

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201891141** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.10.31

(22) Дата подачи заявки
2016.11.30

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

(54) НОВЫЕ АНТИАНГИОГЕННЫЕ СЛИТЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

(31) **15197019.1**

(32) **2015.11.30**

(33) **EP**

(86) **PCT/AU2016/051168**

(87) **WO 2017/091850 2017.06.08**

(71) Заявитель:
**ПНЕРИС ОСТРЕЛИА ПТИ ЛТД.
(AU)**

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

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

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



SEQ ID NO: 8 и 11



SEQ ID NO: 9 и 10



SEQ ID NO: 8 и 15



SEQ ID NO: 9 и 14

A1

201891141

201891141

A1

P39387412EA

НОВЫЕ АНТИАНГИОГЕННЫЕ СЛИТЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Хотя в регуляции ангиогенеза задействованы многие системы трансдукции сигнала, одна из наиболее хорошо описанных и наиболее селективных в отношении эндотелиальных клеток систем включает в себя рецепторную тирозинкиназу Tie-2, которая селективно экспрессируется в эндотелии сосудов (называемая «Tie-2» или «Tie-2R» (также называемая «ORK»)), Tie-2 мыши также называется «tek») и ее лиганды, ангиопозитины (Yancopoulos, G. D., et al., Nature

407:242-48 (2000); Gale, N. W. и Yancopoulos, G. D., *Genes Dev.* 13:1055-1066 (1999)).

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

Как Ang-1, так и -2 связываются с Tie-2 с аффинностью, составляющей 3 нМ (K_d) (Maisonpierre, P.C., et al., *Science* 277 (1997) 55-60). В то время как связывание Ang-1 с Tie-2 стимулирует фосфорилирование рецептора в культивируемых эндотелиальных клетках, наблюдалось, что Ang-2 выступает в роли как агониста, так и антагониста фосфорилирования рецептора Tie-2 (Davis, S., et al., (1996), выше; Maisonpierre, P.C., et al., (1997), выше; Kim, I, J.H. Kim, et al., *Oncogene* 19(39): 4549-4552 (2000); Teichert-Kuliszewska, K., P.C. Maisonpierre, et al., *Cardiovascular Research* 49(3): 659-70 (2001)). Фенотипы нокауты Tie-2 и Ang-1 у мышей одинаковы, что дает основание предполагать, что Ang-1-стимулированное фосфорилирование Tie-2 опосредует ремоделирование и стабилизацию развивающихся сосудов внутриутробно посредством поддержания адгезии эндотелиальных клеток и поддерживающих клеток (Dumont, D. J., et al., *Genes & Development*, 8:1897-1909 [1994]; Sato, T. N., et al., *Nature*, 376:10-14 (1995); Suri, C, et al., (1996), выше). Считается, что роль Ang-1 в стабилизации сосудов является консервативной у взрослых людей, у которых он широко и конститутивно экспрессируется (Hanahan, D., *Science*,

277:48-50 (1997); Zagzag, D., et al., *Experimental Neurology*, 59:391-400 (1999)). Наоборот, экспрессия Ang-2 главным образом ограничена сайтами сосудистого ремоделирования, где, как считается, блокирует функцию Ang-1, индуцируя таким образом состояние пластичности сосудов, способствующее ангиогенезу (Hanahan, D., (1997), выше; Holash, J., et al., *Science*, 284:1994-1998 (1999); Maisonpierre, P. C, et al., (1997), выше).

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

Значимым фактором, который также участвует в физиологическом ангиогенезе и различных заболеваниях и расстройствах, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом, например ростом солидных опухолей, является фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A (также известный как VEGF) (Ferrara, *Nature* (2005) 438, 967-974). Действительно, в экспериментах с нейтрализующими антителами и другими ингибиторами было показано, что блокада пути VEGF-A может быть достаточной для значительной супрессии роста опухолей, ассоциированных с

ангиогенезом, во многих моделях (Willett, *Cancer Cell* (2007) 10(2), 145-147; Batchelor, *Cancer Cell* (2007) 11(1), 83-95), и многие терапии, нацеливающие на данный фактор, были успешны в качестве средств сосудистой нормализации у пациентов, страдающих от различных состояний, возникающих в результате патологического ангиогенеза, в том числе неоваскулярной возрастной макулярной дистрофии (nAMD) (Rosenfeld, *N Engl J Med* (2006) 355(14), 1419-1431; Trichonas G, *Ophthalmol Ther* (2013) 2(2), 89-98; Martin, *N Engl J Med* (2011) 364(2), 1897-1908; Solomon, *Cochrane Database Syst Rev* (2013) 8, Art.No.:CD005139).

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

Совсем недавно была дополнительно установлена функциональная связь между Ang-2 и VEGF-A, когда предположили, что Ang-2 может отвечать за компенсаторную реваскуляризацию и рост опухоли во время анти-VEGF-терапии, и при этом было показано, что он вмешивается в анти-VEGFR-2-

индуцированную нормализацию сосудов (Bullock, J Clin Oncol (2010) 28, abstr 4630). Данные также подтверждают комплементарный механизм действия антагонистов Ang-2 и VEGF в контекстном предупреждении ангиогенеза и роста опухолей (Hashizume, Cancer Res (2010) 70, 2213-2223).

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

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

II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В нижеприведенном перечне определены термины, фразы и сокращения,

используемые по всему данному описанию. Подразумевается, что все термины, перечисленные и определенные в данном документе, охватывают все грамматические формы.

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

Как используется в данном документе, «Ang-2», если не указано, что он происходит от видов, отличных от человека (например, «Ang-2 мыши», «Ang-2 обезьяны» и т. д.), означает Ang-2 человека, полноразмерный белок, определенный с помощью Swiss Prot O15123, (также см. фигуру 6 патента США №6166185; включенного в данный документ с помощью ссылки в полном объеме) или его биологически активный фрагмент (например, фрагмент белка Ang-2, который способен индуцировать ангиогенез *in vitro* или *in vivo*).

Термин «Tie-2» (также называемый в уровне техники «tek») если не указано, что он происходит от видов, отличных от человека (например, «Tie-2 мыши», «Tie-2 обезьяны» и т. д.) относится к Tie-2 человека или его биологически активному фрагменту. Tie-2 человека характеризуется аминокислотной последовательностью, изложенной в базе данных белковых последовательностей NCBI под номером доступа AAA61130.

Как используется в данном документе, «VEGF-A» может представлять собой белок человека с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P15692, белок хомяка с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot Q99PS1, бычий белок с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P15691, белок свиньи с аминокислотной последовательностью под номером доступа в базе данных Swiss Prot P49151,

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

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

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

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

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

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

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

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

данном документе.

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

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

Термин «мутагенез», используемый в данном документе, означает, что экспериментальные условия выбраны таким образом, что аминокислота,

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

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

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

Термин «гомология» используется в данном документе в его общепринятом

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

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

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

мутеина, отличного от человеческого липокалина 2 дикого типа, описанного в данном документе, служит в качестве «искомой последовательности». Термины «эталонная последовательность» и «последовательность дикого типа» используются в данном документе взаимозаменяемо.

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

Термин «вариант», используемый в настоящем изобретении, относится к производным белка или пептида, которые предусматривают модификации аминокислотной последовательности, например, путем замены, делеции, вставки или химической модификации. В некоторых вариантах осуществления такие модификации не снижают функциональность белка или пептида. Такие варианты предусматривают белки, в которых одна или более аминокислот были замещены их соответствующими D-стереоизомерами или аминокислотами, отличными от 20 аминокислот, встречающихся в природе, такими как, например, орнитин, гидроксипролин, цитруллин, гомосерин, гидроксизин, норвалин. Однако такие замены также могут быть консервативными, т. е. аминокислотный остаток замещается химически подобным аминокислотным остатком. Примерами консервативных замен являются замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан.

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

Термин «положение» при использовании в соответствии с настоящим изобретением означает либо положение аминокислоты в аминокислотной последовательности, описанной в данном документе, либо положение нуклеотида в последовательности нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Для понимания термина «соответствует» или «соответствующий», используемого в данном документе в отношении положений в аминокислотной

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

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

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

Термины «органическая молекула» или «небольшая органическая молекула», используемые в данном документе в отношении неприродной мишени, означают органическую молекулу, содержащую по меньшей мере два атома углерода, но предпочтительно не более 7 или 12 способных к вращению углеродных связей, с

молекулярной массой в диапазоне от 100 до 2000 дальтон, предпочтительно от 100 до 1000 дальтон, и необязательно включающую один или два атома металла.

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

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

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

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

Термин «метастаз» в соответствии с настоящим изобретением относится к передаче раковых клеток из первичной опухоли в один или более участков в любом месте у пациента, где развиваются вторичные опухоли. Методы определения того, метастазировал ли рак, известны из уровня техники и включают сканирование костей скелета, рентгенографию грудной клетки, сканирование CAT, сканирование MRI и тесты на опухолевые метчики. Термин

«предупреждение метастаза» означает, что метастаз первичной опухоли или рака является предупрежденным, замедленным или сниженным, а следовательно развитие вторичных опухолей предупреждено, замедлено или снижено. Предпочтительно, метастаз, т. е. вторичные опухоли легкого, является предупрежденным или сниженным, что означает то, что метастатическая передача раковых клеток из первичной опухоли в легкое предупреждена или снижена.

Термин «рак», используемый в данном документе, относится к пролиферативным заболеваниям, таким как лимфомы, лимфоцитарные лейкомии, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярно-клеточный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или интраокулярная меланома, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак груди, рак матки, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточная карцинома, карцинома почечной лоханки, мезотелиома, гепатоцеллюлярный рак, рак желчных протоков, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), опухоли оси позвоночника, глиома мозгового ствола, мультиформная глиобластома, астроцитомы, шваномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденома гипофиза и саркома Юинга, в том числе не поддающиеся лечению версии любой из вышеназванных форм рака или комбинация одного или более вышеназванных форм рака.

Термин «сосудистые заболевания» включает рак, воспалительные заболевания, атеросклероз, ишемию, травму, сепсис, COPD, астму, диабет, AMD, ретинопатию, инсульт, ожирение, острое повреждение легких, кровоизлияние,

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

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

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

Термин «антитело», используемый в данном документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем или генетически сконструированный полипептид или гликобелок, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, предусматривающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе например библиотек фаг-антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и химически манипулировать с использованием методик молекулярной биологии, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую

конфигурацию или введения кодонов, получения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR)). Другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела и минитела, также охвачены экспрессией «антигенсвязывающего фрагмента», используемого в данном документе. Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет обычно содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и будет обычно содержать по меньшей мере одну CDR, которая расположена рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, ассоциированный с доменом VL, домены VH и VL могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Как альтернатива, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

III. ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0047] Фигура 1: представлен общий вид строения репрезентативных слитых полипептидов, описанных в данной заявке, которые являются биспецифичными в отношении мишеней VEGF-A и Ang-2. Репрезентативные слитые полипептиды были созданы на основе антитела, специфичного в отношении VEGF-A (SEQ ID NO: 8 и 9), и мутеина липокалина, специфичного в отношении Ang-2 (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3). Мутеины липокалина были слиты с любым из двух С-концов антитела. Полученные в результате слитые

полипептиды имеют SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15.

[0048] Фигура 2: изображены результаты экспериментов ELISA, в которых определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов, используемых для сравнения биспецифичного антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и антитела положительного контроля (SEQ ID NO: 8 и 9) в отношении VEGF-A. Рекомбинантный VEGF-A наносили на микротитровальный планшет, и тестируемые средства титровали, начиная с концентрации 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли с помощью антитела к Fc IgG человека, как описано в **примере 2**. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50, и максимальным сигналом в качестве незадаанных параметров, и наклоном, который фиксировали для единообразия.

[0049] Фигура 3: представлены результаты экспериментов ELISA, в которых определяли аффинность репрезентативных слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), используемых для сравнения биспецифичного антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, в отношении Ang-2 (SEQ ID NO: 2 и 3). Рекомбинантный Ang-2 наносили на микротитровальный планшет, и тестируемые средства титровали, начиная с концентрации 100 нМ. Связанные исследуемые средства выявляли с помощью антитела к Fc IgG человека или антитела к липокалину, как описано в **примере 3**. Данные приводили в соответствие с моделью связывания 1:1 со значением EC50, и максимальным сигналом в качестве незадаанных параметров, и наклоном, который фиксировали для единообразия.

[0050] Фигура 4: проиллюстрированы результаты эксперимента ELISA, в котором определяли способность репрезентативных слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) одновременно связывать обе мишени – VEGF-A и Ang-2. (A) Рекомбинантный VEGF-A наносили на микротитровальный планшет с последующим титрованием слитых полипептидов, начиная с концентрации 100 нМ. Впоследствии

добавляли постоянную концентрацию биотинилированного Ang-2 человека, который выявляли с помощью экстравидина, как описано в **примере 4**. (B) Также применяли альтернативный формат, в котором Ang-2 наносили на микротитровальный планшет с последующим титрованием слитых полипептидов, начиная с концентрации 100 нМ. Впоследствии добавляли постоянную концентрацию биотинилированного VEGF-A человека.

[0051] Фигура 5: продемонстрировано, что слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и используемый для сравнения контроль (SEQ ID NO: 6 и 7), способны блокировать взаимодействие между Ang-2 человека и его рецептором Tie-2 человека, сверхэкспрессированных в клетках HEK. Постоянную концентрацию Ang-2 человека предварительно инкубировали с переменными концентрациями слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) или используемого для сравнения контроля (SEQ ID NO: 6 и 7). Не нейтрализованный Ang-2 определяли посредством антитела к HIS-метке. Данные приводили в соответствие с моделью связывания в одном участке.

[0052] Фигура 6: продемонстрировано, что слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и используемые для сравнения контроля (SEQ ID NO: 6 и 7; SEQ ID NO: 8 и 9) способны блокировать биологическую активность VEGF-A и/или hAng-2 в клеточном анализе пролиферации. В анализе добавляли слитые полипептиды, отрицательный контроль изотипа IgG и два используемых для сравнения антитела к эндотелиальным клеткам лимфатических сосудов человека (LEC), дополненных VEGF-A. В эксперименте показано, что пролиферация LEC блокируется слитыми полипептидами (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) со значениями IC₅₀ в диапазоне 1,2-0,5 нМ. Используемый для сравнения контроль антитела к VEGF-A (SEQ ID NO: 8 и 9) ингибировал пролиферацию со значением IC₅₀, составляющим 1,2 нМ. Мутеины липокалина (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) частично ингибировали

клеточную пролиферацию с IC₅₀, составляющим 1,9-1,7 нМ, при этом используемое для сравнения антитело к Ang-2 (SEQ ID NO: 6 и 7) характеризовались IC₅₀, составляющим 4,2 нМ. Отрицательные контроли изотипа IgG и SEQ ID NO: 1 не оказывали эффекта в отношении клеточной пролиферации. Данные приводили в соответствие с сигмоидальной моделью доза-ответ.

[0053] **Фигура 7:** представлен результат фармакокинетического анализа биспецифических слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) на кроликах. Самки кроликов получали тестируемые продукты в виде интравитреальной инъекции в правый глаз при дозе, составляющей 100 мкг/глаз. Уровни лекарственного средства выявляли с помощью ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней VEGF-A и Ang-2. Данные приводили в соответствие с использованием некомпартментной модели.

IV. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

В некоторых вариантах осуществления одна субъединица может быть связана с другой субъединицей, как фактически показано на **фигуре 1**. Например, один мутеин липокалина может быть связан посредством пептидной связи с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, С-концом легкой цепи иммуноглобулина и/или N-концом легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых конкретных вариантах осуществления субъединица, представляющая собой мутеин липокалина, может, следовательно,

быть слита на своем N-конце и/или своем C-конце с субъединицей, представляющей собой иммуноглобулин. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления две субъединицы могут быть соединены с помощью пептидного линкера. Линкер может иметь любую структуру и размер и будет понятен специалисту в данной области. Предпочтительный линкер представляет собой линкер (G4S)₃, например который показан под SEQ ID NO: 19.

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

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

В некоторых дополнительных определенных вариантах осуществления VEGF-A-специфичная субъединица содержит полноразмерный иммуноглобулин (такой как моноклональное антитело) или его антигенсвязывающий домен, и Ang-2-специфичная субъединица содержит мутеин липокалина. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 12, SEQ ID NO: 8 и 13, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15, SEQ ID NO: 9 и 16, SEQ ID NO: 8 и 17, SEQ ID NO 9 и 24, SEQ ID NO 8 и 25, SEQ ID NO 9 и 26, SEQ ID NO 8 и 27, SEQ ID NO 9 и 28, SEQ ID NO 8 и 29, SEQ ID NO 9 и 30, SEQ ID NO 8 и 31, SEQ ID NO 9 и 32, SEQ ID NO 8 и 33, SEQ ID NO 9 и 34, SEQ ID NO 8 и 35, SEQ ID NO 9 и 36, SEQ ID NO 8 и 37, SEQ ID NO 9 и 38, SEQ ID NO 8 и 39, SEQ ID NO 9 и 40, SEQ ID NO 8 и 41, SEQ ID NO 9 и 42, SEQ ID NO 8 и 43, SEQ ID NO 9 и 44, SEQ ID NO 8 и 45, SEQ ID NO 9 и 46, SEQ ID NO 8 и 47, SEQ ID NO 9 и 48, SEQ ID NO 8 и 49, SEQ ID NO 9 и 50, SEQ ID NO 8 и 51, SEQ ID NO 9 и 52, SEQ ID NO 8 и 53, SEQ ID

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

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

[0060] В некоторых вариантах осуществления вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, который содержит последовательности нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72-85.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше, как например, приблизительно 0,5 нМ, приблизительно 0,25 нМ или приблизительно 0,1 нМ, например, при оценке указанной аффинности в отношении Ang-2 в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3. Слитый полипептид согласно настоящему изобретению может быть способен связывать Ang-2 со значением EC50, сопоставимым со значением EC50 для мутеина липокалина, специфичного в отношении Ang-2, который включен в такой слитый полипептид, такого как

мутеины липокалина под SEQ ID NO: 2 и 3, например, при оценке указанного мутеина липокалина и слитого полипептида в анализе ELISA, фактически описанном в примере 3.

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

[0066] В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть способны блокировать связывание Ang-2 человека с клетками, экспрессирующими Tie-2 человека, в формате анализа конкурентной клеточной электрохемилюминесценции (ECL), фактически описанном в примере 5.

[0067] В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид согласно настоящему изобретению способен блокировать VEGF-A-зависимую клеточную пролиферацию, в частности, нейтрализовать биологическую активность VEGF-A в краткосрочном анализе пролиферации с использованием эндотелиальных клеток лимфатических капилляров (LEC) , фактически описанном в примере 6.

A. Иллюстративные иммуноглобулины, которые включены в слитые полипептиды

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

включают, например, бевацизумаб (торговое название Avastin) и ранибизумаб (торговое название Люцентис).

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

[0069] Как используется в данном документе, «липокалин» определяют как мономерный белок массой примерно 18-20 кДа, имеющий цилиндрический β -складчатый лист с супервторичной структурной областью, содержащей несколько (предпочтительно восемь) β -нитей, соединенных попарно с помощью нескольких (предпочтительно четырех) петель на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Именно разнообразие петель в остальной части жесткого остова липокалина приводит к появлению разнообразия различных видов связывания среди представителей семейства липокалинов, при этом каждый способен приспосабливаться к мишеням различного размера, формы и с различными химическими особенностями (рассмотрены, например, в Flower, D.R. (1996), выше; Flower, D.R. et al. (2000), выше, или Skerra, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337-350). В действительности липокалиновое семейство белков возникло природным путем для связывания широкого спектра лигандов, причем они характеризуются необычайно низкими уровнями общей консервативности последовательности (зачастую идентичности последовательностей составляют менее 20%), сохраняя при этом высококонсервативный общий паттерн укладки. Соответствие между положениями в разных липокалинах хорошо известно специалисту в данной области техники. См., например, патент США № 7250297.

[0070] Как отмечалось выше, липокалин представляет собой полипептид, определяемый его супервторичной структурой, а именно, цилиндрическим β -складчатым листом с супервторичной структурной областью, содержащий восемь β -нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания. Настоящее изобретение не ограничено мутеинами липокалина, конкретно раскрытыми в данном документе. В данном отношении настоящее изобретение относится к мутеину липокалина

имеющий цилиндрический β -складчатый лист с супервторичной структурной областью, содержащей восемь β -нитей, соединенных попарно четырьмя петлями на одном конце с образованием таким образом кармана связывания, где по меньшей мере одна аминокислота каждой из по меньшей мере трех из указанных четырех петель была подвергнута мутации, и где указанный липокалин является эффективным в связывании Ang-2 с выявляемой аффинностью.

[0071] В другом конкретном варианте осуществления мутеин липокалина, раскрытый в данном документе, представляет собой мутеин липокалина 2 человека. Термины «липокалин 2 человека», или «Lcn 2 человека», или «NGAL человека», используемые в данном документе, относятся к зрелому липокалину человека, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов (NGAL), под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188. Мутеин липокалина 2 человека согласно настоящему изобретению также может называться в данном документе как «мутеин hNGAL». Аминокислотную последовательность, показанную под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, можно использовать в качестве предпочтительной «эталонной последовательности», более предпочтительно, в качестве эталонной последовательности используют аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1.

[0072] В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может включать по меньшей мере одну аминокислотную замену нативного остатка цистеина другой аминокислотой, например остатком серина. В некоторых других вариантах осуществления мутеин липокалина, связывающий Ang-2 с выявляемой аффинностью, может включать один или более ненативных остатков цистеина, замещающих одну или более аминокислот липокалина дикого типа. В дополнительном конкретном варианте осуществления мутеин липокалина в соответствии с настоящим изобретением включает по меньшей мере две аминокислотные замены нативной аминокислоты остатком цистеина с

образованием таким образом одного или более цистеиновых мостиков. В некоторых вариантах осуществления указанный цистеиновый мостик может соединять по меньшей мере две петлевых области. Определение этих областей используется в данном документе в соответствии с Flower (Flower, 1996, выше, Flower, et al., 2000, выше) и Breustedt et al. (2005, выше).

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

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

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

Слитый полипептид согласно настоящему изобретению может включать в себя аминокислотную последовательность дикого типа (природную) «исходного» остова белка (такого как липокалин) вне подвергнутых мутации положений аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления мутеин липокалина, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также может нести одну или более аминокислотных мутаций в положении/положениях последовательности, если только такая мутация, по меньшей мере в значительной степени, не препятствует связывающей активности и укладыванию мутеина или не нарушает их. Такие мутации могут быть выполнены очень легко на уровне ДНК с использованием разработанных стандартных способов (Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т. е. аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности что касается полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также возможно введение неконсервативных изменений в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения отдельных аминокислотных остатков существует также возможность либо вставлять, либо подвергать делеции одну или более

последовательных аминокислот первичной структуры hNGAL, если только эти делеции или вставка приводят в результате к стабильно уложенному/функциональному мутеину (например, мутеинам hNGAL с усеченными N- и С-концами). В таком мутеине, к примеру, один или более аминокислотных остатков добавлены или подвергнуты делеции на N- или С-конце полипептида. В целом такой мутеин может характеризоваться приблизительно по меньшей мере 70%, в том числе по меньшей мере приблизительно 80%, как например по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью зрелого hNGAL. В качестве иллюстративного примера настоящее изобретение также охватывает мутеины NGAL, определенные выше, в которых были подвергнуты делеции аминокислотные остатки (Lys-Asp-Pro, положения 46-48) линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина 2 человека (hNGAL) (SEQ ID NO: 1).

[0077] Аминокислотная последовательность раскрытого в данном документе мутеина липокалина, содержащегося в слитом полипептиде, характеризуется высокой идентичностью последовательности с эталонным липокалином по сравнению с идентичностями последовательностей с другими липокалинами. В данном общем смысле аминокислотная последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению по меньшей мере в значительной степени подобна аминокислотной последовательности эталонного липокалина, при условии, что при выравнивании в ней возможны гэпы (как определено ниже), которые являются результатом добавлений или делеций аминокислот. Соответствующая последовательность мутеина липокалина согласно настоящему изобретению, которая в значительной степени подобна последовательностям эталонного липокалина, в некоторых вариантах осуществления характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 75% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 80% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 82% идентичностью или гомологией последовательности, по меньшей мере 85% идентичностью или

гомологией последовательности, по меньшей мере 87% идентичностью или гомологией последовательности или по меньшей мере 90% идентичностью или гомологией последовательности, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью или гомологией последовательности с последовательностью эталонного липокалина, при условии, что сохраняются измененное положение или последовательность и что возможны один или более гэпов.

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

В одном варианте осуществления мутеины липокалина согласно настоящему изобретению слиты на своем N-конце и/или своем С-конце с партнером по слиянию, который представляет собой белковый домен, удлиняющий время полужизни мутеина в сыворотке крови. В дополнительных конкретных вариантах осуществления белковый домен представляет собой Fc-часть иммуноглобулина, домен СН3 иммуноглобулина, домен СН4 иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок.

В другом варианте осуществления мутеины липокалина согласно настоящему изобретению конъюгированы с соединением, которое удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови. Более предпочтительно, мутеин конъюгирован с соединением, выбранным из группы, состоящей из молекулы полиалкиленгликоля, гидроксизтилкрахмала, Fc-части иммуноглобулина, СН3-домена иммуноглобулина, СН4-домена иммуноглобулина, альбуминсвязывающего пептида и альбуминсвязывающего белка.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к

молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый полипептид, содержащий раскрытый в данном документе мутеин липокалина. Настоящее изобретение охватывает клетку-хозяина, содержащую указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

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

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

[0083] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает слитый полипептид, содержащий Ang-2-связывающие мутеины липокалина 2 человека (Lcn2 человека или hNGAL).

[0084] Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к слитому полипептиду, содержащему мутеин, который способен связывать Ang-2 с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, измеренная с помощью значения K_d , составляющего приблизительно 200 нМ или меньше, как например приблизительно 150 нМ или меньше.

[0085] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает слитый полипептид, содержащий мутеин hNGAL, который способен связывать Ang-2 с K_d , составляющей приблизительно 5 нМ или меньше, например при измерении с помощью инструмента Biacore T200 при поверхностном плазмонном резонансе

(SPR).

[0086] В некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной с помощью значения EC₅₀, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в анализе ELISA.

[0087] В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 с аффинностью, измеренной с помощью значения IC₅₀, составляющего приблизительно 5 нМ или меньше, при оценке в формате анализа конкурентного ELISA.

[0088] В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны к ингибированию или уменьшению пролиферации эндотелиальных клеток лимфатических капилляров, опосредованному Ang-2 со значением IC₅₀, составляющим приблизительно 5 нМ или меньше в клеточном анализе пролиферации.

[0089] В некоторых других вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, проявляют перекрестную реактивность как с Ang-2 человека, так и Ang-2 мыши. В некоторых вариантах осуществления один или более таких мутеинов способны связывать как Ang-2 человека, так и Ang-2 мыши с выявляемой аффинностью, такой как аффинность, измеренная с помощью значения K_d, составляющего приблизительно 200 нМ или меньше, как например приблизительно 150 нМ или меньше.

[0090] В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более таких мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны связывать Ang-2 мыши с аффинностью, измеренной с помощью значения IC₅₀, составляющего приблизительно 5 нМ

или меньше, при оценке в анализе ELISA.

[0091] В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления один или более таких мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, способны блокировать связывание Ang-2 человека с hTie-2 и Ang-2 мыши с hTie-2 со значением IC₅₀, составляющим приблизительно 25 нМ или меньше, соответственно, в формате конкурентного клеточного ECL.

[0092] В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к Ang-4 человека. В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к Ang-3 мыши. В некоторых вариантах осуществления один или более мутеинов hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, не проявляют перекрестную реактивность к VEGF-A человека.

[0093] В связи с этим настоящее изобретение относится к слитому полипептиду, где указанный слитый полипептид содержит мутеин hNGAL, и указанный hNGAL по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или даже больше подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, и при этом указанный полипептид связывает Ang-2 с выявляемой аффинностью.

[0094] В некоторых вариантах осуществления Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, содержит в одном или более положениях последовательности 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134

линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1), один или более из следующих аминокислотных остатков, подвергнутых мутации: Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu или Phe; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val и Lys 134 → Ala, Glu или Trp. В некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL согласно настоящему изобретению содержит два или более, как например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или даже больше, или все подвергнутые мутации аминокислотные остатки в этих положениях последовательности зрелого hNGAL.

[0095] В дополнение, Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может также включать следующую замену, по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln 28 → His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

[0096] В некоторых дополнительных вариантах осуществления мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, который связывается с Ang-2, включает следующие аминокислотные замены по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

- (i) Leu 36 → His; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (j) Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Val; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (k) Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (l) Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Asn 116 → Asp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;
- (m) Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Tyr; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Lys 74 → Glu; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Val 126 → Met; Ser 127 → Met; Asn 129 → Asp; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala или
- (n) Leu 36 → Met; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Asp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Thr; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Gly; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → Pro; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala.

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

[0097] В остальной области, т. е. области, отличающейся от положений последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77-77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134, мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может содержать аминокислотную последовательность дикого типа (природную) вне подвергнутых мутации положений аминокислотной последовательности.

[0098] В дополнительных конкретных вариантах осуществления мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, или ее функциональный фрагмент или вариант. В некоторых вариантах осуществления такой фрагмент или вариант представляет собой структурный гомолог мутеина, определенного под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97.

[0099] Аминокислотная последовательность Ang-2-связывающего мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может характеризоваться высокой идентичностью последовательности, как например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90% идентичностью, в том числе по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97.

[00100] В еще некоторых вариантах осуществления мутеин hNGAL, проявляющий перекрестную реактивность к Ang-2 человека и/или Ang-2 мыши, в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, и ее функциональные фрагменты или варианты.

[00101] Настоящее изобретение также включает структурные гомологи

мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, структурные гомологи которой характеризуются гомологией аминокислотной последовательности или идентичностью последовательности, составляющей более чем приблизительно 60%, предпочтительно более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90%, более чем 92% и наиболее предпочтительно более чем 95% относительно указанного мутеина hNGAL.

[00102] Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно получать путем мутагенеза встречающейся в природе формы липокалина 2 человека (или hNGAL). В некоторых вариантах осуществления мутагенеза замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из приведенных ниже иллюстративных замен, предусматриваются в том случае, если только мутеин сохраняет свою способность связываться с Ang-2, и/или он характеризуется идентичностью последовательности, впоследствии содержащей замену, в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, как например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более высокая идентичность с аминокислотной последовательностью зрелого липокалина 2 человека (номер доступа в базе данных SWISS-PROT P80188).

[00103] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один слитый полипептид согласно настоящему изобретению, содержащий Ang-2-связывающий мутеин hNGAL, или его конъюгат, или слитый белок, описанные в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый наполнитель.

[00104] Соответственно, Ang-2-связывающие мутеины hNGAL, содержащиеся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно

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

С. Мутеины, содержащиеся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению

[00105] При использовании в данном документе в контексте слитого полипептида согласно настоящему изобретению, термин «специфичный в отношении» со ссылкой на мутеин, который связывается с Ang-2, включает то, что мутеин, который направлен против, связывается или вступает в реакцию с Ang-2. Таким образом, состояние «направленный на», «связывающийся» или «вступающий в реакцию» включает то, что мутеин специфически связывается с Ang-2. Термин «специфически» в данном контексте означает, что мутеин захватывает Ang-2, который описан в данном документе, но фактически не захватывает другую мишень. Связывает или захватывает ли мутеин специфически мишень, как определено в данном документе выше, можно легко протестировать, в частности, путем сравнения реакции мутеина hNGAL, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с Ang-2, и реакции указанного мутеина с другой мишенью(-ями). «Специфичное связывание» также можно определять, например, в соответствии с результатами вестерн-блоттингов, тестов ELISA, RIA, ECL, IRMA, с использованием FACS, ИНС и пептидных сканирований.

[00106] Аминокислотная последовательность мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, характеризуется высокой идентичностью с последовательностью липокалина 2 человека по сравнению с идентичностями последовательностей с другим липокалином (см. также выше). В данном общем контексте аминокислотная последовательность мутеина из комбинации в соответствии с настоящим изобретением по меньшей

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

[00107] Мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включает одну или более, как например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или даже двадцать замен по сравнению с соответствующим нативным липокалином hNGAL, при условии, что такой мутеин должен быть способным к связыванию с Ang-2. Например, мутеин может иметь замену в положении, соответствующем отдельному положению (т. е. в соответствующем положении) hNGAL. В некоторых вариантах осуществления мутеин из комбинации в соответствии с настоящим изобретением включает по меньшей

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

[00108] Также мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может содержать гетерологичную аминокислотную последовательность на своем N- или C-конце, предпочтительно C-конце, такую как Strep-метка, например Strep-метка II, без воздействия на биологическую активность (связывание со своей мишенью, например Ang-2) мутеина.

[00109] В частности, для того чтобы определить, соответствует ли аминокислотный остаток аминокислотной последовательности мутеина, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, отличного от hNGAL дикого типа, определенному положению в аминокислотной последовательности липокалина дикого типа, специалист в данной области может применять средства и способы, хорошо известные из уровня техники, например, выравнивания либо вручную, либо с использованием компьютерных программ, таких как BLAST2.0, которая означает средство поиска основного локального выравнивания, или ClustalW, или любой другой подходящей программы, которая подходит для получения выравниваний последовательностей. Соответственно, hNGAL дикого типа может служить в качестве «последовательности для сравнения» или «эталонной последовательности», тогда как аминокислотная последовательность мутеина, отличного от hNGAL дикого типа, описанного в данном документе, служит в качестве «искомой последовательности». Термины «эталонная последовательность» и «последовательность дикого типа» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[00110] В некоторых вариантах осуществления замена (или замещение) представляет собой консервативную замену. Тем не менее, любая замена, в том числе неконсервативная замена или одна или более из перечисленных ниже

иллюстративных замен, рассматривается как возможная лишь в том случае, если мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, сохраняет свою способность связываться с Ang-2, и/или он характеризуется идентичностью с впоследствии замещенной последовательностью в том смысле, что имеет место по меньшей мере 60%, как например, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или более высокая идентичность с «исходной» последовательностью.

[00111] Как правило, консервативные замены представляют собой следующие замены, перечисленные с учетом аминокислоты, подвергаемой мутации, при этом за каждой следует одно или более замещений, которые могут рассматриваться как консервативные: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. Другие замены также допустимы, и они могут быть определены эмпирически или в соответствии с другими известными консервативными или неконсервативными заменами. В качестве дополнительной ориентировки, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые, как правило, могут рассматриваться как ограничивающие консервативные замены друг для друга:

- a. аланин (Ala), глицин (Gly);
- b. аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);
- c. аспарагин (Asn), глутамин (Gln);
- d. аргинин (Arg), лизин (Lys);
- e. изолейцин (Ile), лейцин (Leu), метионин (Met), валин (Val);
- f. фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp);

- g. серин (Ser), треонин (Thr) и
- h. цистеин (Cys), метионин (Met).

[00112] Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда могут быть введены более существенные изменения, такие как следующие, или которые дополнительно описаны ниже в отношении классов аминокислот, и при этом продукты подвергают скринингу в отношении требуемой характеристики. Примерами таких более существенных изменений являются: Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucine; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

[00113] Существенные модификации биологических свойств hNGAL осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по их влиянию на сохранение (a) структуры полипептидного каркаса в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) большей части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы, исходя из общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, метионин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; (2) нейтральные гидрофильные: цистеин, серин, треонин; (3) кислые: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; (4) основные: аспарагин, глутамин, гистидин, лизин, аргинин; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепей: глицин, пролин; и (6) ароматические: триптофан, тирозин, фенилаланин.

[00114] Неконсервативные замены будут включать в себя обмен представителя одного из этих классов на другой класс. Любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержание правильной конформации hNGAL, также может быть заменен, как правило, серином, для улучшения стойкости молекулы к окислению и предупреждения неправильного образования поперечных связей. В свою очередь, цистеиновая связь(-и) может быть добавлена(-ы) для улучшения ее стабильности.

[00115] Любая мутация, в том числе вставка, которая обсуждалась выше, может быть легко выполнена на уровне нуклеиновой кислоты, например ДНК, с использованием известных стандартных способов. Иллюстративными примерами изменений аминокислотной последовательности являются вставки или делеции, а также аминокислотные замены. Такие замены могут быть консервативными, т. е. аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с химически подобными свойствами, в частности что касается полярности, а также размера. Примерами консервативных замен являются замещения из числа представителей следующих групп: 1) аланин, серин и треонин; 2) аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; 3) аспарагин и глутамин; 4) аргинин и лизин; 5) изолейцин, лейцин, метионин и валин; и 6) фенилаланин, тирозин и триптофан. С другой стороны, также возможно введение неконсервативных изменений в аминокислотную последовательность. Кроме того, вместо замещения отдельных аминокислотных остатков также возможна либо вставка, либо делеция одной или более последовательных аминокислот первичной структуры hNGAL, при условии, что эти делеции или вставка приводят к стабильно уложенному/функциональному мутеину.

[00116] Модификации аминокислотной последовательности включают направленный мутагенез одиночных аминокислотных положений для упрощения субклонирования подвергнутого мутации гена hNGAL или его частей с помощью введения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того, эти мутации также можно вводить для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении указанной мишени, такой как Ang-2. Более того, мутации можно вводить, чтобы модулировать определенные характеристики мутеина, как например, для улучшения стабильности укладки, стабильности в сыворотке крови, устойчивости белка, или растворимости в воде, или для снижения склонности к агрегированию, если в этом существует необходимость. Например, встречающиеся в природе остатки цистеина можно подвергать мутации в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидного мостика. Существует также возможность подвергнуть преднамеренной мутации другие

аминокислотные положения последовательности в цистеин с целью введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей. Полученный тиоловый фрагмент можно использовать для ПЭГилирования или ГЭКиления мутеина, например для увеличения времени полужизни соответствующего мутеина в сыворотке крови.

[00117] Существует также возможность подвергнуть мутации другие аминокислотные положения последовательности в цистеин с целью введения новых реакционноспособных групп, например, для конъюгации с другими соединениями, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), биотин, пептиды или белки, или для образования не встречающихся в природе дисульфидных связей.

[00118] В некоторых вариантах осуществления, если один из приведенных выше фрагментов конъюгируется с мутеином, содержащимся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, то конъюгация с боковой цепью аминокислоты может быть преимущественной. Подходящие боковые цепи аминокислот могут встречаться в природе в аминокислотной последовательности hNGAL, или их можно вводить с помощью мутагенеза. В том случае если подходящий сайт связывания вводят посредством мутагенеза, один вариант представляет собой замещение аминокислоты в соответствующем положении остатком цистеина.

[00119] В отношении мутеина липокалина человека 2, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, иллюстративными возможностями такой мутации являются введение остатка цистеина в аминокислотную последовательность липокалина, в том числе мутеина липокалина 2 человека, включение введения остатка цистеина (Cys) по меньшей мере в одно из положений последовательности, которое соответствует положениям 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 или 158

последовательности дикого типа NGAL человека. В некоторых вариантах осуществления, в которых мутеин липокалина 2 человека согласно настоящему изобретению имеет последовательность, в которой, по сравнению с последовательностью под номером доступа в базе данных SWISS-PROT/UniProt P80188, цистеин был замещен другим аминокислотным остатком, соответствующий цистеин может быть повторно введен в последовательность. В качестве иллюстративного примера остаток цистеина в аминокислотном положении 87 может быть введен в таком случае путем возвращения цистеина, который первоначально присутствует в последовательности под номером доступа SWISS-PROT P80188. Полученный тиоловый фрагмент с боковой стороны любого из аминокислотных положений 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 и/или 158 можно использовать для ПЭГиляции или ГЭЖилирования мутеина, например для увеличения времени полужизни соответствующего мутеина липокалина 2 человека в сыворотке крови.

[00120] В другом варианте осуществления путем мутагенеза, для конъюгирования одного из приведенных выше соединений с мутеином, содержащимся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно вводить искусственные аминокислоты с обеспечением подходящих боковых цепей аминокислот. Как правило, эти искусственные аминокислоты конструируют таким образом, чтобы они были более реакционноспособными и таким образом облегчали конъюгацию с требуемым соединением. Одним примером такой искусственной аминокислоты, которую можно вводить посредством искусственной тРНК, является пара-ацетил-фенилаланин.

[00121] В некоторых вариантах осуществления мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, может быть слит на своем N-конце или своем С-конце с белком, белковым доменом или пептидом, к примеру сигнальной последовательностью и/или аффинной меткой.

[00122] Аффинные метки, такие как Strep-tag® или Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766), *myc*-метка, FLAG-метка, His6-

метка или НА-метка, или белки, такие как глутатион-S-трансфераза, также обеспечивающие легкое выявление и/или очистку рекомбинантных белков, являются дополнительными примерами подходящих партнеров по слиянию. И наконец, белки с хромогенными или флуоресцентными свойствами, такие как зеленый флуоресцентный белок (GFP) или желтый флуоресцентный белок (YFP), также являются подходящими партнерами по слиянию для мутеинов согласно настоящему изобретению.

[00123] В целом, можно маркировать мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, с помощью любого соответствующего химического вещества или фермента, которые непосредственно или опосредованно образуют выявляемое соединение или сигнал при химической, физической, оптической или ферментативной реакции. Примером физической реакции, и в то же время оптической реакции/метчика, является испускание флуоресценции при облучении или испускание X-лучей при использовании радиоактивного маркера. Щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена и β -галактозидаза являются примерами ферментных маркеров (и в то же время оптических маркеров), которые катализируют образование продуктов хромогенной реакции. В целом, все маркеры, широко используемые для антител (за исключением тех, которые используют только с фрагментом сахара в Fc-части иммуноглобулинов), также можно использовать для конъюгации с мутеинами, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также можно конъюгировать с любым пригодным терапевтически активным средством, например, для целенаправленной доставки таких средств к данной клетке, ткани или органу или для селективного целенаправленного воздействия на клетки, например клетки опухоли, без воздействия на близлежащие нормальные клетки. Примеры таких терапевтически активных средств включают радионуклиды, токсины, небольшие органические молекулы и терапевтические пептиды (такие как пептиды, действующие в качестве агонистов/антагонистов рецептора клеточной поверхности, или пептиды, конкурирующие за сайт связывания белка на данной

клеточной мишени). Однако мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, также можно конъюгировать с терапевтически активными нуклеиновыми кислотами, такими как молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, малыми интерферирующими РНК, микро-РНК или рибозимы. Такие конъюгаты можно получать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники.

[00124] Как указано выше, мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в некоторых вариантах осуществления можно конъюгировать с фрагментом, который удлиняет время полужизни мутеина в сыворотке крови (в связи с этим см. также публикацию заявки согласно PCT WO 2006/56464, в которой такие стратегии конъюгации описаны в отношении мутеинов липокалина человека, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов, с аффинностью связывания в отношении CTLA-4). Фрагмент, который удлиняет время полужизни в сыворотке крови, может представлять собой молекулу полиалкиленгликоля, гидроксиэтилкрахмал, молекулы жирных кислот, такие как пальмитиновая кислота (Vajo & Duckworth 2000, *Pharmacol. Rev.* **52**, 1-9), Fc-часть иммуноглобулина, CH3-домен иммуноглобулина, CH4-домен иммуноглобулина, альбуминсвязывающий пептид или альбуминсвязывающий белок, трансферрин, при этом упомянуты лишь некоторые. Альбуминсвязывающий белок может представлять собой бактериальный альбуминсвязывающий белок, антитело, фрагмент антитела, в том числе доменные антитела (см., например, патент США № 6696245), или мутеин с активностью связывания в отношении альбумина. Соответственно, подходящие партнеры по конъюгации для удлинения времени полужизни мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включают альбуминсвязывающий белок, например бактериальный альбуминсвязывающий домен, такой как белок G стрептококка (König, T., & Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83). Другими примерами альбуминсвязывающих пептидов, которые можно использовать в качестве партнера по конъюгации, к примеру, являются таковые, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа₁-Хаа₂-Хаа₃-Хаа₄-Cys, где Хаа₁ представляет собой

Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa₂ представляет собой Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa₃ представляет собой Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr и Xaa₄ представляет собой Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной заявке США 2003/0069395 (включенной в данный документ с помощью ссылки в полном объеме) или в Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 35035-35043).

[00125] В других вариантах осуществления собственно альбумин (Osborn, B.L. et al., 2002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 540-548) или биологически активный фрагмент альбумина можно использовать в качестве партнера по конъюгации мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Термин «альбумин» включает альбумины всех млекопитающих, такие как сывороточный альбумин человека, или бычий сывороточный альбумин, или альбумин крысы. Альбумин или его фрагмент можно получить рекомбинантно, как описано в патенте США № 5728553 или заявках на Европейский патент №№ EP 0330451 и EP 0361991 (которые включены в данный документ с помощью ссылки в полном объеме). Рекомбинантный альбумин человека (Recombunin®) от Novozymes Delta Ltd. (Ноттингем, Великобритания) можно конъюгировать или сливать с мутеином согласно настоящему изобретению для удлинения времени полужизни мутеина.

[00126] Если альбумин-связывающий белок представляет собой фрагмент антитела, то он может быть доменным антителом. Доменные антитела (dAb) сконструированы для обеспечения возможности точного контроля биофизических свойств и времени полужизни *in vivo* с обеспечением оптимального профиля безопасности и эффективности продукта. Доменными антителами являются, например, коммерчески доступные от Domantis Ltd. (Кембридж, Великобритания и Массачусетс, США).

[00127] При использовании трансферрина в качестве фрагмента для удлинения времени полужизни мутеинов, содержащихся в слитом полипептиде

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

[00128] Если Fc-часть иммуноглобулина используется с целью пролонгирования времени полужизни мутеинов, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, то можно использовать технологию *SynFusion*™, коммерчески доступную от Syntonix Pharmaceuticals, Inc (Массачусетс, США). Применение этой технологии Fc-слияния обеспечивает возможность создания биофармацевтических средств более длительного действия и может предусматривать, например, две копии мутеина, связанные с Fc-областью антитела, для улучшения фармакокинетики, растворимости и эффективности выработки.

[00129] Еще одной альтернативой для пролонгирования времени полужизни мутеинов согласно настоящему изобретению является слияние с N- или C-концом мутеинов длинных неструктурированных гибких последовательностей, богатых глицином (например, полиглицин с приблизительно 20-80 последовательными остатками глицина). Такой подход, раскрытый в WO 2007/038619, например, также был назван «рПЭГ» (рекомбинантный ПЭГ).

[00130] Если в качестве партнера по конъюгации используется

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

[00131] Кроме того мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно сливать с фрагментом, который может придавать новые характеристики мутеинам согласно настоящему изобретению, такие как ферментативная активность или аффинность связывания в отношении других молекул. Примерами подходящих партнеров по слиянию являются щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глутатион-S-трансфераза, альбуминсвязывающий домен белка G, белок A, фрагменты антител, домены олигомеризации или токсины.

[00132] В частности, может быть возможным слияние мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению согласно данному документу, с активным сайтом отдельного фермента, вследствие чего оба «компонента» полученного в результате слитого белка действуют совместно

на данную терапевтическую мишень. Например, связывающий домен мутеина, который содержится в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, прикрепляется к мишени, обуславливая заболевание, обеспечивая возможность домену фермента разрушать биологическую функцию мишени.

[00133] Настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению. Поскольку вырожденность генетического кода допускает замены определенных кодонов на другие кодоны, определяющие ту же самую аминокислоту, то настоящее изобретение не ограничено конкретной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано в данном документе, а охватывает все молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают в себя нуклеотидные последовательности, кодирующие функциональный мутеин. В связи с этим настоящее изобретение предусматривает нуклеотидные последовательности, показанные под SEQ ID NO: 72-85, кодирующие некоторые мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению.

[00134] В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает воздействие на молекулы нуклеиновой кислоты мутагенезом в нуклеотидных триплетах, кодирующих по меньшей мере одно или даже больше из положений в последовательности, соответствующих положениям 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности NGAL человека (SEQ ID NO: 1).

[00135] Настоящее изобретение также включает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие мутеины, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, которые включают в себя дополнительные мутации вне указанных положений последовательности экспериментального мутагенеза. Такие мутации часто допустимы или могут даже оказаться

преимущественными, например, если они способствуют улучшенной эффективности укладки, стабильности в сыворотке крови, термостойкости или аффинности связывания с лигандом мутеинов.

[00136] Молекула нуклеиновой кислоты, раскрытая в данной заявке, может быть «функционально связана» с регуляторной последовательностью (или регуляторными последовательностями) для обеспечения экспрессии этой молекулы нуклеиновой кислоты.

[00137] Молекулу нуклеиновой кислоты, такую как ДНК, называют «молекулой нуклеиновой кислоты, способной к экспрессии» или способной «обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности», если она включает в себя элементы последовательности, которые содержат информацию относительно транскрипционной и/или трансляционной регуляции, и такие последовательности «функционально связаны» с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Функциональная связь представляет собой связь, при которой элементы регуляторной последовательности и последовательность, подлежащая экспрессии, соединены таким образом, что обеспечивается экспрессия гена. Определенные особенности регуляторных областей, необходимых для экспрессии гена, могут варьировать между видами, но в общем эти области включают в себя промотор, который у прокариот содержит как промотор *per se*, т. е. элементы ДНК, направляющие инициацию транскрипции, так и элементы ДНК, которые при транскрибировании в РНК будут запускать сигнал об инициации трансляции. Обычно эти промоторные области включают в себя 5'-некодирующие последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, такие как боксы -35/-10 и элемент Шайн-Дальгарно у прокариот или ТАТА-бокс, последовательности СААТ и 5'-кэпирующие элементы у эукариот. Такие области также могут включать в себя энхансерные или репрессорные элементы, а также транслированные сигнальные и лидерные последовательности для нацеливания нативного полипептида на конкретный компартмент клетки-хозяина.

[00138] В дополнение к этому 3'-некодирующие последовательности могут содержать регуляторные элементы, вовлеченные в терминацию транскрипции, полиаденилирование или т. п. Однако, если такие последовательности терминации не в достаточной степени функциональны в конкретной клетке-хозяине, тогда их можно заменить сигналами, функциональными в такой клетке.

[00139] Ввиду этого, молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может включать регуляторную последовательность, такую как промоторная последовательность. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включает промоторную последовательность и последовательность терминации транскрипции. Подходящими прокариотическими промоторами являются, например, промотор *tet*, промотор *lacUV5* или промотор T7. Примерами промоторов, применимых для экспрессии в эукариотических клетках, являются промотор SV40 или промотор CMV.

[00140] Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению также могут быть частью вектора или любого другого типа средства для клонирования, такого как плазида, фагмида, фаг, бакуловир, космида или искусственная хромосома.

[00141] В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включена в фазмиду. Фазмидный вектор означает вектор, кодирующий межгенную область умеренного фага, такого как M13 или f1, или его функциональную часть, слитую с кДНК, представляющей интерес. После суперинфекции бактериальных клеток-хозяев этим фагмидным вектором и соответствующим хелперным фагом (например, M13K07, VCS-M13 или R408) продуцируются интактные фаговые частицы, обеспечивая таким образом физическое сопряжение закодированной гетерологичной кДНК с ее соответствующим полипептидом, экспонированным на поверхности фага (см., например, Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 401-424, или Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87-93).

[00142] Такие средства для клонирования могут включать, помимо вышеописанных регуляторных последовательностей, также последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, как описано в данном документе, последовательности для репликации и контрольные последовательности, полученные от вида, совместимого с клеткой-хозяином, которую используют для экспрессии, а также метчики отбора, обеспечивающие селективируемый фенотип у трансформированных или трансфицированных клеток. Из уровня техники известно большое количество подходящих векторов клонирования, и они являются коммерчески доступными.

[00143] Молекулой ДНК, кодирующей мутеин, который содержится в слитом полипептиде, как описано в данном документе, и в частности вектором клонирования, содержащим кодирующую последовательность такого мутеина, можно трансформировать клетку-хозяина, способную экспрессировать ген. Трансформацию можно осуществлять с использованием стандартных методик. Таким образом, настоящее изобретение также направлено на клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, которая раскрыта в данном документе.

[00144] Трансформированные клетки-хозяева культивируют в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок согласно настоящему изобретению. Подходящие клетки-хозяева могут быть прокариотическими, такими как *Escherichia coli* (*E. coli*) или *Bacillus subtilis*, или эукариотическими, такими как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, клетками насекомых SF9 или High5, иммортализованными клеточными линиями млекопитающих (например, клетками HeLa или клетками CHO) или первичными клетками млекопитающих.

[00145] Настоящее изобретение также относится к способу получения мутеина, который содержится в слитом полипептиде, описанном в данном документе, где мутеин или полипептид, фрагмент мутеина или слитый белок мутеина получают, исходя из нуклеиновой кислоты, кодирующей мутеин, с

помощью способов генной инженерии. Способ можно осуществлять *in vivo*, при этом мутеин или полипептид, например, можно получать в организме-хозяине бактериального или эукариотического происхождения, а затем выделять из этого организма-хозяина или его культуры. Также возможно получать белок *in vitro*, например путем применения системы трансляции *in vitro*.

[00146] При получении *in vivo* мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту, кодирующую такой мутеин или полипептид, вводят в подходящий организм-хозяин бактериального или эукариотического происхождения с помощью технологии рекомбинантной ДНК (как уже обозначалось выше). С данной целью клетку-хозяина вначале трансформируют вектором клонирования, который включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутеин, который описан в данном документе, с применением известных стандартных способов. Затем клетку-хозяина культивируют в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии гетерологичной ДНК и, как следствие, синтез соответствующего полипептида. Впоследствии полипептид выделяют либо из клетки, либо из среды для культивирования.

[00147] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, такая как ДНК, раскрытая в данной заявке, может быть «функционально связана» с другой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению для обеспечения возможности экспрессии слитого белка согласно настоящему изобретению. При этом функциональная связь представляет собой связь, в которой элементы последовательности первой молекулы нуклеиновой кислоты и элементы последовательности второй молекулы нуклеиновой кислоты соединены таким образом, что обеспечивается возможность экспрессии слитого белка в виде единого полипептида.

[00148] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления встречающаяся в природе дисульфидная связь между Cys 76 и Cys 175 может быть удалена в мутеинах hNGAL, которые содержатся в слитом полипептиде согласно

настоящему изобретению. Соответственно, такие мутеины можно получать в компартменте клетки, содержащем среду с восстанавливающим окислительно-восстановительным потенциалом, например в цитоплазме грамотрицательных бактерий.

[00149] В случае если мутеин, содержащийся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, включает в себя внутримолекулярные дисульфидные связи, может быть предпочтительным направлять образующийся полипептид в компартмент клетки, содержащий среду с окисляющим окислительно-восстановительным потенциалом, с помощью соответствующей сигнальной последовательности. Эта окисляющая среда может обеспечиваться периплазмой грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, во внеклеточной среде грамположительных бактерий или в просвете эндоплазматического ретикула эукариотических клеток, и она обычно способствует образованию дисульфидных связей в структуре.

[00150] Однако также возможно получение мутеина, содержащегося в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, в цитозоле клетки-хозяина, предпочтительно *E. coli*. В данном случае мутеин или полипептид может быть либо непосредственно получен в растворимом и уложенном состоянии, либо выделен в форме тел включения с последующей ренатурацией *in vitro*. Дополнительной возможностью является применение конкретных штаммов-хозяев с окисляющей внутриклеточной средой, которая таким образом может обеспечивать образование дисульфидных связей в цитозоле (Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 1-8.).

[00151] Однако мутеин или полипептид, которые содержатся в слитом полипептиде, описанном в данном документе, не обязательно можно создавать или получать только путем применения генной инженерии. Вместо этого такой мутеин или полипептид можно также получать путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез полипептидов по Меррифилду, или путем транскрипции и трансляции *in vitro*. Например, возможно, что представляющие

интерес мутации определяют с помощью молекулярного моделирования, а затем синтезируют необходимый (разработанный) полипептид *in vitro* и изучают активность связывания в отношении Ang-2. Способы твердофазного синтеза и/или синтеза в жидкой фазе белков хорошо известны из уровня техники (см., например, Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43).

[00152] В другом варианте осуществления мутеин или полипептид, которые содержатся в слитом полипептиде согласно настоящему изобретению, можно получать путем транскрипции/трансляции *in vitro*, применяя общепринятые способы, известные специалистам в данной области техники.

[00153] Специалисту в данной области будут понятны способы, применимые для получения мутеинов или полипептидов, которые содержатся в их слитом полипептиде, предполагаемых в настоящем изобретении, однако последовательности белков или нуклеиновых кислот которых в данном документе явным образом не раскрыты. В качестве обзора такие модификации аминокислотной последовательности включают, например, направленный мутагенез отдельных аминокислотных положений для упрощения субклонирования подвергнутого мутации гена hNGAL или его частей путем введения сайтов расщепления для определенных рестрикционных ферментов. Кроме того такие мутации можно также вводить для дополнительного улучшения аффинности мутеина в отношении его мишени (например, соответственно Ang-2 или Ang-1). Более того, мутации можно вводить для модулирования определенных характеристик мутеина, как например, для улучшения стабильности укладки, стабильности в сыворотке крови, устойчивости белка, или растворимости в воде, или для снижения склонности к агрегированию, если в этом существует необходимость. Например, встречающиеся в природе остатки цистеина можно подвергать мутации в другие аминокислоты для предотвращения образования дисульфидного мостика.

[00154] Мутеины или полипептиды, содержащиеся в их слитом полипептиде, раскрытые в данном документе, а также их производные, можно

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

[00155] Дополнительные объекты, преимущества и характеристики настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники после изучения следующих примеров и прилагаемых к ним фигур, которые не предназначены быть ограничивающими. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение специфически раскрыто с помощью иллюстративных вариантов осуществления и необязательных характеристик, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и вариации изобретений, приведенных в них в данном документе, и что такие модификации и вариации рассматриваются как часть объема настоящего изобретения.

D. Примерные пути применения, применения и получение слитых полипептидов

[00156] Для ангиогенеза необходимо связывание сигнальных молекул, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), с рецепторами на поверхности нормальных эндотелиальных клеток. При связывании VEGF и других эндотелиальных факторов роста со своими рецепторами на

эндотелиальных клетках, внутри этих клеток инициируются сигналы, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов. Один подход к разработке эффективного антиангиогенного способа лечения заключался в объединении средств, которые действуют в отношении различных мишеней, вовлеченных в ангиогенез, предпочтительно мишеней, которые действуют посредством хорошо изолированных путей передачи сигнала.

[00157] таким образом, настоящее изобретение охватывает применение слитого полипептида, содержащего две субъединицы, где первая субъединица содержит иммуноглобулин или его функциональный фрагмент, специфичные в отношении VEGF-A, и вторая субъединица содержит мутеин hNGAL, специфичный в отношении Ang-2. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид способен блокировать или способствовать блокированию по меньшей мере одного из таких сигналов, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов.

[00158] В некоторых дополнительных вариантах осуществления слитый полипептид можно применять в комбинации с одним или более дополнительных антиангиогенных средств. Используемое в данном документе «антиангиогенное средство» означает любое вещество, способное ингибировать или нарушать связывание одной из таких сигнальных молекул со своим рецептором. В некоторых вариантах осуществления антиангиогенное средство способно блокировать или способствовать блокированию одного из таких сигналов, которые обеспечивают рост и существование новых кровеносных сосудов.

[00159] В некоторых конкретных вариантах осуществления эти дополнительные антиангиогенные средства включают (i) антагонисты Ang-1, Ang-3, Ang-4 и/или Tie-2; (ii) антагонисты Fltl, KDR, Flt4, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF и/или EG-VEGF; (iii) антагонисты дельта-подобного лиганда 4 (DLL4, сосудоспецифичный лиганд Notch), (iv) антагонисты рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и (v) ингибиторы цитокинов. В некоторых дополнительных вариантах осуществления антагонист DLL4 может

представлять собой антитело к DLL4 (например, антитело к DLL4, раскрытое в патентной заявке США № 2009/0142354, как например REGN421 и т. д.). В некоторых дополнительных вариантах осуществления антагонист EGFR может представлять собой антитело к EGFR или низкомолекулярный ингибитор активности EGFR. Другие антиангиогенные средства, которые можно преимущественно вводить в комбинации с Ang-2-связывающими мутеинами hNGAL согласно настоящему изобретению, включают ингибиторы цитокинов, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, и/или с их соответствующими рецепторами.

[00160] В связи с этим, настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любой из слитых полипептидов, упомянутых в данном документе, и антиангиогенное средство, такое как антагонист одного или более DLL4, EGFR или любого из вышеупомянутых цитокинов, где антагонист может представлять собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, siRNA, пептитело, нанотело, антитело, фрагмент антитела (например, фрагмент Fab; фрагмент F(ab')₂; фрагмент Fd; фрагмент Fv; scFv; фрагмент dAb; сконструированную молекулу (такую как диатело, триатело, тетратело, минитело и минимальная распознающая единица); противовирусный препарат, антибиотик, анальгетик, кортикостероиды и/или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID).

[00161] В некоторых вариантах осуществления указанная сконструированная молекула может представлять собой EGF-подобный домен, домен "двойная петля", домен I типа фибронектина, домен II типа фибронектина, домен III типа фибронектина, домен PAN, домен Gla, домен SRCR, домен ингибитора семейства Kunitz/трипсина поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора серинпротеазы по типу ингибиторов семейства Kazal, домен Trefoil (P-типа), домен фактора фон Виллебранда типа C, анафилатоксин-подобный домен, домен CUB, повтор I типа тиреоглобулина, домен LDL-рецептора класса A, домен Sushi, домен Link, домен I типа

тромбоспондина, домен иммуноглобулина или иммуноглобулин-подобный домен (например, доменные антитела или верблюжьи антитела только с тяжелой цепью), домен лектина С-типа, домен МАМ, домен фактора фон Виллебранда А-типа, домен соматомедина В, коровый домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 С-типа, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен ламининового типа, домен C2, «каппа-тело» (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), «минитело» (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), «диатело» (Holliger et al. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments" *PNAS USA* 90:6444-6448 (1993)), «янусин» (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al. new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992), нанотело, аднектин, тетранектин, микротело, аффилин, аффитело, анкирин, кристаллин, ноттин, убиквитин, белки с "цинковыми пальцами", ауто-флуоресцентный белок, анкирин или белок с анкириновым повтором или белок с богатыми лейцином повторами, авимер (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, *Nat Biotech*, Dec; 23(12):1556-61, электронная публикация в *Nat. Biotech.*, выпуск 20 ноября 2005 года).

[00162] При объединении с одним или более дополнительных средств согласно настоящему изобретению слитый полипептид согласно настоящему изобретению можно вводить до, одновременно с (например, в одном и том же составе или в отдельных составах) или после введения другого средства(-ств). Слитый полипептид и антиангиогенное средство можно вводить в комбинации, в том числе параллельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления, комбинации согласно настоящему изобретению, слитый полипептид согласно настоящему изобретению и антиангиогенные средства можно включать в одну композицию, которую можно вводить.

Композиция может содержать эффективное количество слитого полипептида согласно настоящему изобретению и антиангиогенного средства в качестве активных ингредиентов совместно по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным средством, разбавителем или носителем. В связи с этим, комбинации согласно настоящему изобретению можно составлять в композиции с применением фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также установленных способов получения (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно применять фармацевтически инертные неорганические или органические наполнители.

[00163] Слитый полипептид согласно настоящему изобретению и антиангиогенное средство также можно вводить независимо друг от друга, в том числе с индивидуальными временными интервалами в независимые моменты времени. Комбинации слитого полипептида согласно настоящему изобретению и антиангиогенного средства можно предоставлять в различных формах и в любой ориентации.

[00164] Слитый полипептид согласно настоящему изобретению и его комбинации также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или традиционную химиотерапию.

[00165] В некоторых конкретных вариантах осуществления антиангиогенное средство представляет собой антагонист любого компонента из систем рецепторов VEGF/VEGF и системы рецепторов ангиопоэтин/Tie-2; оно представляет собой любое из Flt1, KDR, Flt4, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF, EG-VEGF, Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4 или Tie-2. Путь VEGF-VEGFR и путь Tie-2 следует рассматривать в качестве двух независимых медиаторов, важных для процесса ангиогенеза *in vivo* (Siemeister, G., et al., Cancer Res. 59:3 (1999) 3185-91; Jendreyko, N., et al., Journal of Biological Chemistry, 278:47812-47819 (2003); Jendreyko, N., et al., PNAS, 102:8293-8298

(2005)).

[00166] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает применение (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств для ингибирования дерегулированного ангиогенеза у субъекта. Такое применение включает стадию введения субъекту эффективного количества (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств.

[00167] Подобным образом настоящее изобретение раскрывает применение (i) слитого полипептида согласно настоящему изобретению и (ii) одного или более антиангиогенных средств для лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта. В некоторых дополнительных вариантах осуществления заболевания или расстройства, ассоциированные с дерегулированным ангиогенезом, включают рак, офтальмологические неоваскулярные заболевания (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C, упомянутый в данном документе.

[00168] Дополнительные подробности в отношении слитых полипептидов согласно настоящему изобретению, содержащим субъединицу с выявляемой аффинностью в отношении Ang-2, можно найти в разделе В настоящего изобретения.

[00169] В особенно предпочтительном варианте осуществления слитый полипептид, который содержит субъединицу, специфичную в отношении Ang-2, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97, или их функциональных фрагментов или вариантов. В некоторых вариантах осуществления такие фрагменты или варианты представляют собой

структурные гомологи мутеина, определенного под любым из SEQ ID NO: 1.

[00170] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из следующих: (i) слитый полипептид согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств, композицию из которых можно применять для ингибирования дерегулированного ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C, упомянутый в данном документе.

[00171] В связи с этим, комбинации согласно настоящему изобретению можно составлять в композиции с применением фармацевтически приемлемых ингредиентов, а также установленных способов получения (Gennaro and Gennaro (2000) Remington: The Science и Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Для получения фармацевтических композиций можно применять фармацевтически инертные неорганические или органические наполнители.

[00172] В еще другом аспекте настоящее изобретение отображает способ лечения, предупреждения или облегчения заболевания или расстройства, ассоциированных с дерегулированным ангиогенезом у субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере следующее: (i) слитый полипептид согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств. В некоторых дополнительных вариантах осуществления заболевания или расстройства, ассоциированные с дерегулированным ангиогенезом, включают рак, офтальмологические неоваскулярные заболевания (такие как ретинопатии), артрит и псориаз. В некоторых вариантах осуществления одно антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-A, упомянутый в данном документе, и второе антиангиогенное средство представляет собой антагонист VEGF-C,

упомянутый в данном документе.

[00173] В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ ингибирования или уменьшения дерегулированного ангиогенеза у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества композиции, которая содержит по меньшей мере следующее: (i) слитый полипептид согласно настоящему изобретению и (ii) одно или более антиангиогенных средств.

Настоящее изобретение дополнительно характеризуется следующими пунктами.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пункт 13. Слитый полипептид по пункту 1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая

VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 500 пМ или меньше, при оценке в анализе ELISA, фактически описанном в примере 4.

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

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

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

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

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

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

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

Пункт 21. Слитый полипептид по пункту 1, где слитый полипептид способен снижать или блокировать по меньшей мере одну из биологических функций VEGF-A, в частности VEGF-A-зависимую клеточную пролиферацию, как например в функциональном клеточном анализе пролиферации, фактически описанном в примере 6.

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

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

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

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

Пункт 26. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит один или более подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79,

81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL.

Пункт 27. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu или Phe; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val и Lys 134 → Ala, Glu или Trp.

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

Пункт 29. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

Пункт 30. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов

аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(k) Leu 36 → Gln; Ala 40 → Tyr; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Gly;

Tyr 100 → Leu; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → His; Ser 127 → Leu; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

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

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

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

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

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

Пункт 32. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность мутеина характеризуется по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности аминокислотной

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

мере один остаток серина.

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

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

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

Пункт 50. Слитый полипептид по пункту 51, где моноклональное антитело содержит области тяжелой цепи, определяющие комплементарность (CDR), которые содержатся в тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8, и CDR легкой цепи, которые содержатся в легкой цепи под SEQ ID NO 9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пункт 64. Применение слитого полипептида по любому из пунктов 1-54 или композиции, содержащей такой слитый полипептид, для одновременного

связывания Ang-2 и VEGF-A у субъекта.

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

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

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

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

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

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

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

псориаза.

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

V. ПРИМЕРЫ

[00174] Пример 1. Экспрессия и анализ слитых полипептидов

[00175] Для одновременного связывания VEGF-A и Ang-2 авторы данного изобретения получали несколько репрезентативных слитых полипептидов антитело-мутеин липокалина, сливая вместе антитело, содержащее тяжелую и легкую цепи, представленные под SEQ ID NO: 8 и 9, и один из мутеинов липокалина под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 с помощью неструктурированного линкера (G4S)₃ (SEQ ID NO: 19). Различные форматы, которые были сконструированы, показаны на **фигуре 1**. Такие слитые полипептиды (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) получали посредством слияния одного из мутеинов липокалина под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 с любым из двух C-концов антитела.

[00176] Конструкции получали путем синтеза генов и клонировали в вектор экспрессии для млекопитающих. Затем их транзientно экспрессировали в клетках CHO. Концентрацию слитых полипептидов в среде с клеточной культурой измеряли с помощью сенсорного устройства с белком A от ForteBio (Pall Corp.) и количественно оценивали с помощью стандарта, представляющего собой IgG1 человека.

[00177] Слитые полипептиды очищали с применением хроматографии с белком A с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS). После очистки с помощью SEC, фракции, содержащие мономерный белок, объединяли и снова анализировали с помощью аналитической SEC. В соответствии с этим анализом слитые полипептиды были

полностью мономерными без выявляемых мультимерных молекул или агрегатов.

[00178] Пример 2. Специфичность слитых полипептидов относительно VEGF-A

[00179] Авторы данного изобретения применяли анализ ELISA для определения аффинности слитых белков к рекомбинантному VEGF-A. Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на ночь на микротитровальные планшеты при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T). Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре, а затем промывали. Различные концентрации используемого для сравнения биспецифического антитела (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) и антитела положительного контроля (SEQ ID NO: 8 и 9) или слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации с разбавленным в концентрации, составляющей 1:5000, антителом Fc-HRP к IgG человека (№ 109-035-098, Jackson Laboratory) в PBS-T. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo), и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00180] Результат эксперимента наносили на график на **фигуре 2** совместно с аппроксимированными кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и максимальный сигнал были заданными параметрами, и наклон фиксировали для единообразия. Наблюдаемые значения EC50 находились в одинаковом диапазоне для всех исследуемых слитых полипептидов и используемого для сравнения антитела (0,8-0,15 нМ).

[00181] Пример 3. Специфичность слитых полипептидов относительно Ang-2

[00182] Авторы данного изобретения использовали анализ ELISA для определения аффинности слитых полипептидов и мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 к рекомбинантному Ang-2 человека (Creative BioMart). Мишень растворяли в PBS (5 мкг/мл) и наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS-Т. Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре, а затем промывали. Различные концентрации Ang-2-специфичного мутеина липокалина в мономерной форме (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) или слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) или биспецифического используемого для сравнения контроля (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23) добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Связанные исследуемые средства выявляли после инкубации в течение 1 ч. при комнатной температуре с разбавленным в концентрации, составляющей 1:1000, конъюгированным с антителом HRP к липокалину в PBS-Т или разбавленным в концентрации 1:5000 антителом Fc-HRP к IgG человека (№109-035-098, Jackson Laboratory) в PBS-Т. После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат для HRP (QuantaBlu, Thermo), и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00183] Результат эксперимента наносили на график на **фигуре 3** совместно с аппроксимированными кривыми зависимости, полученными из сигмоидальной функции связывания 1:1, где значение EC50 и максимальный сигнал были заданными параметрами, и наклон фиксировали для единообразия. Наблюдаемые значения EC50 для всех исследуемых слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) были

сходными и варьировали от 0,21 нМ до 0,23 нМ. Значение, полученное для мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль, под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, составляло 0,35-0,5 нМ, в то время как биспецифическое антитело, используемое для сравнения, характеризовалось EC50, составляющим 0,83 нМ.

[00184] Пример 4. Демонстрация одновременного связывания мишени в условиях на основе ELISA

[00185] Для демонстрации одновременного связывания слитых полипептидов с VEGF-A и Ang-2 применяли формат ELISA с двойным связыванием. Рекомбинантный VEGF-A (R&D Systems) в PBS (5 мкг/мл) наносили на ночь на микротитровальные планшеты при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T), с использованием установки Biotek ELx405 для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками. Планшеты блокировали с помощью 2% BSA (вес/об.) в PBS в течение 1 ч. при комнатной температуре, а затем снова промывали. В лунки добавляли различные концентрации слитых полипептидов и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре с последующей стадией промывки. Затем добавляли биотинилированный Ang-2 человека в постоянной концентрации, составляющей 1 мкг/мл, в PBS-T на 1 ч. После промывки в лунки на 1 ч. добавляли экстравидин-HRP (Sigma-Adrich, 1:5000 в PBS-T). После дополнительной стадии промывки в каждую лунку добавляли флуорогенный субстрат с HRP (QuantaBlu, Thermo), и интенсивность флуоресценции выявляли с помощью микропланшетного ридера, считывающего флуоресцентный сигнал.

[00186] Как альтернатива, рекомбинантный Ang-2 (Creative BioMart) в PBS (5 мкг/мл) наносили на микротитровальные планшеты на ночь при 4°C. Планшет промывали пять раз после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл PBS, дополненного 0,05% (об./об.) Tween 20 (PBS-T), с использованием установки для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками Biotek ELx405.

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

[00187] Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на **фигуре 4**. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались отчетливыми сигналами связывания со значениями EC₅₀, находящимися в диапазоне 0,36 до 0,55 нМ, при нанесении VEGF-A на планшет, что демонстрировало то, что такие слитые полипептиды способны одновременно связывать VEGF-A и Ang-2. Биспецифическая молекула, используемая для сравнения (SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23), характеризовалась более низким сигналом связывания со значением EC₅₀, составляющим 1,8 нМ (**фигура 4А**). При использовании альтернативного проведения анализа, когда Ang-2 наносили на планшет и для выявления применяли биотинилированный VEGF-A, все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четкими сигналами связывания со значениями EC₅₀ в диапазоне от 0,95 до 1,3 нМ, при этом биспецифическая молекула, используемая для сравнения, опять-таки характеризовалась более низким сигналом связывания со значением EC₅₀, составляющим 14 нМ (**фигура 4В**). Данное неудовлетворительное связывание биспецифического антитела, используемого для сравнения, может происходить по причине его моновалентного связывания мишени.

[00188] **Пример 5. Блокирование слитыми полипептидами связывания Ang-2 человека с клетками, экспрессирующими hTie-2**

[00189] Связывание слитых полипептидов с Ang-2 человека в конкурентном режиме исследовали на клетках HEK, сверхэкспрессирующих hTie-2, с использованием формата анализа конкурентной клеточной электрохемилюминесценции (ECL) (фигура 5). В данном эксперименте постоянную концентрацию Ang-2 человека инкубировали с разными концентрациями слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), мутеинами липокалина, представляющими собой положительный контроль (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3), используемым для сравнения антителом (SEQ ID NO: 6 и 7) и отрицательными контролями (SEQ ID NO: 1 и hIgG1) в течение 1 h. После этой предварительной инкубации в растворе аликвоту смеси связывающий фрагмент/Ang-2 переносили на планшет MSD, покрытый клетками HEK, сверхэкспрессирующими hTie-2, для измерения концентрации hAng-2, который не был блокирован для связывания с hTie-2, соответственно.

[00190] Все стадии инкубации осуществляли при комнатной температуре, и планшеты промывали после каждой стадии инкубации с помощью 80 мкл буфера PBS два раза с применением устройства для избирательной промывки планшетов с глубокими лунками Biotek EL405 (Biotek). На первой стадии 384-луночный планшет предварительно покрывали на 5 минут поли-D-лизином и дважды промывали с помощью PBS. Высевали 10^4 клеток HEK:hTie-2 на лунку, и обеспечивали прилипание к поверхности лунок в течение ночи при 37°C. После промывки покрытые клетками луночки блокировали с помощью 60 мкл PBS/казеина (2% казеина в PBS) в течение 1 ч. при комнатной температуре.

[00191] Установленную концентрацию Ang-2 человека инкубировали в растворе с различными концентрациями слитых полипептидов, мутеинами липокалина, представляющими собой положительный контроль, антителом, используемым для сравнения, и отрицательными контролями с использованием подходящей исходной концентрации, которую серийно разбавляли в соотношении 1:3 до пикомолярного диапазона в буфере PBS/казеин. После 1 ч. инкубации при комнатной температуре 20 мкл реакционной смеси переносили

на планшет, покрытый HEK:hTie2, для захвата конкурентно несвязанного hAng-2 на 1 час мин. при к. т. Стандартную кривую, включающую различные концентрации hAng-2, получали в PBS/казеине и также инкубировали в течение 1 часа на том же планшете.

[00192] Для обеспечения выявления и количественного определения связанного hAng-2, остаточные надосадочные жидкости удаляли, и добавляли 20 мкл смеси антитела к HIS-метке (Abcam) и Sulfotag-маркированного антитела к Ig козы (Mesoscale Discovery) в концентрации 1 мкг/мл в PBS/казеине, и инкубировали в течение 1 ч. при к. т. После промывки в каждую лунку добавляли 35 мкл буфера для считывания без поверхностно-активных веществ, и сигнал ECL в каждой лунке считывали с применением считывающего устройства Mesoscale Discovery.

[00193] Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на **фигуре 5**. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четким ингибированием связывания hAng-2 с hTie2 со значениями EC50, варьирующими от 0,3 до 0,4 нМ, при этом используемая для сравнения молекула и мутеины липокалина также характеризовались сходными значениями от 0,3 до 0,6 нМ.

[00194] **Пример 6. Опосредованная слитыми полипептидами блокировка VEGF-A в клеточном анализе пролиферации**

[00195] Способность слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15), мутеинов липокалина, представляющих собой положительный контроль (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3), используемых для сравнения антител (SEQ ID NO: 6 и 7; SEQ ID NO: 8 и 9), и отрицательными контролями (SEQ ID NO: 1 и hIgG1) нейтрализовать биологическую активность VEGF-A оценивали посредством применения краткосрочного биологического анализа пролиферации с использованием эндотелиальных клеток лимфатических капилляров (LEC). Пролиферацию LEC можно ингибировать с помощью средств, обладающих нейтрализующим

эффектом в отношении как hVEGF-A, так и hAng-2. Поскольку непосредственно hAng-2 не добавляли в анализ, то эндогенный hAng-2 высвобождался клетками LEC.

[00196] LEC содержали в EBM, 5% фетальной телячьей сыворотки и дополнительном наборе MV2 в стандартных условиях в соответствии с инструкциями производителя (PAA Laboratories), 37°C, атмосфера с 5% CO₂). В 1-й день эксперимента прилипающие клетки отделяли от их субстрата с помощью трипсина/EDTA в соответствии с инструкциями производителя. Далее, клетки центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин, повторно суспендировали в EBM и фильтровали через сито для клеток с размером пор 100 мкм (Falcon) для удаления агрегатов клеток. Затем клетки высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном для культур тканей (Greiner) с плотностью 3200 клеток на лунку, используя конечный объем, составляющий 100 мкл. Их инкубировали в течение 1 часа в стандартных условиях. Через 1 ч. серии разбавлений всех исследуемых средств (предварительно инкубированных с hVEGF-A (R&D systems) при 50 нг/мл в течение 30 минут) добавляли к клеткам LEC в культуре. Через трое суток в культуре степень пролиферации анализировали путем определения количества жизнеспособных клеток. Это осуществляли с применением люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega) для измерения уровней АТФ, которые коррелируют с количеством метаболически активных клеток. Оценивали способность слитых полипептидов (SEQ ID NO: 9 и 10, SEQ ID NO: 8 и 11, SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) и VEGF-A-специфичной молекулы, используемой для сравнения (SEQ ID NO: 8 и 9), нейтрализовать индуцированную VEGF-A пролиферацию. Способность Ang-2-специфичных мутеинов липокалина (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3) и используемого для сравнения антитела (SEQ ID NO: 6 и 7) нейтрализовать hIL-23 также анализировали по его значению IC₅₀, т. е. концентрации мутеинов липокалина, которая приводит к половинному ингибированию hAng-2-опосредованной пролиферации.

[00197] Значения IC50 определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) путем построения графика стандартизованного сигнала в зависимости от концентрации образцов и нелинейной регрессии данных с сигмоидальной моделью доза-ответ.

[00198] Репрезентативные экспериментальные данные наносили на график на **фигуре 6**. Все исследуемые слитые полипептиды характеризовались четким ингибированием пролиферации со значениями EC50, находящимися в диапазоне от 1,2 до 0,5 нМ, при этом используемая для сравнения молекула VEGF-A характеризовалась EC50, составляющим 1,2. hAng-2-специфичные мутеины липокалина и используемый для сравнения контроль hAng-2 (SEQ ID NO: 6 и 7) частично ингибировали пролиферацию со значениями IC50, составляющими 1,2-4,2 нМ. Отрицательные контроли не проявляли эффекта в отношении пролиферации.

[00199] **Пример 7. Фармакокинетическая оценка слитых полипептидов in vivo**

[00200] При оценке слитых полипептидов in vivo применяли интравитреальную инъекцию тестируемого средства кроликам (NY79b; пигментированный), после чего следовало взятие образцов крови, стекловидного тела и ткани сетчатки на протяжении 336-часового периода. Вкратце, кроликам (n=16 на обработку) инъецировали 100 мкг слитого полипептида (SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15) в один глаз (правый), при этом другой глаз (левый) использовали как контроль (т. е., необработанный). Периодически проводили офтальмологические исследования для оценки общего состояния здоровья глаз кроликов.

[00201] Фармакокинетику тестируемых средств определяли на основе плазмы крови и стекловидного тела, взятых у кроликов на протяжении 336-часового периода после инъекции. В частности, кровь и стекловидное тело брали у кроликов через 2 ч., 8 ч., 24 ч., 72 ч., 96 ч., 168 ч., 216 ч. и 336 ч. после введения дозы (n=2 кролика на обработку, умерщвленных в каждой временной точке).

[00202] Уровни лекарственного средства выявляли с помощью ELISA сэндвич-типа, при котором выявляли целую биспецифическую конструкцию посредством мишеней VEGF-A и Ang-2, как описано в примере 4. Данные аппроксимировали с применением некомпартментной модели с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 5. На **фигуре 7** показаны линейные графические изображения концентрации в стекловидном теле с течением времени для конструкций под SEQ ID NO: 9 и 14, SEQ ID NO: 8 и 15. Данные показывают, что биспецифические слитые белки характеризуются значениями конечного периода полужизни, находящимися в диапазоне примерно 3,7-4,5 дней.

[00203] Варианты осуществления, иллюстративно описанные в данном документе, можно надлежащим образом осуществлять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, специально не раскрытых в данном документе. Таким образом, например, термины «содержащий», «включающий», «состоящий из» и т. д. следует читать как имеющие расширительное и неограничивающее значение. В дополнение, термины и выражения, используемые в данном документе, были использованы в качестве терминов описания, а не ограничения, и в использовании таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить любые эквиваленты продемонстрированных и описанных характеристик или их частей, однако следует понимать, что в пределах объема заявленного изобретения возможны разные модификации. Таким образом, следует понимать, что несмотря на то, что данные варианты осуществления были конкретно раскрыты с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных характеристик, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к их модификации и вариациям, и что такие модификации и вариации рассматриваются как часть объема настоящего изобретения. Все патенты, патентные заявки, руководства и прошедшие рецензию публикации, описанные в данном документе, включены в данный документ с помощью ссылки в полном их объеме. Более того, в тех случаях, когда определение или использование термина в ссылочном документе, который включен в данный документ с помощью ссылки, не согласуется или

противоречит определению такого термина, представленному в данном документе, применяется определение термина, представленное в данном документе, а определение термина из ссылочного документа не применяется. Каждое из более узких видов и субродовых группировок, находящихся в пределах родового понятия настоящего изобретения, также образует часть настоящего изобретения. Это подразумевает описание настоящего изобретения в обобщенном виде с оговоркой или отрицательными признаками, удаляющими любой объект из рода, независимо от того, изложен ли исключенный материал конкретно в данном документе или нет. Кроме того в тех случаях, когда характеристики описаны в контексте групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение также таким образом описано в контексте любого отдельного представителя или подгруппы представителей группы Маркуша. Дополнительные варианты осуществления будут очевидны из прилагаемой формулы изобретения.

[00204] Эквиваленты: специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, или с помощью проведения только лишь обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, таким образом включены в описание с помощью ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, отдельный патент или отдельная патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ с помощью ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ПИЕРИС ОСТРЕЛИА ПТИ ЛТД.

Новые антиангиогенные слитые полипептиды

<130> PIE15587PCT

<150> EP 15 197 019.1

<151> 30.11.2015

<160> 97

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hNGAL

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 2
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 2

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 3
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 3

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 4
<211> 459
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 1 HC

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
130 135 140

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
145 150 155 160

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
165 170 175

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
210 215 220

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

225		230		235		240									
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
				245					250					255	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			260					265					270		
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
		275					280					285			
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
	290					295					300				
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
305					310					315					320
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
				325					330					335	
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
			340					345					350		
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
		355					360					365			
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
	370					375					380				
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
385					390					395					400
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
				405					410					415	
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
			420					425					430		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
		435					440					445			
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
	450					455									

<210> 5
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 1 LC

<400> 5

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

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

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 6

<211> 452

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 2 HC

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Pro Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Leu Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Ala Pro Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275					280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
		355					360					365			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
	370					375					380				
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405					410					415	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
			420					425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
		435					440					445			
Ser	Pro	Gly	Lys												
		450													

<210> 7
 <211> 214
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 2 LC

<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Asn Ser Gln
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8

<211> 453

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 4 HC

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 4 LC

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225				230				235				240			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 300	Gln	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val 355	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met 435	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly His Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 11

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	His	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Gly	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Ser	Phe	Gly	Pro	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 12

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 12

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 13

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 13

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 14
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 15

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Gly	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Ser	Phe	Gly	Ala	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 16

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 16

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Asp Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 17

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 17

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 18
<211> 154
<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Tlc

<400> 18

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn Leu Glu Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly Val Lys Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Cys Ser Pro Gly Ser Asp
145 150

<210> 19

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер (G4S)3

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 20

<211> 453

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 3 HC-A

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

[illegible]

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 3 LC-A

<400> 21

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 22

<211> 463

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 3 HC-B

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His

225		230		235		240									
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245					250					255	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Thr
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
		275					280					285			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	290					295					300				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
305					310					315					320
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325					330					335	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
			340					345					350		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro
		355					360					365			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala
	370					375					380				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405					410					415	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			420					425					430		
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		435					440					445			
His	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
	450					455					460				

<210> 23
 <211> 213
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> используемое для сравнения антитело 3 LC-B

<400> 23

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 24

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Thr Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 25

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Gly	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asn	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Gly	Pro	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Thr Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 26

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 27

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 28
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Phe Ala Gly Asn His Arg Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Gly Lys Met His Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Asp Val Thr Phe Ala Phe Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Trp Pro Gly Glu Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Thr Val Met Gln Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 29

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Phe	Ala	Gly	Asn	His	Arg	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Gly	Lys	Met	His	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asn	Val	Thr	Asp	Val	Thr	Phe	Ala	Phe	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Trp Pro Gly Glu Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Thr Val Met Gln Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 30

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Glu Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

100	105	110
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Thr Val Met Gln		
115	120	125
Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu		
130	135	140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly		
145	150	155
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile		
165	170	175
Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
180	185	190
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
195	200	205
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn		
210	215	220
Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
240	240	
Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp		
245	250	255
Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala		
260	265	270
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
275	280	285
Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp		
290	295	300
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
305	310	315
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
325	330	335
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
340	345	350
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 31

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 32
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225						230						235						240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr			
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val			
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val			
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser			
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320			
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala			
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro			
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln			
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala			
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400			
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu			
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser			
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser			
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly			
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480			
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His			

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Lys Lys Cys
530 535 540

Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Asp Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Leu Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Gly Val Met Gln Asn Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 33

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Val	Ala	Gly	Asn	Trp	Tyr	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Ile	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asn	Val	Thr	Gln	Val	Gly	Phe	Glu	Gln	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Asp Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Leu Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Gly Val Met Gln Asn Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 34
<211> 646
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок hNGAL

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Leu Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 35

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 36
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 300	Gln	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Val Glu Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Val Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Trp Leu Lys Lys Cys
530 535 540

Lys Tyr Asn Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Ala Ile Lys Ser Gly Pro Gly Met Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Thr Val Met Gln Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 37

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe
 245 250 255

His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Glu Ala Gly Asn Val Glu Leu Arg
 260 265 270

Glu Asp Lys Asp Pro Val Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys
 275 280 285

Glu Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Glu Val Arg Phe Trp Leu Lys Lys
 290 295 300

Cys Lys Tyr Asn Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Ala Ile Lys Ser Gly Pro Gly Met Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Thr Val Met Gln Asn Arg Glu Trp Phe Trp Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 38

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Met Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Thr	Val	Met	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Trp	Phe	Trp	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 39

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 40
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Trp Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Ser Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Ile Val Tyr Phe Thr Arg Lys Lys Cys
530 535 540

Ser Tyr Arg Ile Tyr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Pro Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Tyr Gln Asn Arg Glu Trp Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 41

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Trp	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Ile	Lys	Met	Ser	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asn	Val	Thr	Ile	Val	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Ser Tyr Arg Ile Tyr Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Pro Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Tyr Gln Asn Arg Glu Trp Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 42

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Tyr	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Trp	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 43

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 44
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225				230				235				240			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 300	Gln	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val 355	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met 435	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Glu Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Ser Pro Gly Gln Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 45

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Glu	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Gly	Pro	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Ser Pro Gly Gln Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 46

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 46

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Ser Ser Pro Gly Gln Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 47

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 48
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly His Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Glu Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 49

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	His	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Glu	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Ser	Phe	Gly	Pro	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 50

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 50

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Pro Pro Gly Asp Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 51

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 51

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 52
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225				230				235				240			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 300	Gln	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met 435	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Gln Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys
530 535 540

Val Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 53

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Gln	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Gly	Ala	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Val Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 54
<211> 646
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок hNGAL

<400> 54

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

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

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

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

Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Val Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 55

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 55

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

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

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

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

Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Val Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 56
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225						230						235						240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr			
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val			
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val			
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser			
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320			
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala			
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro			
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln			
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala			
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400			
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu			
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser			
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser			
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly			
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480			
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His			

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Ile Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Val Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys
530 535 540

Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Leu Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 57

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Val	Lys	Met	Trp	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Glu	Val	Ser	Phe	Gly	Pro	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Asn Tyr Arg Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gly Ile Lys Ser Leu Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys His Val Leu Gln Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 58
<211> 646
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок hNGAL

<400> 58

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Leu Pro Gly Gly Thr Ser Thr Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	His	Val	Leu	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 59

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 59

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 60
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys
530 535 540

Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asp Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Gly Val Met Gln Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 61

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Val	Ala	Gly	Asn	Trp	Tyr	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Ile	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Gln	Val	Gly	Phe	Glu	Gln	Glu	Lys	290	295	300	

Cys Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asp Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Gly Val Met Gln Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 62

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 62

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asp	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Gln		
		115					120					125					
Asp	Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 63

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 63

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 65 70 75 80

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

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

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

Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 64
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225				230				235				240			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 300	Gln	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met 435	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Val Ala Gly Asn Trp Tyr Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys
530 535 540

Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Asp Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Gly Met Met Gln Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 65

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 65

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Val	Ala	Gly	Asn	Trp	Tyr	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Ile	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Gln	Val	Gly	Phe	Glu	Gln	Glu	Lys	290	295	300	

Cys Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Asp Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Gly Met Met Gln Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 66

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 66

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Met	Met	Gln		
		115					120					125					
Asp	Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 67

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 67

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 65 70 75 80

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

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

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

Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 68
<211> 646
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225	230					235					240				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 245	Val	Phe	Leu	Phe	Pro 250	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 255	Thr
Leu	Met	Ile	Ser 260	Arg	Thr	Pro	Glu	Val 265	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val
Ser	His	Glu 275	Asp	Pro	Glu	Val	Lys 280	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 285	Asp	Gly	Val
Glu	Val 290	His	Asn	Ala	Lys	Thr 295	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser
Thr 305	Tyr	Arg	Val	Val	Ser 310	Val	Leu	Thr	Val	Leu 315	His	Gln	Asp	Trp	Leu 320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 325	Lys	Cys	Lys	Val	Ser 330	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 335	Ala
Pro	Ile	Glu	Lys 340	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 345	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 350	Glu	Pro
Gln	Val	Tyr 355	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 360	Arg	Glu	Glu	Met	Thr 365	Lys	Asn	Gln
Val	Ser 370	Leu	Thr	Cys	Leu	Val 375	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 380	Ser	Asp	Ile	Ala
Val 385	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 390	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 395	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp 405	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 410	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 415	Leu
Thr	Val	Asp	Lys 420	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 425	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 430	Cys	Ser
Val	Met	His 435	Glu	Ala	Leu	His	Asn 440	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 445	Ser	Leu	Ser
Leu	Ser 450	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly 455	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 460	Gly	Gly	Ser	Gly
Gly 465	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp 470	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu 475	Ile	Pro	Ala	Pro	Pro 480
Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	His

485

490

495

Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Met Ala Gly Asn Trp Asp Leu Arg Glu
500 505 510

Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Thr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu
515 520 525

Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Gln Val Ala Phe Glu Gln Lys Lys Cys
530 535 540

Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe
545 550 555 560

Thr Leu Gly Gln Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val
565 570 575

Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys
580 585 590

Gly Val Met Gln Asn Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg
595 600 605

Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser
610 615 620

Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile
625 630 635 640

Asp Gln Cys Ile Asp Gly
645

<210> 69

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СЛИТЫЙ белок hNGAL

<400> 69

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Leu	Ile	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Pro	Leu	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Gln	Gln	Asn	Phe	Gln	Asp	Asn	Gln	Phe	245	250	255	
His	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Val	Gly	Met	Ala	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	260	265	270	
Glu	Asp	Lys	Asp	Pro	Ile	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Ile	Tyr	Glu	Leu	Lys	275	280	285	
Glu	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Val	Thr	Gln	Val	Ala	Phe	Glu	Gln	Lys	Lys	290	295	300	

Cys Lys Tyr Ser Ile His Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Gly Gln Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu
325 330 335

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
340 345 350

Lys Gly Val Met Gln Asn Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly
355 360 365

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
370 375 380

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
385 390 395 400

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
405

<210> 70

<211> 646

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 70

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Ala Phe Glu Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Trp Pro Gly Asp Thr Ser Pro Leu Val Arg Val Val Ser

			100					105					110				
Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	His	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Gln		
		115					120					125					
Asn	Arg	Glu	Val	Phe	Ala	Ile	Thr	Leu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Lys	Glu	Leu		
	130					135					140						
Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Gly		
145					150					155					160		
Leu	Pro	Glu	Asn	His	Ile	Val	Phe	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Gln	Cys	Ile		
				165					170					175			
Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
			180					185					190				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn		
	210					215					220						
Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp		
225					230					235					240		
Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala		
			260					265					270				
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp		
	290					295					300						
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
				325					330					335			
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
			340					345					350				
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		

355

360

365

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 370 375 380

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 385 390 395 400

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 405 410 415

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 420 425 430

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 435 440 445

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 450 455 460

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 465 470 475 480

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 485 490 495

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 500 505 510

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 515 520 525

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 530 535 540

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 545 550 555 560

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 565 570 575

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 580 585 590

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 595 600 605

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

610

615

620

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 625 630 635 640

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 645

<210> 71

<211> 407

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок hNGAL

<400> 71

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Ala Phe Glu Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
195 200 205

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
210 215 220

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
225 230 235 240

Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
260 265 270

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro
275 280 285

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
290 295 300

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
305 310 315 320

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
325 330 335

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
340 345 350

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
355 360 365

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
370 375 380

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
385 390 395 400

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
405

<210> 72
<211> 534
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 72

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcccaagc cggaaattac	120
atcctgctgtg aggataagga tccgggaaaa atgtgggcga ccattttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cggagtgagc tttggacctt agaaatgcaa ttacaccatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcggaat taaaagtcct	300
ccgggcgga catcaacctt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agcacgtgct gcagaaccgc gagttctttg agatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttttcaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 73

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 73

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcttcgc cggaaatcac	120
cgtctgctgtg aggataagga tccgggaaaa atgcacgcga ccattttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgacgtgacc tttgcattca agaaatgcaa ttaccgtatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaatat taaaagttgg	300
ccgggcgaga catcaacctt ggtccgctc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agaccgtgat gcagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttttcaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 74

<211> 534

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 74

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
--	----

aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcggttc cggaattgg	120
tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac ccaagtggga tttgagcaaa agaaatgcaa atacagcatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taaaagttgg	300
ccgggcgaca catcactggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agggagtgat gcagaaccgc gaggtttttg caatcacact gtacggggcg	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttttcaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 75
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 75	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcgaggc cggaattggt	120
gagctgcgtg aggataagga tccggttaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac cgaggtgcgt ttttggctga agaaatgcaa atacaatatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgcaat taaaagtggg	300
ccgggcatga catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agaccgtgat gcagaaccgc gagtggtttt ggatcacact gtacggggcg	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gctttttcaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 76
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 76	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggccaagc cggaatttac	120
tggctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgtctgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat ataacgtcac catcgtgtac tttaccgta agaaatgcag ctaccgtatt	240
tacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcctat taaaagttac	300

ccgggcgaca catcaacctt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agcacgtgta ccagaaccgc gagtgggttg agatcacact gtacggggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 77
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 77	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat	120
attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgggggtgtcg tttgggccta agaaatgcaa ttacaggatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagttct	300
ccgggctaga catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacggggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 78
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 78	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcatgc cggaaattat	120
attctgcgtg aggataagga tccggagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtct tttgggccga agaaatgcaa ttacaggatt	240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggtat taaaagtcct	300
ccgggcgata catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgtttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacggggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 79
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 79
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcaggc cggaaattat 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtcg tttggggcta agaaatgcaa ttacaggatt 240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggtat taaaagtgat 300
ccgggcggga catcaacggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 80
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 80
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag ttgggcatgc cggaaattat 120
attctgcgtg aggataagga tccggggaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgagggtgtct tttgggccta agaaatgcaa ttacaggatt 240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggtat taaaagtccg 300
ccgggcggta catcaacggt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 81
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 81
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tgggtacgtag ttgggcaggc cggaaattat 120
attctgcgtg aggataagga tccgtagaaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgggtgtgtct tttggggcta agaaatgcgt ttacaggatt 240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggtat taaaagtccg 300
ccgggcggta catcaacgtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 82
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 82
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tgggtacgtag ttgggcaggc cggaaattat 120
attctgcgtg aggataagga tccgggttaa atgtgggcga ccatttacga gttgaaagaa 180
gataaatcat atgacgtcac cgaggtgtct tttggtccta agaaatgcaa ttacaggatt 240
tggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgggat taaaagtctt 300
ccgggcggta catcaacttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg 360
gtgtttcttca agcatgtgct tcagaaccgc gagttttttg agatcacact gtacgggcgc 420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 83
<211> 534
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 83
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tgggtatgtcg tgggcgttgc cggaaattgg 120
tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcaacat taaaagttgg	300
ccgggcgaca catcaccggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacgacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggagtgat gcaggatcgc gaggtttttg caatcacact gtacggggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 84
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 84	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggatatgtcg tgggcggtgc cggaaattgg	120
tacctgcgtg aggataagga tccgatcaaa atgaccgcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac ccaagtggga tttgagcaag agaaatgcaa atacagcatt	240
cacacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggcgacat taagagttgg	300
ccgggcgaca catcaccggtt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca agggaatgat gcaggaccgc gaggtttttg caatcacact gtacggggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc	534

<210> 85
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Мутеин hNGAL

<400> 85	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccatgggaaa tggtagctag taggtatggc cggaaattgg	120
gatctgcgtg aggataagga tccgattaaa atgacggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac ccaggtggcg tttgagcaga agaaatgcaa gtactcgatt	240
catacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggctagat taaaagttgg	300
ccgggcgata catcaccttt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggggggtgat gcagaaccgc gaggtgtttg ctatcacact gtacggggcgc	420

acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc 480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggc 534

<210> 86
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 87

<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 88
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 89

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 90
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 90

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

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

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Tyr Trp Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 91

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 92

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 92

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gly

85

90

95

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 93

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 93

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

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

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

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

Asp Val Thr Gly Val Ser Phe Gly Ala Lys Lys Cys Val Tyr Arg Ile
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 94

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 94

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

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

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

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

Asp Val Thr Glu Val Ser Phe Gly Pro Lys Lys Cys Asn Tyr Arg Ile
65 70 75 80

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

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

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

Asn Arg Glu Phe Phe Glu Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130

135

140

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

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

Asp Gly

<210> 95

<211> 178

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутеин hNGAL

<400> 95

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
 65 70 75 80

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

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

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

Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140

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

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

Asp Gly

<210> 96
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 96

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Gly Phe Glu Gln Glu Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

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

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

Asp Arg Glu Val Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

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

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

Asp Gly

<210> 97
<211> 178
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутеин hNGAL

<400> 97

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

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

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

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

Asp Val Thr Gln Val Ala Phe Glu Gln Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

Asp Gly

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый полипептид, содержащий первую субъединицу и вторую субъединицу, где первая субъединица состоит из иммуноглобулина или его антигенсвязывающего домена, специфичных в отношении VEGF-A, где вторая субъединица состоит из мутеина липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов человека (hNGAL), специфичного в отношении Ang-2.
2. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.
3. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен связывать VEGF-A со значением EC50, составляющим приблизительно 200 пМ или меньше.
4. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.
5. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен связывать Ang-2 со значением EC50, составляющим приблизительно 250 пМ или меньше.
6. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1 нМ или меньше.
7. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая VEGF-A, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 500 пМ или меньше.
8. Слитый полипептид по п. 1, где слитый полипептид способен одновременно связывать VEGF-A и Ang-2, при этом субъединица, связывающая Ang-2, может связывать свою мишень со значением EC50, составляющим приблизительно 1,5 нМ или меньше.

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

10. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит один или более подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL.

11. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Leu 36 → Gln, Glu, His, Val, Met или Phe; Ala 40 → Val, Tyr, His или Trp; Ile 41 → His, Tyr, Trp или Val; Gln 49 → Gly, Ile, Val, Glu или Val; Tyr 52 → Trp, His, Thr или Ser; Ser 68 → Gly, Asp, Gln, Glu или Ile; Leu 70 → Ser, Thr, Gly, Arg, Tyr или Ala; Arg 72 → Gly, Ala, Trp, Thr или Glu; Lys 73 → Pro, Phe, Leu, Arg, Ala или Gln; Asp 77 → Asn, Lys, Ser или Val; Trp 79 → Thr, Arg, Ser или Asn; Arg 81 → Trp, His или Tyr; Asn 96 → Gly, Ala, Pro, Gln или Asp; Tyr 100 → Pro, Trp, Gly, Ser, Leu или Asp; Leu 103 → Gly, Glu, Asp, Met или Gln; Tyr 106 → Thr, Leu или Phe; Lys 125 → His, Thr или Gly; Ser 127 → Leu или Met; Tyr 132 → Phe, Trp или Val и Lys 134 → Ala, Glu или Trp.

12. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин предусматривает один из следующих наборов подвергнутых мутации аминокислотных замен по сравнению с линейной полипептидной последовательностью зрелого hNGAL: Gln28 → His; Asn 65 → Asp; Lys 74 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 116 → Asp; Val 126 → Met и Asn 129 → Asp.

13. Слитый полипептид по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутеин содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20 или 21 подвергнутых мутации аминокислотных остатков в положениях последовательности 28, 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 116, 125, 126, 127, 129, 132 и 134 линейной полипептидной последовательности зрелого hNGAL (SEQ ID NO: 1).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr 132 → Val; Lys 134 → Ala;

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

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

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

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

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

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

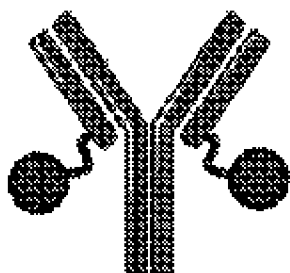
18. Слитый полипептид по п. 17, где моноклональное антитело содержит области тяжелой цепи, определяющие комплементарность (CDR), которые

содержатся в тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8, и CDR легкой цепи, которые содержатся в легкой цепи под SEQ ID NO 9.

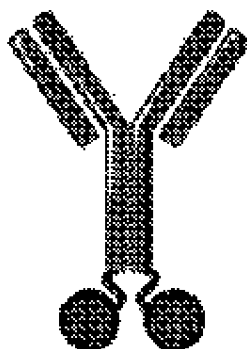
19. Слитый полипептид по п. 17, где моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб.

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

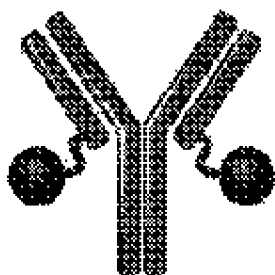
Фигура 1



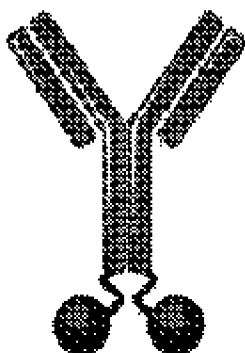
SEQ ID NO: 8 и 11



SEQ ID NO: 9 и 10

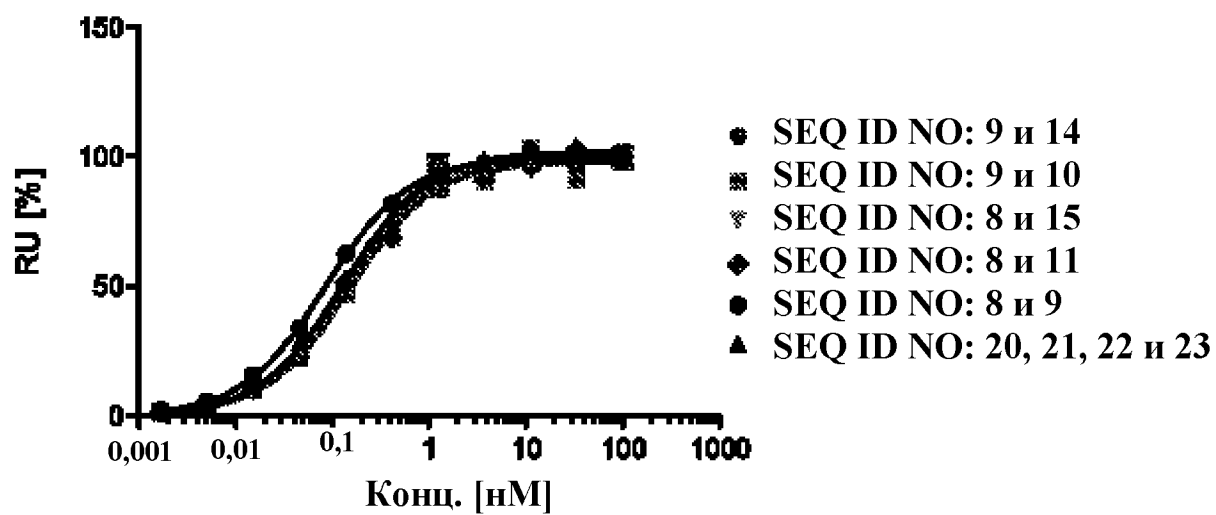


SEQ ID NO: 8 и 15

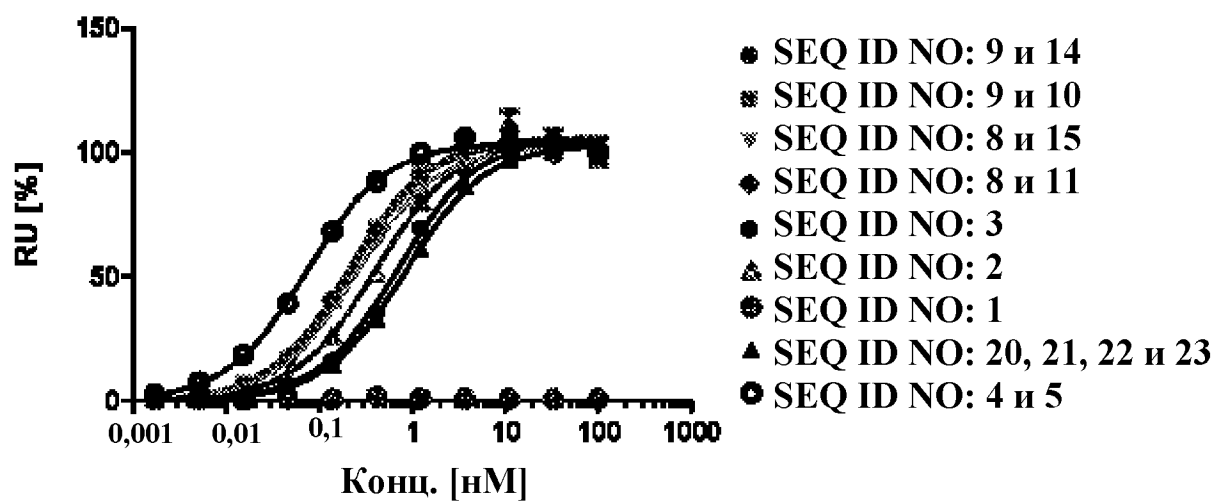


SEQ ID NO: 9 и 14

Фигура 2

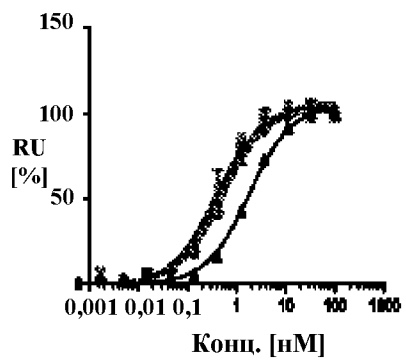


Фигура 3



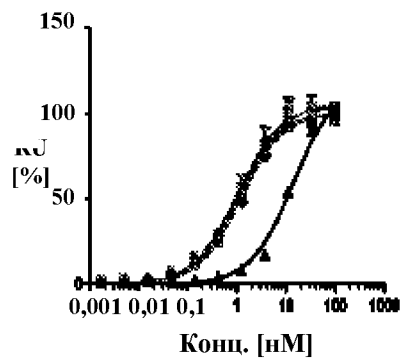
Фигура 4

А-



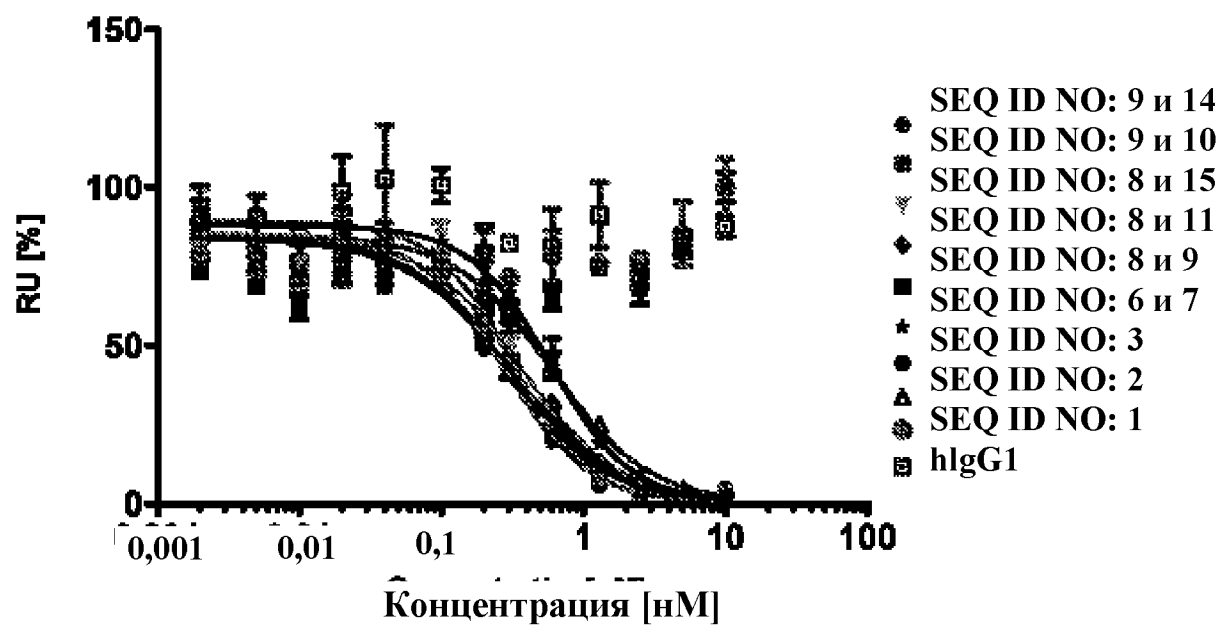
* SEQ ID NO: 9 и 14
* SEQ ID NO: 9 и 10
* SEQ ID NO: 8 и 15
* SEQ ID NO: 8 и 11
* SEQ ID NO: 20, 21,
22 и 23

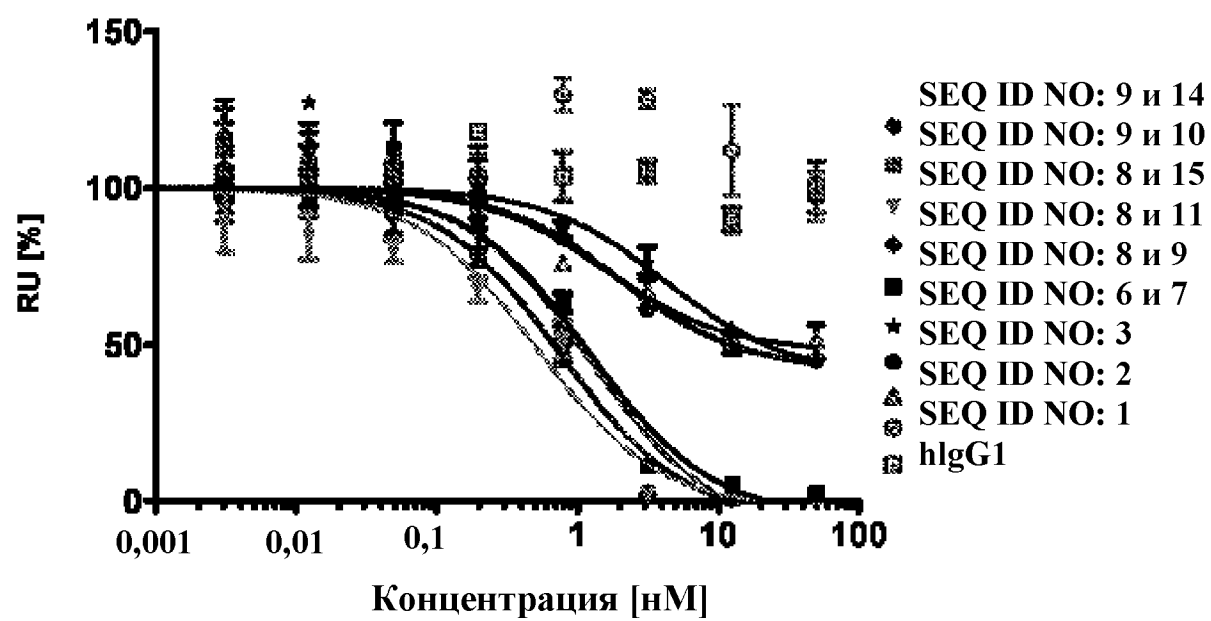
В-



* SEQ ID NO: 9 и 14
* SEQ ID NO: 9 и 10
* SEQ ID NO: 8 и 15
* SEQ ID NO: 8 и 11
* SEQ ID NO: 20, 21,
22 и 23

Фигура 5





Фигура 7

