплощениях мутеин липокалина получают из группы липокалинов, состоящей из липокалина слезной жидкости человека (hT1c), ассоциированного с желатиназой нейтрофилов липокалина человека (hNGAL), аполипопротеина D человека (hAPOD) и билинсвязывающего белка *Pieris Brassicae*.

Аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению имеет высокую идентичность последовательностей с эталонным липокалином (или липокалином дикого типа), из которого она получена, предпочтительно hNGAL, по сравнению с идентичностью последовательностей с другим липокалином (см. также выше). В этом общем контексте аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению по меньшей мере по существу подобна аминокислотной последовательности соответствующего эталонного липокалина (дикого типа) при условии, что при выравнивании могут присутствовать пропуски (определенные



в настоящем документе), которые являются результатом вставок или делеций аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, будучи по существу подобной последовательностям соответствующего эталонного липокалина (дикого типа), в некоторых воплощениях имеет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87% или по меньшей мере 90% идентичности, включая по меньшей мере 95% идентичности, последовательности соответствующего липокалина. В этом отношении мутеин липокалина согласно настоящему изобретению, безусловно, может содержать описанные в настоящем документе замены по сравнению с липокалином дикого типа, что обеспечивает способность мутеина липокалина связываться с CTGF.

Как правило, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению содержит один или более мутантных аминокислотных остатков – относительно аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, или эталонного липокалина, например, hNGAL, – в четырех петлях на открытом конце, которые образуют лигандсвязывающий карман и определяют вход в лигандсвязывающий карман (см. выше). Как объяснено выше, эти области принципиально важны для определения специфичности связывания мутеина липокалина с желаемой мишенью. Мутеин липокалина согласно настоящему изобретению также может содержать мутантные аминокислотные остатки в областях за пределами указанных четырех петель. В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может содержать один или более мутантных аминокислотных остатков в одной или более из трех пептидных петель (обозначенных BC, DE и FG), соединяющих  $\beta$ -цепи на замкнутом конце липокалина. В некоторых конкретных воплощениях мутеин, полученный из полипептида липокалина слезной жидкости, NGAL или их гомолога, может содержать 1, 2, 3, 4 или более мутантных аминокислотных остатков в любом положении последовательности в N-концевой области и/или в трех пептидных петлях BC, DE и FG, расположенных на конце структуры  $\beta$ -цилиндра, которая находится напротив природного связывающего кармана липокалина. В некоторых других воплощениях мутеин, полученный из липокалина слезной жидкости, NGAL или их гомолога, может не содержать мутантных аминокислотных остатков в пептидной петле DE, расположенной на конце структуры  $\beta$ -цилиндра, по сравнению с последовательностью липокалина слезной жидкости дикого типа, NGAL или их гомолога.

Мутеин липокалина согласно настоящему изобретению содержит один или более, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или даже более

мутантных аминокислотных остатков по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего эталонного липокалина (дикого типа), при условии, что такой мутеин липокалина должен быть способен связываться с CTGF. В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере два, включая 2, 3, 4, 5 или даже более, мутантных аминокислотных остатка, при этом нативный аминокислотный остаток соответствующего эталонного липокалина (дикого типа) заменен на остаток аргинина.

Предусмотрены любые типы и количества мутаций, включая замены, делеции и вставки, при условии, что мутеин липокалина сохраняет способность связывать CTGF, и/или он имеет идентичность последовательности, которая составляет по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более идентичности с аминокислотной последовательностью эталонного липокалина (дикого типа), например, зрелого hNGAL.

В некоторых воплощениях замена представляет собой консервативную замену. В некоторых других воплощениях замена представляет собой неконсервативную замену или одну или более из иллюстративных замен, приведенных ниже.

В частности, чтобы определить, отличается ли аминокислотная последовательность мутеина липокалина от таковой эталонного липокалина (дикого типа) в отношении определенного положения в аминокислотной последовательности эталонного липокалина (дикого типа), специалист в данной области техники может применить средства и способы, хорошо известные в данной области техники, например, выравнивание, либо вручную, либо с помощью компьютерных программ, таких как BLAST2.0, что означает Basic Local Alignment Search Tool, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая применима для выравнивания последовательностей. Соответственно, аминокислотная последовательность эталонного липокалина (дикого типа) может служить «исследуемой последовательностью» или «эталонной последовательностью», тогда как аминокислотная последовательность мутеина липокалина служит «искомой последовательностью» (см. также выше).

Консервативные замены обычно представляют собой следующие замены, перечисленные в соответствии с аминокислотой, подлежащей мутации, за каждой из которых следует одна или более замен, которые можно считать консервативными: Ala → Gly, Ser или Val; Arg → Lys; Asn → Gln или His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn или Gln; Ile → Leu или Val; Leu → Ile или Val; Lys → Arg, Gln или Glu; Met → Leu, Tyr или Ile; Phe → Met, Leu или Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser;

Trp → Tyr; Tyr → Trp или Phe; Val → Ile или Leu. Другие замены также допустимы и могут быть определены эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительного ориентира, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые, как правило, можно использовать для определения консервативных замен одной на другую:

- a. Аланин (Ala), глицин (Gly);
- b. Аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);
- c. Аспарагин (Asn), глутамин (Gln);
- d. Аргинин (Arg), лизин (Lys);
- e. Изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val);
- f. Фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp);
- g. Серин (Ser), треонин (Thr); и
- h. Цистеин (Cys), метионин (Met).

Если такие консервативные замены приводят к изменению биологической активности, могут быть введены более существенные изменения, такие как представленные ниже или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, и продукты будут подвергнуты скринингу на наличие желаемых характеристик. Примерами таких более существенных изменений являются: Ala → Leu или Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg или His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala или Phe; Leu → Ala или Met; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile или Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr или Ser; Val → Met, Phe или Ala.

В некоторых воплощениях существенные модификации физических и биологических свойств липокалина (мутеина) достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) основной части боковой цепи.

Встречающиеся в природе остатки подразделяют на группы на основе общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; (2) нейтральные гидрофильные: цистеин, серин, треонин; (3) кислые: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; (4) основные: гистидин, лизин, аргинин; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин. Неконсервативные замены подразумевают замену представителем одного из этих классов представителя другого класса.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации соответствующего липокалина, также может быть заменен, как правило, на серин, чтобы повысить устойчивость молекулы к окислению и предотвратить абберрантное перекрестное связывание. И наоборот, в липокалин может быть добавлена цистеиновая связь (связи) для улучшения его стабильности.

**В. Специфичные к CTGF мутеины липокалина согласно настоящему изобретению.**

Как отмечено выше, липокалин представляет собой полипептид, характеризующийся его супервторичной структурой, а именно супервторичной структурной областью в виде цилиндрического  $\beta$ -складчатого слоя, содержащей восемь  $\beta$ -цепей, попарно соединенных четырьмя петлями с одного конца, тем самым образующих связывающий карман. Настоящее изобретение не ограничивается мутеинами липокалина, конкретно описанными в настоящем документе. В этом отношении настоящее изобретение относится к мутеину липокалина, имеющему супервторичную структурную область в виде цилиндрического  $\beta$ -складчатого слоя, содержащую восемь  $\beta$ -цепей, попарно соединенных четырьмя петлями с одного конца, тем самым образующих связывающий карман, где по меньшей мере одна аминокислота из каждой из по меньшей мере трех из указанных четырех петель была подвергнута мутации, и при этом указанный липокалин эффективно связывает CTGF с обнаруживаемой аффинностью.

В одном конкретном воплощении мутеин липокалина, описанный в настоящем документе, представляет собой мутеин, зрелого ассоциированного с желатиназой нейтрофилов липокалина человека (hNGAL). Мутеин зрелого hNGAL может быть обозначен в настоящем документе как «мутеин hNGAL».

В одном из аспектов настоящее изобретение включает любое количество мутеинов липокалина, полученных из эталонного липокалина (дикого типа), предпочтительно полученных из зрелого hNGAL, которые связывают CTGF с обнаруживаемой аффинностью. В родственном аспекте настоящее изобретение включает различные мутеины липокалина, которые способны регулировать нисходящие сигнальные пути CTGF путем связывания с CTGF. В этом значении CTGF можно рассматривать как неприродную мишень эталонного липокалина (дикого типа), предпочтительно hNGAL, где «неприродная мишень» относится к веществу, которое не связывается с эталонным липокалином (дикого типа) в физиологических условиях. Путем конструирования эталонных липокалинов (дикого типа) с одной или несколькими мутациями в определенных положениях последовательности авторы настоящего изобретения

продемонстрировали, что возможны высокая аффинность и высокая специфичность к неприродной мишени, CTGF. В некоторых воплощениях в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже более нуклеотидных триплетах, кодирующих определенные положения последовательности в липокалинах дикого типа, может быть осуществлен случайный мутагенез путем замены в этих положениях на ряд нуклеотидных триплетов с целью получения мутеина липокалина, который способен связывать CTGF.

Мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут иметь мутантные, включая замененные, удаленные и вставленные, аминокислотные остатки в одном или более положениях последовательности, соответствующих линейной полипептидной последовательности эталонного липокалина, предпочтительно hNGAL. Предпочтительно количество аминокислотных остатков мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые являются мутантными по сравнению с аминокислотной последовательностью эталонного липокалина, предпочтительно hNGAL, составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, например 25, 30, 35, 40, 45 или 50, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11, и еще более предпочтительно 9, 10 или 11. Однако предпочтительно, чтобы мутеин липокалина согласно настоящему изобретению сохранял способность к связыванию CTGF.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение охватывает мутеины hNGAL, определенные выше, в которых один или более аминокислотных остатков, таких как Ile в положении 41 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина 2 человека (hNGAL) (SEQ ID NO: 1), были удалены. Кроме того, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) эталонного липокалина (дикого типа), предпочтительно hNGAL, вне положений последовательности, содержащих мутантные аминокислоты.

В некоторых предпочтительных воплощениях один или более мутантных аминокислотных остатков, содержащихся в мутеине липокалина согласно настоящему изобретению, по меньшей мере по существу не ограничивают активность связывания с обозначенной мишенью и фолдинг мутеина или не препятствуют им. Такие мутации, включая замену, делецию и вставку, могут быть осуществлены на уровне ДНК с применением общепринятых стандартных способов (Sambrook and Russell, 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press). В некоторых воплощениях мутантные аминокислотные остатки в одном или более положениях последовательности, соответствующих линейной полипептидной последовательности эталонного липокалина (дикого типа), предпочтительно hNGAL,

вводят путем случайного мутагенеза посредством замены нуклеотидных триплетов, кодирующих соответствующие положения последовательности эталонного липокалина, на ряд нуклеотидных триплетов.

В некоторых воплощениях мутеин липокалина, который связывает CTGF с обнаруживаемой аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина на другую аминокислоту, например, на остаток серина. В некоторых других воплощениях мутеин липокалина, который связывает CTGF с обнаруживаемой аффинностью, может включать один или более ненативных остатков цистеина, заменяющих одну или более аминокислот эталонного липокалина (дикого типа), предпочтительно hNGAL. В другом конкретном воплощении мутеин липокалина согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты на остаток цистеина, тем самым образуя один или более цистеиновых мостиков. В некоторых воплощениях указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две области петли. Определение этих областей используется в настоящем документе в соответствии с источниками Flower (1996) *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14, Flower (2000) *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36, и Breustedt et al. (2005) *J Biol Chem*, 280, 484-93.

В целом, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может иметь по меньшей мере примерно 70%, в том числе по меньшей мере примерно 80%, например по меньшей мере примерно 85% идентичности аминокислотных последовательностей с аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены CTGF-связывающие мутеины липокалина. В этом отношении в настоящем изобретении предложены один или более мутеинов липокалина, которые способны связывать CTGF (человека) с обнаруживаемой аффинностью, предпочтительно с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно  $10^{-5}$  М или менее. Предпочтительные мутеины липокалина способны связывать CTGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 500 нМ или менее, примерно 400 нМ или менее, примерно 300 нМ или менее, примерно 200 нМ или менее или примерно 100 нМ или менее. Некоторые предпочтительные мутеины липокалина даже способны связывать CTGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее. Еще более предпочтительные мутеины липокалина даже

способны связывать СТGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 9 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 7 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 5 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 3 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее, примерно 0,9 нМ или менее, примерно 0,8 нМ или менее, примерно 0,7 нМ или менее, примерно 0,6 нМ или менее, примерно 0,5 нМ или менее, примерно 0,4 нМ или менее, примерно 0,3 нМ или менее, примерно 0,2 нМ или менее, примерно 0,1 нМ или менее, примерно 0,09 нМ или менее, примерно 0,08 нМ или менее, примерно 0,07 нМ или менее, или даже примерно 0,06 нМ или менее. В некоторых воплощениях мутеины липокалина способны связывать СТGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , которая ниже, чем  $K_D$  моноклонального антитела к СТGF SEQ ID NO: 60 и 61. Некоторые СТGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут обладать перекрестной реактивностью с СТGF яванского макака (суСТGF). Такие мутеины липокалина могут связываться с СТGF яванского макака с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 200 нМ или менее, примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 9 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 7 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 5 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 3 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее или примерно 0,5 нМ или менее. Некоторые СТGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут обладать перекрестной реактивностью с СТGF мыши (mСТGF). Такие мутеины липокалина могут связываться с СТGF мыши с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 200 нМ или менее, примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 9 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 7 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 5 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 3 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее или примерно 0,5 нМ или менее. Некоторые СТGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут обладать перекрестной реактивностью с СТGF крысы (rСТGF). Такие мутеины липокалина могут связываться с СТGF крысы с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 200 нМ или менее, примерно

100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 9 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 7 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 5 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 3 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее или примерно 0,5 нМ или менее. Такая аффинность может быть определена, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в **примере 5**.

Мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению могут быть способны связывать CTGF со значением EC50, составляющим примерно 200 нМ или менее, примерно 100 нМ или менее, примерно 90 нМ или менее, примерно 80 нМ или менее, примерно 70 нМ или менее, примерно 60 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее, примерно 40 нМ или менее, примерно 30 нМ или менее, примерно 20 нМ или менее, примерно 10 нМ или менее, примерно 9 нМ или менее, примерно 8 нМ или менее, примерно 7 нМ или менее, примерно 6 нМ или менее, примерно 5 нМ или менее, примерно 4 нМ или менее, примерно 3 нМ или менее, примерно 2 нМ или менее, примерно 1 нМ или менее или примерно 0,5 нМ или менее. Значение EC50 может быть определено, например, с помощью ELISA, как по существу описано в **примере 6**. В качестве альтернативы, Значение EC50 может быть определено, например, с помощью анализа способом гомогенной флуоресценции с временным разрешением, как по существу описано в **примере 7**.

Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению способны конкурировать или конкурируют с антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой цепи GFTFSSYG (CDR1, SEQ ID NO: 53), IGTGGGT (CDR2, SEQ ID NO: 54) и ARGDYGSGSFFDC (CDR3, SEQ ID NO: 55) и последовательности CDR легкой цепи QGISSW (CDR1, SEQ ID NO: 56), AAS (CDR2) и QQYNSYPPT (CDR3, SEQ ID NO: 57); последовательности VH и VL SEQ ID NO: 58 и 59; и/или последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF. Некоторые другие CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению не конкурируют с антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой цепи GFTFSSYG (CDR1, SEQ ID NO: 53), IGTGGGT (CDR2, SEQ ID NO: 54) и ARGDYGSGSFFDC (CDR3, SEQ ID NO: 55) и последовательности CDR легкой цепи QGISSW (CDR1, SEQ ID NO: 56), AAS (CDR2) и QQYNSYPPT (CDR3, SEQ ID NO: 57); последовательности VH и VL SEQ ID NO: 58 и 59; и/или последовательности тяжелой



цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF. Конкуренция за связывание CTGF может быть определена, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в **примере 8**.

Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом CTGF, который не перекрывается с эпитопом-мишенью антитела, имеющего последовательности CDR тяжелой цепи GFTFSSYG (CDR1, SEQ ID NO: 53), IGTGGGT (CDR2, SEQ ID NO: 54) и ARGDYYSYGSFFDC (CDR3, SEQ ID NO: 55) и последовательности CDR легкой цепи QGISSW (CDR1, SEQ ID NO: 56), AAS (CDR2) и QQYNSYPPT (CDR3, SEQ ID NO: 57); последовательности VH и VL SEQ ID NO: 58 и 59; и/или последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF. Некоторые другие CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению связываются с эпитопом CTGF, который перекрывается с эпитопом-мишенью антитела, имеющего последовательности CDR тяжелой цепи GFTFSSYG (CDR1, SEQ ID NO: 53), IGTGGGT (CDR2, SEQ ID NO: 54) и ARGDYYSYGSFFDC (CDR3, SEQ ID NO: 55) и последовательности CDR легкой цепи QGISSW (CDR1, SEQ ID NO: 56), AAS (CDR2) и QQYNSYPPT (CDR3, SEQ ID NO: 57); последовательности VH и VL SEQ ID NO: 58 и 59; и/или последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF.

Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению способны связываться с фрагментом CTGF, который содержит домены 1 и 2, но не содержит доменов 3 и 4. Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению не связываются с фрагментом CTGF, который содержит домены 1 и 2, но не содержит доменов 3 и 4, однако способны связываться с полноразмерным CTGF. Связывание с различными доменами может быть определено, например, с помощью анализа методом ELISA, такого как анализ, по существу описанный в **примере 9**.

CTGF-связывающий мутеин липокалина согласно настоящему изобретению предпочтительно не обладает перекрестной реактивностью с другими представителями семейства белков CCN. Соответственно, CTGF-связывающий липокалин согласно настоящему изобретению не обладает перекрестной реактивностью с одним или более из представителей семейства белков CCN, выбранных из группы, состоящей из CYR61 (CCN1) (человека), NOV (CCN3) (человека), WISP-1 (CCN4) (человека), WISP-2 (CCN5) (человека) и WISP-3 (CCN6) (человека). CTGF-связывающий липокалин согласно настоящему изобретению предпочтительно не обладает перекрестной реактивностью со

всеми упомянутыми выше представителями семейства белков CCN. Перекрестная реактивность с другими представителями семейства белков CCN может быть определена, например, с помощью анализа методом ELISA, такого как анализ, по существу описанный в **примере 10**.

CTGF-связывающий мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может обеспечивать противofiброзный эффект *in vivo*. Такой противofiброзный эффект может быть выражен с помощью шкалы Эшкрофта. Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина способны обеспечивать столь же низкое или более низкое снижение оценки по шкале Эшкрофта, чем эталонное антитело SEQ ID NO: 60 и 61. Дополнительно или в качестве альтернативы, такой противofiброзный эффект может выражаться в отложении коллагена 1a1 (Colla1) в легких. Некоторые CTGF-связывающие мутеины липокалина способны обеспечивать столь же низкую или более низкую степень отложения Colla1, чем эталонное антитело SEQ ID NO: 60 и 61. Эталонное антитело предпочтительно вводят системно, тогда как мутеин липокалина предпочтительно вводят в легкие местно. Такой противofiброзный эффект может быть определен, например, в блеомициновой модели фиброза легких у мышей, как по существу описано в **примере 11**.

CTGF-связывающие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут быть классифицированы по характеристикам связывания. Мутеин hNGAL, который не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, и который способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, считается принадлежащим к «группе N». Без желания ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что мутеин hNGAL группы N связывается с доменом 1 и/или 2 CTGF. Мутеин hNGAL, который конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, и который способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, считается принадлежащим к «группе NP». Без желания ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что мутеин hNGAL группы NP связывается с доменом 2 CTGF. Мутеин hNGAL, который не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, и который не связывает фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, однако способен связывать полноразмерный CTGF, считается принадлежащим к «группе C». Без желания ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что мутеин hNGAL группы C связывается с доменом 3 и/или 4 CTGF.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложены CTGF-связывающие мутеины hNGAL.

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 110, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 110, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной

последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых

воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной

последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях такой мутеин hNGAL может содержать мутантный аминокислотный остаток в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или даже более мутантных аминокислотных остатков в одном или более положениях последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), и при этом указанный полипептид связывает CTGF, в частности, CTGF человека. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более мутантных аминокислотных остатков в одном или более из указанных выше положений линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка

цистеина, например, на остаток серина. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению включает аминокислотную замену нативного остатка цистеина в положениях 76 и/или 175 на другую аминокислоту, например остаток серина. В связи с этим отмечается, что было обнаружено, что удаление структурной дисульфидной связи (на уровне соответствующей наивной библиотеки нуклеиновых кислот) hNGAL дикого типа, образованной остатками цистеина 76 и 175 (cf. Breustedt *et al.*, J Biol Chem, 2005, 280, 484-93), может обеспечивать мутеины hNGAL, которые не только имеют стабильную укладку, но также способны связывать данную неприродную мишень с высокой аффинностью. В некоторых воплощениях удаление указанной структурной дисульфидной связи может обеспечивать дополнительное преимущество, заключающееся в возможности получения или преднамеренного введения в мутеины согласно настоящему изобретению неприродных дисульфидных связей, вследствие чего повышается стабильность мутеинов. При этом мутеины hNGAL, которые связывают CTGF и имеют дисульфидный мостик, образованный между Cys 76 и Cys 175, также являются частью настоящего изобретения. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению может содержать мутацию в положении Cys 87 зрелого hNGAL. Например, указанный остаток цистеина может быть заменен на остаток другой аминокислоты, например, серина.

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению может содержать мутацию в положении Gln 28 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такая мутация может представлять собой мутацию Gln 28 → His, которая может вводить сайт рестрикции BstXI и может облегчать клонирование.

В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению может содержать мутацию в положении Asn 65 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такая мутация может представлять собой мутацию Asn 65 → Asp, Gln или Glu, предпочтительно мутацию Asn 65 → Asp.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Arg, Lys, Ile, Val, Met или Trp; Ala 40 → Asn, Tyr, Lys, Phe, Ile или Val; Ile 41 → Arg, делеция Ile 41, Gln,



Gly или Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Glu, Ser, Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Pro, Ser, Ala, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Trp, Phe, Gly или Ser; Asn 65 → Asp; Ser 68 → His, Gln или Glu; Leu 70 → His, Arg, Gln или Val; Arg 72 → Met, Leu, Ser, Glu или Asp; Lys 73 → Thr, Gln, Ala, Asn или Asp; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → Arg, Lys, His, Ser, Val, Ile или Leu; Trp 79 → Ile, Leu, Thr или Val; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Asp, Lys или Glu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ile, Ala, Thr, Ser, Arg, His или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Ser, Tyr, Gln, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Gly или Ser; Ser 99 → Asn, Val или Arg; Tyr 100 → Gly, Arg, Ala, His, Phe, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Met, Gln, Ser, Phe, Leu, Glu или Tyr; Thr 104 → Tyr, Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Pro, Ser, Thr, Gln, His или Asp; Val 110 → Ile; Phe 123 → Trp, His, Ala, Leu или Val; Lys 125 → Trp, Ser, His или Ala; Ser 127 → Asn, Thr, Ile, Ala, Gln, Arg, Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly, Leu или Pro; Asn 129 → Thr, Ala или Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Trp, Thr, Ser, Phe, Ile, His или Val; Lys 134 → Thr, Ala, Val, Asn, Phe, Trp, His или Gln; и Thr 136 → Ala или Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Arg, Lys, Ile, Val, Met или Trp; Ala 40 → Asn, Tyr, Lys, Phe, Ile или Val; Ile 41 → Arg, делецию Ile 41, Gln, Gly или Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Glu, Ser, Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Pro, Ser, Ala, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Trp, Phe, Gly или Ser; Asn 65 → Asp;

Ser 68 → His, Gln или Glu; Leu 70 → His, Arg, Gln или Val; Arg 72 → Met, Leu, Ser, Glu или Asp; Lys 73 → Thr, Gln, Ala, Asn или Asp; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → Arg, Lys, His, Ser, Val, Ile или Leu; Trp 79 → Ile, Leu, Thr или Val; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Asp, Lys или Glu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ile, Ala, Thr, Ser, Arg, His или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Ser, Tyr, Gln, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Gly или Ser; Ser 99 → Asn, Val или Arg; Tyr 100 → Gly, Arg, Ala, His, Phe, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Met, Gln, Ser, Phe, Glu или Tyr; Thr 104 → Tyr, Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Pro, Ser, Thr, Gln, His или Asp; Val 110 → Ile; Phe 123 → Trp, His, Ala, Leu или Val; Lys 125 → Trp, Ser, His или Ala; Ser 127 → Asn, Thr, Ile, Ala, Gln, Arg, Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly, Leu или Pro; Asn 129 → Thr, Ala или Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Trp, Thr, Ser, Phe, Ile, His или Val; Lys 134 → Thr, Ala, Val, Asn, Phe, Trp, His или Gln; и Thr 136 → Ala или Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Arg, Lys, Ile, Val, Met или Trp; Ala 40 → Asn, Tyr, Lys, Phe, Ile или Val; Ile 41 → Arg, делеция Ile 41, Gln, Gly или Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Glu, Ser, Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Pro, Ser, Ala, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Trp, Phe, Gly или Ser; Ser 68 → His, Gln или Glu; Leu 70 → His, Arg, Gln или Val; Arg 72 → Met, Leu, Ser, Glu или Asp; Lys 73 → Thr, Gln, Ala, Asn или Asp; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → Arg, Lys, His, Ser, Val, Ile или Leu;

Trp 79 → Ile, Leu, Thr или Val; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Asp, Lys или Glu; Leu 94 → Ile, Ala, Thr, Ser, Arg, His или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Ser, Tyr, Gln, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Gly или Ser; Ser 99 → Asn, Val или Arg; Tyr 100 → Gly, Arg, Ala, His, Phe, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Met, Gln, Ser, Phe, Leu, Glu или Tyr; Thr 104 → Tyr, Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Pro, Ser, Thr, Gln, His или Asp; Val 110 → Ile; Phe 123 → Trp, His, Ala, Leu или Val; Lys 125 → Trp, Ser, His или Ala; Ser 127 → Asn, Thr, Ile, Ala, Gln, Arg, Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly, Leu или Pro; Asn 129 → Thr, Ala или Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Trp, Thr, Ser, Phe, Ile, His или Val; Lys 134 → Thr, Ala, Val, Asn, Phe, Trp, His или Gln; и Thr 136 → Ala или Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Arg, Lys, Ile, Val, Met или Trp; Ala 40 → Asn, Tyr, Lys, Phe, Ile или Val; Ile 41 → Arg, делеция Ile 41, Gln, Gly или Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Glu, Ser, Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Pro, Ser, Ala, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Trp, Phe, Gly или Ser; Ser 68 → His, Gln или Glu; Leu 70 → His, Arg, Gln или Val; Arg 72 → Met, Leu, Ser, Glu или Asp; Lys 73 → Thr, Gln, Ala, Asn или Asp; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → Arg, Lys, His, Ser, Val, Ile или Leu; Trp 79 → Ile, Leu, Thr или Val; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Asp, Lys или Glu; Leu 94 → Ile, Ala, Thr, Ser, Arg, His или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Ser, Tyr, Gln, Asp или Pro; Ile 97 →

Tyr; Lys 98 → Gly или Ser; Ser 99 → Asn, Val или Arg; Tyr 100 → Gly, Arg, Ala, His, Phe, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Met, Gln, Ser, Phe, Glu или Tyr; Thr 104 → Tyr, Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Pro, Ser, Thr, Gln, His или Asp; Val 110 → Ile; Phe 123 → Trp, His, Ala, Leu или Val; Lys 125 → Trp, Ser, His или Ala; Ser 127 → Asn, Thr, Ile, Ala, Gln, Arg, Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly, Leu или Pro; Asn 129 → Thr, Ala или Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Trp, Thr, Ser, Phe, Ile, His или Val; Lys 134 → Thr, Ala, Val, Asn, Phe, Trp, His или Gln; и Thr 136 → Ala или Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 110, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Arg или Lys; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg, делеция Ile 41 или Gln; Asp 47 → Glu или Ser; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → His; Leu 70 → His; Arg 72 → Met, Leu или Ser; Lys 73 → Thr; Asp 77 → Arg или Lys; Trp 79 → Ile или Leu; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ile или Ala; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Pro; Val 110 → Ile; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn или Thr; Tyr 132 → Trp; и Lys 134 → Thr. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях

последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно не связывается с фрагментом, содержащим только домены 1 и 2 CTGF, но при этом способен связываться с полноразмерным CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 47, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 94, 96, 100, 103, 106, 110, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Arg или Lys; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg, делеция Ile 41 или Gln; Asp 47 → Glu или Ser; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → His; Leu 70 → His; Arg 72 → Met, Leu или Ser; Lys 73 → Thr; Asp 77 → Arg или Lys; Trp 79 → Ile или Leu; Arg 81 → Asp; Leu 94 → Ile или Ala; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Pro; Val 110 → Ile; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn или Thr; Tyr 132 → Trp; и Lys 134 → Thr. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID

NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно не связывается с фрагментом, содержащим только домены 1 и 2 CTGF, но при этом способен связываться с полноразмерным CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Ile или Val; Ala 40 → Tyr или Lys; Ile 41 → Gly; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Ser или Ala; Tyr 52 → Phe; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln, Ala или Asn; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → His, Lys, Ser, Val или Ile; Trp 79 → Thr; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Lys; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ala, Thr, Ser, Arg или His; Asn 96 → Ser, Tyr или Gln; Lys 98 → Gly; Ser 99 → Asn; Tyr 100 → Arg, Ala или His; Leu 103 → Gln или Ser; Thr 104 → Tyr; Tyr 106 → Ser или Thr; Phe 123 → Trp, His или Ala; Lys 125 → Ser, His или Ala; Ser 127 → Ile, Thr, Ala, Gln или Arg; Gln 128 → Gly или Leu; Asn 129 → Thr или Ala; Tyr 132 → Thr, Ser, Phe, Ile или His; Lys 134 → Ala, Val, Asn или Phe; и Thr 136 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно

способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Ile или Val; Ala 40 → Tyr или Lys; Ile 41 → Gly; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Ser или Ala; Tyr 52 → Phe; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln, Ala или Asn; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → His, Lys, Ser, Val или Ile; Trp 79 → Thr; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Lys; Leu 94 → Ala, Thr, Ser, Arg или His; Asn 96 → Ser, Tyr или Gln; Lys 98 → Gly; Ser 99 → Asn; Tyr 100 → Arg, Ala или His; Leu 103 → Gln или Ser; Thr 104 → Tyr; Tyr 106 → Ser или Thr; Phe 123 → Trp, His или Ala; Lys 125 → Ser, His или Ala; Ser 127 → Ile, Thr, Ala, Gln или Arg; Gln 128 → Gly или Leu; Asn 129 → Thr или Ala; Tyr 132 → Thr, Ser, Phe, Ile или His; Lys 134 → Ala, Val, Asn или Phe; и Thr 136 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно

настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 87, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Gly; Glu 44 → Thr; Asp 47 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Phe; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Thr или Ser; Asn 96 → Ser; Lys 98 → Gly; Ser 99 → Asn; Tyr 100 → Arg; Leu 103 → Gln или Ser; Thr 104 → Tyr; Tyr 106 → Ser или Thr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 40, 41, 44, 47, 49, 52, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 94, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 106, 125, 127 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Gly; Glu 44 → Thr; Asp 47 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Phe; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Thr; Leu 94 → Thr или Ser; Asn 96 → Ser; Lys 98 → Gly; Ser 99 → Asn; Tyr 100 → Arg; Leu 103 → Gln или



Ser; Thr 104 → Tyr; Tyr 106 → Ser или Thr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; и Lys 134 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Ile или Val; Ala 40 → Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Gln или Tyr; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Phe; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala или Asn; Lys 74 → Arg; Lys 75 → Ser; Asp 77 → Lys, Ser, Val или Ile; Trp 79 → Thr; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Lys; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ala, Thr, Ser, Arg или His; Asn 96 → Tyr и Gln; Tyr 100 → Ala или His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Thr; Phe 123 → Trp, His или Ala; Lys 125 → Ser, His или Ala; Ser 127 → Thr, Ala, Gln или Arg; Gln 128 → Gly или Leu; Asn 129 → Thr или Ala; Tyr 132 → Thr, Ser, Phe, Ile или His; Lys 134 → Val, Asn или Phe; и Thr 136 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ

ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 44, 47, 49, 52, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 94, 96, 100, 103, 106, 123, 125, 127, 128, 129, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Ile или Val; Ala 40 → Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Gln или Tyr; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Phe; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala или Asn; Lys 74 → Arg; Lys 75 → Ser; Asp 77 → Lys, Ser, Val или Ile; Trp 79 → Thr; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Lys; Leu 94 → Ala, Thr, Ser, Arg или His; Asn 96 → Tyr и Gln; Tyr 100 → Ala или His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Thr; Phe 123 → Trp, His или Ala; Lys 125 → Ser, His или Ala; Ser 127 → Thr, Ala, Gln или Arg; Gln 128 → Gly или Leu; Asn 129 → Thr или Ala; Tyr 132 → Thr, Ser, Phe, Ile или His; Lys 134 → Val, Asn или Phe; и Thr 136 → Ala. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях

последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Met или Trp; Ala 40 → Phe, Tyr, Ile или Val; Ile 41 → Arg или Lys; Asp 47 → Gln; Gln 49 → Ser, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Gly или Ser; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln или Glu; Leu 70 → Gln или Val; Arg 72 → Asp или Glu; Lys 73 → Asp или Gln; Asp 77 → Leu или His; Trp 79 → Val или Ile; Arg 81 → Glu или Lys; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ala или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Ser; Ser 99 → Val или Arg; Tyr 100 → Phe, Arg, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Phe, Glu или Tyr; Thr 104 → Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Gln, Ser, Thr, His или Asp; Phe 123 → Leu или Val; Ser 127 → Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly или Pro; Asn 129 → Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Val или Phe; Lys 134 → Trp, His или Gln; и Thr 136 → Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных

остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 47, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Met или Trp; Ala 40 → Phe, Tyr, Ile или Val; Ile 41 → Arg или Lys; Asp 47 → Gln; Gln 49 → Ser, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Gly или Ser; Ser 68 → Gln или Glu; Leu 70 → Gln или Val; Arg 72 → Asp или Glu; Lys 73 → Asp или Gln; Asp 77 → Leu или His; Trp 79 → Val или Ile; Arg 81 → Glu или Lys; Leu 94 → Ala или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Ser; Ser 99 → Val или Arg; Tyr 100 → Phe, Arg, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Phe, Glu или Tyr; Thr 104 → Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Gln, Ser, Thr, His или Asp; Phe 123 → Leu или Val; Ser 127 → Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly или Pro; Asn 129 → Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Val или Phe; Lys 134 → Trp, His или Gln; и Thr 136 → Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин

hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe или Tyr; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Gly; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Val; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Ser 99 → Val; Tyr 100 → Phe; Gly 102 → Thr; Leu 103 → Phe; Thr 104 → Glu; Tyr 106 → Gln; Phe 123 → Leu или Val; Ser 127 → Tyr или Trp; Gln 128 → Gly или Pro; Asn 129 → Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp, His или Gln; и Thr 136 → Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 123,

127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe или Tyr; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Val; Arg 81 → Glu; Asn 96 → Ala; Ser 99 → Val; Tyr 100 → Phe; Gly 102 → Thr; Leu 103 → Phe; Thr 104 → Glu; Tyr 106 → Gln; Phe 123 → Leu или Val; Ser 127 → Tyr или Trp; Gln 128 → Gly или Pro; Asn 129 → Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp, His или Gln; и Thr 136 → Val. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Ile или Val; Ile 41 → Lys; Asp 47 → Gln; Gln 49 → Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Ser; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Val; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Lys; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ala или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 →

Ser; Ser 99 → Arg; Tyr 100 → Arg, Pro или Ser; Gly 102 → Arg; Leu 103 → Glu или Tyr; Thr 104 → Val или Trp; Tyr 106 → Ser, Thr, His или Asp; Ser 127 → Phe, His или Gly; Tyr 132 → Phe; и Lys 134 → Trp. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающий мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 36, 40, 41, 47, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих мутантных аминокислотных остатков: Leu 36 → Trp; Ala 40 → Ile или Val; Ile 41 → Lys; Asp 47 → Gln; Gln 49 → Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Val; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Lys; Leu 94 → Ala или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Ser; Ser 99 → Arg; Tyr 100 → Arg, Pro или Ser; Gly 102 → Arg; Leu 103 → Glu или Tyr; Thr 104 → Val или Trp; Tyr 106 → Ser, Thr, His или Asp; Ser 127 → Phe, His или Gly; Tyr 132 → Phe; и Lys 134 → Trp. В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ

ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 10 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 15 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). В некоторых воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит 20 или более из указанных выше мутантных аминокислотных остатков в этих положениях последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

- (a) Gln 28 → His, Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;
- (b) Gln 28 → His, Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;
- (c) Leu 36 → Lys, Ile 41 → делеция Ile 41, Asp 47 → Glu, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Leu, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Leu, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ile, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; или
- (d) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 →



Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно не связывается с фрагментом, содержащим только домены 1 и 2 CTGF, но при этом способен связываться с полноразмерным CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

(e) Gln 28 → His, Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Asn 96 → Ser, Tyr 100 → Arg, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Ser, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala; или

(f) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ser, Lys 98 → Gly, Ser 99 → Asn, Leu 103 → Ser, Thr 104 → Tyr, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только

домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

(g) Gln 28 → His, Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Trp, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ala, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Thr, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;

(i) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Arg, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106

→ Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(n) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(o) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(p) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Asp, Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → His, Tyr 100 → His, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(q) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → His, Lys 125 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Val;

(r) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Ala, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Gln, Gln 128 → Leu, Tyr 132 → His и Lys 134 → Phe;

(s) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Arg, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;

(t) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(u) Leu 36 → Val, Glu 44 → Pro, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ser, Asn 96 → Gln, Tyr 100 →

Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;  
или

(v) Leu 36 → Val, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

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

(x) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Ser 99 → Val, Gly 102 → Thr, Thr 104 → Glu, Tyr 106 → Gln, Ser 127 → Tyr, Tyr 132 → Val и Lys 134 → Trp;

(y) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Leu, Ser 127 → Tyr, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Ser, Arg 130 → Glu и Lys 134 → His; или

(z) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 →

Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

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

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

(cc) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(dd) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Gly 95 → Ser, Asn 96 → Pro, Lys 98 → Ser, Tyr 100 → Ser, Thr 104 → Val, Tyr 106 → His, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ee) Leu 36 → Trp, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Glu, Ile 97 → Tyr, Ser 99 → Arg,

Tyr 100 → Arg, Gly 102 → Arg, Thr 104 → Trp, Tyr 106 → Asp, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ff) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Glu, Tyr 106 → Thr, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(gg) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; или

(hh) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Ser 127 → Gly, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

(a) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(b) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser

68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(c) Leu 36 → Lys, Ile 41 → делеция Ile 41, Asp 47 → Glu, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Leu, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Leu, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ile, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; или

(d) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно не связывается с фрагментом, содержащим только домены 1 и 2 CTGF, но при этом способен связываться с полноразмерным CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

(e) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Leu 94 → Thr, Asn 96 → Ser, Tyr 100 → Arg, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Ser, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala; или

(f) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Leu 94 → Ser, Lys 98 → Gly, Ser 99 → Asn, Leu 103 → Ser, Thr 104 → Tyr, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

- (g) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;
- (h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Trp, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ala, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Thr, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;
- (i) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;
- (j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;
- (k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;



- (l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Arg, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;
- (m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;
- (n) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;
- (o) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;
- (p) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Asp, Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → His, Tyr 100 → His, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;
- (q) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → His, Lys 125 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Val;
- (r) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Ala, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Gln, Gln 128 → Leu, Tyr 132 → His и Lys 134 → Phe;
- (s) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Arg, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;
- (t) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr,

Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(u) Leu 36 → Val, Glu 44 → Pro, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ser, Asn 96 → Gln, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; или

(v) Leu 36 → Val, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

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

(x) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Ser 99 → Val, Gly 102 → Thr, Thr 104 → Glu, Tyr 106 → Gln, Ser 127 → Tyr, Tyr 132 → Val и Lys 134 → Trp;

(y) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Leu, Ser 127 → Tyr, Gln 128 → Gly, Asn 129 →

Ser, Arg 130 → Glu и Lys 134 → His; или

(z) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

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

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

(cc) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(dd) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Gly 95 → Ser, Asn 96 → Pro, Lys 98 → Ser, Tyr 100 → Ser, Thr 104 → Val, Tyr 106 → His, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ee) Leu 36 → Trp, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Glu, Ile 97 → Tyr, Ser 99 → Arg, Tyr 100 → Arg, Gly 102 → Arg, Thr 104 → Trp, Tyr 106 → Asp, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ff) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Glu, Tyr 106 → Thr, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(gg) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; или

(hh) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Ser 127 → Gly, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

В некоторых воплощениях CTGF-связывающие мутеины hNGAL содержат все, за исключением трех, все, за исключением двух, или все, за исключением одного, мутантные аминокислотные остатки из одного из упомянутых выше наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1). Такой мутеин hNGAL предпочтительно не конкурирует с антителом, представленным SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом SPR, как по существу описано в примере 8. Такой мутеин hNGAL предпочтительно способен связывать фрагмент, содержащий только домены 1 и 2 CTGF, что установлено, например, с помощью анализа методом ELISA, как по существу описано в примере 9.

В оставшейся области, то есть области, отличной от положений последовательности 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136, мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL вне содержащих мутации положений аминокислотной последовательности.

В других воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению имеет

по меньшей мере 70% идентичности последовательностей или по меньшей мере 70% гомологии последовательностей с последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

В других конкретных воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 3-36, или их фрагмент или вариант.

В других конкретных воплощениях мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-36.

Настоящее изобретение также включает структурные гомологи мутеина hNGAL, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-36, при этом указанные структурные гомологи имеют гомологию аминокислотной последовательности или идентичность последовательности, составляющую более примерно 60%, предпочтительно более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 92%, и наиболее предпочтительно более 95%, по отношению к указанному мутеину hNGAL.

В некоторых конкретных воплощениях в настоящем изобретении предложен мутеин липокалина, который связывает CTGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 500 нМ или менее, при этом указанный мутеин липокалина имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-36.

### **С. Модификации мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению.**

В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность с N-конца или C-конца, предпочтительно с C-конца, такую как Strep-tag II (SEQ ID NO: 41) или последовательность сайта расщепления определенными ферментами рестрикции, что не влияет на биологическую активность (например, связывание с мишенью, например, CTGF) мутеина липокалина.

В некоторых других воплощениях могут быть введены дополнительные

модификации мутеина липокалина для модуляции определенных характеристик мутеина, например для улучшения стабильности укладки, стабильности в сыворотке, устойчивости белка, или растворимости в воде, или уменьшения склонности к агрегации, или для придания мутеину новых характеристик.

Например, могут быть подвергнуты мутации одно или более положений аминокислотной последовательности мутеина липокалина для введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгирования с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), биотин, пептиды или белки, или для образования неприродных дисульфидных связей. Конъюгированное соединение, например, PEG или HES, в некоторых случаях может увеличивать время полужизни соответствующего мутеина липокалина в сыворотке.

В одном из воплощений реакционноспособная группа мутеина липокалина может от природы присутствовать в его аминокислотной последовательности, например остатки цистеина, от природы присутствующие в указанной аминокислотной последовательности. В некоторых других воплощениях такая реакционноспособная группа может быть введена путем мутагенеза. В случае, если реакционноспособную группу вводят путем мутагенеза, одной из возможностей является мутация аминокислоты в соответствующем положении с заменой на остаток цистеина. Иллюстративные возможности такой мутации с введением остатка цистеина в аминокислотную последовательность мутеина hNGAL включают введение остатка цистеина по меньшей мере в одно из положений последовательности, которые соответствуют положениям последовательности 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158 последовательности hNGAL дикого типа (SEQ ID NO: 1). Полученный таким образом тиоловый фрагмент может быть применен для PEG-илирования или HES-илирования мутеина, например, с целью увеличения времени полужизни соответствующего мутеина липокалина в сыворотке.

В другом воплощении, с целью обеспечения подходящих боковых цепей аминокислот в качестве новых реакционноспособных групп для конъюгирования одного из указанных выше соединений с мутеином липокалина, в аминокислотную последовательность мутеина липокалина могут быть введены искусственные аминокислоты. Как правило, такие искусственные аминокислоты выполнены с возможностью обеспечения большей реакционной способности и, таким образом, с возможностью облегчения конъюгирования с желаемым соединением. Такие искусственные аминокислоты (например, *para*-ацетилфенилаланин) могут быть введены путем мутагенеза, например, с применением искусственной тРНК.

Для некоторых способов применения описанных в настоящем документе мутеинов липокалина может быть предпочтительным их применение в форме слитых белков. В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению с его N-конца или C-конца подвергают слиянию с белком, белковым доменом или пептидом, например, антителом, фрагментом или вариантом антитела, сигнальной последовательностью и/или аффинной меткой. В некоторых других воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению с его N-конца или C-конца подвергают конъюгированию с партнером, который представляет собой белок, белковый домен или пептид; например, антитело, фрагмент или вариант антитела, сигнальную последовательность и/или аффинную метку.

Примерами подходящих партнеров для слияния являются аффинные метки, такие как Strep-tag или Strep-tag II (Schmidt et al., J Mol Biol, 1996, 255(5):753-66), c-мус-метка, FLAG-метка, His-метка или HA-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, которые обеспечивают простое обнаружение и/или очистку рекомбинантных белков. Также подходящими партнерами для слияния с мутеинами липокалина согласно настоящему изобретению являются белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или желтый флуоресцентный белок (YFP).

В целом, мутеины липокалина согласно настоящему изобретению могут быть помечены любым подходящим химическим веществом или ферментом, которые прямо или опосредованно обеспечивают обнаруживаемое соединение или сигнал в химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Например, флуоресцентная или радиоактивная метка может быть конъюгирована с мутеином липокалина с обеспечением флуоресценции или рентгеновского излучения в качестве обнаруживаемого сигнала. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и  $\beta$ -галактозидаза являются примерами ферментных меток (и одновременно оптических меток), катализирующих образование хромогенных продуктов реакции. В целом, все метки, обычно применяемые для антител (за исключением тех, которые применяют исключительно для конъюгирования с сахарным фрагментом в Fc-части иммуноглобулинов), также могут быть применены для конъюгирования с мутеинами липокалина согласно настоящему изобретению.

Мутеины липокалина согласно настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с любым подходящим терапевтически активным агентом, например, для адресной доставки таких агентов в конкретную клетку, ткань или орган, или для избирательного нацеливания на клетки (например, опухолевые клетки) без воздействия на

оказывающие нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных агентов включают радионуклиды, токсины, низкомолекулярные органические вещества и терапевтические пептиды (такие как пептиды, действующие в качестве агонистов/антагонистов рецептора клеточной поверхности, или пептиды, конкурирующие за сайт связывания белка на конкретной клеточной мишени). Однако мутеины липокалина согласно настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с терапевтически активными нуклеиновыми кислотами, такими как молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, малые интерферирующие РНК, микроРНК или рибозимы. Такие конъюгаты могут быть получены с применением способов, хорошо известных в данной области техники.

В некоторых воплощениях мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может быть слит или конъюгирован с фрагментом, который продлевает время полужизни мутеина в сыворотке (в этом отношении см. также международную патентную публикацию № WO 2006/056464, где такие стратегии описаны применительно к мутеинам ассоциированного с желатиназой нейтрофилов липокалина человека (hNGAL), обладающим аффинностью связывания с CTLA-4). Фрагмент, который продлевает время полужизни в сыворотке, может представлять собой молекулу PEG, молекулу HES, молекулу жирной кислоты, такой как пальмитиновая кислота (Vajo and Duckworth, *Pharmacol Rev*, 2000, 52(1):1-9), Fc-часть иммуноглобулина, домен C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина, домен C<sub>H</sub>4 иммуноглобулина, связывающий альбумин пептид, связывающий альбумин белок или трансферрин, и это лишь некоторые из них.

Если в качестве партнера для конъюгирования применяют PEG, молекула PEG может быть замещенной, незамещенной, линейной или разветвленной. Она также может представлять собой активированное производное полиэтилена. Примерами подходящих соединений являются молекулы PEG, описанные в международной патентной публикации № WO 1999/64016, патенте США № 6177074 или патенте США № 6403564 применительно к интерферону, или описанные для других белков, таких как PEG-модифицированная аспарагиназа, PEG-аденозиндезаминаза (PEG-ADA) или PEG-супероксиддисмутаза (Fuertges and Abuchowski, *Journal of Controlled Release*, 1990, 11(1-3), 139-148). Молекулярная масса такого полимера, такого как полиэтиленгликоль, может находиться в диапазоне от примерно 300 до примерно 70000 дальтон, включая, например, полиэтиленгликоль с молекулярной массой примерно 10000, примерно 20000, примерно 30000 или примерно 40000 дальтон. Кроме того, как описано, например, в патентах США № 6500930 или 6620413, олигомеры и полимеры углеводов, такие как HES, могут быть конъюгированы с мутеином согласно настоящему изобретению с целью продления



времени полужизни в сыворотке.

Если с целью продления времени полужизни мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению в сыворотке применяют Fc-часть иммуноглобулина, может быть использована технология SynFusion™, коммерчески доступная от Syntonix Pharmaceuticals, Inc. (Массачусетс, США). Использование этой технологии слияния с Fc позволяет получать биофармацевтические препараты длительного действия, которые могут, например, состоять из двух копий мутеина, соединенных с Fc-участком антитела для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности производства.

Примерами связывающих альбумин пептидов, которые могут быть применены с целью продления времени полужизни мутеина липокалина в сыворотке, являются, например, пептиды, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа<sub>1</sub>-Хаа<sub>2</sub>-Хаа<sub>3</sub>-Хаа<sub>4</sub>-Cys, где Хаа<sub>1</sub> представляет собой Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Хаа<sub>2</sub> представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Хаа<sub>3</sub> представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Хаа<sub>4</sub> представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной публикации США № 2003/0069395 или источнике Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem., 277(38):35035-43. Связывающий альбумин белок, слитый или конъюгированный с мутеином липокалина с целью продления времени полужизни в сыворотке, может представлять собой связывающий бактериальный альбумин белок, антитело, фрагмент антитела, включая доменные антитела (см., например, патент США 6696245), или мутеин липокалина, обладающий способностью связывать альбумин. Примеры белков, связывающих бактериальный альбумин, включают стрептококковый белок G (König and Skerra, J Immunol Methods, 1998, 218(1-2):73-83).

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

В частности, альбумин как таковой (Osborn et al., J Pharmacol Exp Ther, 2002, 303(2):540-8) или биологически активный фрагмент альбумина может быть применен в качестве партнера мутеина липокалина согласно настоящему изобретению с целью продления времени полужизни в сыворотке. Термин «альбумин» включает все альбумины млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин или альбумин крысы. Альбумин или его фрагмент могут быть получены

рекомбинантным способом, как описано в патенте США № 5728553 или европейских патентных публикациях № EP 0 330 451 и EP 0 361 991. Соответственно, рекомбинантный альбумин человека (например, Recombumin® от Novozymes Delta Ltd., Ноттингем, Великобритания) может быть конъюгирован или слит с мутеином липокалина согласно настоящему изобретению.

Если в качестве партнера для продления времени полужизни мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению в сыворотке применяют трансферрин, мутеины могут быть генетически слиты с N-концом, или C-концом, или обоими концами негликозилированного трансферрина. Время полужизни негликозилированного трансферрина составляет 14-17 дней, и слитый белок трансферрина также будет иметь увеличенное время полужизни. Носитель-трансферрин также обеспечивает высокую биодоступность, биораспределение и стабильность в кровотоке. Эта технология коммерчески доступна от BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, Пенсильвания, США). Рекомбинантный трансферрин человека (DeltaFerrin™) для применения в качестве стабилизатора белка/партнера для продления времени полужизни также коммерчески доступен от Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания).

Еще одной альтернативой продления времени полужизни мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению является слияние с N-концом или C-концом мутеина длинной, неструктурированной, гибкой богатой глицином последовательности (например, последовательности полиглицина, содержащей примерно от 20 до 80 следующих один за другим остатков глицина). Этот подход, описанный, например, в международной патентной публикации № WO 2007/038619, также получил название «rPEG» (рекомбинантный PEG).

В некоторых других воплощениях мутеин липокалина, описанный в настоящем документе, может быть слит или конъюгирован с N-конца и/или C-конца с фрагментом, который может придавать новые характеристики мутеинам липокалина согласно настоящему изобретению, такие как ферментативная активность или аффинность связывания с другими мишенями. Примерами подходящих партнеров для слияния являются щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион S-трансфераза, альбуминсвязывающий домен белка G, белок A, антитела или фрагменты антител, домены олигомеризации, другие мутеины липокалина или токсины.

В частности, может оказаться возможным слияние мутеина липокалина, описанного в настоящем документе, с отдельным активным центром фермента таким образом, что обе «субъединицы» полученного слитого белка совместно действуют на

конкретную терапевтическую мишень. Связывающий домен мутеина липокалина прикрепляется к вызывающей заболевание мишени, что позволяет домену фермента устранить биологическую функцию мишени.

Также возможно слияние мутеина липокалина, описанного в настоящем документе, со второй «субъединицей», которая представляет собой антитело, активный фрагмент антитела или другой мутеин липокалина, таким образом, что полученный слитый белок действует как на мишень мутеина липокалина, так и на еще одну другую конкретную терапевтическую мишень.

Мутеин липокалина, который связывается с конкретной неприродной мишенью, может быть слит с другим мутеином липокалина, который связывается с той же неприродной мишенью. Такое слияние может приводить к более сильному связыванию и, следовательно, к увеличению эффективности благодаря авидности. Увеличение размера этого продукта слияния может приводить к более длительной экспозиции в плазме и/или удерживанию в ткани (например, ткани легких) по сравнению с отдельными мутеинами липокалина. Оба мутеина липокалина могут связываться с различными эпитопами на одной и той же мишени с целью достижения более широкого охвата данной неприродной мишени, например, CTGF, и вследствие этого блокирования большего количества потенциальных партнеров по взаимодействию с неприродной мишенью, например, партнеров по взаимодействию с CTGF. Предпочтительно такие эпитопы не перекрываются. Если два мутеина липокалина связываются с различными эпитопами, также предпочтительно, чтобы указанные два мутеина липокалина не конкурировали друг с другом за связывание с мишенью. Конкуренция за связывание может быть определена, например, как по существу описано в **примере 8**. Таким образом, настоящее изобретение также относится к слитому белку, содержащему два мутеина липокалина, связывающихся с разными (например, неперекрывающимися) эпитопами одной и той же неприродной мишени (например, белка-мишени, такого как CTGF).

Мутеин липокалина согласно настоящему изобретению может быть слит с другим мутеином липокалина согласно настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к слитому белку, содержащему два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению. Оба мутеина липокалина могут содержать одну и ту же аминокислотную последовательность. Однако предпочтительно, чтобы два мутеина липокалина содержали разные аминокислотные последовательности. Оба мутеина липокалина могут связываться с одним и тем же эпитопом CTGF. Однако предпочтительно, чтобы оба липокалина связывались с разными эпитопами. Таким

образом, оба липокалина могут принадлежать к разным группам, выбранным из группы, состоящей из группы N, группы NP и группы C. В качестве иллюстративного примера, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе N, может быть слит с мутеином липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе NP, мутеин липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе C, может быть слит с мутеином липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе N, и/или мутеин липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе NP, может быть слит с мутеином липокалина согласно настоящему изобретению, который принадлежит к группе N, причем последнее является предпочтительным. Слитый белок может содержать линкер, описанный в настоящем документе. Линкер может соединять два мутеина липокалина друг с другом.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, содержащиеся в слитом белке, могут содержать следующие наборы аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), соответственно:

(a) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(b) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(c) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn

96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(d) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(e) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(f) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

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

(g) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(i) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96

→ Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(n) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; или

(o) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, содержащиеся в слитом белке, могут содержать следующие наборы аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), соответственно:

(a) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(b) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(c) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(d) Gln 28 → His, Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr



132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Gln 28 → His, Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(e) Gln 28 → His, Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Gln 28 → His, Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Asn 65 → Asp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(f) Gln 28 → His, Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

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

(g) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(i) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg

81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(n) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Cys 87 → Ser, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; или

(o) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Asn 65 → Asp, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Asn 65 → Asp, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Cys 87 → Ser, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:





NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(d) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 4, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 9;

(e) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%



NO: 13, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(m) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(n) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%





NO: 12, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(k) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28;

(l) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(m) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(n) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%





(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(d) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 4, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 9;

(e) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 4;



идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(m) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(n) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99%





NO: 12, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(k) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28;

(l) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 13, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(m) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 31;

(n) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 15, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях два мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которые содержатся в слитом белке, могут содержать следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 15;

(d) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9;

(e) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 4;

(f) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 30;

(g) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 31;

(h) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 28;

(i) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 15;

(j) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 31;

(k) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 28;

(l) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 31;

(m) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 31;

(n) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 28; или

(o) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 35.

В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предложен слитый белок, который имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62-76. В некоторых конкретных воплощениях слитый белок согласно

настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 62-76, или их фрагмент или вариант. Такой слитый белок предпочтительно связывает CTGF со значением EC50, составляющим примерно 250 нМ или менее.

**D. Получение мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению.**

В одном из аспектов настоящего изобретения предложены способы получения CTGF-связывающих белков, описанных в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины липокалина согласно настоящему изобретению. В другом воплощении настоящее изобретение охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замену определенных кодонов другими кодонами, определяющими ту же самую аминокислоту, настоящее изобретение не ограничивается конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин липокалина, описанный в настоящем документе, а охватывает все молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин. В этой связи в настоящем изобретении предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие некоторые мутеины липокалина согласно настоящему изобретению, представленные SEQ ID NO: 3–36.

В одном из воплощений настоящего изобретения указанный способ включает осуществление мутагенеза молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый hNGAL, в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одно или даже более из положений последовательности 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136.

В одном из воплощений настоящего изобретения указанный способ включает осуществление мутагенеза молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей зрелый hNGAL, в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одно или даже более из положений последовательности 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136.

В другом воплощении способа согласно настоящему изобретению молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый hNGAL, сначала подвергают мутагенезу в одном или более нуклеотидных триплетах, кодирующих положения аминокислотной

последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может быть дополнительно подвергнута мутагенезу в одном или более нуклеотидных триплетях, кодирующих положения 44, 47, 74, 75, 80, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 104, 110, 123, 128, 129, 130 и 136 аминокислотной последовательности, представляющей собой линейную полипептидную последовательность зрелого hNGAL.

Настоящее изобретение также включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутеины липокалина или слитые белки согласно настоящему изобретению, которые содержат дополнительные мутации за пределами указанных положений последовательности в результате экспериментального мутагенеза. Такие мутации часто являются допустимыми или даже могут оказаться предпочтительными, например, если они способствуют повышению эффективности фолдинга, стабильности в сыворотке, термостабильности, стабильности состава или аффинности связывания указанных мутеинов с лигандами.

Молекула нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, называется «способной к экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты» или способной «обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности», если она содержит элементы последовательности, которые содержат информацию, касающуюся регуляции транскрипции и/или трансляции, и такие последовательности «функционально связаны» с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, при которой элементы регуляторной последовательности и последовательность, подлежащая экспрессии, связаны таким образом, что это обеспечивает экспрессию гена. Конкретные свойства регуляторных областей, необходимых для экспрессии гена, могут различаться у разных видов, но, как правило, указанные области содержат промотор, который у прокариот содержит как промотор *per se*, то есть элементы ДНК, управляющие инициацией транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрипции с получением РНК будут сигнализировать об инициации трансляции. Такие промоторные области обычно содержат 5'-некодирующие последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, такие как -35/-10-боксы и элемент Шайна-Дальгарно у прокариот или ТАТА-бокс, СААТ-последовательности и 5'-кэпирующие элементы у эукариот. Указанные области также могут содержать энхансерные или репрессорные элементы, а также транслируемые сигнальные и лидерные последовательности для нацеливания нативного полипептида на конкретный компартмент клетки-хозяина.

Кроме того, 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, участвующие в терминации транскрипции, полиаденилировании или тому подобном. Однако если указанные терминирующие последовательности не являются в удовлетворительной степени функциональными в конкретной клетке-хозяине, то они могут быть заменены сигналами, функциональными в указанной клетке.

Следовательно, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть «функционально связана» с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями), такой как промоторная последовательность, для обеспечения экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящие прокариотические промоторы представляют собой, например, промотор *tet*, промотор *lacUV5* или промотор T7. Примеры промоторов, подходящих для применения для экспрессии в эукариотических клетках, представляют собой промотор SV40 или промотор CMV.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть частью вектора или клонирующего носителя любого другого типа, такого как плазида, фагида, фаг, бакуловирус, космоида или искусственная хромосома.

В одном из воплощений указанная молекула нуклеиновой кислоты включена в фагмиду. Фагмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область умеренного фага, такого как M13 или f1, или ее функциональную часть, слитую с кДНК, представляющей интерес. После суперинфекции бактериальных клеток-хозяев таким фагмидным вектором и соответствующим фагом-помощником (например, M13K07, VCS-M13 или R408) продуцируются интактные фаговые частицы, в результате чего обеспечивается физическое соединение кодируемой гетерологичной кДНК с соответствующим полипептидом, экспонированным на поверхности фага (Lowman, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1997, 26, 401-24, Rodi and Makowski, *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10, 87-93).

Такие клонирующие носители могут содержать, помимо регуляторных последовательностей, описанных выше, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутин липокалина или слитый белок, описанный в настоящем документе, последовательности репликации и регуляторные последовательности, полученные от вида, совместимого с клеткой-хозяином, которую применяют для экспрессии, а также маркеры отбора, придающие селективируемый фенотип трансформированным или

трансфицированным клеткам. В данной области техники известно большое количество подходящих клонирующих векторов, которые являются коммерчески доступными.

Молекула ДНК, кодирующая мутеин липокалина или слитый белок, описанный в настоящем документе, и, в частности, клонирующий вектор, содержащий кодирующую последовательность такого мутеина или слитого белка, может быть трансформирована в клетку-хозяина, способную экспрессировать указанный ген. Трансформация может быть выполнена с применением стандартных методик. Таким образом, настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе.

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

Настоящее изобретение также относится к способу получения мутеина липокалина, фрагмента указанного мутеина или слитого белка, описанного в настоящем документе, где указанный мутеин, фрагмент указанного мутеина или слитый белок, состоящий из указанного мутеина и другого полипептида (например, другого мутеина липокалина, или антитела, или фрагмента антитела), получают исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный мутеин, фрагмент или слитый белок, с помощью методов генной инженерии. Указанный способ может быть осуществлен *in vivo*, указанный мутеин липокалина, фрагмент или слитый белок, например, может быть получен в бактериальном или эукариотическом организме-хозяине, а затем выделен из указанного организма-хозяина или его культуры. Существует также возможность получения белка *in vitro*, например, путем применения системы трансляции *in vitro*.

При получении указанного мутеина липокалина, фрагмента или слитого белка *in vivo* нуклеиновую кислоту, кодирующую такой мутеин, фрагмент или слитый белок, вводят в подходящий бактериальный или эукариотический организм-хозяин с применением технологии рекомбинантной ДНК (как уже упомянуто выше). Для этой цели указанную клетку-хозяина сначала трансформируют клонирующим вектором, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин липокалина, фрагмент или слитый белок, описанный в настоящем документе, с применением известных

стандартных методов. Затем указанную клетку-хозяина культивируют в условиях, которые обеспечивают экспрессию гетерологичной ДНК и, таким образом, синтез соответствующего полипептида. В дальнейшем указанный полипептид выделяют либо из указанной клетки, либо из среды для культивирования.

Кроме того, в некоторых воплощениях в мутеинах hNGAL согласно настоящему изобретению может быть удалена естественно присутствующая дисульфидная связь между Cys 76 и Cys 175. Соответственно, такие мутеины могут быть получены в клеточном компартменте, имеющем среду с восстанавливающим окислительно-восстановительным потенциалом, например, в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

В случае, если мутеин липокалина согласно настоящему изобретению содержит внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительным направить синтезируемый полипептид в клеточный компартмент, имеющий среду с окисляющим окислительно-восстановительным потенциалом, с применением соответствующей сигнальной последовательности. Такая окисляющая среда может быть обеспечена посредством периплазмы грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или просвете эндоплазматического ретикула эукариотических клеток и обычно способствует образованию структурных дисульфидных связей.

Однако существует также возможность получения мутеина, фрагмента или слитого белка согласно настоящему изобретению в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В этом случае указанный полипептид может быть либо непосредственно получен в растворимом и свернутом состоянии, либо выделен в форме телец включения с последующей ренатурацией *in vitro*. Еще одним вариантом является применение конкретных штаммов-хозяев, имеющих окисляющую внутриклеточную среду, которые, таким образом, могут обеспечивать образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al., J Mol Biol, 2002, 315, 1-8).

Однако мутеин липокалина, фрагмент или слитый белок, описанный в настоящем документе, не обязательно может быть создан или получен только путем применения генной инженерии. Вместо этого такой мутеин, фрагмент или слитый белок также может быть получен путем химического синтеза, такого как твердофазный полипептидный синтез Меррифилда, или путем транскрипции и трансляции *in vitro*. Например, возможно, что перспективные мутации выявляют с применением молекулярного моделирования, и полипептиды, содержащие такие мутации, синтезируют *in vitro*, а затем испытывают на активность связывания с CTGF и другие желаемые свойства (такие как стабильность).

Способы твердофазного синтеза полипептидов/белков и их синтеза в жидкой фазе хорошо известны в данной области техники (см., например, Bruckdorfer et al., Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5, 29-43). В другом воплощении мутеин липокалина, фрагмент или слитый белок согласно настоящему изобретению может быть получен путем транскрипции/трансляции *in vitro* с применением общепризнанных способов, известных специалистам в данной области техники.

Кроме того, квалифицированному специалисту будут понятны способы, подходящие для применения для получения мутеина липокалина, фрагмента или слитого белка, который предусмотрен настоящим изобретением, но последовательности белка или нуклеиновой кислоты в случае которого не раскрыты в настоящем документе явным образом. В качестве общего представления такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез отдельных аминокислотных положений для упрощения субклонирования мутировавшего гена липокалина или его частей путем включения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов.

#### **Е. Иллюстративные применения и области применения мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению.**

В целом, мутеины липокалина или слитые белки, раскрытые в настоящем документе, и их производные могут быть применены во многих областях, подобно антителам или их фрагментам. Например, указанные мутеины липокалина или слитые белки могут быть применены для мечения ферментом, антителом, радиоактивным веществом или любой другой группой, обладающей определенной биохимической активностью или характеристиками связывания. При этом их соответствующие мишени или их конъюгаты или слитые белки могут быть обнаружены или приведены в контакт с ними.

В частности, настоящее изобретение относится к многочисленным возможным областям применения CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков.

Настоящее изобретение включает применение одного или более CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков, описанных в настоящем документе, для комплексообразования с CTGF.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению одного или более CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков, раскрытых в настоящем документе, для обнаружения CTGF в образце, а также соответствующему способу диагностики.



Следовательно, в другом аспекте настоящего изобретения раскрытые мутеины липокалина или слитые белки применяют для обнаружения CTGF. Такое применение может включать стадии приведения в подходящих условиях одного или более из указанных мутеинов или слитых белков в контакт с образцом, предположительно содержащим CTGF, в результате чего обеспечивается образование комплекса между указанными мутеинами или слитыми белками и CTGF, и обнаружения указанного комплекса посредством подходящего сигнала. Поддающийся обнаружению сигнал может быть обеспечен меткой, указанной выше, или изменением физических свойств в результате связывания, то есть самим комплексообразованием. Одним из примеров является поверхностный плазмонный резонанс, значение сигнала при котором изменяется в процессе связывания партнеров по связыванию, один из которых иммобилизован на поверхности, такой как золотая пленка.

CTGF-связывающие мутеины липокалина или слитые белки, раскрытые в настоящем документе, также могут быть применены для выделения CTGF. Такое применение может включать стадии приведения в подходящих условиях одного или более из указанных мутеинов или слитых белков в контакт с образцом, предположительно содержащим CTGF, в результате чего обеспечивается образование комплекса между указанными мутеинами или слитыми белками и CTGF, и выделения указанного комплекса из указанного образца.

При применении раскрытых мутеинов или слитых белков для обнаружения CTGF, а также для выделения CTGF, указанные мутеины, слитые белки и/или CTGF или его домен или фрагмент могут быть иммобилизованы на подходящей твердой фазе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает диагностический или аналитический набор, содержащий CTGF-связывающий мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению.

Помимо применения в диагностике, в еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую мутеин или слитый белок согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены мутеины липокалина человека и слитые белки, которые связывают CTGF, для применения в терапии. По существу мутеины липокалина и слитые белки согласно настоящему изобретению, которые связывают CTGF, предполагается применять в способе лечения или предотвращения заболевания человека. Соответственно, также предложены способы лечения или предотвращения заболеваний человека у субъекта, нуждающегося в этом, включающие

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению, который связывает CTGF. Кроме того, также предложено применение мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению, который связывает CTGF, для изготовления лекарственного средства.

Мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению может быть применен для лечения фиброзирующего заболевания, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

«Фиброзирующее заболевание» или «фиброз», в настоящем документе используемые взаимозаменяемо, включают, но не ограничиваются ими, фиброз легких, такой как идиопатический легочный фиброз (IPF) или интерстициальное заболевание легких (ILD) (например, прогрессирующее фиброзирующее ILD (PF-ILD)), фиброз сердца, фиброз печени и фиброз почек. В некоторых воплощениях указанный фиброз представляет собой радиационно-индуцированный фиброз (RIF), такой как радиационно-индуцированный фиброз легких. В некоторых воплощениях мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению применяют для лечения IPF или PF-ILD.

Рак, который может подлежать лечению с применением мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению, включает, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, хондросаркомы, энхондрому, глиому, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, внутривенную холангиокарциному, нейроэндокринные опухоли и плоскоклеточную карциному языка.

Аутоиммунное заболевание, которое может подлежать лечению с применением мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению, включает, но не ограничиваются им, системный склероз.

Инфекционное заболевание, которое может подлежать лечению с применением мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению, включает, но не ограничиваются им, инфекционное заболевание дыхательных путей, такое как пневмония. Лечение указанного инфекционного заболевания может включать лечение или предотвращение поражений легких, связанных с указанным инфекционным заболеванием, например, сопутствующих ему или последовавших за ним. Указанное инфекционное заболевание может представлять собой коронавирусную инфекцию, такую как SARS, MERS или COVID-19. Лечение COVID-19 может включать лечение острого COVID-19, продолжающегося симптоматического COVID-19, пост-COVID-19 синдрома (также называемого «долгий COVID» или «постострые последствия COVID-19 (PASC)») и

лечение поражений органов, сопутствующих или последовавших за инфекцией COVID-19, таких как поражение легких или поражение сердца. В некоторых воплощениях мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению применяют для лечения пост-COVID-19 синдрома, в частности, легочного фиброза как проявления пост-COVID-19 синдрома (также именуемого «PASC-PF»).

Мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению может быть применен для лечения заболевания легких, такого как фиброз легких, заболевания мышц, такого как мышечная дистрофия, такая как мышечная дистрофия Дюшенна, заболевания сердца, заболевания печени, заболевания почек или заболевания глаз, такого как (диабетическая) ретинопатия или глаукома.

В настоящем изобретении также предложен мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению, который связывает CTGF, для ингибирования фиброгенеза или для ингибирования (патологического) отложения внеклеточного матрикса.

Настоящее изобретение охватывает применение CTGF-связывающего мутеина липокалина или слитого белка согласно настоящему изобретению или композиции, содержащей такой мутеин липокалина или слитый белок, для регуляции нисходящих сигнальных путей CTGF. Такое применение может включать связывание CTGF.

Таким образом, настоящее изобретение включает способ обеспечения противомышечного эффекта *in vivo*, включающий применение одного или более CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков согласно настоящему изобретению или одной или более композиций, содержащих такие мутеины липокалина или слитые белки.

Кроме того, настоящее изобретение включает способ регуляции нисходящих сигнальных путей CTGF, включающий применение одного или более CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков согласно настоящему изобретению или одной или более композиций, содержащих такие мутеины липокалина или слитые белки.

Настоящее изобретение также предусматривает способ снижения отложения коллагена в легком, такого как отложение коллагена 1a1 (COL1a1), включающий применение одного или более CTGF-связывающих мутеинов липокалина или слитых белков согласно настоящему изобретению или одной или более композиций, содержащих такие мутеины липокалина или слитые белки.

#### **F. Введение мутеинов липокалина согласно настоящему изобретению**

Мутеин липокалина или слитый белок, раскрытый в настоящем документе, может быть введен субъекту с помощью любого подходящего способа введения. Подходящие способы введения могут включать, но не ограничиваются ими, энтеральные и парентеральные пути. Подходящие пути введения могут включать, но не ограничиваются ими, пероральное введение, интраназальное введение, введение на поверхность слизистой оболочки, ингаляцию, внутрикожное введение, внутривенное введение, подкожное введение, внутримышечное введение.

Мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению может быть введен путем ингаляции. Средства и устройства для ингаляционного введения вещества известны специалисту в данной области техники и, например, раскрыты в источниках WO 94/017784A и Elphick et al. (2015) *Expert Opin. Drug Deliv.*, 12(8):1375-87. Такие средства и устройства включают небулайзеры, дозирующие ингаляторы, порошковые ингаляторы и назальные спреи. Другие средства и устройства, подходящие для направленного ингаляционного введения мутеина липокалина или слитого белка, также известны в данной области техники. Небулайзеры подходят для применения для получения аэрозолей из растворов, тогда как дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка и так далее являются эффективными для получения аэрозолей с мелкими частицами.

Небулайзер представляет собой устройство для доставки лекарственных средств, применяемое для введения лекарственного средства в форме аэрозоля, вдыхаемого в легкие. Различные типы небулайзеров известны специалисту в данной области техники и включают струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры, небулайзеры на основе технологии вибрирующей сетки и жидкостные ингаляторы (soft mist inhalers). Некоторые небулайзеры обеспечивают непрерывный поток распыляемого раствора, то есть, они будут обеспечивать непрерывное распыление в течение длительного периода времени независимо от того, вдыхает ли субъект из них или нет, тогда как другие активируются вдохом, то есть, субъект получает некоторую дозу, только когда вдыхает из них. В некоторых воплощениях мутеин липокалина или слитый белок согласно настоящему изобретению вводят с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой.

Дозирующий ингалятор (metered-dose inhaler, MDI) представляет собой устройство, которое доставляет конкретное количество лекарственного средства в легкие в виде короткого выброса жидкого лекарственного средства в виде аэрозоля. Такой дозирующий ингалятор обычно состоит из трех основных компонентов: баллона, который содержит состав, подлежащий введению, дозирующего клапана, который обеспечивает

дозированное количество состава, подлежащего отмериванию при каждом срабатывании, и актуатора (или мундштука), который позволяет пациенту управлять устройством и направляет жидкий аэрозоль в легкие пациента.

Ингалятор сухого порошка (dry-powder inhaler, DPI) представляет собой устройство, которое доставляет лекарственное средство в легкие в форме сухого порошка. Ингаляторы сухого порошка являются альтернативой ингаляторам на основе аэрозолей, таким как дозирующие ингаляторы. Лекарственное средство обычно содержится либо в капсуле для ручного помещения внутрь ингалятора, либо в запатентованной блистерной упаковке, расположенной внутри ингалятора.

Назальные спреи могут быть применены для назального введения, посредством которого лекарственное средство вдвуют через нос. Назальные спреи могут обеспечивать чрезвычайно быстрое всасывание лекарственного средства.

Дополнительные цели, преимущества и признаки настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники после изучения следующих примеров и прилагаемых к ним чертежей, которые не предназначены для ограничения. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение конкретно раскрыто посредством иллюстративных воплощений и возможных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификациям и вариациям настоящего изобретения, и подразумевается, что такие модификации и вариации входят в объем настоящего изобретения.

## **V. ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1: Отбор и оптимизация мутеинов, специфичных к CTGF**

Специфичные к CTGF мутеины липокалина, описанные в этой заявке, были выбраны из наивных библиотек мутантов на основе hNGAL. Библиотеки подвергали пэннингу в отношении рекомбинантного белка CTGF/CNN2 человека и рекомбинантного белка CTGF крысы (R&D Systems и биотинилированные в собственной лаборатории белки). Пэннинг в отношении белков проводили с применением стандартных процедур. Полученные после селекции клоны подвергали процессу скрининга, описанному в **примере 2**.

Для оптимизации специфичных к CTGF мутеинов были получены кодируемые ДНК библиотеки мутеинов липокалина на основе мутеинов SEQ ID NO: 3, 7, 9, 25 и 29 с применением либо рандомизации выбранных положений, либо способов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) со сниженной точностью. Полученные мутеины липокалина подвергали клонированию с высокой эффективностью в фагмидный вектор,

по существу такой, как описано (Kim et al., 2009, J. Am. Chem. Soc., 131, 10, 3565–3576). Для отбора оптимизированных мутеинов с улучшенной термостабильностью и аффинностью связывания применяли фаговый дисплей. Отбор фагмид проводился в отношении рекомбинантного белка CTGF/CNN2 человека и рекомбинантного белка CTGF крысы (R&D Systems и биотинилированные в собственной лаборатории белки) в более строгих условиях по сравнению с первоначальным отбором мутеина и включал, среди прочего, стадии предварительного инкубирования при повышенной температуре и ограничение целевой концентрации мишени.

**Пример 2: Идентификация мутеинов, специфично связывающихся с CTGF, с помощью высокопроизводительного скрининга методом иммуноферментного анализа (ELISA)**

Отдельные колонии мутеинов липокалина, генетически слитых с С-концевым Strep-tag II (SEQ ID NO: 41), применяли для инокуляции среды 2x Yeast Extract Trypton (2XYT)/Amp и выращивали в течение ночи (14–18 ч) до достижения стационарной фазы. Затем из полученных культур в стационарной фазе инокулировали 50 мкл 2xYT/Amp и инкубировали в течение 3,5–5,5 ч при 37°C, а затем температуру меняли на 22°C до достижения значения OD<sub>595</sub> 0,6–0,8. Продукцию мутеинов индуцировали добавлением 10 мкл 2xYT/Amp, содержащей 1,2 мкг/мл ангидротетрациклина. Культуры инкубировали при 22°C до следующего дня. После добавления 40 мкл 5% (масс./об.) BSA в PBS/T и инкубирования в течение 1 ч при 25°C культуры были готовы к применению в скрининге.

Связывание выделенных мутеинов с CTGF исследовали путем прямого покрытия поверхности лунок планшетов для микротитрования рекомбинантным белком CTGF человека (SEQ ID NO: 79), рекомбинантным белком CTGF крысы (R&D Systems, SEQ ID NO: 82) и рекомбинантным белком CTGF-Fc человека (Creative Biomart, SEQ ID NO: 83) в концентрации 2 мкг/мл в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) в течение ночи при 4°C. После блокирования поверхности планшета PBST (фосфатно-солевой буферный раствор с твином), содержащим 5% BSA (бычий сывороточный альбумин), в планшеты для микротитрования добавляли 20 мкл заблокированных BSA культур и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Связанные мутеины обнаруживали с помощью антитела к StrepTag, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (IBA Lifesciences), после инкубирования в течение 1 ч. Для количественного определения добавляли 20 мкл флуорогенного субстрата пероксидазы QuantaBlu и определяли полученный флуоресцентный сигнал при длине волны возбуждения 330 нм и длине волны испускания 420 нм.

Для отбора мутеинов с повышенной аффинностью и стабильностью скрининг проводили i) при пониженной концентрации антигена (с применением рекомбинантного белка CTGF/CNN2 человека и рекомбинантного белка CTGF крысы (R&D Systems и биотинилированные в собственной лаборатории белки), ii) с применением форматов обратного скрининга, где мутеины захватывали с помощью Strep-tag на планшетах для микротитрования, покрытых антителом к Strep-Tag, и добавляли 2,5 нМ биотинилированного рекомбинантного белка CTGF/CNN2 человека и проводили обнаружение с помощью Extravidin-HRP (Sigma), и, частично, iii) с инкубированием скринируемого супернатанта при 65–75°C перед добавлением в планшет с мишенью.

Затем клоны секвенировали с учетом результатов скрининга и отбирали мутеины для дальнейшего определения характеристик.

### Пример 3: Экспрессия мутеинов

Отобранные мутеины с С-концевой последовательностью SAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 40) линкера SA и пептида Strep-tag II (WSHPQFEK, SEQ ID NO: 41) экспрессировали в *E. coli* в среде 2XYT/Amp и очищали с помощью аффинной хроматографии на Strep-Tactin и препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC). После очистки с помощью SEC фракции, содержащие мономерный белок, объединяли и повторно анализировали с помощью аналитической SEC. Выход иллюстративных мутеинов липокалина после аффинной хроматографии на Strep-Tactin и препаративной SEC, а также содержание мономера после очистки на Strep-Tactin показаны в **таблице 1**.

Некоторые из мутеинов липокалина и слитых белков экспрессировали в СНО с С-концевой His-меткой с применением известных из уровня техники методик (см. **таблицу 2**).

**Таблица 1:** Экспрессия мутеинов в *E. coli*.

SEQ ID NO:	Выход после очистки методом SEC [мг/л]	Содержание мономера после аффинной очистки (по данным аналитической SEC) [%]
3	0,6	98
7	3,75	96
9	1,7	97
23	6,5	97
24	7,8	97

<b>25</b>	3,3	94
<b>29</b>	4,0	94
<b>34</b>	3,5	96
<b>36</b>	4,1	93

**Таблица 2:** Экспрессия мутеинов и слитых белков в клетках СНО.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Выход после очистки методом ИМАС [мг/л]</b>	<b>Содержание мономера после аффинной очистки (по данным аналитической SEC) [%]</b>
<b>5</b>	4,3	94,4
<b>6</b>	2,9	97,1
<b>8</b>	2,7	95,5
<b>10</b>	12,1	88,9
<b>11</b>	11,8	98,0
<b>12</b>	8,5	73,3
<b>13</b>	7,8	71,7
<b>14</b>	3,3	88,8
<b>15</b>	4,7	92,8
<b>16</b>	3,6	92,8
<b>17</b>	5,1	90,9
<b>18</b>	8,7	99,0
<b>19</b>	7,3	87,1
<b>20</b>	4,3	85,9
<b>21</b>	6,4	86,9



<b>22</b>	1,9	90,0
<b>23</b>	2,4	93,3
<b>24</b>	3,5	94,1
<b>26</b>	13,1	87,2
<b>27</b>	4,0	89,0
<b>28</b>	2,5	86,7
<b>31</b>	9,3	94,3
<b>32</b>	6,3	93,6
<b>33</b>	6,7	94,9
<b>34</b>	9,7	94,7
<b>35</b>	9,2	95,8
<b>36</b>	6,2	93,8
<b>62</b>	4,7	97,1
<b>63</b>	3,4	95,4
<b>64</b>	5,2	92,9
<b>68</b>	6,2	91,1
<b>69</b>	5,6	88,1
<b>70</b>	5,3	97,5
<b>71</b>	5,6	98,4
<b>72</b>	5,4	90,9
<b>73</b>	6,2	98,6
<b>74</b>	5,3	97,3

75	4,7	87,3
76	5,3	97,3

#### Пример 4: Оценка термостабильности мутеинов липокалина

Для определения температуры плавления ( $T_m$ ) мутеинов липокалина, которая является общим показателем стабильности укладки, проводили сканирование специфичных к СТGF мутеинов с концентрацией белка 1 мг/мл в PBS (Gibco) (25–100°C) при 1°C/мин с помощью капиллярного прибора nanoDSC (CSC 6300, TA Instruments).  $T_m$  рассчитывали на основе отображаемой термограммы с помощью встроенного программного обеспечения Nano Analyse. Несколько явлений разворачивания могут вносить вклад в наблюдаемую термограмму. В случаях с несколькими переходами переход, обладающий основной энергией разворачивания, в наилучшей степени представляет общую укладку белка и указывается в отчете. Мутеины получали, как описано в примере 3. SEQ ID NO: 3, 7, 9, 25 и 29 экспрессировали с использованием *E. coli*, остальные мутеины экспрессировали с использованием клеток CHO.

Полученные максимальные температуры плавления, а также температура начала плавления для иллюстративных мутеинов липокалина и слитых белков приведены в **таблице 3** ниже.

**Таблица 3:**  $T_m$  и температура начала плавления специфичных к СТGF мутеинов липокалина, определенные методом nanoDSC.

SEQ ID NO:	$T_m$ [°C]	НАЧАЛО ПЛАВЛЕНИЯ [°C]
3	58	н/о
5	66	52
6	66	48
7	65	н/о
8	75	49
9	64	н/о
10	66	50

<b>14</b>	68	57
<b>15</b>	73	59
<b>16</b>	73	59
<b>17</b>	74	59
<b>19</b>	65	49
<b>20</b>	61	46
<b>21</b>	65	55
<b>22</b>	73	59
<b>23</b>	71	55
<b>24</b>	72	58
<b>25</b>	66	н/о
<b>26</b>	71	62
<b>27</b>	64	52
<b>28</b>	65	55
<b>29</b>	76	н/о
<b>31</b>	75	59
<b>32</b>	79	62
<b>33</b>	72	56
<b>34</b>	82	67
<b>35</b>	78	63
<b>36</b>	73	58
<b>62</b>	67	53

<b>63</b>	66	50
<b>64</b>	65	56
<b>68</b>	72	61
<b>69</b>	64	57
<b>70</b>	73	55
<b>71</b>	76	67
<b>72</b>	66	62
<b>73</b>	75	71
<b>74</b>	72	62
<b>75</b>	65	58
<b>76</b>	73	63

н/о – не определяли

**Пример 5: Аффинность связывания мутеинов с CTGF человека, яванского макака, крысы и мыши, определенная методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)**

Для определения кинетики связывания и аффинности иллюстративных мутеинов липокалина, описанных в настоящем документе, применяли метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Связывание иллюстративных мутеинов липокалина с CTGF человека (Creative Biomart), яванского макака, крысы (R&D Systems) и мыши (Abbecha) определяли методом SPR с помощью прибора Biacore (Cytiva, ранее GE Healthcare). Некоторые мишени были слиты с Fc-меткой IgG1 человека и захвачены с помощью набора антител к IgG человека, другие были иммобилизованы непосредственно.

Антитело к Fc IgG человека (GE Healthcare) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 с помощью стандартных химических реакций с аминами в соответствии с инструкциями производителя, что приводило к уровню иммобилизации 5500–14000 резонансных единиц (RU). Для некоторых исследований CTGF человека с Fc-меткой IgG1 человека или CTGF крысы или мыши без метки непосредственно иммобилизовали на чипе CM5. Карбоксильные группы на чипе активировали с помощью 1-этил-3-(3-

диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS). Затем наносили мишени в концентрации 3-5 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) со скоростью потока 10 мкл/мин до достижения уровня иммобилизации 300-1100 резонансных единиц. Остаточные непрореагировавшие сложные эфиры NHS блокировали путем пропускания над поверхностью 1 М раствора этаноламина. Контрольный канал активировали/деактивировали. В режиме захвата проводили захват мишеней с Fc-меткой IgG в концентрации 0,25–2,5 мкг/мл в буфере HBS-EP+ антителом к Fc IgG человека на поверхности чипа в течение 180 с при скорости потока 10 мкл/мин.

Для определения аффинности мутеинов липокалина готовили разведения каждого мутеина в буфере HBS-EP+ в различных концентрациях, как правило, в диапазоне 0,43-2000 нМ, и наносили на подготовленную поверхность чипа для определения аффинности. Анализ связывания проводили при времени контакта 180 с, времени диссоциации 900-3600 с и скорости потока 30 мкл/мин. Все измерения проводили при 25°C. В качестве отрицательного контроля также исследовали мутеины липокалина, которые не связываются с CTGF. Регенерации поверхности чипа для захвата Fc достигали с помощью инъекций 3 М MgCl<sub>2</sub> в течение 60-120 с и 10 мМ глицина-HCl (pH 1,7) в течение 60-120 с при скорости потока 10 мкл/мин с последующей дополнительной промывкой рабочим буфером (буфер HBS-EP+) и периодом стабилизации 120 с. Для непосредственно иммобилизованных мишеней использовали те же условия регенерации. В целях установления требуемых условий выполняли три начальных цикла, после чего проводили измерения для белков. Данные оценивали с помощью программного обеспечения Biacore Evaluation. Для аппроксимации полученных данных использовали двойной контроль и модель связывания 1:1.

Значения, определенные для  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и итоговой равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) иллюстративных мутеинов липокалина, приведены в **таблице 4**. Аффинность связывания с CTGF человека и яванского макака является сопоставимой для большинства проанализированных мутеинов липокалина, что является предпочтительной характеристикой для исследований фармакокинетики и/или безопасности лекарственных средств. Оптимизированные мутеины липокалина SEQ ID NO: 4-6, 8, 10-24, 26-28, 30-36 имеют значения  $K_D$  в нижнем наномолярном диапазоне, демонстрируя до 1500 раз более низкие значения  $K_D$  по сравнению с исходными мутеинами липокалина SEQ ID NO: 3, 7, 9, 25 и 29. Значения  $K_D$  нескольких оптимизированных мутеинов липокалина также были значительно ниже, чем у моноклонального антитела к CTGF SEQ ID NO: 60 и 61 ( $K_D \sim 0,2$  нМ в для CTGF человека). Кроме того, несколько оптимизированных мутеинов

липокалина демонстрировали более медленную скорость диссоциации по сравнению с указанным антителом ( $k_{off} \sim 2,1 \text{ E-}04 \text{ c}^{-1}$  для CTGF человека), что указывает на длительное взаимодействие мутеинов липокалина с мишенью.

Таблица 4: Кинетические константы и аффинность специфичных к CTGF мутеинов, определенные методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

н/о - не определяли, С. - связывание без определения кинетических констант.

SE Q ID NO :	CTGF человека			CTGF яванского макака			CTGF мыши			CTGF крысы		
	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [c <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [нМ ]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [c <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [нМ ]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [c <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [нМ]	$k_{on}$ [M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> ]	$k_{off}$ [c <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [нМ ]
3	2,0 0 E+ 05	7,4 9 E- 03	37,5 00	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	2,9 7 E+ 05	1,1 7 E- 02	39,3 00
5	2,1 1 E+ 05	6,6 5 E- 05	0,31 5	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	2,9 4 E+ 05	3,6 2 E- 04	1,23 3
6	2,9 0 E+ 05	1,4 9 E- 04	0,51 4	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	С.	С.	С.
7	9,7 6 E+ 04	5,8 7 E- 03	60,2 00	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	1,2 0 E+ 05	7,5 4 E- 03	62,8 00

<b>8</b>	4,5 4 E+ 04	1,1 4 E- 04	2,51 6	н/о	н/о	н/о	7,20 E+04	1,31 E-04	1,815	н/о	н/о	н/о
<b>9</b>	7,9 8 E+ 04	1,0 2 E- 03	12,8 11	н/о	н/о	н/о	1,33 E+05	8,32 E-04	6,264	1,0 5 E+ 05	1,6 9 E- 03	16,0 00
<b>10</b>	6,7 7 E+ 04	2,2 3 E- 06	0,03 3	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	8,8 8 E+ 04	4,0 8 E- 05	0,46 0
<b>11</b>	4,4 4 E+ 04	1,0 8 E- 04	2,43 7	н/о	н/о	н/о	8,01 E+04	8,19 E-05	1,022	н/о	н/о	н/о
<b>12</b>	5,5 6 E+ 04	1,3 3 E- 04	2,39 7	н/о	н/о	н/о	9,14 E+04	1,28 E-04	1,405	н/о	н/о	н/о
<b>13</b>	5,1 0 E+ 04	2,5 1 E- 06	0,04 9	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о
<b>14</b>	1,0 2 E+ 05	5,3 4 E- 05	0,52 3	н/о	н/о	н/о	1,90 E+05	7,03 E-05	0,369	н/о	н/о	н/о
<b>15</b>	8,1 7	4,4 7	0,54 7	1,0 7	7,5 7	0,70 7	1,29 E+05	4,51 E-05	0,349	1,2 0	1,1 4	0,95 0

	E+ 04	E- 05		E+ 05	E- 05					E+ 05	E- 04	
<b>16</b>	9,2 3 E+ 04	7,0 2 E- 05	0,76 0	н/о	н/о	н/о	1,61 E+05	6,34 E-05	0,393	н/о	н/о	н/о
<b>17</b>	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о
<b>18</b>	4,0 9 E+ 04	3,0 5 E- 06	0,07 4	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о
<b>19</b>	5,6 6 E+ 04	5,2 0 E- 05	0,91 8	н/о	н/о	н/о	9,32 E+04	2,54 E-05	0,273	н/о	н/о	н/о
<b>20</b>	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о
<b>21</b>	1,2 7 E+ 05	6,6 3 E- 05	0,52 3	н/о	н/о	н/о	2,28 E+05	3,94 E-05	0,173	н/о	н/о	н/о
<b>22</b>	1,4 2 E+ 05	8,0 5 E- 06	0,05 7	н/о	н/о	н/о	С.	С.	С.	1,8 1 E+ 05	4,0 1 E- 05	0,22 1
<b>23</b>	1,2 2 E+ 05	9,4 2 E- 06	0,07 7	С.	С.	С.	С.	С.	С.	н/о	н/о	н/о
<b>24</b>	1,5	1,4	0,09	1,9	2,6	0,13	2,99	1,16	0,034	1,3	3,5	0,25



	7 E+ 05	1 E- 05	0	5 E+ 05	3 E- 05	5	E+05	E-05		8 E+ 05	1 E- 05	5
<b>25</b>	2,6 8 E+ 04	2,4 8 E- 04	9,27 0	н/о	н/о	н/о	Отсутст вие связыва ния	Отсутст вие связыва ния	Отсутст вие связыва ния	4,6 5 E+ 04	1,2 9 E- 03	27,7 00
<b>26</b>	2,3 2 E+ 04	3,0 6 E- 05	1,32 0	н/о	н/о	н/о	3,53 E+04	2,08 E-04	5,895	н/о	н/о	н/о
<b>27</b>	3,0 5 E+ 04	2,4 5 E- 05	0,80 2	н/о	н/о	н/о	4,14 E+04	1,72 E-04	4,161	н/о	н/о	н/о
<b>28</b>	5,0 4 E+ 04	2,6 1 E- 05	0,51 7	н/о	н/о	н/о	6,07 E+04	8,23 E-05	1,355	н/о	н/о	н/о
<b>29</b>	1,0 0 E+ 05	1,1 2 E- 03	11,2 00	н/о	н/о	н/о	Отсутст вие связыва ния	Отсутст вие связыва ния	Отсутст вие связыва ния	1,7 6 E+ 05	3,1 7 E- 03	18,0 00
<b>31</b>	1,9 5 E+ 05	4,8 5 E- 05	0,24 9	1,6 2 E+ 05	7,3 1 E- 05	0,45 2	2,81 E+05	4,44 E-04	1,579	2,2 3 E+ 05	4,2 3 E- 04	1,89 1
<b>32</b>	1,0 9 E+ 05	6,3 9 E- 05	0,58 7	н/о	н/о	н/о	1,33 E+05	2,64 E-04	1,976	н/о	н/о	н/о

	05	05										
<b>33</b>	1,7 2 E+ 05	1,7 1 E- 05	0,09 9	н/о	н/о	н/о	1,76 E+05	5,29 E-05	0,301	2,7 9 E+ 05	6,3 0 E- 05	0,22 6
<b>34</b>	1,5 0 E+ 05	1,6 9 E- 04	1,12 9	1,3 9 E+ 05	2,3 8 E- 04	1,71 7	2,40 E+05	2,86 E-03	11,910	н/о	н/о	н/о
<b>35</b>	1,0 8 E+ 05	5,9 4 E- 05	0,55 0	н/о	н/о	н/о	1,28 E+05	2,87 E-04	2,244	1,9 3 E+ 05	2,7 3 E- 04	1,41 8
<b>36</b>	1,6 5 E+ 05	6,9 5 E- 05	0,42 0	1,4 1 E+ 05	9,7 7 E- 05	0,69 50	3,10 E+05	5,20 E-04	1,679	н/о	н/о	н/о

### Пример 6: Анализ слитых белков методом ELISA

Связывание слитых белков исследовали с помощью анализа методом ELISA. Подробно, поверхность 384-луночного планшета, подходящего для регистрации флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черный с плоским дном, с высокой степенью связывания), покрывали 20 мкл CTGF человека (R&D Systems) в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. После промывки PBS с добавлением 0,05% Tween 20 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 0,1% Tween 20 и 2% BSA (PBS-T/BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. 20 мкл серийных разведений мутеинов инкубировали в PBS-T/BSA в течение 1 ч при комнатной температуре (к.т.).

Остаточные супернатанты удаляли, и добавляли 20 мкл меченного HRP антитела к NGAL или антитела к His-метке в предварительно определенной оптимальной концентрации в PBS-T/BSA и инкубировали в течение 1 ч при к.т. После промывки в каждую лунку добавляли по 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Thermo) и оставляли для протекания реакции на 2-60 минут. Интенсивность флуоресценции каждой

лунки планшета регистрировали с помощью флуориметра для микропланшетов (Tecan). Аппроксимацию кривой проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 или 8. Полученные значения EC50 приведены в **таблице 5** ниже.

**Таблица 5:** Значения EC50 при анализе методом ELISA.

SEQ ID NO:	EC50 [нМ]
65	0,61
66	1,20
67	1,00
74	0,26
76	0,24

#### **Пример 7: Анализ слитых белков методом HTRF**

Связывание некоторых слитых белков исследовали с помощью анализа гомогенной флуоресценции с временным разрешением (анализ HTRF). Подробно, 1 нМ биотинилированного CTGF человека (R&D Systems) инкубировали в течение 1 ч с разведениями некоторых липокалинов, начиная с 5 нМ, в 384-луночном планшете для микротитрования из полистирола белого цвета с плоским дном (Greiner). Образцы разводили в PBS, содержащем 0,1% Tween 20 и 2% BSA. В качестве донора использовали стрептавидин-тербий в концентрации 0,006 мкг/мл, в качестве акцептора - 0,2 мкг/мл антитело к His-d2 (оба CisBio). После инкубирования в течение еще 1 ч интенсивность флуоресценции донора и акцептора в планшете регистрировали с помощью флуориметра для микропланшетов M1000 (Tecan) со стандартными настройками, рекомендованными CisBio. Рассчитанное отношение сигналов использовали для аппроксимации кривой, выполняемой с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7. Полученные значения EC50 приведены в **таблице 6** ниже.

**Таблица 6:** Значения EC50 при анализе методом HTRF.

SEQ ID NO:	EC50 [нМ]
62	0,63
63	0,58

<b>64</b>	0,58
<b>68</b>	0,56
<b>69</b>	0,65
<b>70</b>	0,72
<b>71</b>	0,94
<b>72</b>	0,68
<b>73</b>	0,83
<b>74</b>	0,59
<b>75</b>	0,70
<b>76</b>	0,62

#### **Пример 8: Эпитопный анализ мутеинов липокалина**

Для анализа эпитопов и определения одновременного связывания различных мутеинов липокалина применяли метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR). СТGF человека с Fc-меткой IgG1 человека непосредственно иммобилизовали на чипе CM5 (Creative Biomart, 10 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5) до достижения уровня иммобилизации 470-630 резонансных единиц. Контрольный канал активировали/деактивировали. 2 различных мутеина липокалина или антитело, представленное SEQ ID NO: 60 и 61, смешивали и вводили одновременно в концентрации 750 нМ или 1000 нМ в течение 180 с при скорости потока 30 мкг/мл. В качестве контроля вводили отдельные мутеины липокалина и сравнивали сигнал, полученный от отдельных мутеинов липокалина и смесей в конце введения. Регенерацию чипа проводили путем пропускания 3 М MgCl<sub>2</sub> и глицина-HCl, pH 1,5, каждые 60 с при скорости потока 15 мкл/мин.

Результаты представлены в **таблице 7**. «Да» означает, что одновременное связывание возможно, «нет» означает один и тот же или перекрывающийся эпитоп, «н/о» означает «не определяли».

**Таблица 7:** Одновременное связывание различных мутеинов липокалина и контрольного антитела.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>9</b>	<b>29</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>60 и 61</b>
<b>9</b>	нет	да	нет	да	н/о	нет
<b>29</b>	да	нет	да	нет	н/о	да
<b>7</b>	нет	да	нет	да	н/о	нет
<b>25</b>	да	нет	да	нет	н/о	да
<b>3</b>	н/о	н/о	н/о	н/о	нет	да
<b>60 и 61</b>	нет	да	нет	да	да	нет

Эпитоп иллюстративного мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 также перекрывался с эпитопом моноклонального антитела к CTGF SEQ ID NO: 60 и 61, и указанный мутеин липокалина конкурировал с антителом за связывание с CTGF в конкурентном анализе на основе ELISA (данные не представлены).

#### **Пример 9: Связывание с фрагментами CTGF**

Связывание мутеинов с фрагментами CTGF человека и мыши исследовали с помощью анализа методом ELISA. Подробно, поверхность 384-луночного планшета, подходящего для регистрации флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черный с плоским дном, с высокой степенью связывания), покрывали 20 мкл CTGF человека (R&D Systems, SEQ ID NO 79) и мыши (Biozol, SEQ ID NO: 80) или их фрагментов (Evitria, домены 1 и 2 huCTGF с меткой Fc человека (SEQ ID NO 77) и домены 1 и 2 muCTGF с меткой Fc человека (SEQ ID NO 78)) в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. После промывки PBS с добавлением 0,05% Tween 20 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 0,1% Tween 20 и 2% BSA (PBS-T/BSA) в течение 1 ч

при комнатной температуре. 20 мкл серийных разведений мутеинов, начиная с 1000 нМ, инкубировали в PBS-T/BSA в течение 1 ч при комнатной температуре.

Остаточные супернатанты удаляли, и добавляли 20 мкл меченного HRP антитела к Strep-Tag в предварительно определенной оптимальной концентрации в PBS-T/BSA и инкубировали в течение 1 ч при к.т. После промывки в каждую лунку добавляли по 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Thermo) и оставляли для протекания реакции на 5-25 минут. Интенсивность флуоресценции каждой лунки планшета регистрировали с помощью флуориметра для микропланшетов (Tecan). Аппроксимацию кривой проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7. Полученные значения EC50 приведены в **таблице 8** ниже.

**Таблица 8:** Значения EC50 при анализе методом ELISA.

SEQ ID NO:	EC [нМ]				
	CTGF1-2-huFc мыши	CTGF1-2-huFc человека	CTGF человека	CTGF мыши	CTGF крысы
3	н/с	н/с	6,9	н/с	Слабо
7	14	17	34	29	41
9	5,8	8	14	11	30
25	14	8,8	11	н/с	23
29	17	8,4	11	н/с	20

**Пример 10: Оценка специфичности методом ELISA (белки CCN)**

Связывание мутеинов с близкородственными CTGF белками исследовали с помощью анализа методом ELISA. Подробно, поверхность 384-луночного планшета, подходящего для регистрации флуоресценции (Greiner FLUOTRAC™ 600, черный с плоским дном, с высокой степенью связывания), покрывали 20 мкл CTGF человека или других представителей семейства белков CCN в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C. После промывки PBS с добавлением 0,05% Tween 20 лунки блокировали 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 0,1% Tween 20 и 2% BSA (PBS-T/BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. 20 мкл серийных разведений мутеинов, начиная с 1000 нМ, инкубировали в PBS-T/BSA в течение 1 ч при комнатной температуре (к.т.).

Остаточные супернатанты удаляли, и добавляли 20 мкл меченного HRP антитела к NGAL или антитела к Strep-Tag в предварительно определенной оптимальной

концентрации в PBS-T/BSA и инкубировали в течение 1 ч при к.т. После промывки в каждую лунку добавляли по 20 мкл флуорогенного субстрата HRP (QuantaBlu, Thermo) и оставляли для протекания реакции на 2-60 минут. Интенсивность флуоресценции каждой лунки планшета регистрировали с помощью флуориметра для микропланшетов (Tecan). Когда сигнал для CTGF человека приближался к максимальному значению, оценивали перекрестную реактивность с другими белками.

**Таблица 9:** Результаты анализа методом ELISA.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>CTGF ЧЕЛОВЕКА</b>	<b>huCYR61</b>	<b>huNOV</b>	<b>huWISP-1</b>	<b>huWISP-2</b>	<b>huWISP-3</b>
3	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
7	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
9	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
25	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
29	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
23	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
15	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
74	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания
76	Связывание	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания	Отсутствие связывания

**Пример 11: Противофиброзный эффект нацеленных на CTGF мутеинов**

### липокалина в блеомициновой модели фиброза легких у мышей *in vivo*

Противофиброзную активность мутеинов липокалина при местной доставке в легкие оценивали *in vivo* с использованием модели индуцированного блеомицином фиброза легких у мышей. Блеомицин представляет собой повреждающий ДНК агент, также применяемый в терапии рака, который вызывает выраженное повреждение легочного эпителия при доставке в легкие грызунов. Указанное повреждение вызывает сильный воспалительный ответ в легких, который, в свою очередь, индуцирует ответ в виде фиброза. Пик фиброзного ремоделирования, обычно наблюдаемый между 14 и 21 днем после введения блеомицина, характеризуется избыточным отложением внеклеточного матрикса и разрушением альвеолярных структур легких. В данном случае самцам мышей C57BL/6N в возрасте примерно 9 недель интраназальным путем вводили блеомицин в дозе 1 мг/кг или солевой раствор в качестве контроля. Животным ежедневно вводили мутеины липокалина в дозе 5 мг/кг или PBS в качестве контроля носителя посредством местной доставки в легкие с 0 дня по 13 день после введения блеомицина. Также животным через день вводили моноклональное антитело к CTGF (SEQ ID NO: 60 и 61) в дозе 10 мг/кг внутривенным путем. Животных умерщвляли на 14 день после введения блеомицина и анализировали степень фиброза легких в фиксированных формалином и заключенных в парафин тканях легких с помощью гистопатологической оценки с использованием шкалы Эшкрофта (модификация Matsuse) и количественного цифрового анализа обнаруживаемого при ИНС отложения белка коллагена 1a1.

Для определения балла по шкале Эшкрофта срезы ткани легких окрашивали в соответствии с трихромным методом по Crossman (Gray, Peter (1954) *The Microtome's Formulary and Guide*. Blakiston, Нью-Йорк, 1954). Всю область легких, подлежащую гистопатологическому анализу, оценивали в десяти полях при малом увеличении и рассчитывали общий балл для каждого животного в виде среднего (Ashcroft et al., *Journal of clinical pathology* 41.4 (1988): 467-470; Matsuse, T., et al. *European Respiratory Journal* 13.1 (1999): 71-77.). На **фигуре 1А** показаны баллы по шкале Эшкрофта для различных исследуемых групп. Введение блеомицина приводило к значительному увеличению балльной оценки легких животных из группы контроля носителя по сравнению с легкими животных из группы здорового контроля при введении солевого раствора, что указывает на выраженный профиброзный ответ. Ежедневная местная доставка мутеина липокалина SEQ ID NO: 24 в легкие мышей значительно снижала оценку по шкале Эшкрофта по сравнению с легкими животных из группы контроля носителя при введении PBS. Оценка по шкале Эшкрофта легких животных, получавших мутеин липокалина, в среднем



снижалась на 14,1% по сравнению со средней оценкой по шкале Эшкрофта легких животных, получавших носитель, при том же пути введения. Следует отметить, что введение нацеленного на CTGF моноклонального антитела (SEQ ID NO: 60 и 61) при системной доставке не оказывало существенного влияния на оценку по шкале Эшкрофта и не ослабляло фиброзное ремоделирование легких.

В качестве второго показателя фиброзного ремоделирования легких исследовали отложение коллагена 1a1 (Colla1) с помощью иммуногистохимического анализа. Демаскирование антигена в срезах ткани легких осуществляли с помощью раствора для демаскирования антигена (PT Link modul, DAKO) с последующим инкубированием срезов ткани с первичным поликлональным антителом кролика к COL1A1 в течение 1 часа (1:2000, LSBio) и обнаружением с помощью набора для обнаружения ImmPRESS (Vector, MP-7401). Было проведено два контрольных опыта; в качестве контроля служило окрашивание без первичного антитела и с изотипическим контролем IgG кролика (Vector). Окрашенные срезы ткани оценивали на предмет отложения Colla1 с помощью цифрового анализа изображений с использованием протокола морфометрии (программное обеспечение CaloPix, TRIBVN). На **фигуре 1B** показаны результаты анализа отложения коллагена в различных группах лечения в процентах Colla1-положительной площади поверхности легких. Введение блеомицина выразительно индуцировало отложение Colla1 в тканях легких по сравнению с легкими при введении солевого раствора. Местная доставка в легкие мутеина липокалина SEQ ID NO: 24 приводила к значительному уменьшению Colla1-положительной площади поверхности легких по сравнению с легкими животных, получавших контрольный носитель PBS, что соответствует снижению на 25,2% по сравнению со средним значением для соответствующих контролей. Системная доставка моноклонального антитела к CTGF (SEQ ID NO: 60 и 61) также значительно снижала уровни Colla1, в несколько меньшей степени, на 20,9% по сравнению со средним значением для животных, получавших контрольный носитель.

В целом, этот эксперимент показал более сильный общий противифиброзный ответ при местном введении нацеленного на CTGF мутеина липокалина, доставляемого непосредственно в легкие, по сравнению с системным нацеливанием белка при применении моноклонального антитела. Таким образом, это исследование подтверждает предложенное авторами настоящего изобретения обоснование разработки нацеленных на CTGF мутеинов липокалина для ингаляционного введения с целью достижения лучшего взаимодействия с мишенью и эффективности по сравнению с ингибиторами, вводимыми системным путем.

**Пример 12: Действие нацеленных на CTGF мутеинов липокалина на образование органоидов легких**

Действие нацеленных на CTGF мутеинов липокалина анализировали с использованием органоидной модели регенерации легких. В этой модели фибробласты легких CCL-206 культивируют совместно со свежевыделенными первичными Epcam-положительными эпителиальными клетками-предшественниками мыши, и через 14 дней оценивают количество образовавшихся органоидов. Предварительная обработка фибробластов CCL-206 TGF- $\beta$ 1 приводит к нарушению образования органоидов, которое имеет сходство с нарушением регенерации легких, например, наблюдающимся при заболевании легких, таком как IPF. Нарушение образования органоидов может быть устранено путем обработки различными лекарственными средствами, такими как нинтеданиб, который используют в качестве положительного контроля в этой модели. В этом примере совместно культивируемые клетки обрабатывали нинтеданибом (100 нМ), контролем каркасной последовательности мутеина липокалина, который не связывается с CTGF (100 нМ), нацеленным на CTGF слитым белком SEQ ID NO: 74 (10 и 100 нМ) и моноклональным антителом к CTGF (SEQ ID NO: 60 и 61) в течение 14 дней. Результаты представлены на **фигуре 2**. Оценка количества органоидов подтвердила нарушение образования органоидов при стимуляции TGF- $\beta$ 1. Этот эффект был частично устранен при обработке нинтеданибом в качестве положительного контроля. Следует отметить, что обработка нацеленным на CTGF слитым белком SEQ ID NO: 74 в концентрации 100 нМ обуславливала еще более выраженную тенденцию к улучшению образования органоидов, тогда как нацеленное на CTGF моноклональное антитело (SEQ ID NO: 60 и 61) не оказывало действия на образование органоидов.

**Пример 13: Связывание с активированными фибробластами легких человека**

Связывание нацеленных на CTGF мутеинов липокалина и слитых белков с экспрессирующими CTGF стимулированными TGF- $\beta$ 1 нормальными фибробластами легких человека (NHLF) исследовали путем инкубирования NHLF в течение 24 часов с конструкциями и 10 нг/мл TGF- $\beta$ 1, который индуцирует экспрессию CTGF. NHLF без стимуляции TGF- $\beta$ 1 были включены в качестве отрицательного контроля. Конструкции обнаруживали с помощью вторичного антитела к каркасу липокалина, конъюгированного с AlexaFluor647, после того, как NHLF были зафиксированы в 4% PFA и блокированы 5% BSA. Изображения были получены с помощью прибора Cytation5 Reader (Biotek). Сигналы количественно оценивали с помощью программного обеспечения Gene5 и нормировали к соответствующим контролям. Для указанных экспериментов клетки

выращивали в условиях, которые способствуют отложению псевдо-3D внеклеточного матрикса, как описано в источнике Good et al. (Good et al., BMC Biomed Eng, 1:14 (2019)).

Иллюстративные данные, показанные на **фигуре 4**, иллюстрируют способность нацеленных на CTGF мутеинов липокалина и слитых белков, описанных в настоящем документе, связываться с экспрессирующими CTGF активированными фибробластами легких человека зависимым от концентрации образом.

#### **Пример 14: Поведение при распылении**

Пригодность нацеленных на CTGF мутеинов липокалина и слитых белков, описанных в настоящем документе, для введения посредством ингаляции исследовали с применением коммерчески доступного небулайзера с вибрирующей сеткой (Philips InnoSpire Go®). Распределение капель по размерам характеризовали методом лазерной дифракции с применением небулайзера в сочетании с анализатором Malvern Spraytec и ингаляционной ячейкой.

Иллюстративные данные для иллюстративного нацеленного на CTGF мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 (**A**) и слитого белка SEQ ID NO: 74 (**B**) показаны на **фигуре 5** и в **таблице 10** ниже. Эти данные показывают, что биофизические свойства нацеленных на CTGF мутеинов липокалина и слитых белков, описанных в настоящем документе, позволяют получать аэрозоли, которые подходят для ингаляционного применения у людей и характеризуются частицами достаточно малого размера для достижения эффективного осаждения в легких. Распыление мутеинов липокалина и слитых белков не оказало негативного влияния на стабильность и активность указанных молекул (данные не представлены).

**Таблица 10:** Распределение капель по размерам при распылении.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Dv10(мкм)</b>	<b>Dv50(мкм)</b>	<b>Dv90(мкм)</b>	<b>%V&lt;10мкм</b>	<b>%V&lt;5мкм</b>	<b>%V&lt;1мкм</b>
<b>23</b>	1,471	3,484	8,622	93,55	68,97	1,874
<b>74</b>	1,824	4,589	10,5	88,4	54,81	0,984

#### **Пример 15: Распределение в ткани легких в фиброзированных легких мышей**

Биораспределение в ткани легких флуоресцентно меченных мутеинов и слитых белков исследовали в фиброзированных легких мышей. На 21 день после введения блеомицина (см. **пример 11**) мышам вводили либо меченный Alexa-647 иллюстративный мутеин липокалина SEQ ID NO: 23, либо меченный Alexa-647 иллюстративный слитый

белок SEQ ID NO: 74 (оба вводили в легкие), либо меченное Alexa-647 нацеленное на CTGF моноклональное антитело (SEQ ID NO: 60 и 61), доставляемое системно посредством внутривенной инфузии. Биораспределение вводимых различным образом соединений в ткани легких анализировали с помощью визуализации левого легкого посредством микроскопии плоскостного освещения через 2, 8 и 24 часа после доставки.

Иллюстративные обзорные 3D-изображения представлены на **фигуре 6А**, а иллюстративные увеличенные 2D-срезы 3D-изображений легких представлены на **фигуре 6В**. На **фигуре 6С** и **фигуре 6D** представлены общая флуоресценция соединений в фиброзных областях и объемная доля фиброзной области, являющаяся мишенью указанных соединений, соответственно. Эти данные явно указывают на то, что нацеленные на CTGF мутеины липокалина, а также (в меньшей, но все же существенной степени) слитые белки, содержащие такие мутеины, обеспечивают эффективное нацеливание на фиброзную ткань в легких мышей, включая дистальные области легких. Столь эффективное нацеливание не могло быть достигнуто при системном введении моноклонального антитела к CTGF.

#### **Пример 16: ФК в легких мышей**

Фармакокинетические (ФК) профили иллюстративного мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 и моноклонального антитела к CTGF SEQ ID NO: 60 и 61 анализировали в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF), ткани легких и плазме мышей. Мутеин липокалина (100 мкг/мышь) вводили в ротолотку мышей и определяли экспозицию в различных компартментах через 2, 4, 8 и 24 ч с помощью ELISA (**фигура 7А**). 100 мкг антитела вводили мышам путем внутривенной инфузии и определяли экспозицию через 1, 8, 24 и 96 ч с помощью ELISA (**фигура 7В**).

Как показано на **фигуре 7А**, ФК-анализ доставленного через ротолотку мутеина липокалина SEQ ID NO: 23 подтвердил значительную экспозицию в легких в течение 24 часов, что обосновывает легочную доставку один раз в день. В то время как достигалась высокая экспозиция мутеина липокалина в легких при поступлении в плазму лишь примерно 1%, экспозиция антитела в легких при системной доставке была значительно ниже в BALF и ткани легких - в легкие поступало лишь примерно 20% (**таблица 11**).

**Таблица 11:** Экспозиция в легких и плазме.

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Экспозиция в легких по сравнению с плазмой (%)</b>	<b>Экспозиция в плазме по сравнению с легкими (%)</b>
<b>23</b>	100*	0,9
<b>60 и 61</b>	20,3	100*

\* Принято за 100% для компартмента введения

Схожие результаты были получены при применении слитого белка, содержащего два белка липокалина, при этом указанный слитый белок демонстрировал увеличенное время удерживания в BALF и легких по сравнению с отдельным белком липокалина (данные не представлены).

Воплощения, описанные в настоящем документе в иллюстративных целях, могут быть должным образом осуществлены на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящем документе. Так, например, термины «содержащий», «включающий», «имеющий в своем составе» и так далее должны быть истолкованы расширительно и без ограничений. Кроме того, термины и выражения, используемые в настоящем документе, использовались в качестве терминов описания, а не ограничения, и использование таких терминов и выражений не подразумевает исключения каких-либо эквивалентов показанных и описанных признаков или их частей, но следует понимать, что в пределах объема заявленного изобретения возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящие воплощения были конкретно раскрыты посредством предпочтительных воплощений и возможных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к их модификациям и вариациям, и подразумевается, что такие модификации и вариации входят в объем настоящего изобретения. Все патенты, патентные заявки, руководства и рецензируемые публикации, описанные в настоящем документе, настоящим полностью включены посредством ссылки. Кроме того, если определение или применение термина в источнике, который включен в настоящий документ посредством ссылки, не соответствует или противоречит определению этого термина, представленному в настоящем документе, применяется определение этого термина, представленное в настоящем документе, а определение этого термина, представленное в источнике, не применяется. Каждый из более узких видов и подгрупповых групп, входящих в объем настоящего изобретения в обобщенном виде, также составляет

часть настоящего изобретения. Это включает общее описание настоящего изобретения с оговоркой или отрицательным ограничением, исключающим любой объект из рода, независимо от того, указан ли конкретно исключенный материал в настоящем документе. Кроме того, когда признаки описываются в контексте групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также описывается в контексте любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша. Дополнительные воплощения станут очевидны из следующей формулы изобретения.

Эквиваленты: Специалистам в данной области техники будут очевидны, или ими могут быть установлены с применением не более чем рутинных экспериментов, многие эквиваленты конкретных воплощений настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка включены в настоящий документ посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Мутеин липокалина, способный связывать CTGF (фактор роста соединительной ткани) с обнаруживаемой аффинностью.

2. Мутеин липокалина по п. 1, способный связывать CTGF с аффинностью, определяемой  $K_D$ , составляющей примерно 500 нМ или менее, примерно 400 нМ или менее, примерно 300 нМ или менее, примерно 200 нМ или менее, примерно 150 нМ или менее, примерно 100 нМ или менее, примерно 50 нМ или менее или примерно 30 нМ или менее.

3. Мутеин липокалина по п. 1 или п. 2, связывающий CTGF со значением  $EC_{50}$ , составляющим примерно 250 нМ или менее, примерно 200 нМ или менее, примерно 150 нМ или менее, примерно 100 нМ или менее или примерно 50 нМ или менее.

4. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-3, обладающий перекрестной реактивностью с CTGF яванского макака.

5. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-4, обладающий перекрестной реактивностью с CTGF мыши.

6. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-5, обладающий перекрестной реактивностью с CTGF крысы.

7. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-6, где указанный мутеин конкурирует с антителом, имеющим последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF.

8. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-6, где указанный мутеин не конкурирует с антителом, имеющим последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61, за связывание CTGF.

9. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-8, не обладающий перекрестной реактивностью с одним или более из представителей семейства белков CCN, выбранных из группы, состоящей из CYR61 (CCN1), NOV (CCN3), WISP-1 (CCN4), WISP-2 (CCN5) и WISP-3 (CCN6).

10. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-9, способный оказывать противофиброзное действие *in vivo*.

11. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-10, где указанный мутеин содержит в одном или более положениях, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 44, 47, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 106, 110, 123, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 134 и 136 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), десять или более из следующих мутантных

аминокислотных остатков: Gln 28 → His; Leu 36 → Arg, Lys, Ile, Val, Met или Trp; Ala 40 → Asn, Tyr, Lys, Phe, Ile или Val; Ile 41 → Arg, делецию Ile 41, Gln, Gly или Lys; Glu 44 → Thr, Ile, Asp, Val или Pro; Asp 47 → Glu, Ser, Arg, Gln или Tyr; Gln 49 → Pro, Ser, Ala, Phe, Leu или Ala; Tyr 52 → Trp, Phe, Gly или Ser; Asn 65 → Asp; Ser 68 → His, Gln или Glu; Leu 70 → His, Arg, Gln или Val; Arg 72 → Met, Leu, Ser, Glu или Asp; Lys 73 → Thr, Gln, Ala, Asn или Asp; Lys 74 → Glu или Arg; Lys 75 → Arg или Ser; Asp 77 → Arg, Lys, His, Ser, Val, Ile или Leu; Trp 79 → Ile, Leu, Thr или Val; Ile 80 → Ser; Arg 81 → Asp, Lys или Glu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Ile, Ala, Thr, Ser, Arg, His или Glu; Gly 95 → Ser; Asn 96 → Ala, Ser, Tyr, Gln, Asp или Pro; Ile 97 → Tyr; Lys 98 → Gly или Ser; Ser 99 → Asn, Val или Arg; Tyr 100 → Gly, Arg, Ala, His, Phe, Pro или Ser; Gly 102 → Thr или Arg; Leu 103 → Met, Gln, Ser, Phe, Glu или Tyr; Thr 104 → Tyr, Glu, Val или Trp; Tyr 106 → Pro, Ser, Thr, Gln, His или Asp; Val 110 → Ile; Phe 123 → Trp, His, Ala, Leu или Val; Lys 125 → Trp, Ser, His или Ala; Ser 127 → Asn, Thr, Ile, Ala, Gln, Arg, Tyr, Trp, Phe, His или Gly; Gln 128 → Gly, Leu или Pro; Asn 129 → Thr, Ala или Ser; Arg 130 → Glu или Leu; Tyr 132 → Trp, Thr, Ser, Phe, Ile, His или Val; Lys 134 → Thr, Ala, Val, Asn, Phe, Trp, His или Gln; и Thr 136 → Ala или Val.

12. Мутеин липокалина по любому из пп. 1-11, где указанный мутеин содержит один из следующих наборов аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1):

- (a) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;
- (b) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;
- (c) Leu 36 → Lys, Ile 41 → делеция Ile 41, Asp 47 → Glu, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Leu, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Leu, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ile, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;
- (d) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 →



Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(e) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Leu 94 → Thr, Asn 96 → Ser, Tyr 100 → Arg, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Ser, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala;

(f) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Gly, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Lys 74 → Glu, Lys 75 → Arg, Asp 77 → His, Trp 79 → Thr, Leu 94 → Ser, Lys 98 → Gly, Ser 99 → Asn, Leu 103 → Ser, Thr 104 → Tyr, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ile и Lys 134 → Ala;

(g) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Trp, Lys 125 → Ser, Ser 127 → Ala, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Thr, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;

(i) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Arg, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys

134 → Val;

(m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(n) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(o) Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val;

(p) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Asp, Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ile, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → His, Tyr 100 → His, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(q) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → His, Lys 125 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Val;

(r) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Phe 123 → Ala, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Gln, Gln 128 → Leu, Tyr 132 → His и Lys 134 → Phe;

(s) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → Ala, Ser 127 → Arg, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Ala, Tyr 132 → Ser и Lys 134 → Asn, Thr 136 → Ala;

(t) Leu 36 → Ile, Glu 44 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

- (u) Leu 36 → Val, Glu 44 → Pro, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ser, Asn 96 → Gln, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;
- (v) Leu 36 → Val, Glu 44 → Thr, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;
- (w) Leu 36 → Met, Ala 40 → Phe, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Phe, Leu 103 → Phe, Tyr 106 → Gln, Ser 127 → Tyr, Tyr 132 → Val и Lys 134 → Trp;
- (x) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Ser 99 → Val, Gly 102 → Thr, Thr 104 → Glu, Tyr 106 → Gln, Ser 127 → Tyr, Tyr 132 → Val и Lys 134 → Trp;
- (y) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Leu, Ser 127 → Tyr, Gln 128 → Gly, Asn 129 → Ser, Arg 130 → Glu и Lys 134 → His;
- (z) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;
- (aa) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Ile, Ile 41 → Lys, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Glu, Tyr 106 → Ser, Ser 127 → Phe, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;
- (bb) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Ile, Ile 41 → Lys, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Glu, Tyr 106 → Ser, Ser 127 → Phe, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;
- (cc) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68

→ Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(dd) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Gly 95 → Ser, Asn 96 → Pro, Lys 98 → Ser, Tyr 100 → Ser, Thr 104 → Val, Tyr 106 → His, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ee) Leu 36 → Trp, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Glu, Ile 97 → Tyr, Ser 99 → Arg, Tyr 100 → Arg, Gly 102 → Arg, Thr 104 → Trp, Tyr 106 → Asp, Ser 127 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(ff) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Phe, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Glu, Tyr 106 → Thr, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(gg) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; или

(hh) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Ser 127 → Gly, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

**13.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-12, где указанный мутеин связывается с эпитопом CTGF, который перекрывается с эпитопом антитела, имеющего последовательности тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 60 и 61.

**14.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-13, где указанный мутеин имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-36.

**15.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-14, где указанный мутеин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-36, или их фрагмент или вариант.

**16.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-15, где указанный мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из органической молекулы, ферментной метки, радиоактивной метки, цветной метки, флуоресцентной метки, хромогенной метки, люминесцентной метки, гаптена, дигоксигенина, биотина, цитостатического агента, токсина, комплексного соединения металла, металла и коллоидного золота.

**17.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-16, где указанный мутеин с N-конца и/или C-конца слит с партнером по слиянию, который представляет собой белок, белковый домен, пептид или мутеин липокалина.

**18.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-17, где указанный мутеин с N-конца и/или C-конца слит с партнером по слиянию, который представляет собой антитело или фрагмент антитела.

**19.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-18, где указанный мутеин конъюгирован с соединением, которое продлевает время полужизни мутеина в сыворотке.

**20.** Мутеин липокалина по п. 19, где соединение, которое продлевает время полужизни в сыворотке, выбрано из группы, состоящей из молекулы полиэтиленгликоля (PEG), гидроксиэтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, домена C<sub>H3</sub> иммуноглобулина, домена C<sub>H4</sub> иммуноглобулина, связывающего альбумин пептида и связывающего альбумин белка.

**21.** Слитый белок, содержащий два мутеина липокалина по любому из пп. 1-20.

**22.** Слитый белок по п. 21, содержащий два мутеина липокалина, которые содержат следующие наборы аминокислотных остатков, мутантных по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), соответственно:

(a) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и  
Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 →

Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(b) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Gln, Asp 47 → Ser, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Ser, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Tyr 106 → Pro, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(c) Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(d) Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110 → Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr; и

Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val;

(e) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Arg, Ala 40 → Asn, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Pro, Tyr 52 → Trp, Ser 68 → His, Leu 70 → His, Arg 72 → Met, Lys 73 → Thr, Asp 77 → Arg, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Asp, Asn 96 → Ala, Tyr 100 → Gly, Leu 103 → Met, Tyr 106 → Pro, Val 110

→ Ile, Lys 125 → Trp, Ser 127 → Asn, Tyr 132 → Trp и Lys 134 → Thr;

(f) Ala 40 → Lys, Glu 44 → Ile, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 74 → Arg, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

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

(g) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(h) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Ser, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Thr и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(i) Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp; и

Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val;

(j) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(k) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val;

(l) Asp 47 → Tyr, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Asn, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Val, Trp 79 → Thr, Ile 80 → Ser, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Thr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;

(m) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp;



(n) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Ala 40 → Tyr, Ile 41 → Arg, Gln 49 → Ser, Tyr 52 → Gly, Ser 68 → Gln, Leu 70 → Gln, Arg 72 → Asp, Lys 73 → Asp, Asp 77 → Leu, Trp 79 → Val, Arg 81 → Glu, Asn 96 → Ala, Tyr 106 → Gln, Phe 123 → Val, Ser 127 → Trp, Gln 128 → Pro, Arg 130 → Leu и Lys 134 → Gln, Thr 136 → Val; или

(o) Asp 47 → Gln, Gln 49 → Ala, Tyr 52 → Phe, Leu 70 → Arg, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Ala, Lys 75 → Ser, Asp 77 → Lys, Trp 79 → Thr, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Tyr, Tyr 100 → Ala, Leu 103 → Gln, Tyr 106 → Thr, Lys 125 → His, Ser 127 → Thr, Tyr 132 → Ile и Lys 134 → Val; и

Leu 36 → Trp, Ala 40 → Val, Ile 41 → Lys, Asp 47 → Gln, Gln 49 → Leu, Tyr 52 → Ser, Ser 68 → Glu, Leu 70 → Val, Arg 72 → Glu, Lys 73 → Gln, Asp 77 → His, Trp 79 → Ile, Arg 81 → Lys, Leu 94 → Ala, Asn 96 → Asp, Tyr 100 → Pro, Leu 103 → Tyr, Tyr 106 → Ser, Tyr 132 → Phe и Lys 134 → Trp.

**23.** Слитый белок по п. 21 или п. 22, содержащий два мутеина липокалина, которые содержат аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей со следующими аминокислотными последовательностями, или которые содержат следующие аминокислотные последовательности, соответственно:

(a) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 31;

(b) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15;

(c) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 15;

(d) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9;

(e) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 4;

- (f) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 30;
- (g) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 31;
- (h) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 28;
- (i) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 15;
- (j) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 31;
- (k) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 28;
- (l) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 31;
- (m) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 31;
- (n) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 28; или
- (o) аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 35.

**24.** Слитый белок по любому из пп. 21-23, где указанный слитый белок имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%, предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62-76.

**25.** Слитый белок по любому из пп. 21-24, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 62-76, или их фрагмент или вариант.

**26.** Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин липокалина по любому из пп. 1-20 или слитый белок по любому из пп. 21-25.

**27.** Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 26.

**28.** Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 26 или вектор по п. 27.

**29.** Способ получения мутеина липокалина по любому из пп. 1-20 или слитого белка по любому из пп. 21-25, где указанный мутеин или слитый белок получают исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный мутеин или слитый белок.

**30.** Способ связывания и/или обнаружения CTGF у субъекта, включающий использование мутеина липокалина по любому из пп. 1-20, или слитого белка по любому из пп. 21-25, или композиции, содержащей такой мутеин или слитый белок.

**31.** Способ обеспечения противофиброзного эффекта у субъекта, включающий использование мутеина липокалина по любому из пп. 1-20, или слитого белка по любому из пп. 21-25, или композиции, содержащей такой мутеин или слитый белок.

**32.** Способ регуляции нисходящих сигнальных путей CTGF, включающий использование мутеина липокалина по любому из пп. 1-20, или слитого белка по любому из пп. 21-25, или композиции, содержащей такой мутеин или слитый белок.

**33.** Способ снижения отложения коллагена в легких, включающий использование мутеина липокалина по любому из пп. 1-20, или слитого белка по любому из пп. 21-25, или композиции, содержащей такой мутеин или слитый белок.

**34.** Фармацевтическая композиция, содержащая мутеин липокалина по любому из пп. 1-20 или слитый белок по любому из пп. 21-25.

**35.** Мутеин липокалина по любому из пп. 1-20, слитый белок по любому из пп. 21-25 или фармацевтическая композиция по п. 34 для применения в терапии.

**36.** Мутеин липокалина, слитый белок или фармацевтическая композиция для применения по п. 35, где указанное применение представляет собой применение в лечении фиброзного заболевания, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

**37.** Мутеин липокалина, слитый белок или фармацевтическая композиция для применения по п. 35 или п. 36, где указанное применение представляет собой применение в лечении заболевания легких, заболевания мышц, заболевания сердца, заболевания печени, заболевания почек или заболевания глаз.

**38.** Мутеин липокалина, слитый белок или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 35-37, где указанное применение представляет собой применение в лечении фиброзного заболевания.

**39.** Мутеин липокалина, слитый белок или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 35-38, где указанное применение представляет собой применение в лечении идиопатического легочного фиброза (IPF).

**40.** Мутеин липокалина, слитый белок или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 35-38, где указанное применение представляет собой применение в лечении COVID-19.

**41.** Применение мутеина липокалина по любому из пп. 1-20 или слитого белка по любому из пп. 21-25 для изготовления лекарственного средства.

**42.** Применение по п. 41, где лекарственное средство предназначено для лечения фиброзного заболевания, рака, заболевания легких и/или COVID-19.

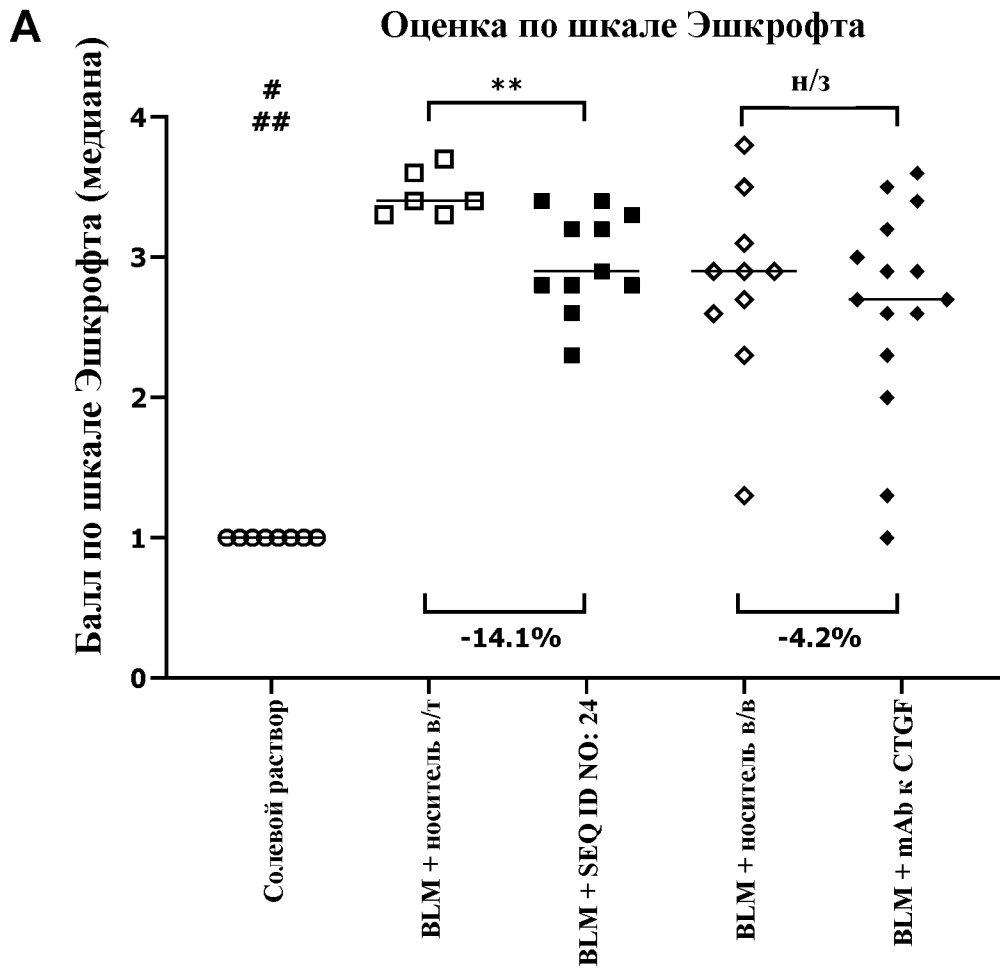
**43.** Применение по п. 41 или п. 42, где лекарственное средство предназначено для лечения IPF.

**44.** Способ лечения заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества мутеина липокалина по любому из пп. 1-20, слитого белка по любому из пп. 21-25 или фармацевтической композиции по п. 34.

**45.** Способ по п. 44, где заболевание представляет собой фиброзное заболевание, рак, заболевание легких и/или COVID-19.

**46.** Способ по п. 44 или п. 45, где заболевание представляет собой IPF.

Фигура 1

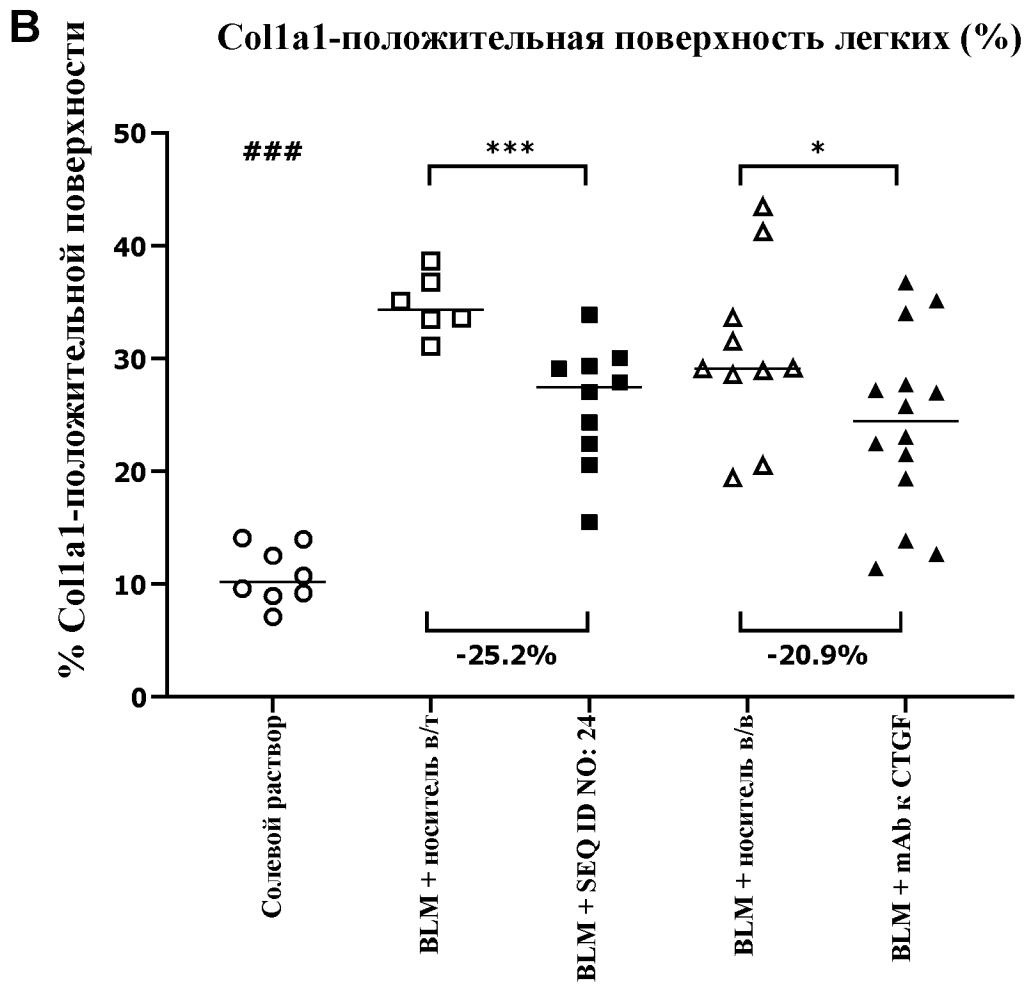


# $p < 0,05$  Солевой раствор по сравнению с BLM + носитель в/т, критерий знаковых рангов Уилкоксона

## $p < 0,01$  Солевой раствор по сравнению с BLM + носитель в/в, критерий знаковых рангов Уилкоксона

\*\* $p < 0,01$  BLM + SEQ ID NO: 24 по сравнению с BLM + носитель в/т, односторонний критерий Манна-Уитни

Фигура 1 (продолжение)



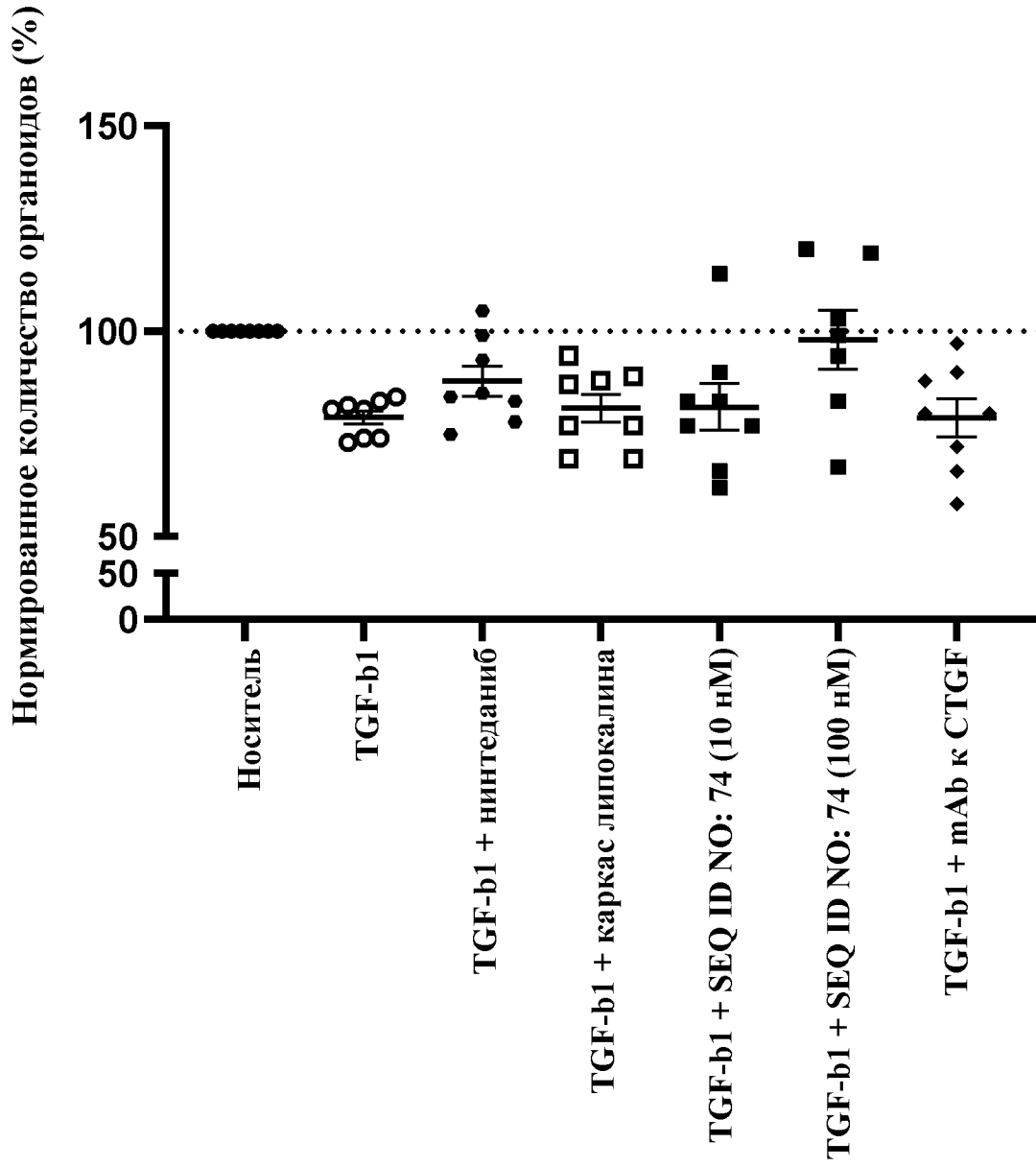
1

### $p < 0,001$  Солевой раствор по сравнению с BLM + носитель в/т или в/в, односторонний критерий Манна-Уитни

\*\*\* $p < 0,01$  BLM + SEQ ID NO: 24 по сравнению с BLM + носитель в/т, односторонний критерий Манна-Уитни

\* $p < 0,001$  BLM + mAb к CTGF по сравнению с BLM + носитель в/в, односторонний критерий Манна-Уитни

Фигура 2



Фигура 3

SEQ ID NO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1 (дикий тип)	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
3	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	R	A	G	N	A
4	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	R	A	G	N	A
5	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	R	A	G	N	A
6	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	R	A	G	N	A
7	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	Y
8	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	Y
9	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	K
10	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
11	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
12	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
13	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
14	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
15	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
16	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
17	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
18	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
19	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
20	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
21	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
22	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
23	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
24	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
25	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
26	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
27	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
28	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
29	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
30	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
31	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
32	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
33	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
34	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
35	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A
36	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A	P	P	L	S	K	V	P	L	Q	Q	N	F	Q	D	N	Q	F	Q	G	K	W	Y	V	V	G	L	A	G	N	A



Фигура 3 (продолжение)

SEQ ID NO:	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
1(дикий тип)	I	L	R	E	D	K	D	P	Q	K	M	Y	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	N	V	T	S	H	V	L	F	R	K	K	C	D	Y	W	I	
3	R	L	R	E	D	K	D	P	P	K	M	W	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	N	V	T	H	V	H	F	M	T	K	K	C	R	Y	I	I	
4	-	L	R	E	D	K	E	P	P	K	M	W	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	H	V	H	F	M	T	K	K	C	R	Y	I	I	
5	Q	L	R	E	D	K	S	P	P	K	M	W	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	H	V	H	F	S	T	K	K	C	R	Y	I	I	
6	G	L	R	T	D	K	R	P	S	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	Q	E	R	C	H	Y	T	I	I
7	G	L	R	T	D	K	R	P	S	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	Q	E	R	C	H	Y	T	I	I
8	I	L	R	I	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	Q	E	R	C	H	Y	T	I	I
9	I	L	R	I	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	Q	E	R	C	H	Y	T	I	I
10	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	R	S	C	S	Y	T	I	I
11	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	R	S	C	S	Y	T	I	I
12	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	R	S	C	S	Y	T	I	I
13	I	L	R	E	D	K	Y	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	N	K	S	C	V	Y	T	I	I
14	I	L	R	E	D	K	Y	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	I	Y	T	I	I
15	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	K	Y	T	I	I
16	I	L	R	T	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	V	Y	T	I	I
17	I	L	R	T	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	V	Y	T	I	I
18	I	L	R	D	D	K	Y	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	I	Y	T	I	I
19	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	S	Y	T	I	I
20	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	S	Y	T	I	I
21	I	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	S	Y	T	I	I
22	I	L	R	V	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	S	Y	T	I	I
23	I	L	R	P	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	V	Y	T	I	I
24	I	L	R	T	D	K	Q	P	A	K	M	F	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	S	V	R	F	E	A	K	S	C	V	Y	T	I	I
25	R	L	R	E	D	K	D	P	S	K	M	G	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	N	V	T	Q	V	Q	F	D	D	K	K	C	L	Y	V	I	I
26	R	L	R	E	D	K	D	P	S	K	M	G	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	Q	V	Q	F	D	D	K	K	C	L	Y	V	I	I
27	R	L	R	E	D	K	D	P	S	K	M	G	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	Q	V	Q	F	D	D	K	K	C	L	Y	V	I	I
28	R	L	R	E	D	K	D	P	S	K	M	G	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	Q	V	Q	F	D	D	K	K	C	L	Y	V	I	I
29	K	L	R	E	D	K	D	P	F	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	N	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
30	K	L	R	E	D	K	D	P	F	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
31	K	L	R	E	D	K	Q	P	Q	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
32	K	L	R	E	D	K	Q	P	F	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
33	K	L	R	E	D	K	Q	P	F	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
34	I	L	R	E	D	K	Q	P	F	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
35	K	L	R	E	D	K	Q	P	L	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I
36	K	L	R	E	D	K	Q	P	A	K	M	S	A	T	I	Y	E	L	K	E	D	K	S	Y	D	V	T	E	V	V	F	E	Q	K	C	H	Y	I	I	I	I

Фигура 3 (продолжение)

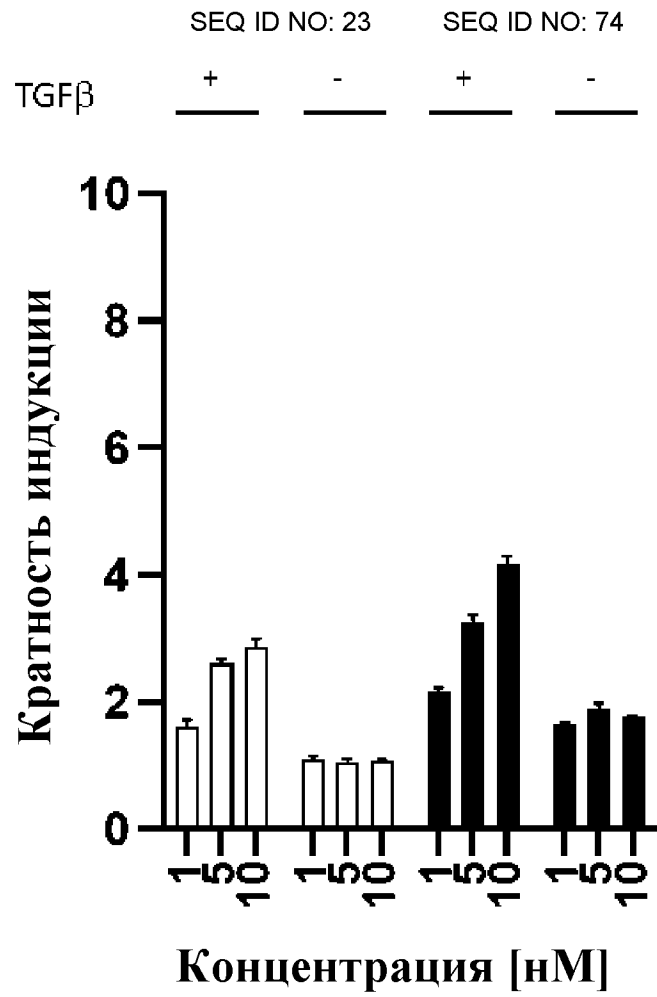
SEQ ID NO:	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	
1(дичий тип)	R	T	F	V	P	G	C	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	Y	P	G	L	T	S	Y	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
3	D	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	G	P	G	M	T	S	P	L	V	R	I	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
4	D	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	G	P	G	M	T	S	P	L	V	R	I	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
5	D	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	G	P	G	L	T	S	P	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
6	D	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	G	P	G	L	T	S	P	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
7	R	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	S	I	K	S	R	P	G	Q	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
8	R	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	G	N	Y	P	G	S	Y	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
9	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
10	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
11	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
12	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
13	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
14	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
15	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
16	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
17	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
18	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
19	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
20	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
21	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
22	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
23	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
24	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	Q	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
25	E	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	A	P	G	F	T	S	Q	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
26	E	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	I	K	S	A	P	G	T	L	E	S	Q	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M
27	E	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	Y	P	G	L	T	S	Q	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
28	E	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	A	I	K	S	Y	P	G	L	T	S	Q	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
29	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
30	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
31	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
32	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	S	P	I	S	S	P	P	G	L	V	S	H	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
33	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	N	Y	K	R	R	P	P	R	L	W	S	D	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M
34	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	T	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
35	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	
36	K	T	F	V	P	G	S	Q	P	G	E	F	T	L	G	D	I	K	S	P	P	G	E	T	S	S	L	V	R	V	V	S	T	N	Y	N	Q	H	A	M	

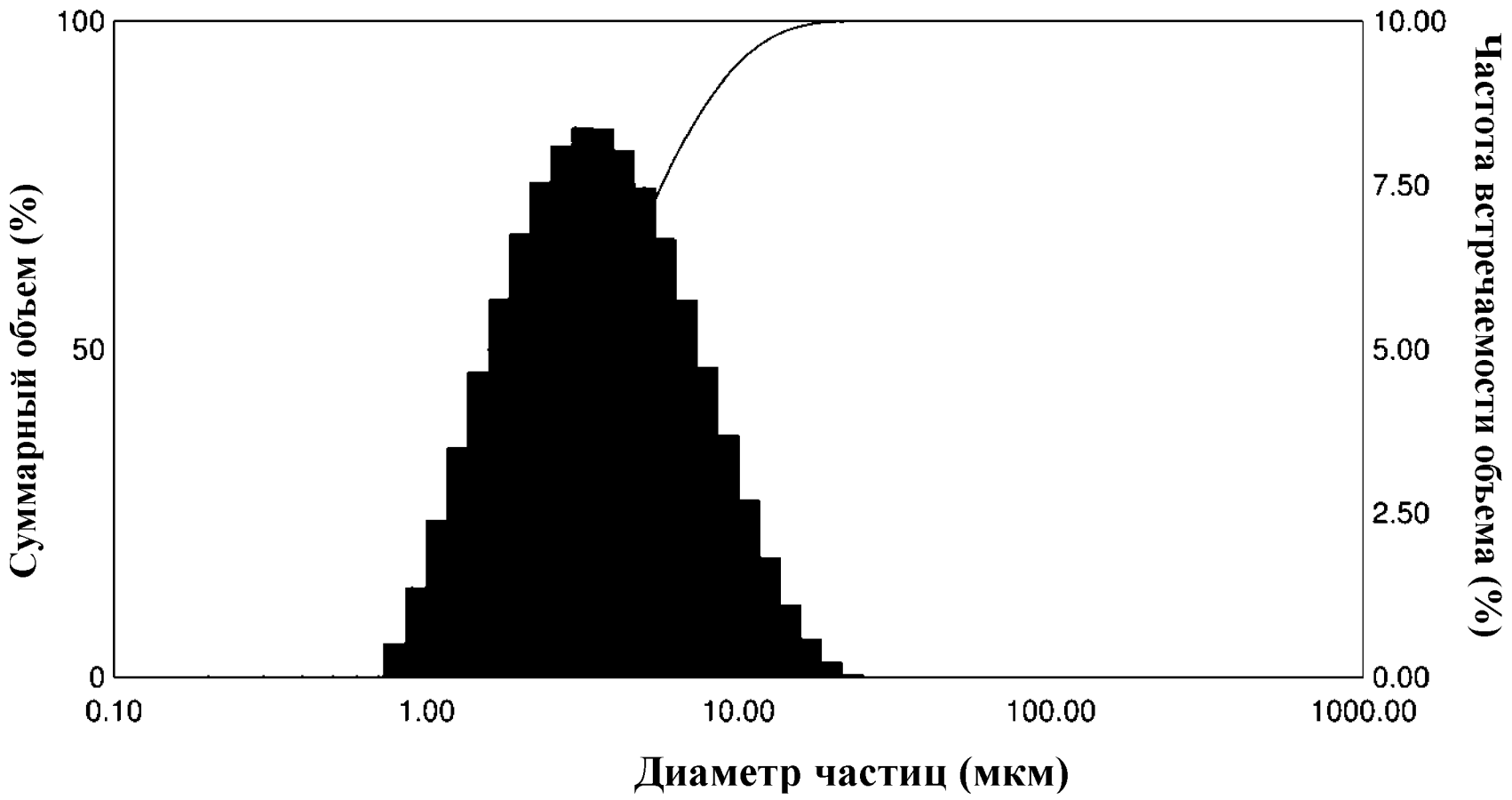


Фигура 3 (продолжение)

SEQ ID NO:	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178
1 (Диккий тип)	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
3	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
4	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
5	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
6	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
7	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
8	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
9	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
10	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
11	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
12	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
13	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
14	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
15	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
16	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
17	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
18	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
19	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
20	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
21	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
22	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
23	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
24	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
25	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
26	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
27	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
28	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
29	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
30	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
31	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
32	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
33	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
34	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
35	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G
36	L	P	E	N	H	I	V	F	P	V	P	I	D	Q	C	I	D	G

Фигура 4

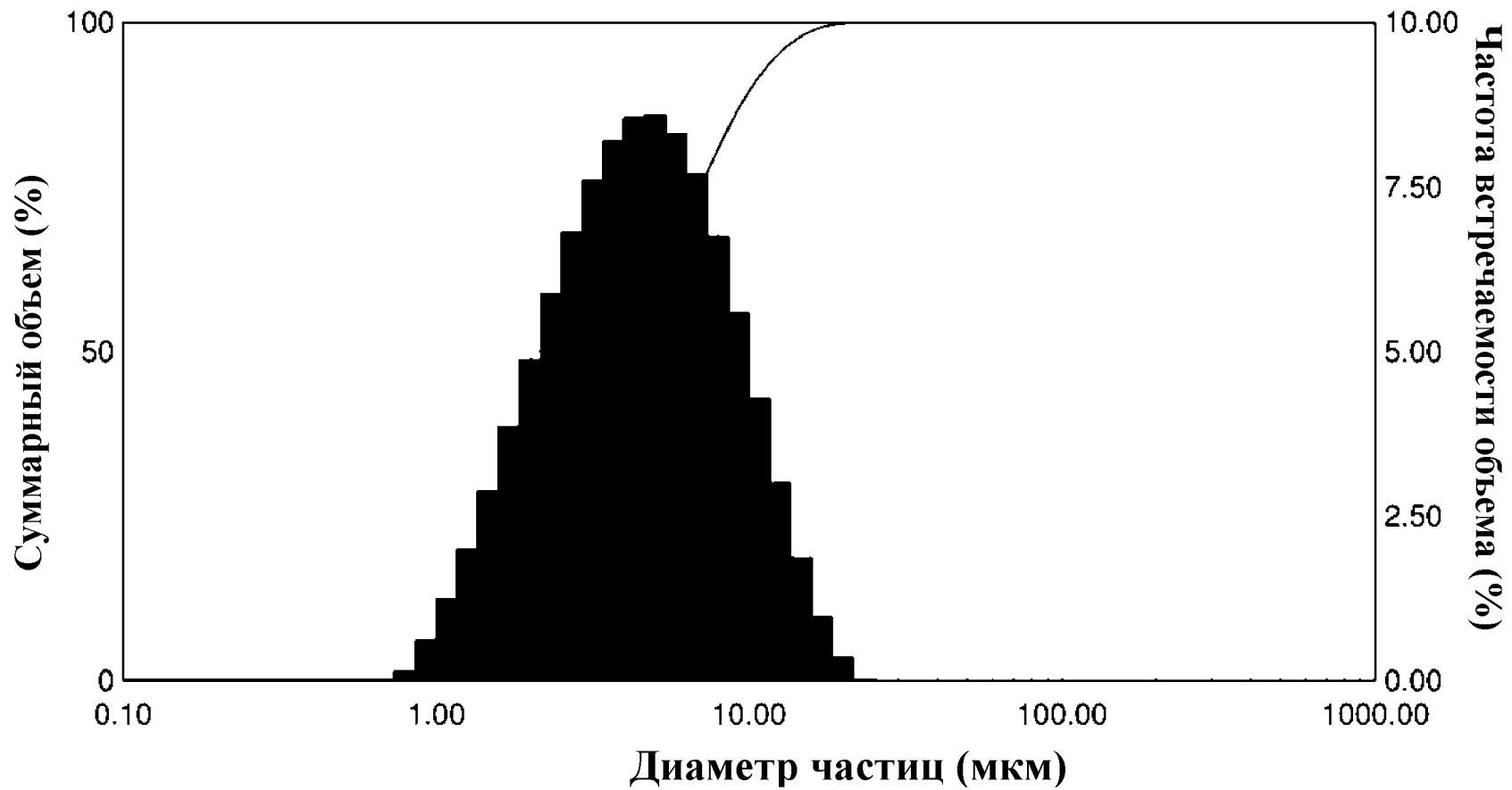




Фигура 5

A

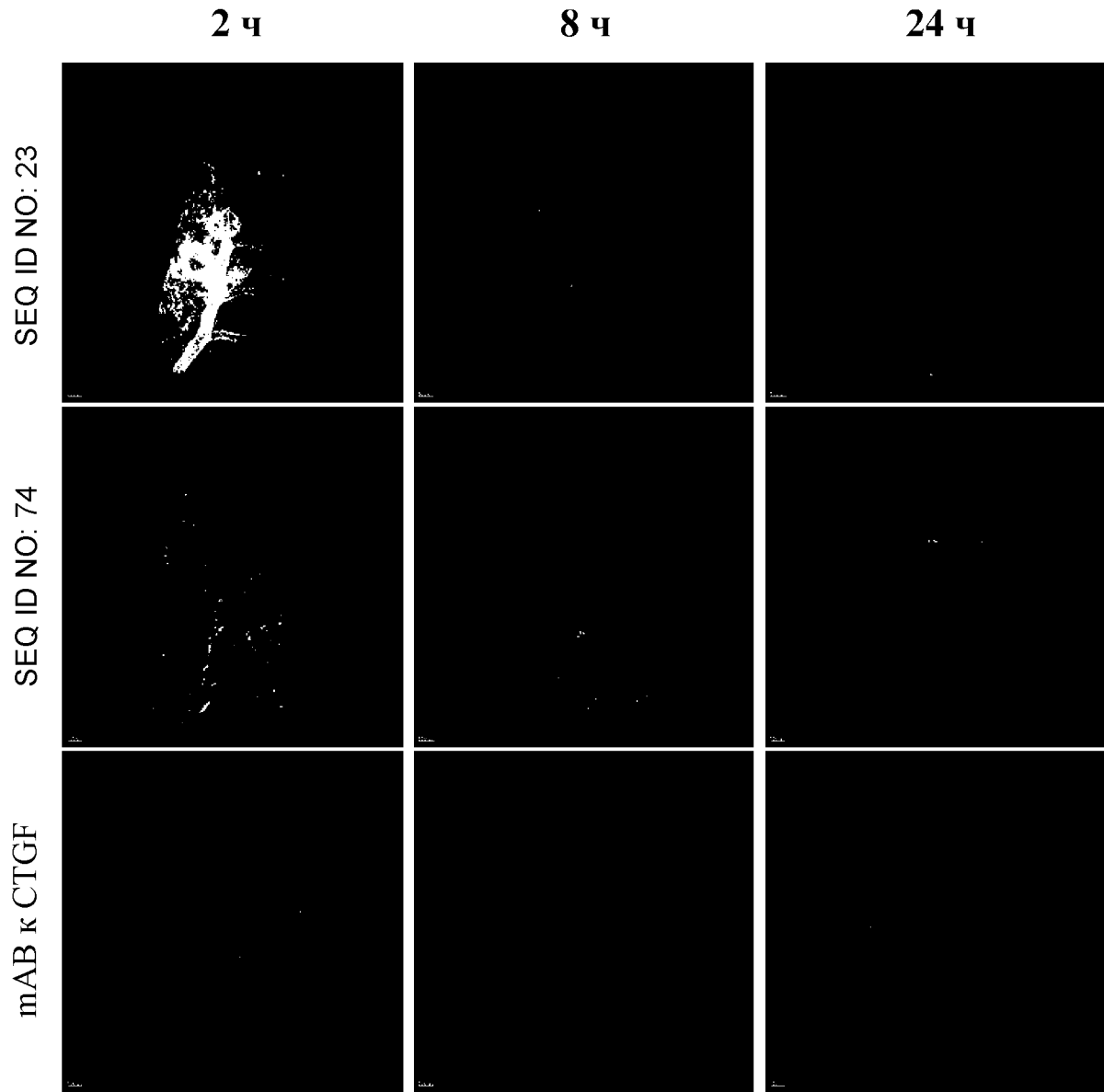
**В**



Фигура 5 (продолжение)

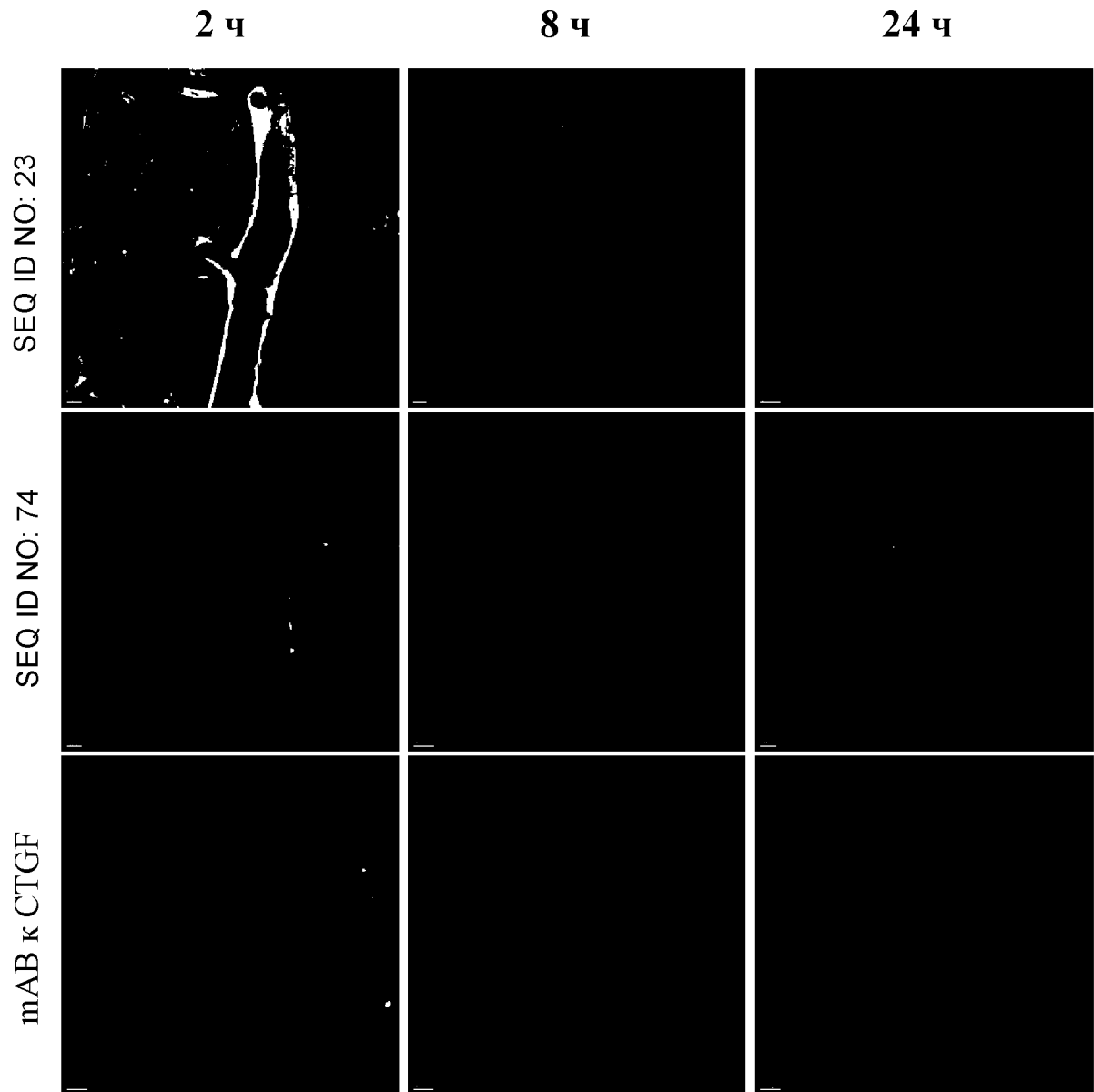
Фигура 6

**A**



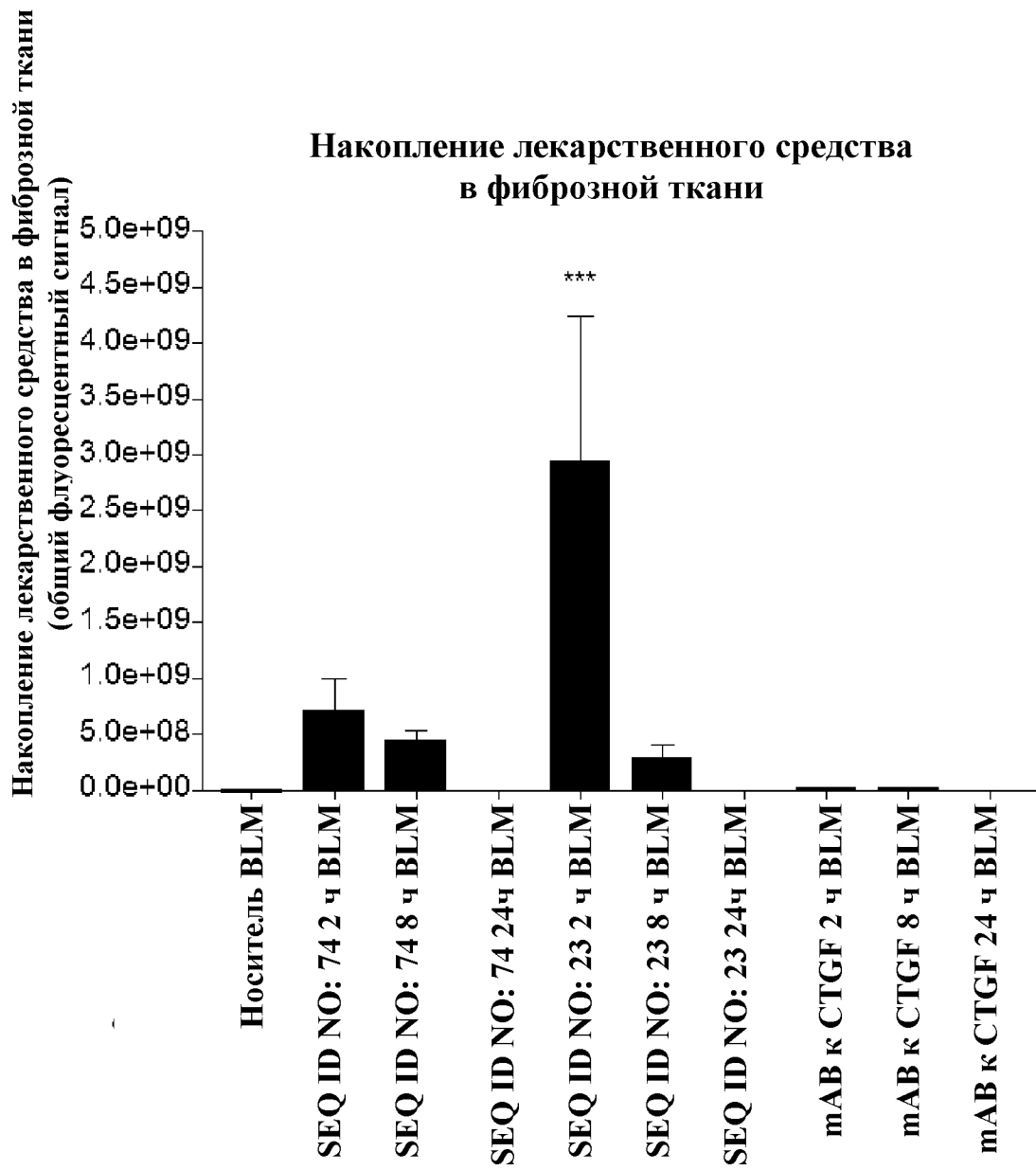


Фигура 6 (продолжение)

**B**

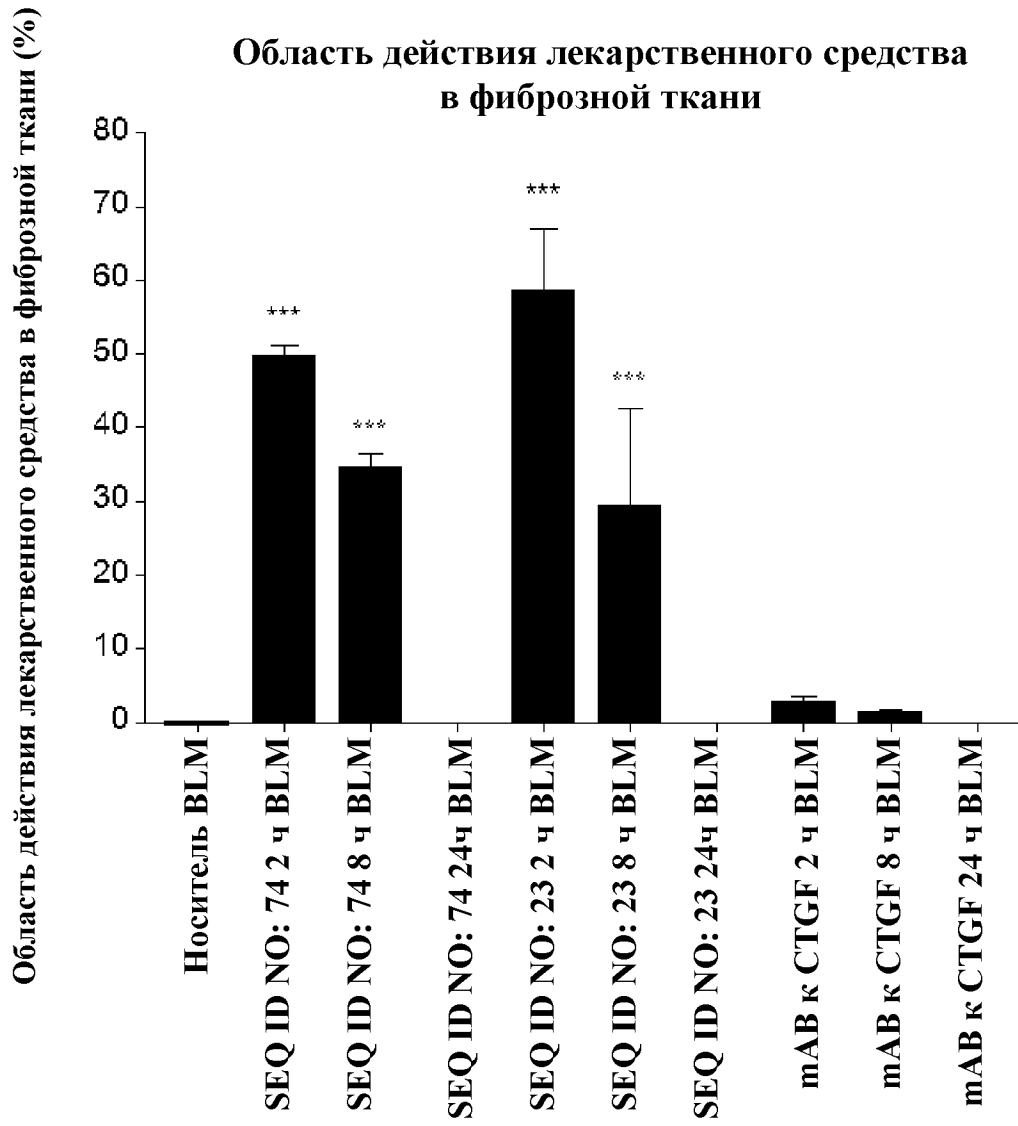
Фигура 6 (продолжение)

С



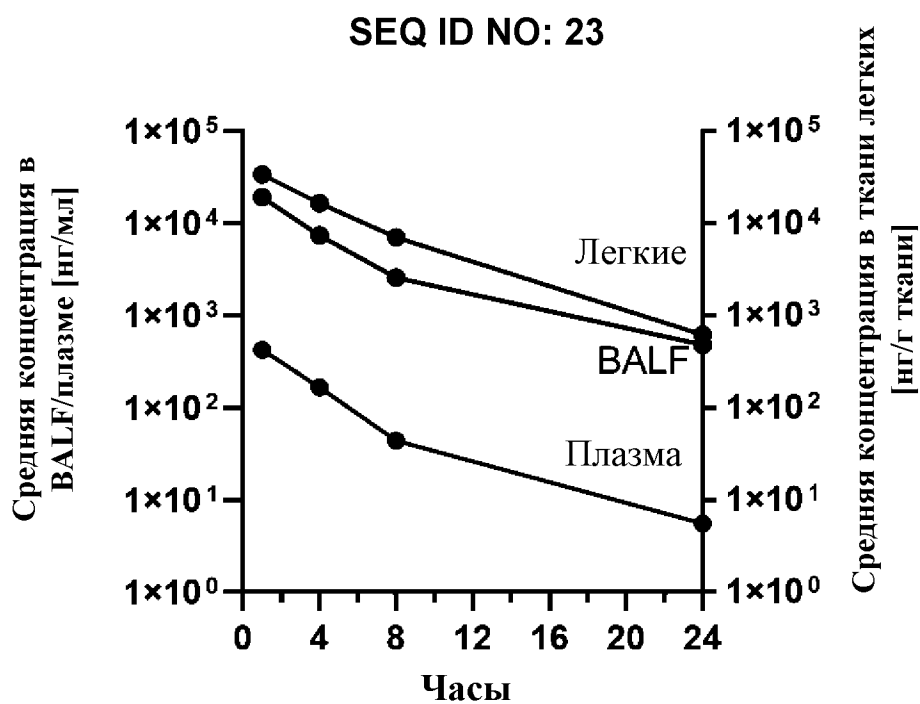
Фигура 6 (продолжение)

D



Фигура 7

А



В

