

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2015142437, 13.03.2014

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

14.03.2013 US 61/781,511;

04.07.2013 EP 13175023.4

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2017 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 14.10.2015

(86) Заявка РСТ:

EP 2014/055013 (13.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2014/140210 (18.09.2014)

Адрес для переписки:

123242, Москва, пл. Кудринская, д. 1, а/я 35,
"Михайлюк, Сороколат и партнеры - патентные
поверенные"

(71) Заявитель(и):

ДАЙИТИ САНКИО КО., ЛТД (JP)

(72) Автор(ы):

МАЧИНЕР Габриеле (DE),**РОТЕ** Кристине (DE),**ХОЛБАУМ** Андреас (BE),**БЕЛ АЙБА** Рачида Сихам (DE),**ХИННЕР** Марлон (DE),**АЛЛЕРСДОРФЕР** Андреа (DE),**ЛУНДЕ** Брэдли (DE),**ВИДЕНМАН** Александер (DE),**ЯМАГУТИ** Синдзи (JP),**АБУРАТАНИ** Такахидэ (JP),**ХАСИМОТО** Рюдзи (JP),**ТАКАХАСИ** Тохру (JP),**НАГАСАКИ** Тикако (JP),**НАРА** Футоси (JP),**НИСИЗАВА** Томохиро (JP)(54) **НОВЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ДЛЯ PCSK9**

(57) Формула изобретения

1. Мутеин липокалина слезной жидкости человека, где мутеин содержит:

(a) мутированный аминокислотный остаток в любом или нескольких из положений последовательности 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 и 108 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека и

(b) мутированный аминокислотный остаток в любом или нескольких из положений последовательности 61, 101, 111, 114 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека,

при этом мутеин специфически связывается с PCSK9.

2. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с PCSK9 любого примата за исключением человека или ее иммуногенным фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 10 нМ.

3. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с мышшиной PCSK9 или ее иммуногенным фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 10 нМ.

4. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с человеческой PCSK9 или ее фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 10 нМ.

5. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с человеческой PCSK9 или ее фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 1 нМ.

6. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с человеческой PCSK9 или ее фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 0,1 нМ.
7. Мутеин липокалина по п. 1, где мутеин связывается с человеческой PCSK9 или ее фрагментом с константой диссоциации (KD), равной или менее чем 1 пМ.
8. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Arg 26 → Ser, Phe, Trp, His или Thr.
9. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Glu 34 → Asn, Thr, Arg или Gly, Leu 56 → Met, Ser, Gln, Phe, His или Asn.
10. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Ser 58 → Lys, Ala, Arg, Trp или Pro.
11. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Met 31 → Ala, Gly, His, Pro, Ser, Asp, Glu или Gln.
12. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Leu 33 → Tyr, Trp, Tyr, Phe, Pro или Ala.
13. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Ser 61 → Trp или Phe, Asp 80 → Ser, Met, Pro, Ile, Gln, Tyr, Ser, Val или Thr.
14. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Glu 104 → Leu, Pro, Ser, Ala, Asn, Thr, Lys или Asp.
15. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: His 106 → Pro, Gln, Gly, Arg, Val, Thr, Asn или Leu.
16. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Lys 108 → Gln, Ala, Trp, Tyr, Arg, Asp, Asn, Ser, Glu или Thr.
17. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Glu 27 → Arg, Ser, Gln, Thr, Phe, Lys, Ala или Arg.
18. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Pro 29 → Gly, Asp, Asn, Ile, Leu или Met.
19. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Asn 32 → Ile, Leu, Tyr, Met или Trp.
20. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Leu 105 → Cys, Tyr, Trp, Glu, Arg, Ser, His, Ala, Val, Asp, Pro, Gly или Lys.
21. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Phe 28 → Cys, Arg, Lys, Trp, Asp, Gly, His, Leu или Asn.
22. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Glu 30 → Arg, Asp, Thr, Ser, Gly, Ala или Asn.
23. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих

аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Ile 57 → Tyr, Trp, His, Gln, Thr или Arg.

24. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Lys 83 → Arg, Ser, Gln, Thr или Glu.

25. Мутеин по п. 1, содержащий один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека:

- (a) Arg 26 → Phe; Asn 32 → Ile; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Met; Ser 58 → Ala и Lys 83 → Ser,
- (b) Arg 26 → Trp; Asn 32 → Leu; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Ser и Ser 58 → Ala,
- (c) Arg 26 → His; Asn 32 → Tyr; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Ser; Ser 58 → Arg и Lys 83 → Gln;
- (d) Arg 26 → Phe; Asn 32 → Met; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Ala и Lys 83 → Thr;
- (e) Asn 32 → Trp; Glu 34 → Arg; Leu 56 → Asn; Ser 58 → Trp и Lys 83 → Ser,
- (f) Arg 26 → Phe; Asn 32 → Leu; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Phe; Ser 58 → Ala и Lys 83 → Arg,
- (g) Arg 26 → Thr; Asn 32 → Trp; Glu 34 → Asn; Leu 56 → His; Ser 58 → Pro и Lys 83 → Ser,
- (h) Asn 32 → Trp; Glu 34 → Asn; Leu 56 → Phe; Ser 58 → Arg и Lys 83 → Glu,
- (i) Arg 26 → Trp; Asn 32 → Leu; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Met; Ser 58 → Ala и Lys 83 → Ser или
- (j) Asn 32 → Trp; Glu 34 → Gly; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Ala и Lys 83 → Gln.

26. Мутеин по п. 1, содержащий один из следующих наборов аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека:

- (a) Glu 27 → Ser; Phe 28 → Arg; Pro 29 → Gly; Glu 30 → Asp; Met 31 → Ala; Leu 33 → Trp; Ile 57 → Tyr; Asp 80 → Met; Glu 104 → Pro; Leu 105 → Tyr; His 106 → Gln; Lys 108 → Ala,
- (b) Glu 27 → Gln; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Asp; Glu 30 → Thr; Met 31 → Gly; Leu 33 → Trp; Ile 57 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Gly; Lys 108 → Trp,
- (c) Glu 27 → Glu; Phe 28 → Trp; Pro 29 → Asn; Glu 30 → Gly; Met 31 → His; Leu 33 → Tyr; Ile 57 → Tyr; Asp 80 → Pro; Glu 104 → Ser; Leu 105 → Trp; His 106 → Pro; Lys 108 → Tyr,
- (d) Glu 27 → Thr; Phe 28 → Asp; Pro 29 → Asn; Glu 30 → Ser; Met 31 → Pro; Leu 33 → Phe; Ile 57 → Tyr; Asp 80 → Ile; Glu 104 → Ala; Leu 105 → Glu; His 106 → Arg; Lys 108 → Arg,
- (e) Glu 27 → Phe; Phe 28 → Lys; Pro 29 → Ile; Glu 30 → Ala; Met 31 → Ser; Leu 33 → Pro; Ile 57 → Trp; Asp 80 → Gln; Glu 104 → Asn; Leu 105 → Arg; His 106 → Gln; Lys 108 → Asp,
- (f) Glu 27 → Lys; Phe 28 → Gly; Pro 29 → Pro; Glu 30 → Thr; Met 31 → Pro; Leu 33 → Trp; Ile 57 → His; Asp 80 → Tyr; Glu 104 → Ala; Leu 105 → Ser; His 106 → Val; Lys 108 → Asn,
- (g) Glu 27 → Glu; Phe 28 → His; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Ala; Met 31 → Asp; Leu 33 → Ala; Ile 57 → Gln; Asp 80 → Ile; Glu 104 → Ala; Leu 105 → Tyr; His 106 → Pro; Lys 108 → Ser,
- (h) Glu 27 → Ala; Phe 28 → Asp; Pro 29 → Met; Glu 30 → Gly; Met 31 → Asp; Leu 33 → Pro; Ile 57 → Thr; Asp 80 → Thr; Glu 104 → Thr; His 106 → Thr; Lys 108 → Arg,

(i) Glu 27 → Arg; Phe 28 → Leu; Pro 29 → Asp; Glu 30 → Asn; Met 31 → Glu; Leu 33 → Trp; Ile 57 → Tyr; Asp 80 → Gln; Glu 104 → Pro; Leu 105 → Arg; His 106 → Asn; Lys 108 → Ala,

(j) Glu 27 → Lys; Phe 28 → Asn; Pro 29 → Met; Glu 30 → Gly; Met 31 → Gln; Leu 33 → Pro; Ile 57 → Arg; Asp 80 → Ile; Glu 104 → Asp; Leu 105 → Arg; His 106 → Leu; Lys 108 → Thr или

(k) Glu 27 → Ser; Phe 28 → Arg; Pro 29 → Gly; Glu 30 → Asp; Met 31 → Ala; Leu 33 → Trp; Ile 57 → Tyr; Asp 80 → Met; Glu 104 → Pro; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Ala.

27. Мутеин по п. 1, содержащий следующую комбинацию аминокислотных замен: Arg 26 → Phe; Glu 27 → Ser; Phe 28 → Arg; Pro 29 → Gly; Glu 30 → Asp; Met 31 → Ala; Asn 32 → Ile; Leu 33 → Trp; Glu 34 → Thr; Leu 56 → Met; Ile 57 → Tyr; Ser 58 → Ala; Lys 83 → Ser; Glu 104 → Pro и Lys 108 → Thr по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека.

28. Мутеин по п. 27, дополнительно содержащий одну или несколько из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Thr 43 → Ile или Ala, Glu 45 → Gly, Asn 48 → Gly, Glu 63 → Gly, Ala 66 → Val, Glu 69 → Val, Lys 70 → Arg, Ala 79 → Thr, Met или Val, Asp 80 → Met или Ser, Gly 82 → Ser, His 84 → Gln, Val 85 → Gly, Tyr 87 → Ser, Ile 88 → Thr или Leu, His 92 → Pro, Leu 105 → His, Gly или Tyr и His 106 → Gln или Arg.

29. Мутеин по п. 1, содержащий следующую комбинацию аминокислотных замен: Glu 27 → Phe; Phe 28 → Lys; Pro 29 → Ile; Asn 32 → Trp; Leu 33 → Pro; Glu 34 → Arg; Leu 56 → Asn; Ile 57 → Trp; His 106 → Gln и Lys 108 → Glu по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека.

30. Мутеин по п. 29, дополнительно содержащий одну или несколько из следующих аминокислотных замен по сравнению со зрелым липокалином слезной жидкости человека: Glu 43 → Gly или Ala, Glu 45 → Gly, Ser 58 → Trp или Arg, Glu 63 → Asp, Glu 69 → Gly, Lys 70 → Arg, Asp 80 → Gln, Val или Thr, Gly 82 → Asp, Lys 83 → Ser или Arg, Ala 86 → Glu или Ser, Phe 99 → Leu, Glu 102 → Lys или Val, Glu 104 → Asn или Lys и Pro 106 → Thr.

31. Мутеин по п. 1, где мутеин содержит аминокислотную замену нативной аминокислоты остатком цистеина в положениях 28 или 105 относительно аминокислотной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека.

32. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет по меньшей мере 75% идентичности с последовательностью зрелого липокалина слезной жидкости человека.

33. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 3-28, 62-71 и 82, или ее фрагмент или вариант.

34. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 23, или ее фрагмент или вариант.

35. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 13, или ее фрагмент или вариант.

36. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 20, или ее фрагмент или вариант.

37. Мутеин по п. 1, где мутеин имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 22, или ее фрагмент или вариант.

38. Мутеин по п. 1, где мутеин конъюгирован с фрагментом-меткой.

39. Мутеин по п. 1, где мутеин конъюгирован с фрагментом, который может нацеливать на конкретные область тела, организм, ткань, орган или клетку в субъекте.

40. Мутеин по п. 1, где мутеин конъюгирован с фрагментом, который может продлить период полужизни мутеина в сыворотке.

41. Мутеин по п. 1, где мутеин конъюгирован с молекулой полиалкиленгликоля.
42. Конъюгированный мутеин по п. 41, где конъюгированный мутеин содержит аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 30-32.
43. Мутеин по п. 1, где мутеин конъюгирован с альбумин-связывающим белком.
44. Конъюгированный мутеин по п. 43, где конъюгированный мутеин содержит аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 83-84.
45. Мутеин по п. 1, где мутеин гибридизирован с фрагментом, который может придавать новые характеристики гибриду.
46. Мутеин липокалина, который представляет собой антагонист PCSK9.
47. Мутеин липокалина, который конкурирует за связывание LDL-R с PCSK9.
48. Мутеин липокалина, который конкурирует за связывание моноклонального антитела, содержащего SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 33, с PCSK9.
49. Мутеин липокалина, который способен полностью или частично ингибировать PCSK9-опосредованную понижающую регуляцию LDL-R.
50. Мутеин липокалина, который способен восстанавливать захват LDL в присутствии PCSK9.
51. Способ создания одного или нескольких мутеинов липокалина слезной жидкости человека, где один или несколько мутеинов связываются с PCSK9, включающий:
 - (а) подвергание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей липокалин слезной жидкости человека, мутагенезу в:

(i) любом одном или нескольких из положений аминокислотной последовательности 26-34, 56-58, 80, 83, 104-106 и 108 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека и

(ii) любом одном или нескольких из положений аминокислотной последовательности 61, 101, 111, 114 и 153 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека,

тем самым получая одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько мутеинов липокалина слезной жидкости человека,

(b) экспрессирование одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, полученных в (а), в системе экспрессии, тем самым получая один или несколько мутеинов липокалина слезной жидкости человека, и

(с) дополнительный отбор одного или нескольких мутеинов, полученных в (b).

52. Способ по п. 51, где этап (с) дополнительно включает:

(ci) получение PCSK9 или ее иммуногенного фрагмента,

(cii) приведение одного или нескольких мутеинов, полученных в ходе отбора, в контакт с PCSK9 или ее иммуногенным фрагментом, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между PCSK9 или ее иммуногенным фрагментом и мутеином, имеющим по отношению к ним аффинность связывания, и

(cii) удаление одного или нескольких мутеинов, не имеющих никакой или не имеющих существенной аффинности связывания.

53. Способ по п. 51 или 52, где отбор на этапе (с) выполняют в конкурентных условиях.

54. Способ по п. 51 или 52, где этап (а) дополнительно включает: (a)(iii) подвергание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей липокалин слезной жидкости человека, мутагенезу в любом одном или нескольких из положений аминокислотной последовательности 79, 92 и 105 линейной полипептидной последовательности зрелого липокалина слезной жидкости человека.

55. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин по любому из пп. 1-50.

56. Молекула нуклеиновой кислоты, изложенная в любой из SEQ ID NO: 36-61, 72-

81 и 86-89.

57. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 55 или 56.

58. Применение мутеина по любому из пп. 1-50 для связывания PCSK9 у субъекта.

59. Применение мутеина по любому из пп. 1-50 для ингибирования связывания PCSK9 с LDL-R у субъекта.

60. Применение мутеина по любому из пп. 1-50 для обнаружения PCSK9, включающее:

(а) приведение мутеина в контакт с тестируемым образцом, предположительно содержащим PCSK9, в подходящих условиях, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между мутеином и PCSK9 или ее доменом или фрагментом, и
(b) обнаружение комплекса с помощью подходящего сигнала.

61. Применение мутеина по любому из пп. 1-50 для выделения PCSK9, включающее:

(а) приведение мутеина в контакт с образцом, предположительно содержащим PCSK9, в подходящих условиях, тем самым обеспечивая возможность образования комплекса между мутеином и PCSK9 или ее доменом или фрагментом, и
(b) выделение комплекса из образца.

62. Применение мутеина по любому из пп. 1-50 для нацеливания соединения на предварительно выбранные организм, ткань, орган или клетку, подлежащие обработке соединением, включающее этапы:

(а) конъюгирования мутеина с указанным соединением и
(b) доставки комплекса мутеин/соединение в предварительно выбранные организм, ткань, орган или клетку.

63. Набор, содержащий мутеин по любому из пп. 1-50.

A
2
0
1
5
1
4
2
4
3
7
A
R
U

R
U
2
0
1
5
1
4
2
4
3
7
A