

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成29年4月13日(2017.4.13)

【公表番号】特表2016-519051(P2016-519051A)

【公表日】平成28年6月30日(2016.6.30)

【年通号数】公開・登録公報2016-039

【出願番号】特願2015-562159(P2015-562159)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/50 (2017.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/435 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 47/48

A 6 1 P 9/10

C 4 0 B 40/08

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月9日(2017.3.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)成熟ヒト涙液リボカリンの直線状ポリペプチド配列 (SEQ ID NO: 1) の配列位置26 ~ 34、56 ~ 58、80、83、104 ~ 106、および108のうちのいずれか1つまたは複数における変異したアミノ酸残基、ならびに

(b)成熟ヒト涙液リボカリンの直線状ポリペプチド配列 (SEQ ID NO: 1) の配列位置61、101、111、114、および153のうちのいずれか1つまたは複数における変異したアミノ酸残基

を含み、かつPCSK9に特異的に結合する、ヒト涙液リポカリンのムテイン。

【請求項2】

PCSK9のアンタゴニストであり、

PCSK9へのLDL-Rの結合に関して競合的であり、

PCSK9への、SEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 33を含むモノクローナル抗体の結合に関して競合的であり、

PCSK9の媒介によるLDL-Rの下方調節を全面的にもしくは部分的に阻害でき、または

PCSK9の存在下でLDL取込みを回復させることができる、

請求項1に記載のリポカリンムテイン。

【請求項3】

10nM以下の解離定数(K_D)でヒト以外の霊長類のPCSK9またはその免疫原性断片、

10nM以下の解離定数(K_D)でマウスPCSK9もしくはその免疫原性断片、または

10nM以下、1nM以下、0.1nM以下、もしくは1pM以下の解離定数(K_D)でヒトPCSK9またはその断片

に結合する、請求項1または2に記載のリポカリンムテイン。

【請求項4】

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、以下のアミノ酸置換：

Arg26 Ser、Phe、Trp、His、もしくはThr、

Glu34 Asn、Thr、Arg、もしくはGly、

Leu56 Met、Ser、Gln、Phe、His、もしくはAsn、

Ser58 Lys、Ala、Arg、Trp、もしくはPro、

Met31 Ala、Gly、His、Pro、Ser、Asp、Glu、もしくはGln、

Leu33 Tyr、Trp、Tyr、Phe、Pro、もしくはAla、

Ser61 TrpまたはPhe、

Asp80 Ser、Met、Pro、Ile、Gln、Tyr、Ser、Val、もしくはThr、

Glu104 Leu、Pro、Ser、Ala、Asn、Thr、Lys、もしくはAsp、

His106 Pro、Gln、Gly、Arg、Val、Thr、Asn、もしくはLeu、

Lys108 Gln、Ala、Trp、Tyr、Arg、Asp、Asn、Ser、Glu、もしくはThr、

Glu27 Arg、Ser、Gln、Thr、Phe、Lys、Ala、もしくはArg、

Pro29 Gly、Asp、Asn、Ile、Leu、もしくはMet、

Asn32 Ile、Leu、Tyr、Met、もしくはTrp、

Leu105 Cys、Tyr、Trp、Glu、Arg、Ser、His、Ala、Val、Asp、Pro、Gly、もしくはLy

s、

Phe28 Cys、Arg、Lys、Trp、Asp、Gly、His、Leu、もしくはAsn、

Glu30 Arg、Asp、Thr、Ser、Gly、Ala、もしくはAsn、

Ile57 Tyr、Trp、His、Gln、Thr、もしくはArg、または

Lys83 Arg、Ser、Gln、Thr、もしくはGlu

のうちの少なくとも1つを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項5】

(I)成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換の以下のセットのうちの1つ：

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

または、

(II) 成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下のセットのうちの1つ：

- (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 → Tyr; His 106 → Gln; Lys 108 → Ala,
- (l) 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,
- (m) 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,
- (n) 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,
- (o) 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,
- (p) 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,
- (q) 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,
- (r) 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,
- (s) 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,
- (t) 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, または
- (u) 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

または、

(III) 成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下の組合せ：

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 および Lys 108 →
 Thr

、好ましくはさらに、成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、以下のアミノ酸置換：

Thr 43 → Ile または Ala,

Glu 45 → Gly, Asn 48 → Gly, Glu 63 → Gly, Ala 66 → Val, Glu 69 → Val, Lys 70 →
 Arg, Ala 79 → Thr, Met または Val, Asp 80 → Met または Ser, Gly 82 → Ser, His 84 → Gln, Val
 85 → Gly, Tyr 87 → Ser, Ile 88 → Thr または Leu, His 92 → Pro, Leu 105 → His, Gly または
 Tyr および His 106 → Gln または Arg

のうちの1つまたは複数、

または(IV) 成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下の組合せ：

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 および

Lys 108 → Glu

、好ましくはさらに、成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、以下のアミノ酸置換：

Glu 43 → Gly または

Ala, Glu 45 → Gly, Ser 58 → Trp または Arg, Glu 63 → Asp, Glu 69 → Gly, Lys 70 →
 Arg, Asp 80 → Gln, Val または Thr, Gly 82 → Asp, Lys 83 → Ser または Arg, Ala 86 → Glu または
 Ser, Phe 99 → Leu, Glu 102 → Lys または Val, Glu 104 → Asn または Lys および Pro 106 → Thr

のうちの1つまたは複数

を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項6】

成熟ヒト涙液リボカリンのアミノ酸配列に対して、位置28または位置105におけるシス
 テイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を含み、または成熟ヒト涙液リボカ
 リンの配列に対して少なくとも75%の同一性を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載
 のムテイン。

【請求項7】

SEQ ID NO: 3～28、62～71、および82のいずれか1つに示すアミノ酸配列またはその断
 片もしくは変種のアミノ酸配列、

SEQ ID NO: 23に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列、

SEQ ID NO: 13に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列、

SEQ ID NO: 20に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列、また
 は

SEQ ID NO: 22に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列
 を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項8】

標識部分にコンジュゲートされている、

対象の内部の特定の身体領域、生物、組織、器官、または細胞を標的とすることができ
 る部分にコンジュゲートされている、

ムテインの血清半減期を延ばすことができる部分にコンジュゲートされている、

ポリアルキレングリコール分子にコンジュゲートされており、好ましくはSEQ ID NO: 3
 0～32のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含む、

アルブミン結合タンパク質にコンジュゲートされており、好ましくはSEQ ID NO: 83～84のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含む、または
融合物に新しい特徴を与えることができる部分に融合されている、
請求項1～7のいずれか一項に記載のムテイン。

【請求項9】

PCSK9に結合する、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインを作製する方法であって、

(a) ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子を、

(i) 成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26～34、56～58、80、83、104～106、および108のうちのいずれか1つまたは複数、ならびに

(ii) 成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置61、101、111、114、および153のうちのいずれか1つまたは複数

における変異誘発に供し、それによって、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインをコードする1種または複数種の核酸分子を得る段階、

(b) (a)で得られた1種または複数種の核酸分子を発現系において発現させ、それによって、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインを得る段階、ならびに

(c) (b)で得られた1種または複数種のムテインをさらに選択する段階

を含む方法。

【請求項10】

(I) 段階(c)が、

(ci) PCSK9またはその免疫原性断片を提供する段階、

(cii) 選択によって得られた1種または複数種のムテインをPCSK9またはその免疫原性断片と接触させ、それによって、PCSK9またはその免疫原性断片とそれに対する結合親和性を有するムテインとの複合体の形成を可能にする段階、および

(ciii) 結合親和性を有していない、または実質的な結合親和性を有していない、1種または複数種のムテインを除去する段階

をさらに含む、

(II) 段階(c)における選択が、競合的条件下で実施され、または

(III) 段階(a)が、

(a) (iii) ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子を、成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置79、92、および105のうちのいずれか1つまたは複数における変異誘発に供する段階

をさらに含む、

請求項9に記載の方法。

【請求項11】

請求項1～8のいずれか一項に記載のムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子またはSEQ ID NO: 36～61、72～81、および86～89のいずれか1つに示す核酸分子。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項13】

対象の中のPCSK9に結合させるための、または

対象におけるLDL-RへのPCSK9の結合を阻害するための、

請求項1～8のいずれか一項に記載のムテインまたはそのようなムテインを含む組成物の使用。

【請求項14】

請求項1～8のいずれか一項に記載のムテインの使用であって、

(I) PCSK9の検出のための、

(a) ムテインを、PCSK9を含むと疑われる試験試料と適切な条件下で接触させ、それによって、ムテインとPCSK9またはそのドメインもしくは断片との複合体の形成を可能にすること、および

(b)適切なシグナルによって複合体を検出すること
を含む使用；

(II)PCSK9の分離のための、

(c)ムテインを、PCSK9を含むことになっている試料と適切な条件下で接触させ、それによ
って、ムテインとPCSK9またはそのドメインもしくは断片との複合体の形成を可能にする
こと、および

(d)試料から複合体を分離すること
を含む使用；または

(III)化合物で処置すべき予め選択された生物、組織、器官、または細胞へとその化合
物を標的指向させるための、

(e)ムテインを前記化合物とコンジュゲートさせること、および

(f)予め選択された生物、組織、器官、または細胞にムテイン/化合物複合体を送達するこ
と
を含む使用。

【請求項 15】

請求項1~8のいずれか一項に記載のムテインを含むキット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

「ベクター」という用語は、本明細書において使用される場合、それが連結されている別の核酸を増殖させることができる核酸分子を意味する。この用語は、自己複製する核酸構造体としてのベクター、ならびに導入された先の宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。ある種のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸配列の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

[本発明1001]

(a)成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列の配列位置26~34、56~58、80、83、104~106、および108のうちのいずれか1つまたは複数における変異したアミノ酸残基、ならびに

(b)成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列の配列位置61、101、111、114、および153のうちのいずれか1つまたは複数における変異したアミノ酸残基を含み、かつPCSK9に特異的に結合する、ヒト涙液リポカリンのムテイン。

[本発明1002]

PCSK9のアンタゴニストであるリポカリンムテイン。

[本発明1003]

PCSK9へのLDL-Rの結合に関して競合的であるリポカリンムテイン。

[本発明1004]

PCSK9への、SEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 33を含むモノクローナル抗体の結合に関して競合的であるリポカリンムテイン。

[本発明1005]

PCSK9の媒介によるLDL-Rの下方調節を全面的にまたは部分的に阻害できるリポカリンムテイン。

[本発明1006]

PCSK9の存在下でLDL取込みを回復させることができるリポカリンムテイン。

[本発明1007]

10nM以下の解離定数(K_D)でヒト以外の霊長類のPCSK9またはその免疫原性断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1008]

10nM以下の解離定数(K_D)でマウスPCSK9またはその免疫原性断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1009]

10nM以下の解離定数(K_D)でヒトPCSK9またはその断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1010]

1nM以下の解離定数(K_D)でヒトPCSK9またはその断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1011]

0.1nM以下の解離定数(K_D)でヒトPCSK9またはその断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1012]

1pM以下の解離定数(K_D)でヒトPCSK9またはその断片に結合する、本発明1001~1006のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1013]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Arg26 Ser、Phe、Trp、His、またはThrのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1014]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Glu34 Asn、Thr、Arg、またはGly、Leu56 Met、Ser、Gln、Phe、His、またはAsnのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1015]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Ser58 Lys、Ala、Arg、Trp、またはProのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1016]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Met31 Ala、Gly、His、Pro、Ser、Asp、Glu、またはGlnのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1017]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Leu33 Tyr、Trp、Tyr、Phe、Pro、またはAlaのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1018]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Ser61 TrpまたはPhe、Asp80 Ser、Met、Pro、Ile、Gln、Tyr、Ser、Val、またはThrのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1019]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Glu104 Leu、Pro、Ser、Ala、Asn、Thr、Lys、またはAspのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1020]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換His106 Pro、Gln、Gly、Arg、Val、Thr、Asn、またはLeuのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1021]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Lys108 Gln、Ala、Trp、Tyr、Arg、Asp、Asn、Ser、Glu、またはThrのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001~1012のいずれかのムテイン。

[本発明1022]

成熟ヒト涙液リポカリンと比較して、アミノ酸置換Glu27 Arg、Ser、Gln、Thr、Phe、

Lys、Ala、またはArgのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1023]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Pro29 Gly、Asp、Asn、Ile、Leu、またはMetのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1024]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Asn32 Ile、Leu、Tyr、Met、またはTrpのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1025]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Leu105 Cys、Tyr、Trp、Glu、Arg、Ser、His、Ala、Val、Asp、Pro、Gly、またはLysのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1026]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Phe28 Cys、Arg、Lys、Trp、Asp、Gly、His、Leu、またはAsnのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1027]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Glu30 Arg、Asp、Thr、Ser、Gly、Ala、またはAsnのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1028]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Ile57 Tyr、Trp、His、Gln、Thr、またはArgのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1029]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換Lys83 Arg、Ser、Gln、Thr、またはGluのうちの少なくとも1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1030]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下のセットのうちの1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン：

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

°

[本発明1031]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下のセットのうちの1つを含む、本発明1001～1012のいずれかのムテイン:

- (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, または
- (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

°
[本発明1032]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下の組合せを含む、本発明1001

~ 1012のいずれかのムテイン:

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 および Lys 108 →

Thr

°

[本発明1033]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換

Thr 43 → Ile または Ala,

Glu 45 → Gly, Asn 48 → Gly, Glu 63 → Gly, Ala 66 → Val, Glu 69 → Val, Lys 70 →

Arg, Ala 79 → Thr, Met または Val, Asp 80 → Met または Ser, Gly 82 → Ser, His 84 → Gln, Val

85 → Gly, Tyr 87 → Ser, Ile 88 → Thr または Leu, His 92 → Pro, Leu 105 → His, Gly または

Tyr および His 106 → Gln または Arg

のうちの1つまたは複数をさらに含む、本発明1032のムテイン。

[本発明1034]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換の以下の組合せを含む、本発明1001

~ 1012のいずれかのムテイン:

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 および

Lys 108 → Glu

°

[本発明1035]

成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、アミノ酸置換

Glu 43 → Gly または

Ala, Glu 45 → Gly, Ser 58 → Trp または Arg, Glu 63 → Asp, Glu 69 → Gly, Lys 70 →

Arg, Asp 80 → Gln, Val または Thr, Gly 82 → Asp, Lys 83 → Ser または Arg, Ala 86 → Glu または

Ser, Phe 99 → Leu, Glu 102 → Lys または Val, Glu 104 → Asn または Lys および Pro 106 → Thr

のうちの1つまたは複数をさらに含む、本発明1034のムテイン。

[本発明1036]

成熟ヒト涙液リボカリンのアミノ酸配列に対して、位置28または位置105におけるシス
テイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を含む、本発明1001 ~ 1035のいずれ
かのムテイン。

[本発明1037]

成熟ヒト涙液リボカリンの配列に対して少なくとも75%の同一性を有する、本発明1001
~ 1036のいずれかのムテイン。

[本発明1038]

SEQ ID NO: 3 ~ 28、62 ~ 71、および82のいずれか1つに示すアミノ酸配列またはその断
片もしくは変種のアミノ酸配列を有する、本発明1001 ~ 1012のいずれかのムテイン。

[本発明1039]

SEQ ID NO: 23に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列を有す
る、本発明1001 ~ 1012のいずれかのムテイン。

[本発明1040]

SEQ ID NO: 13に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列を有す

る、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1041]

SEQ ID NO: 20に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列を有する、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1042]

SEQ ID NO: 22に示すアミノ酸配列またはその断片もしくは変種のアミノ酸配列を有する、本発明1001～1012のいずれかのムテイン。

[本発明1043]

標識部分にコンジュゲートされている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1044]

対象の内部の特定の身体領域、生物、組織、器官、または細胞を標的とすることができる部分にコンジュゲートされている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1045]

ムテインの血清半減期を延ばすことができる部分にコンジュゲートされている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1046]

ポリアルキレングリコール分子にコンジュゲートされている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1047]

SEQ ID NO: 30～32のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含む、本発明1046のコンジュゲートされたムテイン。

[本発明1048]

アルブミン結合タンパク質にコンジュゲートされている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1049]

SEQ ID NO: 83～84のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含む、本発明1048のコンジュゲートされたムテイン。

[本発明1050]

融合物に新しい特徴を与えることができる部分に融合されている、本発明1001～1042のいずれかのムテイン。

[本発明1051]

PCSK9に結合する、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインを作製する方法であって、

(a) ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子を、

(i) 成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26～34、56～58、80、83、104～106、および108のうちのいずれか1つまたは複数、ならびに

(ii) 成熟ヒト涙液リポカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置61、101、111、114、および153のうちのいずれか1つまたは複数

における変異誘発に供し、それによって、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインをコードする1種または複数種の核酸分子を得る段階、

(b) (a) で得られた1種または複数種の核酸分子を発現系において発現させ、それによって、ヒト涙液リポカリンの1種または複数種のムテインを得る段階、ならびに

(c) (b) で得られた1種または複数種のムテインをさらに選択する段階を含む方法。

[本発明1052]

段階(c)が、

(ci) PCSK9またはその免疫原性断片を提供する段階、

(cii) 選択によって得られた1種または複数種のムテインをPCSK9またはその免疫原性断片と接触させ、それによって、PCSK9またはその免疫原性断片とそれに対する結合親和性を有するムテインとの複合体の形成を可能にする段階、および

(ciii) 結合親和性を有していない、または実質的な結合親和性を有していない、1種または複数種のムテインを除去する段階
をさらに含む、本発明1051の方法。

[本発明1053]

段階(c)における選択が、競合的条件下で実施される、本発明1051または1052の方法。

[本発明1054]

段階(a)が、

(a)(iii) ヒト涙液リボカリンをコードする核酸分子を、成熟ヒト涙液リボカリンの直線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置79、92、および105のうちのいずれか1つまたは複数
における変異誘発に供する段階

をさらに含む、本発明1051～1053のいずれかの方法。

[本発明1055]

本発明1001～1050のいずれかのムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子
。

[本発明1056]

SEQ ID NO: 36～61、72～81、および86～89のいずれか1つに示す核酸分子。

[本発明1057]

本発明1055または1056の核酸分子を含む宿主細胞。

[本発明1058]

対象の中のPCSK9に結合させるための、本発明1001～1050のいずれかのムテインまたは
そのようなムテインを含む組成物の使用。

[本発明1059]

対象におけるLDL-RへのPCSK9の結合を阻害するための、本発明1001～1050のいずれかの
ムテインまたはそのようなムテインを含む組成物の使用。

[本発明1060]

PCSK9の検出のための、本発明1001～1050のいずれかのムテインの使用であって、

(a) ムテインを、PCSK9を含むと疑われる試験試料と適切な条件下で接触させ、それによっ
て、ムテインとPCSK9またはそのドメインもしくは断片との複合体の形成を可能にするこ
と、および

(b) 適切なシグナルによって複合体を検出すること

を含む使用。

[本発明1061]

PCSK9の分離のための、本発明1001～1050のいずれかのムテインの使用であって、

(a) ムテインを、PCSK9を含むことになっている試料と適切な条件下で接触させ、それによ
って、ムテインとPCSK9またはそのドメインもしくは断片との複合体の形成を可能にする
こと、および

(b) 試料から複合体を分離すること

を含む使用。

[本発明1062]

化合物で処置すべき予め選択された生物、組織、器官、または細胞へとその化合物を標
的指向させるための、本発明1001～1050のいずれかのムテインの使用であって、

(a) ムテインを前記化合物とコンジュゲートさせること、および

(b) 予め選択された生物、組織、器官、または細胞にムテイン/化合物複合体を送達するこ
と

を含む使用。

[本発明1063]

本発明1001～1050のいずれかのムテインを含むキット。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

いくつかの態様において、本開示によるヒト涙液リボカリンムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンと比較して、以下のアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを含む：

Met 31 → Ala, Gly, His, Pro, Ser, Asp, Glu または Gln, Leu 33 →

Tyr, Trp, Tyr, Phe, Pro または Ala, Ser 61 → Trp または Phe, Asp 80 → Ser, Met, Pro, Ile, Gln, Tyr, Ser, Val または Thr, Glu 104 → Leu, Pro, Ser, Ala, Asn, Thr, Lys または Asp, His 106 → Pro, Gln, Gly, Arg, Val, Thr, Asn または Leu および Lys 108 → Gln, Ala, Trp, Tyr, Arg, Asp, Asn, Ser, Glu または Thr

。