

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 2 月 3 日 (03.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/021000 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/104876

(22) 国际申请日: 2020 年 7 月 27 日 (27.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 杨乃波 (YANG, Naibo); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 李新洋 (LI, Xinyang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼,

Guangdong 518083 (CN)。 侯勇 (HOU, Yong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 徐讯 (XU, Xun); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘龙奇 (LIU, Longqi); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 顾颖 (GU, Ying); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王媚娘 (WANG, Meiniang); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘小盼 (LIU, Xiaopan); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路 681 号外经大厦 21 楼, Shanghai 200032 (CN)。

(54) Title: ANTIGEN-BINDING CHARACTERISTIC EPIOTOPE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗体结合的特征性表位及其应用

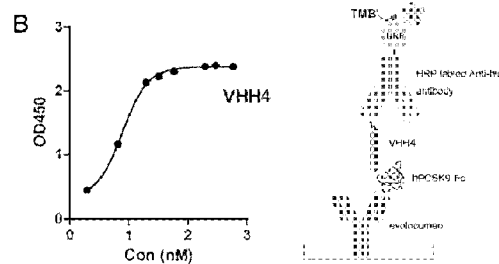
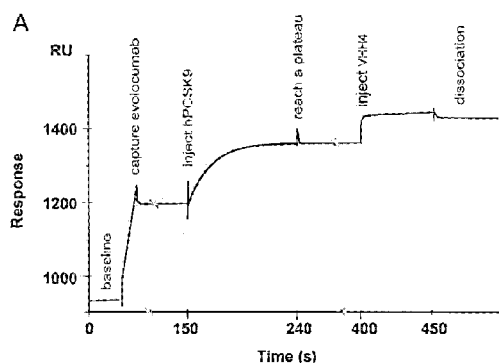


图 3

(57) Abstract: Provided are a polypeptide fragment and a preparation method therefor. The polypeptide fragment comprises an amino acid sequence as shown in $X^1X^2X^3X^4X^5GX^6$ from N-terminus to C-terminus, wherein X1 is S, T, E, Y, or F; X2 is T, N, G, S, or D; X3 is H, E, Y, T, K, R, or A; X4 is G, Y, H, R, or M; X5 is A, F, Q, H, I, or V; X6 is W or F. Also disclosed is an isolated nucleic acid molecule coding the polypeptide, and preparation of a polypeptide vaccine for PCSK9 using the polypeptide. The polypeptide fragment may be bound to an anti-PCSK9 antibody, and can be used for detection, screening or auxiliary screening for a new anti-PCSK9 antibody, so that the problem of an adverse reaction, for example, strong immunogenicity of a patient on an original antibody, is alleviated.

(57) 摘要: 提供一种多肽片段及其制备方法, 所述多肽片段包含从 N 端至 C 端如 $X^1X^2X^3X^4X^5GX^6$ 所示的氨基酸序列, 其中, X1 为 S、T、E、Y 或 F; X2 为 T、N、G、S 或 D; X3 为 H、E、Y、T、K、R 或 A; X4 为 G、Y、H、R 或 M; X5 为 A、F、Q、H、I 或 V; X6 为 W 或 F。还公开了编码该多肽的分离的核酸分子, 并利用该多肽来制作针对 PCSK9 的多肽疫苗。该多肽片段可与抗 PCSK9 抗体结合, 可检测、筛选或辅助筛选新的抗 PCSK9 抗体, 从而缓解患者对原抗体出现免疫原性强等不良反应的问题。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利 (细则4.17(ii))
- 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

一种抗体结合的特征性表位及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种抗体结合的特征性表位及其应用。

背景技术

心血管疾病严重威胁着人类，是所有人口族群的首要死因。据国家心血管病中心发布的《中国心血管病报告2019》显示，我国心血管病（cardiovascular disease, CVD）患病人数已经高达2.9亿，每年约有350万人死于心血管疾病。目前市面上用于降低胆固醇的药物主要有他汀类（statins）、胆固醇吸收抑制剂和普罗布考等。尽管他汀类药物心血管疾病治疗上表现出色，但随着其广泛使用，可能产生的弊端也渐渐被发现。首先，强化他汀治疗患者仍有较高心血管事件残余风险，在2年内发生的风险达22.4%；其次，有大量患者无法耐受他汀类药物，尤其是家族性高胆固醇血症患者，即使接受最大剂量的最有效的他汀类药物治疗，仍然不能达到降低LDL-C浓度的目的；最重要的是，他汀类药物存在多种副作用，如引起患者血糖异常、肌肉毒性、记忆和认知障碍等，副作用的发生率高达20%，严重的副作用会导致横纹肌溶解和急性肾功能衰竭，相当一部分患者因不能忍受副作用带来的肌肉疼痛而终止了治疗。

前蛋白转化酶枯草溶菌素9（Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9），枯草蛋白酶亚家族的一种新的前蛋白转化酶，是常染色体显性家族性高胆固醇血症的重要影响因子之一。研究发现，PCSK9除了能影响血浆胆固醇水平，调节神经细胞的凋亡，还与炎症反应有一定的相关性。目前对于PCSK9的研究主要集中在对肝脏脂质代谢的调节功能。前期的研究显示，PCSK9可通过促进肝细胞的低密度脂蛋白受体（low-density lipoprotein receptor, LDL-R）的降解，调节肝脏脂质代谢，进而影响血浆中低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C）的水平。但PCSK9存在两种突变类型，功能获得型突变和功能缺失型突变。族群试验显示，若干PCSK9“获得功能”的突变常发生于染色体显性高胆固醇血症的个体，而PCSK9“失去功能”的突变则与血浆胆固醇减少有关，PCSK9功能缺失型突变个体患冠心病的风险明显降低。2005年，Hobbs等在Dallas Heart Study上报道了携带PCSK9无义突变基因的个体中LDL-C水平会比一般人低28%；在2006，Hobbs等又发表PCSK9基因突变对冠心病的作用，该结果基于一项动脉粥样硬化风险调查，他们对9523个白人和3363个非洲裔美国人进行了长达15年的跟踪观察，发现缺失1个或2个PCSK9功能基因的人群的冠心病的发病率显著低于普通人群。Copenhagen

Heart Study发现PCSK9基因的功能性缺失会使LDL-C水平下降11-15%，冠心病患病率下降6-46%。Zimbabwe等报道了PCSK9的缺失突变可使非洲女性的LDL-C水平下降27%。PCSK9抑制剂提供了一种全新的治疗模式来对抗LDL-C，被视为他汀类之后降脂领域取得的最大进步。PCSK9抑制剂的出现，为那些服用他汀类药物时出现严重副作用的患者，及他汀类药物无法达到LDL-C目标水平的患者，如遗传性高胆固醇血症患者带来了福音。

PCSK9 抑制剂除了能阻止 LDL-R 回收，还可以抑制 NF- κ B 通道，从而减少血栓、炎症、血管内皮细胞激活等急性冠状动脉综合症的风险。目前 PCSK9 抑制剂这个领域潜在的研究项目有抑制蛋白抗体、siRNA、反义寡核苷酸以及小分子抑制剂等。单克隆抗体药物因具有靶向性强、特异性高和毒副作用低等特点，是目前 PCSK9 抑制剂研究的主要领域。在动物水平的研究显示，加入中和 PCSK9 的抗体之后，小鼠肝脏中的 LDL-R 表达水平显著上升，血液中 LDL-C 浓度下降 30%。对灵长类动物，PCSK9 单克隆抗体也表现出显著的效果，LDL-C 水平的下降效果可维持数周以上。到目前为止，还没有发现抗 PCSK9 蛋白单抗类药物有比较明显的毒副作用，只有报道称出现过局部注射反应、腹泻和头疼等较轻微的副作用。赛诺菲的 Praluent (Alirocumab) 和安进的 Repatha (Evolocumab) 是目前全球市场唯二获批的人源化的 PCSK9 抗体。根据汤森路透对 2015 年获批药物潜力销售排行榜，到 2019 年前者的销售规模将达到 44.14 亿美元，而后的销售规模将会达到 18.62 亿美元。我国 CVD 患者众多，在 2015 年统计的结果显示，CVD 患人数已经高达 2.9 亿，每年约有 350 万人死于心血管疾病，然而我国在 PCSK9 抑制剂领域的研究却严重滞后，完全不能满足 CVD 患者的需求。

抗体药物是目前新药研发的主要方向，在传染病的诊断、防治和生物科学研究领域都已得到了广泛的应用。到2015年截止，已经有48个抗体药物成功上市，仅2014年4月至2015年3月期间就有7个抗体药物成功获批。2015年全球销售排名前10的药物中有6个都为抗体药物。自1993年Hamers等在骆驼血液发现了天然缺失轻链的重链抗体后，纳米抗体 (Nanobody, Nb) 逐渐取代其他的小型抗体，逐渐成为新型抗体药物研发的热点。Nb 通常只有15 kDa左右，约传统抗体大小的十分之一，其内部存在二硫键，表面有大量亲水残基，对热和pH有较强的抵抗力；Nb缺乏Fc段和轻链的性质使其能够识别传统抗体无法识别的隐蔽表位或小表位，且避免了补体反应；此外，纳米抗体还具有稳定性高、毒性低、可溶性强、易于靶点筛选和易于在原核微生物中直接表达，经济性好等诸多优势。序列同源性分析显示，骆驼Nb的VHH胚系基因序列和人VH3高度同源，但CDR1和CDR3比人的稍长，CDR3在三级结构中向外凸出，因而推测有更高的抗原结合的特异性和亲和力。

鉴于以上优点，Nb正被逐步开发为疾病诊断和治疗方面的单抗药物，广泛的应用与酶的抑制剂，肿瘤、感染和炎症等生物抑制剂的开发上。然而，纳米抗体微小的体积虽为其治疗功能提供了很多的优势，但小分子蛋白在体内极容易被消除。通过基因工程将Nb改造成靶点酶、跨膜蛋白或者双价化能够有效地提高抗体活力和稳定性等，以达到研究目的。在对抑制病毒复制的研究中发现，双价纳米抗体的有效性至少是单价纳米抗体的60倍，并且在动物体内作用时间更长，有效地延迟了动物的死亡时间。抗体药物的前景巨大，但国内抗体药物仍然处于起步阶段。因此，开发国产化PCSK9抗体抑制剂，满足我国国民对于抗体药物的迫切需求，具有深远而积极的意义。

2015年，国际药企巨头安进和赛诺菲/再生元先后经FDA批准上市两款PCSK9抑制剂Repatha和Praluent，迄今为止，二者销量逐年升高，每年营收高达5-7亿美元。2014年10月17日，安进控告赛诺菲/再生元的Praluent侵犯了其Repatha 三项专利权(专利号为No. US8563698, US8829165和US8859741)；最后赛诺菲败诉，他们被禁止在美国销售新的PCSK9抑制剂药物Praluent，由此可见表位保护的重要性，如今Praluent在国际上的销量不足Repatha的一半（据报道，赛诺菲是在以下表位的氨基酸上侵权安进的专利：S153, I154, P155, R194, D238, A239, I369, S372, D374, C375, T377, C378, F379, V380, 和 S381）。

发明内容

为解决现有技术中缺乏有效的 PCSK9 抗原表位及靶向该表位的抗体的技术问题，本发明提供了一种抗体结合的特征性表位例如 PCSK9 抗原表位及其应用。

目前已经上市的药物结合 PCSK9 的表位一般都处于 PCSK9 的前导区（31-152）和催化区（153-425），当病人对此类药物产生耐药或不反应时，需要结合 PCSK9 其它表位的药物。PCSK9 的前导区和催化区内很多关键的表位氨基酸已经被赛诺菲或者安进公司申请专利保护，而 PCSK9 的 C 端区域很多氨基酸表位尚未被保护；之前的研究显示 VHH4-Fc 抗体结合 PCSK9 的亲和力高达 0.6 nM，在 PCSK9 转基因大鼠模型上降脂药效可达约 40%的水平，说明该抗体具有极好的应用前景，该抗体所结合的表位也可以用来筛选新的抗 PCSK9 的抗体。

为解决上述技术问题，本发明的第一方面提供了一种多肽片段，其中，所述多肽片段包含从 N 端至 C 端如 $X^1X^2X^3X^4X^5GX^6$ 所示的氨基酸序列，其中， X^1 为 S、T、E、Y 或 F，优选为 S； X^2 为 T、N、G、S 或 D，优选为 T； X^3 为 H、E、Y、T、K、R 或 A，优选为 H； X^4 为 G、Y、H、R 或 M，优选为 G； X^5 为 A、F、Q、H、I 或 V，优选为 A； X^6 为 W 或 F，优选为 W。

优选地，所述多肽片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 所示。

本发明中阐述的 VHH4-Fc 对于 PCSK9 的结合表位处于 C 端区域（第 447-453 的：STHGAGW [SEQ ID NO: 9]）为一新的表位，如图 1 为 PCSK9 蛋白氨基酸序列和分区结构示意图。其中 VHH4-Fc 指的是纳米抗体 VHH4 融合了抗体恒定区 Fc 形成的嵌合抗体，VHH4 的序列见专利 1(申请号：201711298806.3)和专利 2(申请号：PCT/CN2020/074624；PCSK9 的单域抗体及其应用)。

优选地，所述多肽片段与 VHH4 抗体或其变体特异性结合，所述抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 (VHH4) 或如 SEQ ID NO: 24 所示 (VHH4-hFc)。

更优选地，所述突变为在所述抗体的氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸残基的缺失、增加或替换。与纳米抗体 VHH4 或 VHH4-Fc 的氨基酸序列相似度 80% 以上视为与本发明所述的多肽片段结合的抗体的范围。即所述突变与所述抗体的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 的同一性并保持所述抗体的功能。

Fc 区既可以指人的抗体的恒定区，也可以指任何物种抗体的 Fc 恒定区，所述目标抗体包含任何物种的全部 Fc 亚型，即包含如 IgG1 Fc，IgG2 Fc 等。任何有关 VHH4 的分子修饰包括但不限于甲基化修饰、糖基化修饰，PEG 修饰，小分子偶联如 KLH-VHH4 以及 VHH4 与对应轻链的二聚化形成抗体的 Fab 分子等。Fc 亦可以替换为如人血清白蛋白形成 HSA-VHH4 或 VHH4-HSA 等任意融合 VHH4 的蛋白。由此，所述多肽片段可以结合的抗体为融合有人血清白蛋白的融合蛋白。

鉴定表位有很多种方法：包括蛋白结晶后晶体衍射法 (X-ray 法) 和丙氨酸扫描突变法等；X-ray 法鉴定效率高，精度高，但是存在成本高、抗原抗体复合物不好结晶、对复合物纯度要求高等缺点；丙氨酸扫描突变法需要突变大量的抗原分子，需要蛋白量大，而且有些部位氨基酸突变后表达量极低甚至不能表达，成本也很高。本发明中采用了对随机多肽库进行噬菌体展示的方法进行抗体结合抗原表位的鉴定，随后再采用 Western 进行表位验证，具有效率高，成本低的优势。

为解决上述技术问题，本发明的第二方面提供了一种分离的核酸分子，其编码如上所述的多肽片段。

为解决上述技术问题，本发明的第三方面提供了一种表达载体，其包含如上所述的分离的核酸分子；优选地，所述表达载体的基础载体（即骨架载体）为 pMECS。

为解决上述技术问题，本发明的第四方面提供了一种转化体，其含有如上所述的分

离的核酸分子或表达载体。优选地，所述转化体的宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

为解决上述技术问题，本发明的第五方面提供了一种 PCSK9 抗原组合，其包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 所示的多肽片段中的两种或多种。

为解决上述技术问题，本发明的第六方面提供了一种多肽疫苗，其特征在于，其由以下方法制备而成：将包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 所示的多肽片段中的至少一种作为抗原产生的可特异性结合 PCSK9 的多克隆抗体。

为解决上述技术问题，本发明的第七方面提供了一种配体，所述配体可以特异性结合如上所述的多肽片段，但所述配体不为氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 或在 SEQ ID NO: 24 所示的抗体。

为解决上述技术问题，本发明的第八方面提供了一种抑制剂，其可以靶向抑制如上所述的分离的核酸分子。优选地，所述抑制剂为 siRNA 或 mRNA 疫苗。

为解决上述技术问题，本发明的第九方面提供了一种试剂盒，其包括如上所述的多肽片段，和/或，如上所述的配体。

为解决上述技术问题，本发明的第十方面提供了一种上述的多肽片段的制备方法，其包括如下步骤：培养如上所述的转化体，使其表达获得表达产物。

优选地，所述的制备方法还包括纯化所述的表达产物的步骤。

为解决上述技术问题，本发明的第十方面提供了一种所述的多肽片段、所述的分离的核酸分子、所述的表达载体、所述的转化体、所述的 PCSK9 抗原组合或所述的试剂盒在制备特异性结合 PCSK9 的抑制剂或检测 PCSK9 蛋白的制剂或 PCSK9 疫苗中的应用。

为解决上述技术问题，本发明的第十一方面提供了一种如上所述的配体、所述的抑制剂在制备竞争性抑制抗 PCSK9 抗体的试剂中的应用。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

本发明探寻到不同以往抗体的结合表位，丰富了抗 PCSK9 抗体的结合表位的多样性。阐明了先前研发抗体 VHH4-Fc 与目标抗原 PCSK9 的相互作用机制，解析了相互作用表位。阐述了目标抗体和 PCSK9 抗原相互结合的表位，有利于提升 VHH4-Fc 该药物的市

场价值，也有利于对 VHH4-Fc 的进一步改造和优化。更重要的是，还可以利用该新的抗原表位来制作针对 PCSK9 的多肽疫苗；以及该多肽片段可与抗 PCSK9 抗体结合，可用于检测、筛选或辅助筛选新的抗 PCSK9 的抗体，以缓解现有技术中患者对原抗体出现免疫原性强等不良反应的问题。

附图说明

图 1 为人 PCSK9 的氨基酸序列；

图 2 为 VHH4-Fc 与 PCSK9 亲和力测定结果示意图；

图 3 为新型抗体与 Repatha 结合抗原表位差异鉴定实验；

图 4 为人 PCSK9 抗原三种突变体的氨基酸序列对比示意图；

图 5 为人 PCSK9 及其三种突变体的 Western Blot 验证。

具体实施方式

实施例1 VHH4-Fc和人PCSK9亲和力检测

对于 Fc 标签融合蛋白 VHH4-Fc，采用基于 SPR 技术的 Protein A 芯片捕获法来测定它与人 PCSK9 (hPCSK9) 之间的亲和力。首先用 Protein A 芯片捕获 VHH4-Fc 抗体，再进样（流过）5 个不同浓度的 hPCSK9 抗原进行亲和力的测定，结合时间设置为 120s，解离时间设置位 180s，再生溶液选取的是 pH 2.0 的 100 mM 的甘氨酸溶液，系统溶液为 1×PBST。如图 2，最终的亲和力结果，是基于 Biacore T200 内置的评价软件给出的拟合曲线，再得出 koff 和 kon 值，由公式 $K_D (nM) = k_{off} (1/s) / k_{on} (1/Ms)$ 计算得出。参数说明：Rmax 为最大响应值，通常是处于 0-100 RU 之间；Chi² 值小于等于 1/10 Rmax 视为测定结果可靠。测定结果显示：VHH4-Fc 与 hPCSK9 的结合常数是 1.872×10^6 ，解离常数是 1.288×10^{-3} ，Rmax（最大结合值）是 24.71 RU，Chi² 值为 0.693，最终拟合得出的亲和力为 0.6879 nM。

图 2 中，横坐标指的是抗原抗体反应的时间轴，单位是（秒，s）；纵坐标指的是抗原抗体的结合或者解离时的响应值，单位是 Response units (RU)。不同的曲线代表进样不同浓度的抗体。本实验的亲和力是在 25 °C 的反应条件下测试得到。

实施例2 表位差异检测

表位差异检测（epitope binning test）的目的是为了检测筛选出的抗体与上市药物 Evolocumab（商品名：Repatha，瑞百安）结合人 PCSK9 表位的异同。本节共采用两种方

案来检测 CN201711298806.3 和 PCT/CN2020/074624 的 VHH4 的抗体（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示）与已经上市的抗体药物结合靶点抗原 PCSK9 的表位差异。

第一种方案是基于 SPR 技术的亲和动力学检测，设置 Biacore T200 的反应温度为室温（即 25℃），取一张新的 CM5 芯片，将上市抗体 Evolocumab 用 1×PBS 稀释至 1 μg/mL，然后偶联至通道 2 上，偶联水平拟定位约 270 RU，与此同时，保持 1 通道为空白对照。接下来，将带 his 标签的人 PCSK9（简称 hPCSK9-his）抗原用 1×PBS 稀释至 5 μg/mL，设置程序将其作为样本 1（Sample 1）自动进样，结合时间设置为 90 s，如果人 PCSK9 抗原表面 Evolocumab 的特异性结合位点全部被饱和，结合和解离曲线都将进入平台期。接着，将抗体 VHH4-his（浓度 5 μg/mL，用 1×PBS 稀释）作为样本 2（Sample 2）继续进样 60 s，如果 VHH4 与 Evolocumab 结合 hPCSK9 的表位不同，曲线将会继续升高；反之，曲线将继续保持平台期。两种样本的解离时间均设置为 120 s，再生溶液为 pH 2.0 的 100 mM 的甘氨酸，系统溶液为 1×PBST。

第二种方案为双抗体“夹心”ELISA 法：取一块新的 96 孔 ELISA 板，每孔包被 100 ng 的 Evolocumab，条件为 4℃ 过夜。次日用 1×PBST 洗涤三次后，用 3 % 的 BSA 封闭 96 孔板孔底没有结合抗体的位点，条件为室温封闭 1 小时。用 1×PBST 洗涤三次后，接着用 5 μg/mL 的 hPCSK9-Fc 抗原作为“一抗”室温孵育 1 小时；接着用 1×PBST 洗涤五次后，用系列倍比稀释的 VHH4-his 加到孔中，去结合人 hPCSK9-Fc 抗原上的抗原表位，如果 Evolocumab 和 VHH4-his 等新型抗体结合表位相同，VHH4-his 将不会再结合 hPCSK9-Fc 而被洗掉，反之，VHH4-his 不会被洗掉。接下来加辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗 his 标签的二抗（1:5000 稀释），室温反应 1 h。随后，用 1×PBST 洗涤三次后，每孔加入 100 μL 的 HRP 底物 TMB，在室温黑暗的环境中反应 5~10 min，随后加入 50 μL 1 M 的浓硫酸终止反应，用酶标仪读取 OD450 吸光值。

表位差异鉴定结果如图 3 所示，图 3 的 A 为基于表面等离子共振技术（SPR）检测 VHH4 和上市药物结合人 PCSK9 抗原表位的差异检测实验，所示为利用亲和动力学的方法测定的结果，横坐标为时间轴，纵坐标为相对响应值；共包含多个阶段，如基线阶段（baseline），捕获 Evolocumab 阶段（capture evolocumab），PCSK9 进样并结合稳定的阶段（inject hPCSK9），VHH4 进样阶段（inject VHH4）和解离阶段（dissociation 阶段）。在第一个阶段，捕获 Evolocumab 后，反应曲线稳定在 1200 RU 左右；在 PCSK9-his 进样后，Evolocumab 与 PCSK9-his 开始结合，并最终稳定在约 1350 RU，证明 PCSK9 上 Evolocumab 的特异性结合位点被其自身饱和，随着 VHH4 的进样，反应曲线进一步上升，表明 PCSK9 上除了 Evolocumab 的特异性结合位点，还存在 VHH4 的特异性结合位点，

证实 VHH4 抗体和 Evolocumab 结合 PCSK9 的表位不尽相同。

图 3 的 B 为基于双抗体“夹心”ELISA 技术检测 (VHH4) 和上市药物结合人 PCSK9 抗原表位的差异检测实验,横坐标代表不同浓度的 VHH4;纵坐标代表 OD450 的吸光值。首先是在 ELISA 板中包被过量的 Evolocumab, 然后加入 hPCSK9-Fc (作为“一抗”), Evolocumab 将 PCSK9 上的特异性结合位点完全饱和,接着加入 VHH4-his(作为“二抗”), 如果 VHH4-his 与 Evolocumab 结合 PCSK9 的位点相同, 最终在洗涤时将完全被洗掉, 图 3B 中实验结果显示, VHH4 与 PCSK9 在 Evolocumab 饱和其结合位点后仍有结合曲线, 证实 VHH4 新型抗体和 Evolocumab 结合 PCSK9 的表位不尽相同。图 3 B 右侧为双抗体夹心 ELISA 的实验原理示意图。

实施例 3 表位鉴定实验

(1) 噬菌体展示库的构建

取 1 μ L 随机多肽库和噬菌体质粒 pMECS 相连接的 DNA 产物转化 TG 感受态细胞 (相关分析克隆的步骤参见分子克隆实验指南 (第 2 版)_(美)J. 萨姆布鲁克 (Joseph Sambrook)); 37 °C 复苏 2 h, 梯度稀释至 10^1 、 10^2 和 10^3 , 分别取 300 μ L 涂布平板, 37 °C, 过夜培养, 计算克隆数, 约 10^5 个克隆/平板。采用上述相同的转化方法, 大量转化, 直到文库的克隆数达到 10^7 以上。将所有克隆用 LB 洗脱下, 5,000 g, 离心 5 min, 沉淀用 2 mL LB 悬浮, 加入等体积的 30 % 甘油, -80 °C 冻存。

(2) 噬菌体扩增和拯救

采用辅助噬菌体对随机多肽的噬菌体文库进行扩增和拯救。将步骤 (1) 中保存的单克隆文库接入 100 mL 培养基中培养至对数生长期, 加入 MOI 为 20 的辅助噬菌体, 室温, 静置 30 min, 低速离心后, 沉淀用培养基悬起, 接入 300 mL 培养基中, 培养过夜。次日, 3,000 g 离心 30 min, 收集上清, 加入 PEG 沉淀噬菌体, 冰上静置 30 min, 3,000 g 离心 30 min, 沉淀为噬菌体随机多肽库, 用 PBS 悬浮沉淀后, 测定其滴度为 2.9×10^{12} pfu/mL。

(3) 亲和 VHH4-Fc 的噬菌体库淘洗和拯救

取 100 ng VHH4-Fc 蛋白包被 ELISA 板, 4 °C, 过夜孵育。次日, 加入拯救出的 VHH4-Fc 特异的噬菌体, 室温, 孵育 2 h; PBST 洗孔 10 次, 加入 100 μ L 三乙胺, 室温, 孵育 30 min, 收集的噬菌体即为获得的亲和 VHH4-Fc 的噬菌体库; 取 10 μ L 感染 TG 细胞涂布平板, 用于测定筛选后的克隆数测定, 剩余的筛选后的噬菌体的用于扩增。按上述如此步骤反复淘选进行三至四轮多肽筛选。

(4) ELISA 评价可以特异性结合 VHH4-Fc 的多肽的富集程度

ELISA板包被100 ng的VHH4-Fc蛋白, 4 °C孵育过夜; 次日加2 %的BSA室温封闭1 h; 实验组分别加入每轮淘洗后扩增的噬菌体, 对照组加入等量野生型的噬菌体, 室温, 孵育2 h; PBST洗10次, 以去除没有结合的噬菌体; 加入HRP标记的抗M13抗体, 室温孵育1 h; 加入显色液, 避光反应10-30 min, 测吸光值, 吸光值随着淘洗次数逐渐上升, 并在第三轮到第四轮淘洗时趋于稳定, 表明特异性的抗体得到了富集。

(5) 鉴定VHH4-Fc特异性结合的多肽的阳性克隆

ELISA板包被100 ng的VHH4-Fc, 4 °C孵育过夜; 取最后一轮筛选获得的噬菌体涂布的平板, 随机挑取38个单克隆于1 mL培养基中, 37 °C, 培养至对数期, 加入1 mM IPTG诱导过夜; 次日, 离心收集菌沉, 破碎后, 5,000 g离心15 min, 收集上清; 同时取ELISA板, 加2 %的BSA室温封闭1 h; 实验组每孔加入单克隆破碎上清, 对照组加入空白TG破碎上清, 室温, 孵育2 h; PBST洗10次, 加入鼠抗HA标签的抗体, 室温1 h; PBST洗3-5次, 加入AP标记的抗鼠IgG抗体, 室温1 h; 加入底物, 反应10-20 min, 在酶标仪上读取吸光值; 当吸光值与对照孔比值大于2.1 (Base line) 时, 判定为阳性克隆; 并将阳性克隆对应孔的大肠杆菌送Sanger测序。

(6) 阳性克隆的序列分析

分析Sanger测序结果显示, 共有8种独特型多肽与VHH4-Fc存在特异性结合, 如下表2中的黑体字母加下划线代表了表位中可能存在的固定氨基酸序列, 比照PCSK9抗原的氨基酸序列, 推断出VHH4-Fc与人PCSK9的作用表位 (公共基序) 可能为第447-453位的“STHGAGW” (序列位置见图1)。

我们总结出要保护的VHH4-Fc抗体结合的具体表位, 应该包括但不限于氨基酸特征: (N端-X¹X²X³X⁴X⁵GX⁶-C端), 其中X代表20种氨基酸中的任意一种氨基酸, 但一般地来讲, 第1位X¹经常为S、T、E和F中的任意一种氨基酸; 第2位X²经常为T、Y、G、S和D中的任意一种氨基酸; 第3位X³经常为H、E、Y、T、K和A中的任意一种氨基酸; 第4位X⁴经常为G、Y、H、和R中的任意一种氨基酸; 第5位X⁵经常为A、F、Q、H、I和V中的任意一种氨基酸; 第7位X⁶经常为W和F中的任意一种氨基酸。

文中所述氨基酸密码子的对照表如下:

表 1 氨基酸密码子对照表

氨基酸英文名称	中文名称	三字母缩写	单字母缩写
Alanine	丙氨酸	Ala	A
Arginine	精氨酸	Arg	R
Asparagine	天冬酰胺	Asn	N
Asparticacid	天冬氨酸	Asp	D

Cysteine	半胱氨酸	Cys	C
Glutamine	谷氨酰胺	Gln	Q
Glutamicacid	谷氨酸	Glu	E
Glycine	甘氨酸	Gly	G
Histidine	组氨酸	His	H
Isoleucine	异亮氨酸	Ile	I
Leucine	亮氨酸	Leu	L
Lysine	赖氨酸	Lys	K
Methionine	甲硫氨酸	Met	M
Phenylalanine	苯丙氨酸	Phe	F
Proline	脯氨酸	Pro	P
Serine	丝氨酸	Ser	S
Threonine	苏氨酸	Thr	T
Tryptophan	色氨酸	Trp	W
Tyrosine	酪氨酸	Tyr	Y
Valine	缬氨酸	Val	V

表 2 基于随机多肽库和噬菌体展示技术鉴定到的多肽

多肽序号	SEQ ID NO:	短肽的序列
多肽 01	SEQ ID NO: 1	EGY <u>HHG</u> WIHMPS
多肽 02	SEQ ID NO: 2	VL <u>STTSRIG</u> WWM
多肽 03	SEQ ID NO: 3	<u>TTAMV</u> <u>G</u> WWMQEV
多肽 04	SEQ ID NO: 4	<u>TYHHG</u> FINSYAR
多肽 05	SEQ ID NO: 5	F <u>SKGAGW</u> NELMQ
多肽 06	SEQ ID NO: 6	LTPTYN <u>YHHG</u> WT
多肽 07	SEQ ID NO: 7	<u>SDHYQ</u> <u>G</u> WWMNHL
多肽 08	SEQ ID NO: 8	<u>STEGF</u> <u>G</u> WPGHLI
推断的抗原表位	SEQ ID NO: 9	<u>STHGAGW</u>

实施例 4 表位验证实验

随后我们设计了两种有关“**STHGAGW**”这一表位的 PCSK9 分子截断突变体，如下图 4 列出了三种突变体氨基酸的序列对比，其中标黄的部分为截断的部分氨基酸，其中 PCSK9-mu01 (SEQ ID NO: 20) 为截断无关表位的对照，PCSK9-mu02 (SEQ ID NO: 21) 和 PCSK9-mu03 (SEQ ID NO: 22) 为截断部分推测表位的突变体。

如图 5，将表达以上 PCSK9 蛋白及其突变体的哺乳细胞培养上清和细胞裂解物进行 SDS-PAGE 电泳，每五个一组，点样顺序从左到右分别为 PCSK9-mu01、PCSK9-mu02、PCSK9-mu02 (重复上样)、PCSK9-mu03 和野生型 PCSK9 (PCSK9-WT)；其中泳道 1-5 和 11-15 为表达 PCSK9 的细胞培养上清，泳道 6-10 和 16-20 为表达 PCSK9 的细胞裂解沉淀物，主要考察表达的目的蛋白处于胞内还是胞外；后将电泳胶转膜做 Western Blot 验证，主要考察截断突变后的 PCSK9 是否仍可以正常表达 (图 5A) 以及是否可以和 VHH4-hFc 结合 (图 5B)，结果如图 5 所示，PCSK9-WT (泳道 5、10、15 和 20 的 76kDa 处) 在细胞培养上清和沉淀中均有表达，而其他三种 PCSK9 突变体均在胞内表达 (泳道 6-9)，此外，截断突变对照 PCSK9-mu01 (泳道 16) 在截断后仍可以与 VHH4-hFc 发生结合，说明截断的多肽不是 VHH4-hFc 和 PCSK9 结合的关键表位；然而对于突变体 PCSK9-mu02，虽然 Anti-HA 抗体检测胞内有表达 (泳道 7 和 8 有条带)，但与 VHH4-hFc 几乎不再结合 (泳道 17 和 18 无条带)；突变体 PCSK9-mu03 情况类似，虽然 Anti-HA 抗体检测胞内有表达 (图 A 泳道 9 的 48 kDa 处有条带)，但 VHH4-hFc 与 PCSK9-mu03 不再结合 (图 B 泳道 19 的 48 kDa 处无条带)，这说明“STHGAGW” (位于 hPCSK9 的第 447-453 位) 确实为目标抗体 VHH4-hFc 与人 PCSK9 抗原的相互结合表位，或至少是 hPCSK9 空间表位的一部分。

对比实施例 1 Evolocumab 表位鉴定实验

将实施例 3 中的 VHH-Fc 替换为 Evolocumab，其它实验步骤同实施例 3。由此获得了与 Evolocumab 高亲和力结合的部分多肽。由下表 3 可知 VHH4-Fc 与 Evolocumab 结合的多肽片段完全不同，即这两个抗体结合完全不同的抗原表位。

表 3 基于随机多肽库和噬菌体展示技术鉴定到的多肽

序号	SEQ ID NO:	短肽的序列
Evo01	SEQ ID NO: 10	GLAMSMNSPMRM

Evo02	SEQ ID NO: 11	NDWHLLKWLQNK
Evo03	SEQ ID NO: 12	MPMPVSHLHLDN
Evo04	SEQ ID NO: 13	GWCLSKTLLQNT
Evo05	SEQ ID NO: 14	EFNTDRSASDWV
Evo06	SEQ ID NO: 15	LSTPVSDRFWLR
Evo07	SEQ ID NO: 16	TTHMWNYPYRTH
Evo08	SEQ ID NO: 17	MGGVNSTSLMRL
Evo09	SEQ ID NO: 18	WSSPPLWIARMD
Evo10	SEQ ID NO: 19	YSPWTKHSNFPF

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 一种多肽片段, 其特征在于, 所述多肽片段包含从 N 端至 C 端如 $X^1X^2X^3X^4X^5GX^6$ 所示的氨基酸序列, 其中, X^1 为 S、T、E、Y 或 F, 优选为 S; X^2 为 T、N、G、S 或 D, 优选为 T; X^3 为 H、E、Y、T、K、R 或 A, 优选为 H; X^4 为 G、Y、H、R 或 M, 优选为 G; X^5 为 A、F、Q、H、I 或 V, 优选为 A; X^6 为 W 或 F, 优选为 W。
2. 如权利要求 1 所述的多肽片段, 其特征在于, 所述多肽片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 所示。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的多肽片段, 其特征在于, 所述多肽片段与 VHH4 抗体或其突变体或其分子修饰体特异性结合, 所述抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 或在 SEQ ID NO: 24 所示。
4. 如权利要求 3 所述的多肽片段, 其特征在于, 所述突变为在所述抗体的氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸残基的缺失、增加或替换, 且所述突变与所述抗体的氨基酸序列具有至少 80%、85%、90%、95%、98%、99% 的同一性并保持所述抗体的功能, 所述分子修饰为甲基化修饰、糖基化修饰、PEG 修饰、小分子偶联如 KLH-VHH4。
5. 如权利要求 3 或 4 所述的多肽片段, 其特征在于, 所述多肽片段可以结合的抗体为融合有例如人血清白蛋白的融合蛋白。
6. 一种分离的核酸分子, 其编码如权利要求 1-5 任一项所述的多肽片段。
7. 一种表达载体, 其包含如权利要求 6 所述的分离的核酸分子; 优选地, 所述表达载体的基础载体为 pMECS。
8. 一种转化体, 其含有如权利要求 6 所述的分离的核酸分子或权利要求 7 所述的表达载体; 优选地, 所述转化体的宿主细胞为原核细胞或真核细胞。
9. 一种多肽疫苗, 其特征在于, 其由以下方法制备而成: 将包括氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 9 所示的多肽片段中的至少一种作为抗原用于免疫可使机体内产生可特异性结合 PCSK9 的多克隆抗体。
10. 一种配体, 其特征在于, 所述配体可以特异性结合如权利要求 1-5 任一项所述的多肽片段, 但所述配体不为氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 或 SEQ ID NO: 24 所示的抗体。
11. 一种抑制剂, 其特征在于可以靶向抑制如权利要求 6 所述的分离的核酸分子; 优选地, 所述抑制剂为 siRNA 或 mRNA 疫苗。

12. 一种试剂盒，其特征在于，其包括如权利要求 1-5 任一项所述的多肽片段，和/或，如权利要求 10 所述的配体。

13. 一种权利要求 1-5 任一项所述的多肽片段的制备方法，其包括如下步骤：培养如权利要求 8 所述的转化体，使其表达获得表达产物；优选地，还包括纯化所述的表达产物的步骤。

14. 如权利要求 1-5 任一项所述的多肽片段、权利要求 6 所述的分离的核酸分子、权利要求 7 所述的表达载体、权利要求 8 所述的转化体或权利要求 12 所述的试剂盒在制备特异性结合 PCSK9 的抑制剂或检测 PCSK9 蛋白的制剂或 PCSK9 疫苗中的应用。

15. 如权利要求 10 所述的配体、权利要求 11 所述的抑制剂在制备竞争性抑制抗 PCSK9 抗体的试剂中的应用。

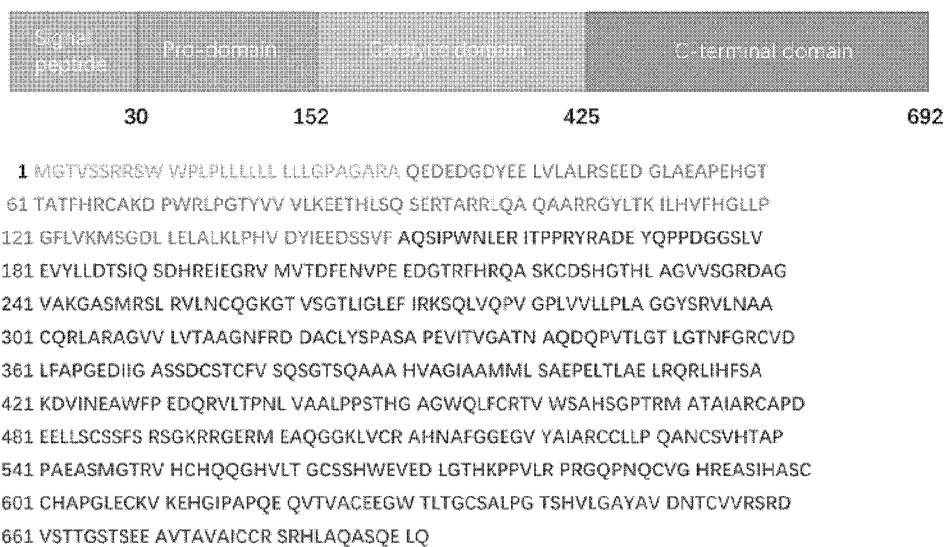


图 1

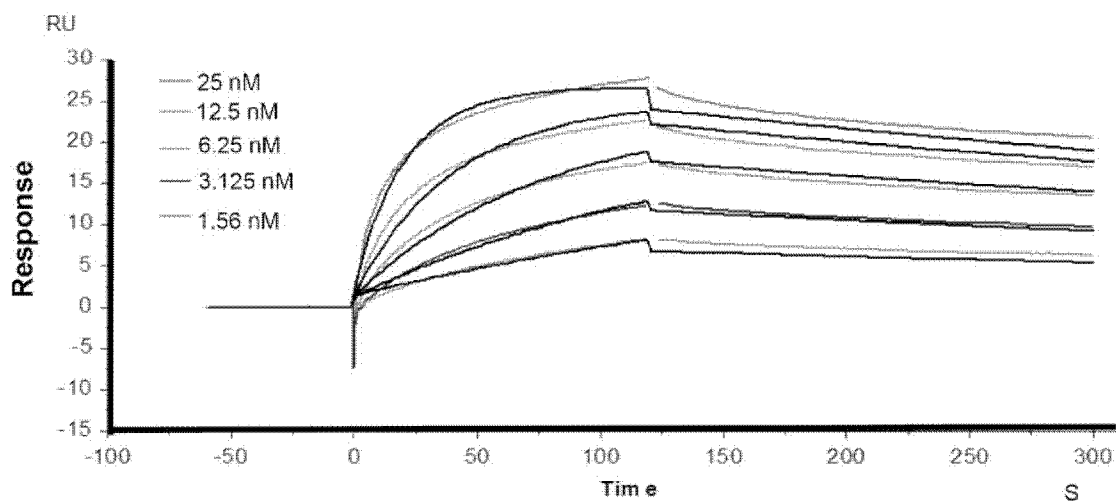


图 2

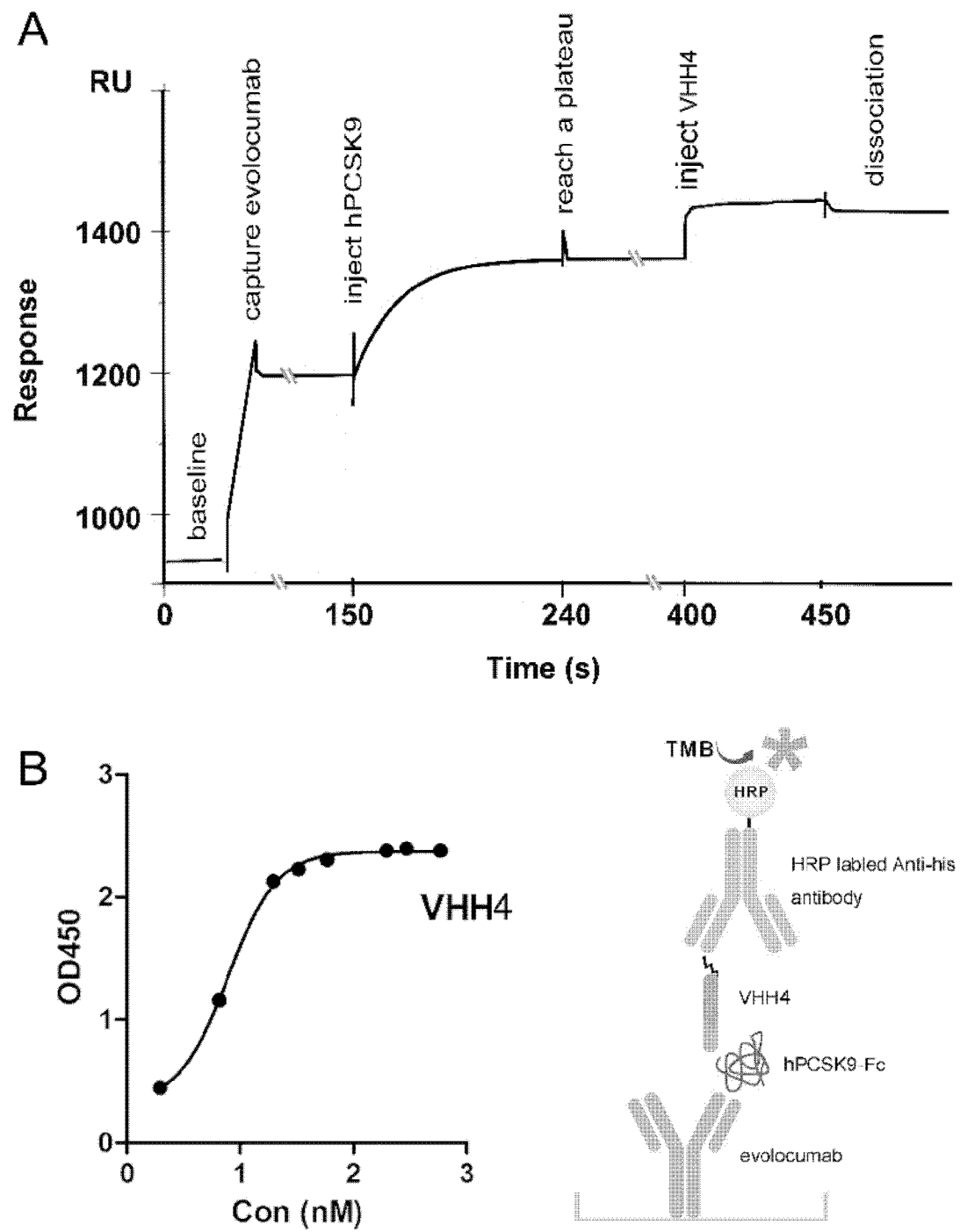


图 3

>PCSK9-mu01

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPFHGTTATFHRCA
 KDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELAL
 KLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD
 ENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTSGTLIGLEFIR
 KSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPFVITVGAT
 NAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDFAPGEDHIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTL
 AELRQRLIHFSKDVINEAWFPEDQRVLTPLNLVAALPPSTHAGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVA
 RCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAE
 ASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKV
 KEHGIPAPQEQTVAEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAIC
 CRSRHLAQASQELQ

>PCSK9-mu02

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPFHGTTATFHRCA
 KDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELAL
 KLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD
 ENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTSGTLIGLEFIR
 KSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPFVITVGAT
 NAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDFAPGEDHIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTL
 AELRQRLIHFSKDVINEAWFPEDQRVLTPLNLVAALPPSTHAGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVA
 RCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAE
 ASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKV
 KEHGIPAPQEQTVAEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAIC
 CRSRHLAQASQELQ

>PCSK9-mu03

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPFHGTTATFHRCA
 KDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELAL
 KLPHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD
 ENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTSGTLIGLEFIR
 KSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPFVITVGAT
 NAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDFAPGEDHIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTL
 AELRQRLIHFSKDVINEAWFPEDQRVLTPLNLVAALPPSTHAGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVA
 RCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAE
 ASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKV
 KEHGIPAPQEQTVAEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAIC
 CRSRHLAQASQELQ

图 4

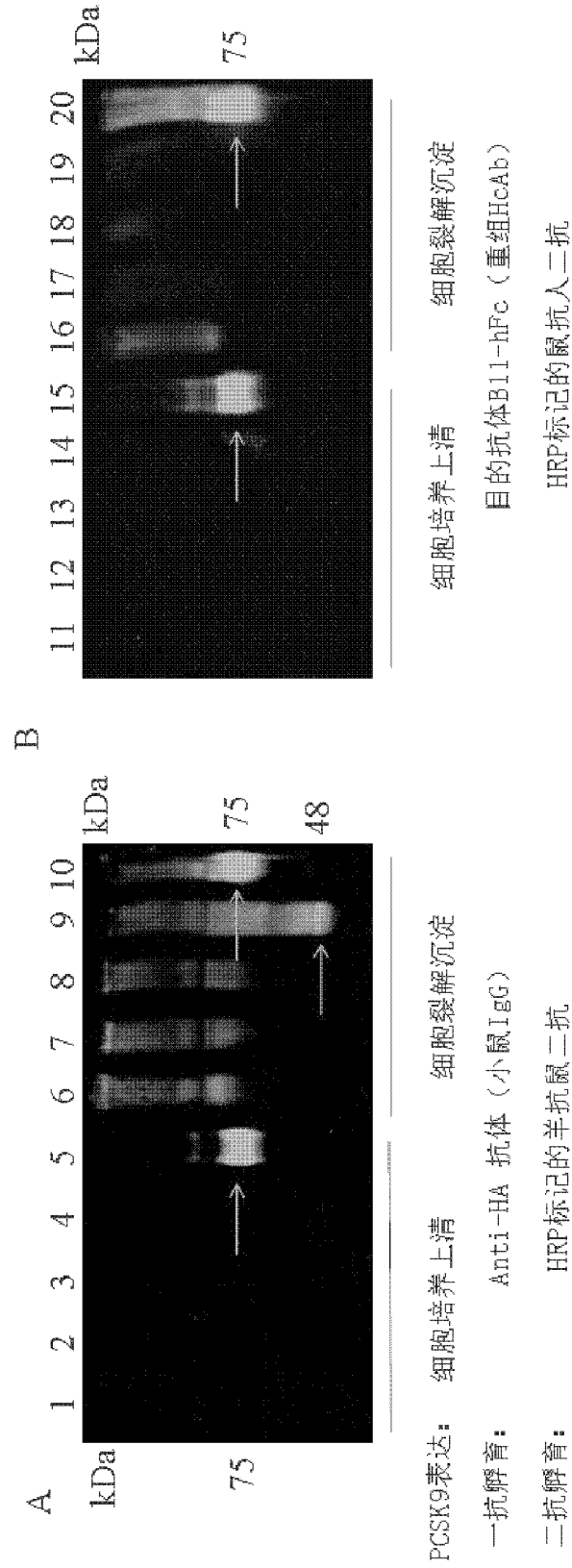


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/104876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 7/00(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, China Patents Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN and search terms: 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9, 447-453, 表位, epitope, SEQ ID Nos: 1-9																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2</td> <td>1, 10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2</td> <td>2-9, 11-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 109897110 A (BGI RESEARCH) 18 June 2019 (2019-06-18) claim 1, and sequence list</td> <td>2-9, 11-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) claims 1-11</td> <td>6-9, 11, 13-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) entire document</td> <td>1-5, 10, 12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103261230 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 21 August 2013 (2013-08-21) claims 45-47</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2	1, 10	Y	CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2	2-9, 11-15	Y	CN 109897110 A (BGI RESEARCH) 18 June 2019 (2019-06-18) claim 1, and sequence list	2-9, 11-15	Y	CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) claims 1-11	6-9, 11, 13-15	A	CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) entire document	1-5, 10, 12	A	CN 103261230 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 21 August 2013 (2013-08-21) claims 45-47	1-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2	1, 10																					
Y	CN 101679527 A (NOVARTIS AG.) 24 March 2010 (2010-03-24) claims 1-82, description page 15 table 2	2-9, 11-15																					
Y	CN 109897110 A (BGI RESEARCH) 18 June 2019 (2019-06-18) claim 1, and sequence list	2-9, 11-15																					
Y	CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) claims 1-11	6-9, 11, 13-15																					
A	CN 105085684 A (SHANGHAI HENGZHEN INDUSTRY CO., LTD.) 25 November 2015 (2015-11-25) entire document	1-5, 10, 12																					
A	CN 103261230 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 21 August 2013 (2013-08-21) claims 45-47	1-15																					
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 17 March 2021		Date of mailing of the international search report 09 April 2021																					
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/104876**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108883166 A (FUNPEP CO LTD; UNIV OSAKA) 23 November 2018 (2018-11-23) claims 1-15	1-15
A	CN 109475593 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 15 March 2019 (2019-03-15) claims 1-7	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/104876

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/104876

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	101679527	A	24 March 2010	EP	2137218 A2	30 December 2009
				EC	SP099688 A	30 November 2009
				MA	31304 B1	01 April 2010
				GT	200900264 A	12 August 2011
				AR	066042 A1	22 July 2009
				KR	20100019440 A	18 February 2010
				TW	200906439 A	16 February 2009
				ZA	200906489 B	26 May 2010
				MX	2009010957 A	29 October 2009
				IL	201194 D0	17 May 2010
				TN	2009000410 A1	31 March 2011
				ZA	200906489 A	26 May 2010
				AU	2008237940 A1	23 October 2008
				CO	6231040 A2	20 December 2010
				WO	2008125623 A3	05 February 2009
				WO	2008125623 A2	23 October 2008
				CA	2681428 A1	23 October 2008
				JP	2010523135 A	15 July 2010
				US	2010233177 A1	16 September 2010
				BR	PI0810551 A2	03 September 2019
				EA	200901376 A1	30 December 2010
				PE	20090145 A1	23 April 2009
CN	109897110	A	18 June 2019	None		
CN	105085684	A	25 November 2015	CN	105085684 B	17 April 2020
CN	103261230	A	21 August 2013	TW	201307391 A	16 February 2013
				US	2012195910 A1	02 August 2012
				JP	2014511106 A	08 May 2014
				EC	SP13012786 A	30 September 2013
				BR	112013015687 A2	11 October 2016
				CO	6721041 A2	31 July 2013
				AU	2011348232 A1	18 July 2013
				KR	20130118925 A	30 October 2013
				CA	2820953 A1	28 June 2012
				EA	201390929 A1	30 December 2013
				ZA	201304153 B	27 August 2014
				CR	20130336 A	22 October 2013
				WO	2012088313 A1	28 June 2012
				SG	191219 A1	31 July 2013
				MX	2013007168 A	04 November 2013
				AR	084456 A1	15 May 2013
				EP	2655419 A1	30 October 2013
				MA	34818 B1	02 January 2014
CN	108883166	A	23 November 2018	EP	3434279 A4	06 November 2019
				WO	2017164409 A1	28 September 2017
				JP	WO2017164409 A1	31 January 2019
				KR	20180123064 A	14 November 2018
				CA	3018482 A1	28 September 2017
				AU	2017238817 A1	04 October 2018
				EP	3434279 A1	30 January 2019
				US	2019105388 A1	11 April 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/104876

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109475593	A	15 March 2019	US	10787484	B2	29 September 2020
				BR	112018076242	A2	26 March 2019
				US	2019177366	A1	13 June 2019
				JP	2019523235	A	22 August 2019
				MX	2018016057	A	06 May 2019
				AU	2017281332	A1	20 December 2018
				TW	201811359	A	01 April 2018
				WO	2017220701	A1	28 December 2017
				KR	20190022680	A	06 March 2019
				CA	3026823	A1	28 December 2017
				IL	263460	D0	31 January 2019
				US	2020283478	A1	10 September 2020
				EP	3474875	A1	01 May 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/104876

A. 主题的分类

C07K 7/00(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9, 447-453, 表位, epitope, SEQ ID Nos: 1-9

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101679527 A (诺瓦提斯公司) 2010年 3月 24日 (2010 - 03 - 24) 权利要求1-82, 说明书第15页表2	1, 10
Y	CN 101679527 A (诺瓦提斯公司) 2010年 3月 24日 (2010 - 03 - 24) 权利要求1-82, 说明书第15页表2	2-9、11-15
Y	CN 109897110 A (深圳华大生命科学研究院) 2019年 6月 18日 (2019 - 06 - 18) 权利要求1, 序列表	2-9、11-15
Y	CN 105085684 A (上海亨臻实业有限公司) 2015年 11月 25日 (2015 - 11 - 25) 权利要求1-11	6-9, 11, 13-15
A	CN 105085684 A (上海亨臻实业有限公司) 2015年 11月 25日 (2015 - 11 - 25) 全文	1-5, 10, 12
A	CN 103261230 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 权利要求45-47	1-15
A	CN 108883166 A (国立大学法人大阪大学 丰沛股份有限公司) 2018年 11月 23日 (2018 - 11 - 23) 权利要求1-15	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 3月 17日

国际检索报告邮寄日期

2021年 4月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王翔宇

电话号码 62089318

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109475593 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年 3月 15日 (2019 - 03 - 15) 权利要求1-7	1-15

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/104876

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	101679527	A	2010年 3月 24日	EP	2137218	A2	2009年 12月 30日
				EC	SP099688	A	2009年 11月 30日
				MA	31304	B1	2010年 4月 1日
				GT	200900264	A	2011年 8月 12日
				AR	066042	A1	2009年 7月 22日
				KR	20100019440	A	2010年 2月 18日
				TW	200906439	A	2009年 2月 16日
				ZA	200906489	B	2010年 5月 26日
				MX	2009010957	A	2009年 10月 29日
				IL	201194	D0	2010年 5月 17日
				TN	2009000410	A1	2011年 3月 31日
				ZA	200906489	A	2010年 5月 26日
				AU	2008237940	A1	2008年 10月 23日
				CO	6231040	A2	2010年 12月 20日
				WO	2008125623	A3	2009年 2月 5日
				WO	2008125623	A2	2008年 10月 23日
				CA	2681428	A1	2008年 10月 23日
				JP	2010523135	A	2010年 7月 15日
				US	2010233177	A1	2010年 9月 16日
				BR	PI0810551	A2	2019年 9月 3日
				EA	200901376	A1	2010年 12月 30日
				PE	20090145	A1	2009年 4月 23日
CN	109897110	A	2019年 6月 18日	无			
CN	105085684	A	2015年 11月 25日	CN	105085684	B	2020年 4月 17日
CN	103261230	A	2013年 8月 21日	TW	201307391	A	2013年 2月 16日
				US	2012195910	A1	2012年 8月 2日
				JP	2014511106	A	2014年 5月 8日
				EC	SP13012786	A	2013年 9月 30日
				BR	112013015687	A2	2016年 10月 11日
				CO	6721041	A2	2013年 7月 31日
				AU	2011348232	A1	2013年 7月 18日
				KR	20130118925	A	2013年 10月 30日
				CA	2820953	A1	2012年 6月 28日
				EA	201390929	A1	2013年 12月 30日
				ZA	201304153	B	2014年 8月 27日
				CR	20130336	A	2013年 10月 22日
				WO	2012088313	A1	2012年 6月 28日
				SG	191219	A1	2013年 7月 31日
				MX	2013007168	A	2013年 11月 4日
				AR	084456	A1	2013年 5月 15日
				EP	2655419	A1	2013年 10月 30日
				MA	34818	B1	2014年 1月 2日
CN	108883166	A	2018年 11月 23日	EP	3434279	A4	2019年 11月 6日
				WO	2017164409	A1	2017年 9月 28日
				JP	W02017164409	A1	2019年 1月 31日
				KR	20180123064	A	2018年 11月 14日
				CA	3018482	A1	2017年 9月 28日
				AU	2017238817	A1	2018年 10月 4日
				EP	3434279	A1	2019年 1月 30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/104876

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 109475593 A				2019年 3月 15日		US 2019105388 A1	2019年 4月 11日
						US 10787484 B2	2020年 9月 29日
						BR 112018076242 A2	2019年 3月 26日
						US 2019177366 A1	2019年 6月 13日
						JP 2019523235 A	2019年 8月 22日
						MX 2018016057 A	2019年 5月 6日
						AU 2017281332 A1	2018年 12月 20日
						TW 201811359 A	2018年 4月 1日
						WO 2017220701 A1	2017年 12月 28日
						KR 20190022680 A	2019年 3月 6日
						CA 3026823 A1	2017年 12月 28日
						IL 263460 D0	2019年 1月 31日
						US 2020283478 A1	2020年 9月 10日
						EP 3474875 A1	2019年 5月 1日