

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-501952

(P2011-501952A)

(43) 公表日 平成23年1月20日(2011.1.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 6
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 93 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-531314 (P2010-531314)	(71) 出願人	596129215
(86) (22) 出願日	平成20年10月27日 (2008.10.27)		シェーリング コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成22年6月7日 (2010.6.7)		Schering Corporation
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/081311		アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
(87) 国際公開番号	W02009/055783		033-0530, ケニルワース, ギャロ
(87) 国際公開日	平成21年4月30日 (2009.4.30)		ッピング ヒル ロード 2000
(31) 優先権主張番号	60/982, 922	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成19年10月26日 (2007.10.26)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質障害およびコレステロール障害を治療するための抗PCSK9および方法

(57) 【要約】

抗PCSK9抗体またはPCSK9のペプチド阻害薬の投与によってコレステロールおよび脂質の代謝の障害を治療するための組成物および方法。本発明は例えば、被験者（例えば、ヒト）において総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリタンパク質Bレベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率または低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させるための方法であって、PCSK9とLDL受容体との間の結合を阻害する、PCSK9に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または組換え抗体）またはEGF-Aポリペプチドの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤（例えば、エゼチミブおよび/またはシンバスタチン）と組み合わせて、前記被験者に投与することを含む方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む 11B5 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (i i) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む 75B9 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (i i i) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む 77D10 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (i v) 配列番号 34 のアミノ酸配列を含む 29C10 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (v) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む 22D11 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (v i) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む 1F11 / 1G11 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 ;
- (v i i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む 11B5 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;
- (v i i i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む 75B9 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;
- (i x) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む 77D10 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;
- (x) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む 29C10 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;
- (x i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む 22D11 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ; および
- (x i i) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む 1F11 / 1G11 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3
- から成る群より選択される 1 つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

20

【請求項 2】

さらなる化学療法剤と組み合わせての請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。

30

【請求項 3】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または HMG - CoA レダクターゼ阻害薬である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルプレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシノロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ビスプロロール、フマル酸ビスプロロール、ネビボロール (nebiavalol)、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チプレノロールまたはトラモロールである、請求項 2 に記載の組成物。

40

【請求項 5】

さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、請求項 4 に記載の組成物。

50

【請求項 6】

ヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v 二量体、d s f v、(d s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性 d s ダイアボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 9】

免疫グロブリンの定常領域に連結されている、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記定常領域が 軽鎖、 1 重鎖、 2 重鎖、 3 重鎖または 4 重鎖である、請求項 9 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

医薬的に許容される担体と組み合わせて請求項 1 に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

20

【請求項 12】

(i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y M H (配列番号 11) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (配列番号 12) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：S Y F G S I F A Y (配列番号 13) を含む H C D R 3；

(i i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号 19) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号 20) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：S Y Y G S I F A Y (配列番号 21) を含む H C D R 3；

(i i i) アミノ酸配列：G F N I K D Y Y I H (配列番号 27) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号 28) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号 29) を含む H C D R 3；

30

(i v) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号 35) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号 36) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号 37) を含む H C D R 3；

(v) アミノ酸配列：G F T F S N H D M A (配列番号 43) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (配列番号 44) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (配列番号 45) を含む H C D R 3；

40

(v i) アミノ酸配列：G Y T F T D Y Y M N (配列番号 51) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (配列番号 52) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：G I I T E I A E D F (配列番号 53) を含む H C D R 3；

(v i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L Y (配列番号 15) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R S S H R A S (配列番号：16) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y Q S Y P P T (配列番号 17) を含む L C D R 3；

50

(v i i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L F (配列番号 23) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R T S Y L A S (配列番号 24) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y H T Y P P T (配列番号 25) を含む L C D R 3；

(i x) アミノ酸配列：R A S G N I H S Y L A (配列番号 31) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：N A K T L P D (配列番号 32) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q H F W N T P W T (配列番号 33) を含む L C D R 3；

(x) アミノ酸配列：R A S Q D I S N Y L N (配列番号 39) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：Y S S R L H S (配列番号 40) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q G K T L P L T (配列番号 41) を含む L C D R 3；

(x i) アミノ酸配列：R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (配列番号 47) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R V S N R F S (配列番号 48) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：L Q S T H F P P T (配列番号 49) を含む L C D R 3；および

(x i i) アミノ酸配列：K A S Q N V G T N V V (配列番号 55) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：S A S Y R Y S (配列番号 56) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q Y K T Y P Y T (配列番号 57) を含む L C D R 3

から成る群より選択される 1 つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

さらなる化学療法剤と組み合わせて請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。

【請求項 14】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または H M G - C o A レダクターゼ阻害薬である、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサソール、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリベルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチア

10

20

30

40

50

ゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロプレニラミン、リドフラジン、プレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ベルヘキシリン、オクスプレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレバロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテビル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、請求項 1 3 に記載の組成物。

10

【請求項 1 6】

前記さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、請求項 1 5 に記載の組成物。

20

【請求項 1 7】

ヒト化抗体である、請求項 1 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 8】

ヒト化抗体である、請求項 1 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 9】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 1 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 2 0】

ラクダ化単一ドメイン抗体、ダイアボディ、 $s c f v$ 、 $s c f v$ 二量体、 $d s f v$ 、 $(d s f v)_2$ 、 $d s F v - d s f v'$ 、二重特異性 $d s$ ダイアボディ、 $F v$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ 、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項 1 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 1】

免疫グロブリンの定常領域に連結されている、請求項 1 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 2】

前記定常領域が 軽鎖、 1 重鎖、 2 重鎖、 3 重鎖または 4 重鎖である、請求項 2 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 2 3】

医薬的に許容される担体と組み合わせて請求項 1 2 に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

【請求項 2 4】

(a) アミノ酸配列：

【化36】

EVQLQQSGAELVKPGASVTLSCITASGFNIKDTY
MHWVNQRPEQGLVWIGRIDPANGHTEYDPKFKQD
KATITTDTSSENTAYLHLSLTSGLDTAVYYCARS
YFGSIFAYWGQGTLVTVSA

(配列番号10)

を含む免疫グロブリン重鎖；

10

(b) アミノ酸配列：

【化37】

QIVLTQSPAIMSA SPGEKVTISCSASSSVSYLY
WYQQKPGSSPKPWIFRSSHRA SGVPARFSGSGS
GTSYSLTIS SMEAEDAATYYCHQYQSYPTFGG
GTKLEIKRA

(配列番号14)

20

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(c) アミノ酸配列：

【化38】

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKDTY
IHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTEYDPKFKQG
RATLTDTSSNTAYLQLFSLTSEDSAVYFCARS
YYGSI FAYWGQGTLVTVSA

(配列番号18)

30

を含む免疫グロブリン重鎖；

(d) アミノ酸配列：

【化39】

QIVLTQSPAIMSA SPGEKVTISCSASSSVSYLF
WYQQKPGSSPKPWIFRTSYLASGVPARFSGSGS
GTSFSLTIS SMEAEDAATYYCHQYHTYPTFGG
GTKLEIKRA

(配列番号22)

40

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(e) アミノ酸配列：

【化40】

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTTSGFNIKDY
IHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPKFQG
KATMTADTSSNTAYLQLSSSLTSADTAVYYCNA
YYRYDDGTWFPYWGQGTLVTVSA

(配列番号26)

を含む免疫グロブリン重鎖；

10

(f) アミノ酸配列：

【化41】

DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHSYL
AWYQQKQKSPQFLVDNAKTLPDGVPSRFSVSG
SGTQYSLKINSLSQPEDFGTYYCQHFWNTPWTFG
GGTKLEIKRA

(配列番号30)

20

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(g) アミノ酸配列：

【化42】

EVL LQQSVAE LVRPGASVRLSCTASGFNIKDTY
IHWVRQRPEQGLEWFGWIDPANGYTKYAPNFG
KATLT TDTSSNTAYLHLSSSLTSEDSAIYYCARG
YYRYYS L DYWGQGTSVTVSS

(配列番号34)

30

を含む免疫グロブリン重鎖；

(h) アミノ酸配列：

【化43】

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYL
N WYQQKPDGTVKLLIYYSSRLHSGVPSRFSGRG
SGTDYSLTISTLEQEDIATYFCQQGKTLPLTFG
AGTKLEL KRA

(配列番号38)

40

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(i) アミノ酸配列：

【化 4 4】

EVQLVDSGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNHD
MAWVRQAPTKGLEWVASITPSGGTTYRDSVEG
RFTVSRDENVKSSLHLQMDSLTSEDTATYYCARQ
NYVDGSYYYGLYYFDYWGGQGMVTVSS

(配列番号42)

を含む免疫グロブリン重鎖；

10

(j) アミノ酸配列：

【化 4 5】

DVLMTQTPLVSLPVSLGGQVSI SCRSSQSLVYS D
GNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPR
FSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLG LYYCLQSTHF
PPTFGSGTKLEIKRA

(配列番号46)

20

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(k) アミノ酸配列：

【化 4 6】

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKVSGYTFTDYY
MNWVKQSHGKSL EWIGDINPNNGGAIYNQKFKG
KATLTVDKSSSIAYMELRSLTSEDSAVYYCTSG
ITEIAEDFWGQGTTTLTVSS

(配列番号50)

30

を含む免疫グロブリン重鎖；および

(l) アミノ酸配列：

【化 4 7】

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV
VWYQQKPGQSPKALIHSA SYRYSQGVPRDRFKGSG
SGTDFTLTITNVQSEDL AGFFCQQYKTYPTYTFG
GGTQLEIKRA

(配列番号54)

40

を含む免疫グロブリン軽鎖

から成る群より選択される1つまたはそれより多くのメンバーを含む、請求項12に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 5】

さらなる化学療法剤と組み合わせて請求項24に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。

【請求項 2 6】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテ

50

ンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬またはHMG-CoAレダクターゼ阻害薬である、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルプレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ビスプロロール、フマル酸ビスプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール2-プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、ブレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、ブレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル1H-インドール-2-カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ソフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスブレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ-ヒドロクロロチアジド、メチルドパ-クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレバロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテピル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、請求項25に記載の組成物。

【請求項28】

前記さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

ヒト化抗体である、請求項24に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項30】

ヒト化抗体である、請求項24に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項31】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメ

10

20

30

40

50

ラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 32】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、 $s c f v$ 、 $s c f v$ 二量体、 $d s f v$ 、 $(d s f v)_2$ 、 $d s F v - d s f v'$ 、二重特異性 $d s$ ダイアボディ、 $F v$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ 、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 33】

免疫グロブリンの定常領域に連結されている、請求項 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 34】

前記定常領域が 軽鎖、1 重鎖、2 重鎖、3 重鎖または 4 重鎖である、請求項 33 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 35】

医薬的に許容される担体と組み合わせて請求項 24 に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

【請求項 36】

$P C S K 9$ と $L D L$ 受容体との間の結合を阻害する、 $P C S K 9$ に特異的に結合する単離抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは単離 $E G F - A$ ポリペプチド、および医薬的に許容される担体を含有する医薬組成物。

20

【請求項 37】

前記抗体が $P C S K 9$ 触媒ドメインまたは $L D L$ 受容体 $E G F - A$ ドメインと相互作用する $P C S K 9$ のドメインに特異的に結合する、請求項 36 に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

ヒト $L D L$ 受容体のおよそアミノ酸位置 314 から始まり、およそアミノ酸位置 355 で終わるアミノ酸から成る、ヒト $L D L$ 受容体フラグメントに対して約 90% またはそれより高いアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、場合により、

(i) $P C S K 9$ に結合する；

(i i) $P C S K 9$ への結合に関して $L D L$ 受容体または抗 $P C S K 9$ 抗体もしくはその抗原結合フラグメントと競合する；

30

(i i i) 動物に投与した場合、総コレステロールレベルを低下させる；

(i v) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質コレステロールレベルを低下させる；

(v) 動物に投与した場合、アポリタンパク質 B レベルを低下させる；

(v i) 動物に投与した場合、総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる；および

(v i i) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる

ことから成る群より選択される 1 つまたはそれより多くの性質を含む単離ポリペプチド、または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

40

【請求項 39】

配列番号 3 のアミノ酸配列から成る請求項 38 に記載のポリペプチドまたは医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

【請求項 40】

被験者において、

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；または

50

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率を低下させるための方法であって、P C S K 9 に特異的に結合する、P C S K 9 アンタゴニストである E G F - A ポリペプチドまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤と組み合わせて前記被験者に投与する工程を含み、該抗体もしくはフラグメントまたは E G F - A ポリペプチドは、P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、方法。

【請求項 4 1】

前記抗体もしくはフラグメントが、P C S K 9 触媒ドメインまたは L D L 受容体 E G F - A ドメインと相互作用する P C S K 9 のドメインに特異的に結合する、請求項 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 4 2】

被験者において高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症または黄色腫を治療するまたは予防するための方法であって、P C S K 9 に特異的に結合する、E G F - A ポリペプチドまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤と組み合わせて前記被験者に投与する工程を含み、該抗体もしくはフラグメントまたは E G F - A ポリペプチドは、P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、方法。

【請求項 4 3】

前記抗体が、P C S K 9 触媒ドメインまたは L D L 受容体 E G F - A ドメインと相互作用する P C S K 9 のドメインに特異的に結合する、請求項 4 2 に記載の方法。

20

【請求項 4 4】

被験者において、

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリポタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；もしくは

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるため；または

高コレステロール血症；

高脂血症；

高トリグリセリド血症；

シトステロール血症；

アテローム性動脈硬化症；

動脈硬化症；

冠状動脈性心疾患；

血管炎症；もしくは

黄色腫

を治療するための方法であって、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効量を前記被験者に投与する工程を含む方法。

30

40

【請求項 4 5】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをさらなる化学療法剤と組み合わせて投与する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または H M G - C o A レダクターゼ阻害薬である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン

50

、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ソフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロプレニラミン、リドフラジン、プレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスブレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレバロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテピル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記さらなる化学療法剤がエゼチミブおよび、場合により、シンバスタチンである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

被験者において、

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリポタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；もしくは

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるため；または

高コレステロール血症；
 高脂血症；
 高トリグリセリド血症；
 シトステロール血症；
 アテローム性動脈硬化症；
 動脈硬化症；
 冠状動脈性心疾患；
 血管炎症；もしくは
 黄色腫

を治療するための方法であって、請求項 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効量を前記被験者に投与する工程を含む方法。

10

【請求項 51】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをさらなる化学療法剤と組み合わせて投与する、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または HMG - CoA レダクターゼ阻害薬である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセブトロール、塩酸アルプレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、ブラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、ブラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、ブレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、ブレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸プトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニトレート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスプレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カブ

20

30

40

50

トブリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレパロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテピル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸ブラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記さらなる化学療法剤がエゼチミブおよび、場合により、シンバスタチンである、請求項 5 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 5】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを作製するための方法であって、前記重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンをコードし、その発現を指令する 1 つまたはそれより多くのポリヌクレオチドを、1 つまたはそれより多くの宿主細胞に導入する工程；ならびに前記宿主細胞を前記重鎖および軽鎖の免疫グロブリンが発現される条件下で増殖させる工程を含む方法。

20

【請求項 5 7】

前記軽鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドと、前記重鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドが別々の宿主細胞中に存在する、請求項 5 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2007 年 10 月 26 日出願の米国特許出願第 60 / 982, 922 号に対する優先権を主張する。米国特許出願第 60 / 982, 922 号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

30

【0002】

(発明の分野)

本発明の分野は、抗 PCSK9 抗体またはその抗原結合フラグメントを投与することによってコレステロール恒常性の障害を治療するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

アテローム硬化性冠状動脈心疾患 (CHD) は、西欧諸国における死亡および心臓血管の病的状態の主要な原因である。アテローム硬化性冠状動脈心疾患についての危険因子は、高血圧、糖尿病、家族歴、男性であること、喫煙、高い血清コレステロールレベル、高い低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロールレベルおよび低い高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールレベルを含む。一般に、約 225 - 250 mg / dl を超える総コレステロールレベルは CHD の危険度の重大な上昇に結びつく。

40

【0004】

様々な臨床試験で、総コレステロールまたは LDL コレステロールのレベル上昇はヒトのアテローム性動脈硬化症を促進することが明らかにされた。疫学的調査は、心臓血管罹病率および死亡率が総コレステロールおよび LDL コレステロールのレベルによって直接変化することを確認した。

【0005】

LDL コレステロールレベルを低下させるための 1 つの方法は、HMG - CoA レダクターゼ阻害薬を投与することによる。これらの薬剤は、HMG - CoA レダクターゼおよ

50

び肝臓におけるコレステロール合成に拮抗し、細胞表面の肝LDL受容体の数を増加させてLDLの取込みと異化を促進する。そのようなアプローチの欠点は、これらの薬剤が共通して、例えば、肝毒性を含む、不都合な副作用プロファイルを有することである。選択的なアプローチは、LDL受容体経路を直接調節することである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

PCSK9（プロタンパク質コンベルターゼズブチリシンノケキシン9型）は、細胞の表面上のLDL受容体に結合し、その発現を調節するセリンプロテアーゼファミリーのメンバーである。LDL受容体-PCSK9相互作用の阻害はコレステロール障害の治療への魅力的なアプローチである。抗体または低分子阻害剤の使用による大型タンパク質間の相互作用（すなわちタンパク質間相互作用またはPPI）の阻害は、しかし、一般に極めて難しく、厳しい課題であるとみなされている。約74KDaの分子量を有する、PCSK9のような大型タンパク質と、約160KDaの分子量を有する（細胞表面でグリコシル化される；未熟形態では115KDa）LDLRは、大きな範囲にわたって広範囲の分子間接触を示す可能性が高い。広範囲の接触の存在により、所与の抗体または低分子阻害剤がそれらの結合を成功裏にブロックすることは起こりそうにない。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

（発明の要旨）

20

本発明は、驚くべきことに、大型タンパク質の間の分子間相互作用の遮断に関連する技術的な問題を克服し、抗体またはペプチドによるPCSK9-LDLR相互作用の遮断が可能であることを明らかにした。本明細書で詳細に論じるように、これは、次に、コレステロール障害を治療する新規方法を提供する。

【0008】

本発明は、一部には、被験者（例えば、ヒト）において総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリポタンパク質Bレベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率または低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させるための方法であって、PCSK9とLDL受容体との間の結合を阻害する、PCSK9に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または組換え抗体）またはEGF-Aポリペプチドの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤（例えば、エゼチミブおよび/またはシンバスタチン）と組み合わせて、前記被験者に投与することを含む方法を提供する。本発明の1つの実施形態では、前記抗体またはフラグメントまたはEGF-Aポリペプチドは、PCSK9触媒ドメインまたはLDL受容体EGF-Aドメインと相互作用するPCSK9のドメインに特異的に結合する。

30

【0009】

本発明はさらに、一部には、被験者において高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症または黄色腫を治療するまたは予防するための方法であって、PCSK9とLDL受容体との間の結合を阻害する、PCSK9に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または組換え抗体）またはEGF-Aポリペプチドの治療有効量を、場合によりさらなる治療薬（例えば、エゼチミブおよび/またはシンバスタチン）と組み合わせて、前記被験者に投与することを含む方法を提供する。本発明の1つの実施形態では、前記抗体またはフラグメントまたはEGF-Aポリペプチドは、PCSK9触媒ドメインまたはLDL受容体EGF-Aドメインと相互作用するPCSK9のドメインに特異的に結合する。

40

【0010】

本発明はまた、一部には、PCSK9とLDL受容体との間の結合を阻害する、PCSK9に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント（例えば、モノクローナ

50

ル抗体、ポリクローナル抗体または組換え抗体)またはEGF-Aポリペプチド、および医薬的に許容される担体を、場合によりさらなる化学療法剤(例えば、エゼチミブおよび/またはシンバスタチン)と共に含有する医薬組成物を提供する。

【0011】

本発明はまた、ヒトLDL受容体のおよそアミノ酸位置314から始まり、およそアミノ酸位置355で終わるアミノ酸から成る、ヒトLDL受容体フラグメントに対して約90%またはそれより高いアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、場合により、(i)PCSK9に結合する；(ii)PCSK9への結合に関してLDL受容体または抗PCSK9抗体もしくはその抗原結合フラグメントと競合する；(iii)動物に投与した場合、総コレステロールレベルを低下させる；(iv)動物に投与した場合、低密度リポタンパク質コレステロールレベルを低下させる；(v)動物に投与した場合、アポリタンパク質Bレベルを低下させる；(vi)動物に投与した場合、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率を低下させる；および(vii)動物に投与した場合、低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させることから成る群より選択される1つまたはそれより多くの性質を含む単離ポリペプチド、または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物を提供する。本発明の1つの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列、または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物から成る。

【0012】

本発明は、

(i)配列番号10のアミノ酸配列を含む11B5重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含む75B9重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(iii)配列番号26のアミノ酸配列を含む77D10重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(iv)配列番号34のアミノ酸配列を含む29C10重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(v)配列番号42のアミノ酸配列を含む22D11重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(vi)配列番号50のアミノ酸配列を含む1F11/1G11重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(vii)配列番号14のアミノ酸配列を含む11B5軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(viii)配列番号22のアミノ酸配列を含む75B9軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(ix)配列番号30のアミノ酸配列を含む77D10軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(x)配列番号38のアミノ酸配列を含む29C10軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(xi)配列番号46のアミノ酸配列を含む22D11軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(xii)配列番号54のアミノ酸配列を含む1F11/1G11軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3

から成る群より選択される1つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。本発明はまた、

(i)アミノ酸配列：G F N I K D T Y M H(配列番号11)を含むHC DR1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q D(配列番号12)を含むHC DR2およびアミノ酸配列：S Y F G S I F A Y(配列番号13)を含むHC DR3；

(i i) アミノ酸配列： G F N I K D T Y I H (配列番号 19) を含む H C D R 1、アミノ酸配列： R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号 20) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列： S Y Y G S I F A Y (配列番号 21) を含む H C D R 3；

(i i i) アミノ酸配列： G F N I K D Y Y I H (配列番号 27) を含む H C D R 1、アミノ酸配列： W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号 28) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列： Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号 29) を含む H C D R 3；

(i v) アミノ酸配列： G F N I K D T Y I H (配列番号 35) を含む H C D R 1、アミノ酸配列： W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号 36) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列： G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号 37) を含む H C D R 3；

(v) アミノ酸配列： G F T F S N H D M A (配列番号 43) を含む H C D R 1、アミノ酸配列： S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (配列番号 44) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列： Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (配列番号 45) を含む H C D R 3；

(v i) アミノ酸配列： G Y T F T D Y Y M N (配列番号 51) を含む H C D R 1、アミノ酸配列： D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (配列番号 52) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列： G I I T E I A E D F (配列番号 53) を含む H C D R 3；

(v i i) アミノ酸配列： S A S S S V S Y L Y (配列番号 15) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： R S S H R A S (配列番号： 16) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： H Q Y Q S Y P P T (配列番号 17) を含む L C D R 3；

(v i i i) アミノ酸配列： S A S S S V S Y L F (配列番号 23) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： R T S Y L A S (配列番号 24) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： H Q Y H T Y P P T (配列番号 25) を含む L C D R 3；

(i x) アミノ酸配列： R A S G N I H S Y L A (配列番号 31) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： N A K T L P D (配列番号 32) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： Q H F W N T P W T (配列番号 33) を含む L C D R 3；

(x) アミノ酸配列： R A S Q D I S N Y L N (配列番号 39) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： Y S S R L H S (配列番号 40) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： Q Q G K T L P L T (配列番号 41) を含む L C D R 3；

(x i) アミノ酸配列： R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (配列番号 47) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： R V S N R F S (配列番号 48) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： L Q S T H F P P T (配列番号 49) を含む L C D R 3；

(x i i) アミノ酸配列： K A S Q N V G T N V V (配列番号 55) を含む L C D R 1、アミノ酸配列： S A S Y R Y S (配列番号 56) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列： Q Q Y K T Y P Y T (配列番号 57) を含む L C D R 3

から成る群より選択される 1 つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。さらに、本発明は、(a) アミノ酸配列：

【 0 0 1 3 】

10

20

30

40

【化1】

EVQLQQSGAELVKPGASVTLSCCTASGFNIKDTY
MHWVNQRPEQGLVWIGRIDPANGHTEYDPKFQD
KATITTDTSSENTAYLHLSLTSGLDTAVYYCAR
SYFGSIFAYWGQGTLVTVSA (配列番号10)

【0014】

を含む免疫グロブリン重鎖；(b)アミノ酸配列：

【0015】

【化2】

QIVLTQSPA
IMASAPGEKVTISCSASSSVSYLYWYQQKPGSS
PKPWIFRSSHRSASGVPARFSGSGSGTSSLTIS
SMEAEDAATYYCHQYQSYPPPTFGGGTKLEIKRA
(配列番号14)

【0016】

を含む免疫グロブリン軽鎖；(c)アミノ酸配列：

【0017】

【化3】

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNI
KDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTEYDP
KFQGRATLTDTSSSENTAYLQLFSLTSEDSAVYF
CARSYYGSI FAYWGQGTLVTVSA (配列番号18)

【0018】

を含む免疫グロブリン重鎖；(d)アミノ酸配列：

【0019】

【化4】

QIVLTQSPA
IMASAPGEKVTISCSASSSVSYLFWYQQKPGSS
PKPWIFRTSYLASGVPARFSGSGSGTSFSLTIS
SMEAEDAATYYCHQYHTYPPPTFGGGTKLEIKRA
(配列番号22)

【0020】

を含む免疫グロブリン軽鎖；(e)アミノ酸配列：

【0021】

【化5】

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTTSGFNI
KDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAP
KFQGKATMTADTSSENTAYLQLSSLTSA DTAVYY
CNAYYRYDDGTWFPYWGQGTLVTVSA
(配列番号26)

【0022】

10

20

30

40

50

を含む免疫グロブリン重鎖；(f)アミノ酸配列：

【0023】

【化6】

DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHSYL
AWYQQKQGKSPQFLVDNAKTLPDGVPSRFSVSG
SGTQYSLKINSLSQPEDDFGTYYCQHFWNTPWTFG
GGTKLEIKRA (配列番号30)

【0024】

を含む免疫グロブリン軽鎖；(g)アミノ酸配列：

【0025】

【化7】

EVLLQQSVAELVRPGASVR
LSCTASGFNIKDTYIHWVRQRPEQGLEWFGWID
PANGYTKYAPNFPQGKATLTDTSSNTAYLHLS
LTSEDSAIYYCARGYRYYSLDYWGGGTSTVTS
S (配列番号34)

【0026】

を含む免疫グロブリン重鎖；

(h)アミノ酸配列：

【0027】

【化8】

DIQMTQT
TSSLSASLGDRTVITSCRASQDISNYLNWYQQKP
DGTVKLLIYYSSRLHSGVPSPRFSGRGSGTDSL
TISTLEQEDIATYFCQQGKTLPLTFGAGTKLEL
KRA

(配列番号38)

【0028】

を含む免疫グロブリン軽鎖；(i)アミノ酸配列：

【0029】

【化9】

EVQLVDSGGGLVQPGRSLLKLSCTAASGFTFSNHD
MAWVRQAPTKGLEWVASITPSGGTTYRDSVEG
RFTVSRDNVKSSLHLQMDSLTSEDTATYYCARQ
NYYDGSYYYGLYYFDYWGGGVMTVSS

(配列番号42)

【0030】

を含む免疫グロブリン重鎖；(j)アミノ酸配列：

【0031】

10

20

30

40

【化10】

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
 G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
 F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
 P P T F G S G T K L E I K R A (配列番号46)

【0032】

を含む免疫グロブリン軽鎖；(k)アミノ酸配列：

【0033】

【化11】

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S
 V K I S C K V S G Y T F T D Y Y M N W V K Q S H G K S L E W I G D
 I N P N N G G A I Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S I A Y M E L
 R S L T S E D S A V Y Y C T S G I I T E I A E D F W G Q G T T L T
 V S S

(配列番号50)

【0034】

を含む免疫グロブリン重鎖；および(l)アミノ酸配列：

【0035】

【化12】

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V
 G T N V V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R F
 K G S G S G T D F T L T I T N V Q S E D L A G F F C Q Q Y K T Y P
 Y T F G G G T Q L E I K R A (配列番号54)

【0036】

を含む免疫グロブリン軽鎖

から成る群より選択される1つまたはそれより多くのメンバーを含む、請求項xxxに記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。本発明の実施形態は、例えば、さらなる化学療法剤、例えば、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬またはHMG-CoAレダクターゼ阻害薬と共に本発明の抗体またはポリペプチドのいずれかを含有する組成物を含む。本発明の1つの実施形態では、さらなる化学療法剤は、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルプレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシノール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール(nebivolol)、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール2-プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロールまたはトラモロールである。本発明の実施形態はまた、抗体またはフラグメントが、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、二重特異

10

20

30

40

50

性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、 $s c f v$ 、 $s c f v$ 二量体、 $d s f v$ 、 $(d s f v)_2$ 、 $d s f v - d s f v'$ 、二重特異性 $d s$ ダイアボディ、 $F v$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ 、またはドメイン抗体であるものを含む。本発明の1つの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、免疫グロブリン定常領域、例えば、軽鎖、1重鎖、2重鎖、3重鎖または4重鎖に連結されている。本発明はまた、医薬的に許容される担体と共に本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を提供する。

【0037】

本発明はまた、被験者において、総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリポタンパク質Bレベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率もしくは低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させるため；または高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症もしくは黄色腫を治療するための方法であって、本明細書で述べるように治療有効量の本発明の任意のポリペプチドまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または、その医薬組成物を、場合により、例えば、本明細書で述べるような、さらなる化学療法剤と組み合わせて前記被験者に投与することを含む方法を提供する。

10

【0038】

本発明はまた、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを作製するための方法であって、前記重鎖および/または軽鎖免疫グロブリンをコードし、その発現を指令する1つまたはそれより多くのポリヌクレオチドを1つまたはそれより多くの宿主細胞に導入すること；ならびに前記宿主細胞を、前記重鎖および軽鎖免疫グロブリンが発現される条件下で増殖させることを含む方法を提供し、その方法では、例えば、前記軽鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドと、前記重鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドとは、別々の宿主細胞中に存在する。

20

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1-1】マウス抗ヒトPCSK9抗体の成熟可変領域アミノ酸配列。CDRに下線を付している。

【図1-2】マウス抗ヒトPCSK9抗体の成熟可変領域アミノ酸配列。CDRに下線を付している。

30

【図1-3】マウス抗ヒトPCSK9抗体の成熟可変領域アミノ酸配列。CDRに下線を付している。

【図1-4】マウス抗ヒトPCSK9抗体の成熟可変領域アミノ酸配列。CDRに下線を付している。

【発明を実施するための形態】

【0040】

(発明の詳細な説明)

本発明は、コレステロール障害を治療する革新的方法のための方法および組成物を含む。本発明の方法および組成物は、LDL受容体経路を調節することによってコレステロール障害を治療するために有用である。具体的には、本発明の方法および組成物は、PCSK9とLDLRの相互作用に拮抗し、それにより血流からのLDLのクリアランス上昇を導く。PPIをブロックすることに関連する非常な技術的困難さにもかかわらず、本発明は、この相互作用を標的化し、ブロックするための、それゆえ血中コレステロールレベルに関する有益な作用を導く方法を提供する。

40

【0041】

低密度リポタンパク質受容体(LDLR)という用語は、任意のそのような受容体、例えば、ヒトLDLRとその任意の対立遺伝子変異体を包含する。本発明の1つの実施形態では、完全長LDLRは以下のアミノ酸配列を含む(例えば、GenBank NM_000527.2参照)：

50

【 0 0 4 2 】

【 化 1 3 】

MGPWCWKLRTVALLLAAAGTAVGDRCEERNEFQCQDGKCI SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCG
GRVNRCI PQFWRCQDQVDCDNGSDEQGCPPKTC SQDEFRC HDGKCI SRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCPGPAS
FQCNSSTCIPQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDE
ENCAVATCRPDEFQCSDGNCIHGSRQCDREYDCKDMSDEVGCVNVTLC EGPKNFKCHSGECITL DKVCNMARDCRD
WSDEPIKECGTNECLDNNGGC SHVCNDLKIGYECLCPDGFQ LVAQRRCEDIDECQDPDTC SQLCVNLEGGYKCQCE
EGFQ LDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVRKMTLDRSEYTS LIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDLSQRMICSTQL
DRAHGVSSYDTVISRDIQAPDGLAVDWIHSNIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFMY
WTDWGTTPAKIKKGG LINGVDIYSLVTENIQWPNGITLDLLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHP
PSLAVFEDKVFWDI INEAI F SANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTTLSNGGCQYLCLPA
PQINPHSPKFTCACPDGM LLARDMRSLTEAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQHTTTTRPVDPDTSRLPGATPGLT
TVEIVTMSHQALGDVAGRGNEKKPSSVRALSIVLP I VLLVFLCLGVFLLWKNWRLKNINSINFDNPVYQKTTEDEV
HICHNQDGYSPSRQMSLEDDVA

10

(配列番号1)

【 0 0 4 3 】

本発明の1つの実施形態では、可溶性LDLRフラグメントは以下のアミノ酸配列を含む(Yamamotoら、Cell (1984) 39: 27-38):

【 0 0 4 4 】

【 化 1 4 - 1 】

AVGDRCEERNEFQCQDGKCI SYKWVCDGSAECQDGSDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNRCI PQFWRCQDQVDCDN
GSDEQGCPPKTC SQDEFRC HDGKCI SRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCPGPASFQCNSSTCIPQLWACDNDPDC
EDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLSGECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQCSDGNCI
HGSRQCDREYDCKDMSDEVGCVNVTLC EGPKNFKCHSGECITL DKVCNMARDCRDWSDEPIKECGTNECLDNNGGC
SHVCNDLKIGYECLCPDGFQ LVAQRRCEDIDECQDPDTC SQLCVNLEGGYKCQCEEGFQ LDPHTKACKAVGSIAYL
FFTNRHEVRKMTLDRSEYTS LIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDLSQRMICSTQLDRAHGVSSYDTVISRDIQAPD
GLAVDWIHSNIYWTDSVLGT VSVADTKGVKRKTLFRENGSKPRAIVVDPVHGFMYWTDWGTTPAKIKKGG LINGVDIY
SLVTENIQWPNGITLDLLSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRKTILEDEKRLAHPPSLAVFEDKVFWDI INEAI F
SANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTTLSNGGCQYLCLPAPQINPHSPKFTCACPDGM LLA
RDMRSLTEAEAAVATQETSTVRLKVSSTAVRTQHTTTTRPVDPDTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALGDVAGRGNE
KKPSSVR

20

(配列番号2)

【 0 0 4 5 】

本発明の1つの実施形態では、LDL受容体のEGF-Aドメインは以下のアミノ酸配列を含む:

【 0 0 4 6 】

【 化 1 4 - 2 】

GTNECLDNNGGC SHVCNDLKIGYECLCPDGFQ LVAQRRCEDI (配列番号3)

【 0 0 4 7 】

「被験者」という用語は、任意の動物、例えば、ヒトなどの哺乳動物を含む。

【 0 0 4 8 】

P C S K 9

本発明は、P C S K 9、例えば、ヒトP C S K 9に特異的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを含む組成物および方法を包含する。本発明の一部の実施形態では、以下で述べる様々な種からの特定P C S K 9ポリペプチド配列またはその抗原性フラグメントは、抗原として使用され得る:

40

HUMAN gi | 31317307 | ref | NP_777596.2 | プロタンバク質コンベルターゼズブチリシン/ケキシン9型

プレプロタンパク質 [ヒト (Homo sapiens)]

【 0 0 4 9 】

【化 1 5】

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRC AKD
PWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHV
DYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVPE
EDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGT VSGTLIGLEFIRKSQ LVPV
GPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT
LGTNFGRCVDLFAPEGEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIH FSA
KDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSF S
RSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAPAEASMGTRVHCHQQGHVLT
GCSSHWEVEDLGTHKPFVLRPRGQPNQCVGHREASI HASCCHAPGLECKVKEHGI PAPQEQVT VACEEGW
TLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQ

10

(配列番号4)

【0 0 5 0】

CHIMP gi | 114556790 | ref | XP_001154126.1 | 予
測：プロタンパク質コンベルターゼズブチリシン/ケキシン9型 [チンパンジー (Pan
troglodytes)]

【0 0 5 1】

【化 1 6】

20

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDDEDGLAEAPEHGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVLKEE
THLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIP
WNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVPEEDGTRFHRQASKCDS
HGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGT VSGTLIGLEFIRKSQ LVPVGPLVVLLPLAGGYSR
VLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT LGTNFGRCVDLFAPG
EDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIH FSAKDVINEAWFPEDQRV
LTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSF SRSGKRRGERMEAQGG
KLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSIH TAPPAPAEAGMGTRVHCHQQGHVLTGCS SHWEVEDLGTHK
PFMLRPRGQPNQCVGHREASI HASCCRAPGLECKVKEHGI PAPQEQVT VACEEGWTLTGCSALPGTSHVL
GAYAVDNTCVVRSRDVSTAGSTSEEAVAAVAICCRSRHLAQASQELQ

30

(配列番号5)

【0 0 5 2】

MOUSE gi | 23956352 | ref | NP_705793.1 | プロタン
パク質コンベルターゼズブチリシン/ケキシン9型 [ハツカネズミ (Mus muscu
lus)]

【0 0 5 3】

【化 1 7】

MGTHCSAWLRWPLLPPLPPLLLLLLLLCPTGAGAQDEDEGDYEELMLALPSQEDGLADEAAHVATATFERRC
SKEAWRLPGTYIVVLMEEETQRLQIEQTAHRLQTRAARRGYVIKVLHIFYDLFPGLVKMSSDLLGLALKL
PHVEYIEEDSFVFAQSIIPWNLERIIIPAWHQTEEDRSPDGSSQVEVYLLDTSIQGAHREIEGRVTITDENS
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGTSLSLSRLVLCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLI
QPSGPLVLLPLAGGYSRILNAAACRHLARTGVVLVAAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPV
LGTGTNFGRCVDLFAPGKDIIGASSDCSTCFMSQSGTSQAAAHVAGIVARMLSREPTLTALAE LRQRLIH
FSTKDVINMAWFPEDQQVLTPLNVLATLPPSTHETGGQLLCRTVWSAHSGPTRTATATARCAPEEELLSCS
SFSRSGRRRGDWIEAIGQQQVCKALNAFGGEGVYAVARCCLVPRANC SIHNTPAARAGLETHVHCHQKDH
VLTGCSFHWEVEDLSVRRQPALRSRRQPGQCVGHQAASVYASCCHAPGLECKIKEHGISGPSEQVTVACE
AGWTLTGCNVLPGLSLTLGAYSVDNLCVARVHDTARADRTSGEATVAAAICCRSRPSAKASWVQ

10

(配列番号6)

【0054】

RAT gi | 77020250 | ref | NP_954862.2 | プロタンパク質
コンベルターゼズブチリシン/ケキシシ9型 [ドブネズミ (ラット)] (Rattus n
orvegicus)]

【0055】

【化 1 8】

20

MGIRCSTWLRWPLSPQLLLLLLLLCPTGSRAQDEDEGDYEELMLALPSQEDSLVDEASHVATATFERRCSKEA
WRLPGTYVVVLMEEETQRLQVEQTAHRLQTTWAARRGYVIKVLHVIFYDLFPGLVKMSSDLLGLALKLPHVE
YIEEDSLVFAQSIIPWNLERIIIPAWQQTEEDSSPDGSSQVEVYLLDTSIQSGHREIEGRVTITDENSVP
EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGTSLSLSRLVLCQKGTVSGTLIGLEFIRKSQLIQPSG
PLVLLPLAGGYSRILNTACQRLARTGVVLVAAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT
LGTNFGRCVDLFAPGKDIIGASSDCSTCYMSQSGTSQAAAHVAGIVAMMLNRDPALTLAE LRQRLILFSTK
DVINMAWFPEDQQRVLTENRVATLPPSTQETGGQLLCRTVWSAHSGPTRTATATARCAPEEELLSCSSFSR
SGRRRGDRIEAIGQQQVCKALNAFGGEGVYAVARCCLLPRVNC SIHNTPAARAGPQTPVHCHQKDHVLTG
CSFHWEVENLRAQQQPLLSRHRQPGQCVGHQEAASVHASCHAPGLECKIKEHGIAGPAEQVTVACEAGWT
LTGCNVLPGLSLPLGAYSVDNVCVARIRDAGRADRTSEEATVAAAICCRSRPSAKASWVHQ

30

(配列番号7)

【0056】

EGF - A

本発明はまた、場合によりさらなる化学療法剤（例えば、本明細書で述べるような）と
共に、LDL受容体EGF - Aドメインを含むポリペプチドまたは医薬的に許容される担
体を含むその医薬組成物を被験者に投与することにより、該被験者において総コレス
テロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリタンパク質Bレ
ベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率または低密度リポタンパク質/高
密度リポタンパク質の比率を低下させるための方法を提供する。LDL受容体のEGF -
AドメインはPCSK9に結合し、そして、特定の理論または機序に拘束されることなく
、PCSK9への結合に関して完全な内因性LDL受容体と競合することによってPCSK
9の活性を低下させ得る。

40

【0057】

例えば、本発明の1つの実施形態では、EGF - Aドメインは以下のアミノ酸配列を含
むまたは以下のアミノ酸配列から成る：

【0058】

【化 1 9】

GTNECLDNNGGCASHVCNLDKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDI (配列番号3)

【0 0 5 9】

本発明の1つの実施形態では、ヒトLDL受容体は以下のアミノ酸配列を含む：

【0 0 6 0】

【化 2 0】

```

1  mppwgwkrlrw tvaillaaag tavgdrcern efqcqdgkci sykwvcdgsa ecqdgdsesq
61  etclsvtcks gdfscggrvn rcipqfwred gqvdcnngsd eggcppkctc qdefrchdggk
121 cisrqfvcds drdcldgsde ascpvlitcp asfqnsstc ipqlwacdnd pdccdgsdew
181 pqrccrglyvf qgdsspcsaf efhclsgeci hsswrcdggp dckdksdeen cavatcrpde
241 fqcsdgnclh gsrqcdreyd ckdmdevgc vnvltcegn kfkchsgeci tldkvcnmar
301 dcrdwsdipi kecgtnecl d nnggcshvcn dlkigyeclc pdgfgqlvaqr rcedidecqd
361 pdtcsqlevn leggykcgce egfqlphtk ackavgsiay lfftnrhevr kmtdrseyt
421 slipnlrnrv aldtevasnr iywsdlsqrm icstqldrah gvssydtvis rdiqapdgla
481 vdwihsniyw tdsvlgtvsv adtkgvkrkt lfrenskpr aivvdpvhgf mywtwdgtpa
541 kikkgglnv diyslvteni qwpngitld lsgrylwvds klhsissidv nggnrktilc
601 dekrlahpfs lavfedkvfw tdiineaifs anrltgsdvn llaenlispe dmvlfnhltq
661 prgvnwcert tlnggcqyl cipapqinph spkftcacpd gmlardmrs clteaavaa
721 tqetstvrk vsstavrtqh ttrpvpdts rlpqatpglt tveivtmshq algdvagrgn
781 ekkpssvral sivilpivllv flclgvfilw knwrlknins infdnpyyqk ttdevhich
841 nqdgysypsr qmvsleddva

```

10

20

(配列番号1)

【0 0 6 1】

EGF-Aドメインに下線を付し、太字活字で示している。Genbankアクセッション番号：NP_000518、EAW84170、BAD92646、1またはAAF24515、1も参照のこと。

【0 0 6 2】

30

本発明はまた、例えば、医薬的に許容される担体を含む医薬組成物中の、EGF-Aポリペプチドを含むまたはEGF-Aポリペプチドから成る単離ポリペプチドを包含する。本発明はまた、場合により、天然では他の直接隣接するLDL受容体配列に隣接していない任意の他の異種ポリペプチドに融合した、そのようなポリペプチド、ならびに、例えば、本明細書で論じるような、融合ポリペプチドの投与を含む治療の方法を提供する。そのようなポリペプチドを本明細書では「EGF-Aポリペプチド」と称することがあり、またEGF-Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを「EGF-Aポリヌクレオチド」と称することがある。

【0 0 6 3】

例えば、本発明の1つの実施形態では、EGF-Aポリヌクレオチドは以下のヌクレオチド配列を含む：

40

【0 0 6 4】

【化 2 1】

```

GGTACTAATGAATGCTCTTGATAATAATGGTGGTTGTTCTCATGTTTGTAATGATCTTAA
ATTGGTTATGAATGCTCTTTGTCCTGATGGTTTCAAACTTGTGCTCAACGTCGTTGTAAGATATT

```

(配列番号9)

【0 0 6 5】

前記で論じたように、本発明はまた、本発明のEGF-Aポリペプチドおよびポリヌクレオチドと、「タグ」と称され得る第2のポリペプチドまたはポリヌクレオチド部分を含

50

む融合物を包含する。本発明の融合ポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントを発現ベクターに挿入することにより、好都合に構築され得る。本発明の融合物は、精製または検出を容易にするタグを含み得る。そのようなタグは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ヘキサヒスチジン (His6) タグ、マルトース結合タンパク質 (MBP) タグ、赤血球凝集素 (HA) タグ、セルロース結合タンパク質 (CBP) タグおよび myc タグを含む。^{3 2} P、^{3 5} S、³ H、^{1 4} C、^{1 8} F、^{1 2 5} I、^{1 3 1} I、^{1 1 3 m} I n、^{7 6} Br、^{6 7} Ga、^{9 9 m} T c、^{1 2 3} I、^{1 1 1} I n および ^{6 8} Ga などの検出可能なタグも、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを標識するために使用し得る。そのような融合物を構築し、使用するための方法は極めて慣例的であり、当技術分野において周知である。

10

【0066】

本発明のそのような EGF-A ポリペプチドをコードする任意の単離ポリヌクレオチドも、そのようなポリヌクレオチドを含む任意のベクターおよびそのようなベクターを含む宿主細胞 (例えば、細菌宿主細胞または真核細胞) と共に、本発明の一部を形成する。発現制御配列 (例えば、プロモーター) に作動可能に連結されたそのようなポリヌクレオチドも本発明の一部を形成する。

【0067】

一般に、「プロモーター」または「プロモーター配列」は、細胞において RNA ポリメラーゼに結合することができ (例えば、直接にまたは他のプロモーター結合タンパク質もしくは物質を介して)、コード配列の転写を開始させることができる DNA 調節領域である。プロモーター配列は、一般に、転写開始部位によってその 3' 末端で結合され、任意のレベルで転写を開始させるために必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流 (5' 方向) に伸びる。プロモーター配列内には、転写開始部位 (例えば、ヌクレアーゼ S1 でマッピングすることにより、好都合に定義される) ならびに RNA ポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン (コンセンサス配列) が認められ得る。プロモーターは、エンハンサーおよびリプレッサー配列を含む他の発現制御配列と、または本発明の核酸と作動可能に連結され得る。遺伝子発現を制御するために使用し得るプロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (米国特許第 5,385,839 号および同第 5,168,062 号)、SV40 初期プロモーター領域 (Benoit 等 (1981) *Nature* 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの 3' ロングターミナルリピートに含まれるプロモーター (Yamamoto 等 (1980) *Cell* 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner 等 (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster 等 (1982) *Nature* 296:39-42); -ラクタマーゼプロモーター (Villa-Komaroff 等 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731) または tac プロモーター (DeBoer 等 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25) などの原核生物発現ベクター; "Useful proteins from recombinant bacteria" in *Scientific American* (1980) 242:74-94 も参照のこと; ならびに Gal4 プロモーター、ADC (アルコールデヒドロゲナーゼ) プロモーター、PGK (ホスホグリセロールキナーゼ) プロモーターまたはアルカリホスファターゼプロモーターなどの酵母または他の真菌からのプロモーターエレメントを含むが、これらに限定されない。

20

30

40

【0068】

細胞または他の発現系における転写制御配列および翻訳制御配列が、RNA ポリメラーゼを介したコード配列の RNA、好ましくは mRNA への転写を指令し、次にそれがスプライシングされた RNA となり (それがイントロンを含む場合)、場合によりコード配列によってコードされるタンパク質へと翻訳され得る場合、コード配列は転写制御配列および翻訳制御配列「の制御下にある」、「と機能的に連結されている」または「と作動可能

50

に連結されている」。

【0069】

「発現する」および「発現」という用語は、遺伝子、RNAまたはDNA配列内の情報が明らかになることを可能にするまたは明らかになるようにすること、例えば、対応する遺伝子の転写および翻訳に關与する細胞機能を活性化することによってタンパク質を生産することを意味する。DNA配列は、RNA（例えば、mRNA）またはタンパク質などの「発現産物」を形成するように細胞においてまたは細胞によって発現される。発現産物自体も、細胞によって「発現される」と言われ得る。

【0070】

「ベクター」という用語は、DNAまたはRNA配列が宿主を形質転換して、場合により、導入された配列の発現および/または複製を促進するように、DNAまたはRNA配列を宿主細胞に導入することができる媒体（例えば、プラスミド）を包含する。

【0071】

本発明において使用できるベクターは、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組込み可能なDNAフラグメント、および宿主のゲノムへの核酸の導入を促進し得る他の媒体を含む。プラスミドは最も一般的に使用される形態のベクターであるが、同様の機能を果たし、当技術分野で公知であるかまたは公知となる他のすべての形態のベクターが本明細書における使用に適する。例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 and Supplements, Elsevier, N.Y. およびRodriguezら（編集）、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, MA 参照。

【0072】

「発現系」という用語は、例えば、適切な条件下で、そのベクターによって担持され、宿主細胞に導入されるタンパク質または核酸を発現することができる、宿主細胞および適合性ベクターを包含する。一般的な発現系は、大腸菌（E. coli）宿主細胞とプラスミドベクター、昆虫宿主細胞とバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳動物宿主細胞とベクターを含む。

【0073】

原核生物宿主 - ベクター系は、多くの異なる種のための多種多様なベクターを含む。DNAを増幅するための代表的なベクターは、pBR322またはその誘導体の多く（例えば、pUC18もしくはpUC19）である。EGF-Aポリペプチドを発現するために使用できるベクターは、lacプロモーターを含むもの（pUCシリーズ）；trpプロモーターを含むもの（pBR322-trp）；lppプロモーターを含むもの（pINシリーズ）；-pPプロモーターもしくは-pRプロモーターを含むもの（pOTS）；またはptacなどのハイブリッドプロモーターを含むもの（pDR540）を包含するが、これらに限定されない。Brosiusら、“Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters”, in Rodriguez and Denhardt（編集）Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205 - 236 参照。多くのポリペプチドは、米国特許第4,952,496号、同第5,693,489号および同第5,869,320号およびDavalloo, P.ら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2035-2039; Studier, F.W.ら（1986）J. Mol. Biol. 189:113-130; Rosenberg, A.H.ら（1987）Gene 56:125-135; およびDunn, J.J.ら（1988）Gene 68:259に開示されているような大腸菌/T7発現系において高レベルで発現され得る。

10

20

30

40

50

【0074】

本発明は、本発明のEGF-Aポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、プロモーターなどの発現制御配列に作動可能に連結された）を含むベクターを適切な宿主細胞に導入し、ベクター内のポリヌクレオチドからのポリペプチドの発現に適した条件下で宿主細胞を増殖させる（例えば、適切な液体増殖培地で増殖させる）ことを含む、本発明のEGF-Aポリペプチドの発現の方法を含む。

【0075】

また、配列番号3のアミノ酸配列と約90%またはそれより高いアミノ酸配列類似性または同一性を有する任意の単離ポリペプチドも本発明の一部である。本発明の1つの実施形態では、そのようなポリペプチドは、PCSK9もしくはその機能的フラグメントに結合しなければならないか、またはPCSK9とLDL受容体もしくはそのいずれかの機能的フラグメントの結合を阻害しなければならないか、または許容される動物モデル（例えば、イヌ、霊長類、ウサギ、マウスもしくはラットなどの哺乳動物）またはヒトなどの被験者において総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリタンパク質Bレベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率または低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させる能力を示さなければならない。

10

【0076】

本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学および当分野の技術内の組換えDNA手法が使用され得る。そのような手法は文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (本明細書中以下では「Sambrookら、1989」); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover 編集、1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編集、1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins 編集 (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.I. Higgins 編集 (1984)); Animal Cell Culture (R.J. Freshney 編集 (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubelら (編集)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994) 参照。

20

30

【0077】

「宿主細胞」という用語は、細胞による物質の生産、例えば、細胞による遺伝子、DNAもしくはRNA配列またはタンパク質の発現または複製のために、任意の方法で選択される、改変される、トランスフェクトされる、形質転換される、増殖されるまたは使用されるまたは操作される任意の生物の任意の細胞を包含する。

40

【0078】

「単離ポリヌクレオチド」または「単離ポリペプチド」という用語は、それぞれ、細胞においてまたは組換えDNA発現系において通常認められる他の成分から部分的にまたは完全に分離されている、ポリヌクレオチド（例えば、RNAもしくはDNA分子、または混合ポリマー）またはポリペプチドを包含する。これらの成分は、細胞膜、細胞壁、リボソーム、ポリメラーゼ、血清成分および外来性ゲノム配列を含むが、これらに限定されない。

【0079】

単離ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本発明の1つの実施形態では、基本的に

50

分子の均質な組成物であるが、多少の不均質性を含み得る。

【0080】

本発明は、本発明の E G F - A ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに対応するアミノ酸配列またはヌクレオチド配列への表面的なまたはわずかな改変を企図する。特に、本発明は、本発明の E G F - A ポリペプチドをコードする核酸の配列保存的変異体を企図する。E G F - A ポリヌクレオチド配列の「配列保存的変異体」は、所与のコドン内の1つまたはそれより多くのヌクレオチドの変化がその位置でコードされるアミノ酸の変化を生じさせないものである。本発明の E G F - A ポリペプチドの機能保存的変異体も本発明によって企図される。「機能保存的変異体」は、E G F - A ポリペプチド内の1つまたはそれより多くのアミノ酸残基が、ポリペプチドの全体的な高次構造および/または機能（例えば、P C S K 9 に結合する能力または P C S K 9 と L D L 受容体もしくはそのフラグメントの結合を阻害する能力）を変化させることなく変更されたものであり、類似の性質を有する別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を含むが、決してこれに限定されない。類似の性質を有するアミノ酸は当技術分野において周知である。例えば、交換可能であり得る極性/親水性アミノ酸は、アスパラギン、グルタミン、セリン、システイン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む；交換可能であり得る非極性/疎水性アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む；交換可能であり得る酸性アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含み、交換可能であり得る塩基性アミノ酸は、ヒスチジン、リシンおよびアルギニンを含む。

10

20

【0081】

本発明は、E G F - A をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号 9）およびその機能的フラグメントならびに前記ポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸を含む。本発明の1つの実施形態では、核酸は、低ストリンジェンシー条件下で、中ストリンジェンシー条件下でまたは高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。一本鎖形態の核酸分子が温度および溶液のイオン強度の適切な条件下で他の核酸分子にアニーリングすることができる場合、核酸分子は、c D N A、ゲノム D N A または R N A などの別の核酸分子に「ハイブリダイズ可能」である（S a m b r o o k ら、前出参照）。温度およびイオン強度の条件がハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。典型的な低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、55℃、5×SSC、0.1% SDS、0.25% 乳、および 42℃ でホルムアミドなし；または 42℃ で 30% ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDS である。典型的な中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションが 40% ホルムアミド、5×SSC または 6×SSC 中 42℃ で実施されることを除き、前記低ストリンジェンシー条件と同様である。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション条件が 50% ホルムアミド、5×SSC または 6×SSC 中、場合により、より高い温度（例えば、42℃ より高い温度：57℃、59℃、60℃、62℃、63℃、65℃ または 68℃）で実施されることを除き、低ストリンジェンシー条件と同様である。一般に、SSC は 0.15 M NaCl および 0.015 M クエン酸ナトリウムである。ハイブリダイゼーションは2つの核酸が相補的配列を含むことを必要とするが、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存して、塩基間のミスマッチが起こり得る。核酸をハイブリダイズするための適切なストリンジェンシーは、当技術分野で周知の変数である、核酸の長さおよび相補性の程度に依存する。2つのヌクレオチド配列の間の類似性または相同性の程度が大きいほど、その下で核酸がハイブリダイズし得るストリンジェンシーはより高い。100ヌクレオチド長より大きいハイブリッドに関して、融解温度を計算するための方程式が導かれている（S a m b r o o k ら、前出、9.50 - 9.51 参照）。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに関しては、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（S a m b r o o k ら、前出参照）。本発明の1つの実施形態では、そのようなポリヌクレオチドは、P C S K 9 もしくはその機能的フラグメントに結合しなければならないが、または

30

40

50

P C S K 9 と L D L 受容体もしくはそのいずれかの任意の機能的フラグメントの結合を阻害しなければならないか、または許容される動物モデル（例えば、イヌ、霊長類、ウサギ、マウスもしくはラットなどの哺乳動物）またはヒトなどの被験者において総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリポタンパク質 B レベル、総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率または低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる能力を示さなければならないポリペプチドをコードする。

【 0 0 8 2 】

また、比較を B L A S T アルゴリズムによって実施する場合（そこではアルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大のマッチを与えるように選択される）、参照ヌクレオチド配列（配列番号 9）または参照アミノ酸配列（配列番号 3）に少なくとも約 70 % 同一である、好ましくは少なくとも約 80 % 同一である、より好ましくは少なくとも約 90 % 同一である、最も好ましくは少なくとも約 95 %（例えば、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %）同一であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列を含むポリペプチドも本発明に包含される。比較を B L A S T アルゴリズムによって実施する場合（そこではアルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大のマッチを与えるように選択される）、配列番号 3 の参照 E G F - A アミノ酸配列に少なくとも約 70 % 類似する、好ましくは少なくとも約 80 % 類似する、より好ましくは少なくとも約 90 % 類似する、最も好ましくは少なくとも約 95 %（例えば、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、100 %）類似するアミノ酸配列を含むポリペプチドも本発明に包含される。

【 0 0 8 3 】

配列同一性は、比較する 2 つの配列のヌクレオチドまたはアミノ酸の間の正確なマッチを指す。配列類似性は、非同ーで生化学的に関連するアミノ酸の間のマッチに加えて、比較する 2 つのポリペプチドのアミノ酸の間の正確なマッチの両方を指す。類似の性質を共有し、交換可能であり得る生化学的に関連するアミノ酸については前記で論じている。

【 0 0 8 4 】

B L A S T アルゴリズムに関する以下の参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる：B L A S T アルゴリズム：A l t s c h u l , S . F . ら (1 9 9 0) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 ; G i s h , W . ら (1 9 9 3) N a t u r e G e n e t 3 : 2 6 6 - 2 7 2 ; M a d d e n , T . L . ら (1 9 9 6) M e t h . E n z y m o l . 2 6 6 : 1 3 1 - 1 4 1 ; A l t s c h u l , S . F . ら (1 9 9 7) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 ; Z h a n g , J . ら (1 9 9 7) G e n o m e R e s . 7 : 6 4 9 - 6 5 6 ; W o o t t o n , J . C . ら (1 9 9 3) C o m p u t . C h e m . 1 7 : 1 4 9 - 1 6 3 ; H a n c o c k , J . M . ら (1 9 9 4) C o m p u t . A p p l . B i o s c i . 1 0 : 6 7 - 7 0 ; アラインメントスコアリングシステム：D a y h o f f , M . O . ら、" A m o d e l o f e v o l u t i o n a r y c h a n g e i n p r o t e i n s . " i n A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e , (1 9 7 8) v o l . 5 , s u p p l . 3 , M . O . D a y h o f f (編 集) , p p . 3 4 5 - 3 5 2 , N a t l . B i o m e d . R e s . F o u n d . , W a s h i n g t o n , D C ; S c h w a r t z , R . M . ら、" M a t r i c e s f o r d e t e c t i n g d i s t a n t r e l a t i o n s h i p s . " i n A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e , (1 9 7 8) v o l . 5 , s u p p l . 3 , M . O . D a y h o f f (編 集) , p p . 3 5 3 - 3 5 8 , N a t l . B i o m e d . R e s . F o u n d . , W a s h i n g t o n D C ; A l t s c h u l , S . F . , (1 9 9 1) J . M o l . B i o l . 2 1 9 : 5 5 5 - 5 6 5 ; S t a t e s , D . J . ら (1 9 9 1) M e t h o d s 3 : 6 6 - 7 0 ; H e n i k o f f , S . ら (1 9 9 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 0 9 1 5 - 1 0 9 1 9 ; A

ltschul, S. F. ら (1993) J. Mol. Evol. 36: 290 - 300 ; アラインメント統計学: Karlin, S. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 2268 ; Karlin, S. ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877 ; Dembo, A. ら (1994) Ann. Prob. 22: 2022 - 2039 ; および Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai 編集) (1997) pp. 1 - 14, Plenum, New York.

10

【0085】

抗体

本発明は、抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントを含む方法および組成物を包含する。抗PCSK9抗体等の用語は、PCSK9（例えば、ヒトPCSK9）に特異的に結合するいかなる抗体も包含する。本発明において使用される抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントは、全PCSK9タンパク質に対して惹起されるまたはそれに結合する抗体およびフラグメント、ならびにPCSK9内の特定の短いエピトープ、例えば、PCSK9の触媒ドメインもしくはその部分（例えば、VF A Q S I P W N L E R エピトープ（配列番号8）に結合する部分）またはアミノ酸配列: S R S G K R R G E R M E A（配列番号4のアミノ酸490 - 502）を有する、PCSK9のC末端ドメイン（すなわちPCSK9のcatドメインに対するC末端）に対して惹起されるまたはそれに結合する抗体を包含する。本発明の1つの実施形態では、抗PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントは、LDL受容体のEGF-Aドメインと相互作用するPCSK9のドメインに結合する。

20

【0086】

本発明の具体的な単離マウス抗ヒトPCSK9抗体免疫グロブリン配列を以下に示す。各々の免疫グロブリン鎖についてのCDR配列に下線を付している。

【0087】

11B5免疫グロブリン重鎖

【0088】

30

【化22】

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y
M H W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
K A T I T T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y Y C A R S
Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号10)

HCDR1: G F N I K D T Y M H (配列番号11)

40

HCDR2: R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (配列番号12)

HCDR3: S Y F G S I F A Y (配列番号13)

【0089】

11B5免疫グロブリン軽鎖

【0090】

【化23】

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L Y
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P A R F S G S G S
G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y Q S Y P P T F G G
G T K L E I K R A

(配列番号14)

LCDR1: S A S S S V S Y L Y (配列番号15)

10

LCDR2: R S S H R A S (配列番号16)

LCDR3: H Q Y Q S Y P P T (配列番号17)

【0091】

75B9免疫グロブリン重鎖

【0092】

【化24】

E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G
R A T L T T D T S S N T A Y L Q L F S L T S E D S A V Y F C A R S
Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

20

(配列番号18)

HCDR1: G F N I K D T Y I H (配列番号19)

HCDR2: R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号20)

HCDR3: S Y Y G S I F A Y (配列番号21)

30

【0093】

75B9免疫グロブリン軽鎖

【0094】

【化25】

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L F
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S Y L A S G V P A R F S G S G S
G T S F S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H T Y P P T F G G
G T K L E I K R A

(配列番号22)

40

LCDR1: S A S S S V S Y L F (配列番号23)

LCDR2: R T S Y L A S (配列番号24)

LCDR3: H Q Y H T Y P P T (配列番号25)

【0095】

77D10免疫グロブリン重鎖

【0096】

50

【化26】

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTTSG F N I K D Y Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
KATMTADTSSNTAYLQLSSLTSA DTAVYYCNA
Y Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号26)

HCDR1: G F N I K D Y Y I H (配列番号27)

10

HCDR2: W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号28)

HCDR3: Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号29)

【0097】

77D10免疫グロブリン軽鎖

【0098】

【化27】

DIQLTQSPASLSASVGETVTITCR A S G N I H S Y L
A W Y Q Q K Q G K S P Q F L V D N A K T L P D G V P S R F S V S G
SGTQYSLKINSLSLPEDFGTYYCQ H F W N T P W T F G
GGTKLEIKRA

20

(配列番号30)

LCDR1: R A S G N I H S Y L A (配列番号31)

LCDR2: N A K T L P D (配列番号32)

LCDR3: Q H F W N T P W T (配列番号33)

【0099】

30

29C10免疫グロブリン重鎖

【0100】

【化28】

EVLLQQSVAELVRPGASVRLSCTASG F N I K D T Y
I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
KATLTDTSSNTAYLHLSLTS E D S A I Y Y C A R G
Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S

(配列番号34)

40

HCDR1: G F N I K D T Y I H (配列番号35)

HCDR2: W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号36)

HCDR3: G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号37)

【0101】

29C10免疫グロブリン軽鎖

【0102】

【化29】

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISC RASQDISNYL
NWYQQKPDGTVKLLIYYSSRLHSGVPSRFSGRG
 SGTDYSLTISTLEQEDIATYFC QQGKTLPLTFG
 AGTKLELKRA

(配列番号38)

LCDR1: RASQDISNYLN (配列番号39)

10

LCDR2: YSSRLHSG (配列番号40)

LCDR3: QQGKTLPLT (配列番号41)

【0103】

22D11免疫グロブリン重鎖

【0104】

【化30】

EVQLVDSGGGLVQPGRSCLKLSCAAS GF TFSNHD
MAWVRQAPTKGLEWVASITPSGGTTYYRDSVEG
 RFTVSRDENVKSSSLHLQMDSLTSEDTATYYCAR Q
NY YDGSYYYGLYYFDYWGQGVMTVSS

20

(配列番号42)

HCDR1: GF TFSNHDMA (配列番号43)

HCDR2: SITPSGGTTYRDSVEG (配列番号44)

HCDR3: QNY YDGSYYYGLYYFDY (配列番号45)

30

【0105】

22D11免疫グロブリン軽鎖

【0106】

【化31】

DVLMTQTFVSLPVSLGGQVSI SCRSSQSLVYSD
GNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYRVSNRFS GVPD
 RFS SGSGSGTDFTLKISRVEPEDELGLYYC LQSTHF
PPTFGSGTKLEIKRA

(配列番号46)

40

LCDR1: RSSQSLVYSDGNTYLH (配列番号47)

LCDR2: RVSNRFS (配列番号48)

LCDR3: LQSTHF PPT (配列番号49)

【0107】

1F11/1G11免疫グロブリン重鎖

【0108】

50

【化32】

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKVSGYTFTDYY
 MNWVKQSHGKSLIEWIGDINPNNGGAIYNQKFKG
 KATLTVDKSSSIAYMELRSLTSEDSAVYYCTSG
 IITEIAEDFWGQGTTLTVSS

(配列番号50)

HCDR1: GYTFTDYYMN (配列番号51)

10

HCDR2: DINPNNGGAIYNQKFKG (配列番号52)

HCDR3: GIITEIAEDF (配列番号53)

【0109】

1F11 / 1G11 免疫グロブリン軽鎖

【0110】

【化33】

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVG TNV
VWYQQKPGQSPKALIH SASYRYS SGVPDR FKGSG
 SGTDFTLTITNVQSEDLAGFFC QQYKTPYT FG
 GGTQLEIKRA

20

(配列番号54)

LCDR1: KASQNVGTVV (配列番号55)

LCDR2: SASYRYS (配列番号56)

LCDR3: QQYKTPYT (配列番号57)

30

【0111】

本発明は、Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987および1991); またはChothiaら、J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Nature 342: 878 (1989); およびJ. Mol. Biol. 186: 651 (1989) (KabatもしくはChothia) またはAl-Lazikaniら、J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997) に述べられている慣例によって定義されるような前記に示す軽鎖および/または重鎖免疫グロブリンからの1つまたはそれより多くの(例えば、3つの)CDRを含む単離ポリペプチド(例えば、抗体およびその抗原結合フラグメント)を包含する。

40

【0112】

ゆえに、本発明は、前記に示す軽鎖および/または重鎖免疫グロブリンCDRの1つまたはそれを超えて含むいかなる抗体またはその抗原結合フラグメントも包含する。本発明の1つの実施形態では、抗体またはフラグメントは、3つの軽鎖CDR全部および/または3つの重鎖CDR全部を、例えば、前記で特定した順序で含む。本発明の実施形態は、例えば、抗体またはフラグメントがモノクローナル抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、ダイアボディ、一本鎖抗体、ジスルフィドFv (dsfv)、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ およびドメイン抗体である、前記で述べた

50

ような、抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。ゆえに、抗体という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包含するが、これらに限定されない。抗体の抗原結合フラグメントという用語は、典型的には、親抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持する、親抗体の抗原結合領域または可変領域の少なくとも一部（例えば、1つまたはそれより多くのCDR）を含む、抗体のフラグメントまたは誘導体を包含する。抗体の抗原結合フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント；dsFv；(dsFv)₂、dsダイアボディ；dsFv-dsFv'；一本鎖抗体分子、例えば、sc-Fv、scFv二量体（二価ダイアボディ）；二重特異性ダイアボディ；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0113】

本発明は、PCSK9、例えば、ヒトPCSK9に特異的に結合する抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントを含む。本発明の1つの実施形態では、ヒトPCSK9に特異的に結合する抗体またはフラグメントは、ラット、マウスまたはチンパンジーのPCSK9に対するそれと比較してヒトPCSK9に選択的に結合する。ヒトPCSK9への選択的結合とは、ラット、マウスまたはチンパンジーのPCSK9への結合の親和性よりも任意の程度大きい親和性（例えば、1%、10%、50%、100%または10倍高い親和性）での結合を意味する。本発明の1つの実施形態では、抗ヒトPCSK9抗体は、いかなる他の種のPCSK9への検出可能な結合も伴わずに（例えば、マウスまたはラットのPCSK9への検出可能な結合を伴わずに）ヒトPCSK9に結合する。特異的抗PCSK9結合とは、結合し得る他の任意のタンパク質のそれよりも少なくとも約100倍高いK_dおよび約500nMの最小K_dでの、PCSK9またはその抗原性フラグメントへの抗体の結合を指す。

20

【0114】

抗体を作製するためのいかなる適切な方法も使用し得る。例えば、受容者をPCSK9またはその抗原性フラグメントで免疫し得る。免疫のいかなる適切な方法も使用できる。そのような方法は、アジュバント、他の免疫刺激薬、反復ブースター免疫、および1つまたはそれより多くの免疫化経路の使用を含み得る。PCSK9のいかなる適切なソースも、本明細書で開示する組成物および方法の抗体およびフラグメントの作製のための免疫原として使用できる。そのような形態は、当技術分野で公知の組換え、合成、化学的または酵素分解手段を介して作製される全タンパク質、ペプチドおよびエピトープを含むが、これらに限定されない。

30

【0115】

いかなる形態の抗原も、生物学的に活性な抗体を生成するのに十分である抗体を作製するために使用できる。ゆえに、惹起した抗原は、単独のまたは当技術分野で公知の1つもしくはそれより多くの免疫原性増強剤と組み合わせた、単一エピトープ、複数のエピトープまたはタンパク質全体であり得る。惹起した抗原は、単離完全長タンパク質、細胞表面タンパク質（例えば、少なくとも抗原の一部でトランスフェクトした細胞で免疫する）または可溶性タンパク質フラグメントであり得る。

【0116】

いかなる適切な方法も、PCSK9を阻害するための所望生物学的特性を備えた抗体を惹起するために使用できる。モノクローナル抗体(mAb)は、マウス、ラット、他のげっ歯類、ヒト、他の霊長類等のような様々な哺乳動物宿主から作製され得る。そのようなモノクローナル抗体を作製するための手法の説明は、例えば、Stitesら（編集）BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY（第4版）Lange Medical Publications, Los Altos, CAおよびその中で引用される参考文献；HarlowとLane（1988）ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press；Goding（1986）MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE（第2版）Academic Press, New York, NYに見出され

40

50

る。ゆえに、モノクローナル抗体は、当技術分野の研究者が精通する様々な手法によって入手し得る。典型的には、所望抗原で免疫した動物からの脾細胞を、一般に骨髓腫細胞との融合によって不死化する。KohlerとMilstein(1976)Eur. J. Immunol. 6: 511-519参照。不死化の選択的な方法は、エプスタイン バールウイルス、癌遺伝子もしくはレトロウイルスでの形質転換、または当技術分野で公知の他の方法を含む。例えば、Doylerら(編集、1994および定期的補遺)CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY参照。単一不死化細胞から生じるコロニーを、抗原に対する所望の特異性および親和性を有する抗体の産生に関してスクリーニングし、そのような細胞によって産生されたモノクローナル抗体の収量を、脊椎動物宿主の腹腔内への注射を含む、様々な手法によって増強し得る。あるいは、モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードするDNA配列を、例えば、Huseら(1989)Science 246: 1275-1281に概説されている一般的プロトコールに従って、ヒトB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離し得る。

【0117】

他の適切な手法は、ファージまたは同様のベクター中の抗体のライブラリーの選択を含む。例えば、Huseら、前出；およびWardら(1989)Nature 341: 544-546参照。キメラ抗体またはヒト化抗体を含む、本発明のポリペプチドおよび抗体は、改変を加えてまたは改変せずに使用し得る。しばしば、ポリペプチドおよび抗体は、共有結合によってまたは非共有結合的に、検出可能なシグナルを提供する物質と結合することによって標識される。多種多様な標識および結合手法が公知であり、学術文献および特許文献の両方において広範に報告されている。適切な標識は、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光部分、化学発光部分、磁性粒子等を含む。そのような標識の使用を教示する特許は、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号を含む。また、組換え免疫グロブリンは、Cabilllyの米国特許第4,816,567号；Queenら(1989)Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033を参照して生成され得るか、またはMendezら(1997)Nature Genetics 15: 146-156を参照して、トランスジェニックマウスにおいて作製され得る。

【0118】

所与の抗原で免疫した場合にヒト免疫グロブリンを産生するマウスも当技術分野において使用可能である。例えば、Lonberg, N.ら(1994)Nature 368(6474): 856-859；Lonberg, N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101；Lonberg, N.ら(1995)Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93、およびHarding, F.ら(1995)Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546)；Taylor, L.ら(1992)Nucleic Acids Research 20: 6287-6295；Chen, J.ら(1993)International Immunology 5: 647-656；Tuailonら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724；Choiら(1993)Nature Genetics 4: 117-123；Chen, J.ら(1993)EMBO J. 12: 821-830；Tuailonら(1994)J. Immunol. 152: 2912-2920；Lonbergら(1994)Nature 368(6474): 856-859；Lonberg, N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101；Taylor, L.ら(1994)International Immunology 6: 579-591；Lonberg, N

10

20

30

40

50

ら (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65 - 93 ;
 Harding, F. ら (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 53
 6 - 546 ; Fishwild, D. ら (1996) Nature Biotechno-
 logy 14: 845 - 851 および Harding ら (1995) Annals N
 Y Acad. Sci. 764: 536 - 546 参照。さらに、米国特許第 5, 545,
 806 号 ; 同第 5, 569, 825 号 ; 同第 5, 625, 126 号 ; 同第 5, 633, 4
 25 号 ; 同第 5, 789, 650 号 ; 同第 5, 877, 397 号 ; 同第 5, 661, 01
 6 号 ; 同第 5, 814, 318 号 ; 同第 5, 874, 299 号 ; 同第 5, 770, 429
 号 および 同第 5, 545, 807 号 ; ならびに 国際特許出願公開公報第 WO 98 / 248
 84 号 ; 同第 WO 94 / 25585 号 ; 同第 WO 93 / 12227 号 ; 同第 WO 92 / 2
 2645 号 および 同第 WO 92 / 03918 号 も 参照のこと。

10

【0119】

「Fab フラグメント」は、1本の軽鎖および1本の重鎖の C_H1 領域と可変領域から成る。Fab 分子の重鎖は別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【0120】

「Fc」領域は、抗体の C_H1 ドメインと C_H2 ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを含有する。2つの重鎖フラグメントは、2つまたはそれを超えるジスルフィド結合によっておよび C_H3 ドメインの疎水性相互作用によって結びつけられている。

【0121】

「Fab'」フラグメントは、1本の軽鎖ならびに、 $F(ab')_2$ 分子を形成するために2つの Fab' フラグメントの2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が結合されるように、 V_H ドメインと C_H1 ドメインおよびまた C_H1 ドメインと C_H2 ドメインの間の領域を含む1本の重鎖の一部を含有する。

20

【0122】

「 $F(ab')_2$ フラグメント」は、2本の軽鎖および、2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成されるように、 C_H1 ドメインと C_H2 ドメインの間の定常領域の一部を含む2本の重鎖を含有する。 $F(ab')_2$ フラグメントは、それゆえ、2本の重鎖の間のジスルフィド結合によって結びつけられた2つの Fab' フラグメントから成る。

【0123】

「ジスルフィド安定化 Fv フラグメント」および「dsFv」は、ジスルフィド架橋によって連結された可変重鎖 (V_H) および / または可変軽鎖 (V_L) を有する分子を含む。

30

【0124】

「Fv 領域」は、重鎖と軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0125】

「一本鎖 Fv」または「scFv」抗体という用語は、抗体の V_H ドメインと V_L ドメインを含み、これらのドメインが一本のポリペプチド鎖に存在する抗体フラグメントを指す。一般に、Fv ポリペプチドは、 V_H 鎖と V_L 鎖が対合して結合部位を形成することを可能にする、 V_H ドメインと V_L ドメインの間のポリペプチドリンカー（例えば、5 ~ 12 残基長）をさらに含む。scFv の総説については、Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg と Moore 編集, Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 参照。また、国際特許出願公開公報第 WO 88 / 01649 号 および 米国特許第 4, 946, 778 号 および 同第 5, 260, 203 号 も 参照のこと。

40

【0126】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域だけを含む免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントである。一部の場合、2つまたはそれを超える V_H 領域がペプチドリンカーで共有結合連結されて、二価ドメイン抗体を形成する。二価ドメイン抗体の2つの V_H 領域は、同じ抗原または異なる抗原を標的し得る。

50

【 0 1 2 7 】

「二価抗体」は2つの抗原結合部位を含む。一部の場合、2つの結合部位は同じ抗原特異性を有する。しかし、二価抗体は二重特異性であり得る。例えば、本発明は、s c f v および d s f v 部分の各々が共通のまたは異なる抗原結合特異性を有し得る、s c f v 二量体および d s f v 二量体を包含する。

【 0 1 2 8 】

本発明の1つの実施形態では、(d s f v)₂ は3本のペプチド鎖を含む：ペプチドリ
ンカーで連結され、ジスルフィド架橋によって2つのV_L 部分に対して結合された2つの
V_H 部分。本発明の1つの実施形態では、二重特異性 d s ダイアボディは、V_H 1 と V_L
1 の間のジスルフィド架橋によって V_L 1 - V_H 2 部分（ペプチドリ
ンカーによってテザ
ー（鎖繋）された）に連結された V_H 1 - V_L 2 （同じくペプチドリ
ンカーによってテザ
ーされた）を含む。本発明の1つの実施形態では、二重特異性 d s f v - d s f v ' も3
本のペプチド鎖を含む：重鎖がペプチドリ
ンカー（例えば、長い柔軟なリンカー）によ
って連結され、それぞれジスルフィド架橋によって V_L 1 および V_L 2 部分に結合されてお
り、各々のジスルフィド対合した重鎖と軽鎖が異なる抗原特異性を有する、V_H 1 - V_H
2 部分。本発明の1つの実施形態では、s c f v 二量体（二価ダイアボディ）は、重鎖と
軽鎖がペプチドリ
ンカーによって結合して、1本の鎖のV_H が別の鎖のV_L と調和的に働
いて2つの同一結合部位を形成するように、別のそのような部分と二量体化している、V
H - V_L 部分を含む。本発明の1つの実施形態では、二重特異性ダイアボディは、V_H 1
と V_L 1 が調和的に働いて、V_H 2 と V_L 2 が調和的に働いて、各々の組み合わせられたセ
ットが多様な抗原特異性を有する、V_L 1 - V_H 2 （ペプチドリ
ンカーによって連結され
た）と結合した V_H 1 - V_L 2 部分（ペプチドリ
ンカーによって連結された）を含む。

10

20

【 0 1 2 9 】

本明細書で使用される、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の
集団、すなわち集団を構成する個々の抗体が、少量存在し得る天然に起こり得る突然変異
を除いて同一である、集団から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的
であり、単一抗原エピトープだけを対象とする。これに対し、従来の（ポリクローナル）
抗体製剤は、典型的には種々のエピトープを対象とする（または種々のエピトープに特異
的な）多数の抗体を含有する。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均質な抗体
の集団から得られるという抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の作製を必要
とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗
体は、組換えによってもしくは K o h l e r ら（1975）N a t u r e 256:49
5 によって最初に記述されたハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組換え D
N A 法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）によって作製され得る。「モノ
クローナル抗体」はまた、例えば、C l a c k s o n ら（1991）N a t u r e 35
2:624-628 および M a r k s ら（1991）J . M o l . B i o l . 222:5
81-597 に述べられている手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離し得る
。P r e s t a（2005）J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 116:
731 も参照のこと。

30

40

【 0 1 3 0 】

モノクローナル抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定種に由来するまたは特定
抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体内の対応する配列と同一または相同であり、
鎖の残りの部分が別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗
体内の対応する配列と同一または相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、なら
びに、それらが所望生物活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントを包含する（米
国特許第4,816,567号；および M o r r i s o n ら（1984）P r o c . N a
t l . A c a d . S c i . U S A 81:6851-6855）。例えば、可変ドメイン
はマウスなどの実験動物からの抗体（「親抗体」）より得られ、定常ドメイン配列は、生
じるキメラ抗体が親マウス抗体よりもヒト被験者において有害な免疫応答を惹起する可
能性がより低くなるように、ヒト抗体から得られる。

50

【0131】

本発明の組換え抗体またはその抗原結合フラグメントは、本発明の1つの実施形態では、組換えによって作製される、例えば、生物（例えば、細菌細胞（例えば、大腸菌）または哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）に形質転換された抗体またはフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミド）に導入されたポリヌクレオチドから発現され、その後生物から抗体またはフラグメントを単離して作製される抗体である。

【0132】

本発明は、本発明の任意の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたはポリペプチドを発現するための方法を含む。例えば、本発明の1つの実施形態は、CHO細胞（例えば、CHO-K1またはDXB11細胞）などの宿主細胞（例えば、単一宿主細胞）において、少なくとも免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖の可変ドメインを含む免疫グロブリン分子または免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントを作製するための工程であって、(i)前記宿主細胞を、少なくとも免疫グロブリン重鎖の可変ドメインをコードする第1ポリヌクレオチドおよび少なくとも免疫グロブリン軽鎖の可変ドメインをコードする第2ポリヌクレオチドで形質転換し、そして(ii)前記免疫グロブリン重鎖と軽鎖が前記形質転換宿主細胞において別々の分子として生成されるように、前記第1ポリヌクレオチドと前記第2ポリヌクレオチドを独立して発現させる段階を含む工程を包含する。本発明の1つの実施形態では、ポリヌクレオチドはCMVプロモーターなどのプロモーターに作動可能に連結される。本発明はまた、免疫グロブリン分子または免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントを作製するための工程であって、第1ハプロイド酵母宿主細胞（例えば、ピキア・パストリス（メタノール資化性酵母）（*Pichia pastoris*）などのピキア属）を、少なくとも免疫グロブリン重鎖または軽鎖の可変ドメインをコードする第1ポリヌクレオチドで形質転換し、第2ハプロイド酵母宿主細胞（例えば、ピキア・パストリスなどのピキア属）を、その他の鎖をコードする第2ポリヌクレオチドで形質転換して、ハプロイド細胞に二倍体などの倍数体を形成するのを可能にし（例えば、接合を介して）、ハプロイドから倍数体を選択して、重鎖と軽鎖が倍数体において発現され、場合により培地に分泌される条件下で倍数体を増殖させる工程を含む工程を包含する。

【0133】

本発明の1つの実施形態では、宿主細胞に導入されたポリヌクレオチドは異所性のままであるが、本発明のもう1つの実施形態では、ポリヌクレオチドは宿主細胞の染色体DNAに組み込まれる。

【0134】

本発明の1つの実施形態では、抗体またはフラグメントを作製するための方法は、発現された鎖を宿主細胞および/または培地から単離する工程をさらに含む。

【0135】

本発明はまた、ラクダ化単ドメイン抗体を含む。例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Muyldermansら(2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmannら(1999) J. Immunol. Methods 231:25; 国際公開公報第WO94/04678号; 同第WO94/25591号; 米国特許第6,005,079号参照。ラクダ科(Camelidae)（ラクダ、ヒトコブラクダおよびラマ）は、軽鎖を欠き、それゆえ「重鎖」IgGまたはHCAb（重鎖抗体）と呼ばれるIgG抗体を含む。HCAbは、重鎖可変ドメインだけから成るので、典型的には約95kDaの分子量を有する。HCAbは軽鎖を欠くが、真正な抗原結合レパートリーを有する(Hamers-Castermanら、Nature(1993)363:446-448; Nguyenら、Adv. Immunol.(2001)79:261-296; Nguyenら、Immunogenetics.(2002)54:39-47)。1つの実施形態では、本発明は、単ドメイン抗体が形成されるように改変が加えられた2つのV_Hドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

本明細書で使用される、「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、前記フラグメントは、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン (V_L) に連結された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む ($V_H - V_L$ または $V_L - V_H$)。同じ鎖上の2つのドメインの間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは別の鎖の相補的ドメインと対合することを強いられ、2つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第EP 404, 097号；国際公開公報第WO 93/11161号；および Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448においてより詳細に説明されている。設計された抗体変異体の総説については、一般に Holliger と Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136 参照。

10

【 0 1 3 7 】

本明細書で使用される、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体と非ヒト（例えば、マウスまたはラット）抗体の両方からの配列を含む抗体の形態を指す。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループ (CDR) の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、フレームワーク (FR) 領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。免疫グロブリン軽鎖可変領域または重鎖可変領域は、CDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域から成る。ヒトフレームワーク配列につ

20

いてのいくつかの公的なソースが使用可能であり、例えば、V-base (MRC Center for Protein Engineering) を含む。ヒト化抗体は、場合によりヒト免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部を含む。例えば、本発明の1つの実施形態は、本明細書で述べる、例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域に融合した、特定のマウス免疫グロブリン CDR とヒト免疫グロブリンフレームワーク領域を含むヒト化抗PCSK9（例えば、抗ヒトPCSK9）抗体を包含する。以下の米国特許は参照により本明細書に組み込まれる：第5, 585, 089号、第5, 693, 761号、第5, 693, 762号および第6, 180, 370号。例えば、本発明の実施形態は、以下の群のCDRのいずれかが本発明のヒト化抗体内に含まれるものを包含する：

30

(i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y M H (配列番号11) を含むHC DR 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (配列番号12) を含むHC DR 2およびアミノ酸配列：S Y F G S I F A Y (配列番号13) を含むHC DR 3；

(ii) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号19) を含むHC DR 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号20) を含むHC DR 2およびアミノ酸配列：S Y Y G S I F A Y (配列番号21) を含むHC DR 3；

(iii) アミノ酸配列：G F N I K D Y Y I H (配列番号27) を含むHC DR 1、アミノ酸配列：W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号28) を含むHC DR 2およびアミノ酸配列：Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号29) を含むHC DR 3；

40

(iv) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号35) を含むHC DR 1、アミノ酸配列：W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号36) を含むHC DR 2およびアミノ酸配列：G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号37) を含むHC DR 3；

(v) アミノ酸配列：G F T F S N H D M A (配列番号43) を含むHC DR 1、アミノ酸配列：S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (配列番号44) を含むHC DR 2およびアミノ酸配列：Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (配列番号45) を含むHC DR 3；

50

(v i) アミノ酸配列：G Y T F T D Y Y M N (配列番号 5 1) を含む H C D R 1、アミノ酸配列：D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (配列番号 5 2) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：G I I T E I A E D F (配列番号 5 3) を含む H C D R 3；

(v i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L Y (配列番号 1 5) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R S S H R A S (配列番号：1 6) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y Q S Y P P T (配列番号 1 7) を含む L C D R 3；

(v i i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L F (配列番号 2 3) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R T S Y L A S (配列番号 2 4) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y H T Y P P T (配列番号 2 5) を含む L C D R 3；

(i x) アミノ酸配列：R A S G N I H S Y L A (配列番号 3 1) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：N A K T L P D (配列番号 3 2) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q H F W N T P W T (配列番号 3 3) を含む L C D R 3；

(x) アミノ酸配列：R A S Q D I S N Y L N (配列番号 3 9) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：Y S S R L H S (配列番号 4 0) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q G K T L P L T (配列番号 4 1) を含む L C D R 3；

(x i) アミノ酸配列：R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (配列番号 4 7) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R V S N R F S (配列番号 4 8) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：L Q S T H F P P T (配列番号 4 9) を含む L C D R 3；

(x i i) アミノ酸配列：K A S Q N V G T N V V (配列番号 5 5) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：S A S Y R Y S (配列番号 5 6) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q Y K T Y P Y T (配列番号 5 7) を含む L C D R 3。

【0 1 3 8】

本発明はまた、本明細書で示す免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを、前記ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むベクター、および前記ポリヌクレオチドとベクターを含む単離宿主細胞（例えば、C H O 細胞、大腸菌のような細菌細胞ならびにサッカロミセス・セレビスエ (S . c e r e v i s i a e) およびピキア・パストリスなどのピキア属のような真菌細胞）と共に包含する。前記ポリペプチドを作製するための方法も包含され、その方法は、ポリヌクレオチドまたはベクターを宿主細胞に導入し、ポリペプチドが発現され得、場合により分泌され得る条件下で宿主細胞を培養して、場合によりポリペプチドを単離する工程を含む。

【0 1 3 9】

治療方法、投与および医薬製剤

本発明は、コレステロールまたは脂質の恒常性の障害およびそれに関連する障害、例えば、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症および黄色腫を、治療有効量の抗 P C S K 9 抗体（例えば、本明細書で述べるような）もしくはその抗原結合フラグメントまたは E G F - A ポリペプチドを投与することによって治療するまたは予防するための方法を提供する。

【0 1 4 0】

高コレステロール血症という用語は、例えば、家族性および非家族性の高コレステロール血症を含む。家族性高コレステロール血症 (F H C) は、低密度リポタンパク質 (L D L) に結合した血清コレステロールの上昇によって特徴づけられる常染色体優性障害である。家族性高コレステロール血症は、ヘテロ接合 F H C とホモ接合 F H C の両方を含む。

【0141】

高脂血症は血流中の脂質の増加である。これらの脂質は、コレステロール、コレステロールエステル、リン脂質およびトリグリセリドを含む。高脂血症は、例えば、I型、IIa型、IIb型、III型、IV型およびV型を含む。

【0142】

シトステロール血症は、まれな遺伝性植物ステロール蓄積疾患である。一般に、罹患者における代謝欠損は、胃腸管からのシトステロールの過剰吸収、シトステロールの肝分泌低下とその後の排泄低下、およびコレステロール合成の変化を引き起こす。

【0143】

アテローム性動脈硬化症は、動脈の内層における脂肪物質、コレステロール、細胞廃棄物、カルシウムおよびフィブリンの沈着に関連する動脈の硬化を含む。生じる集積物はプラークと呼ばれる。

【0144】

動脈硬化症は、硬化を導く、動脈壁におけるカルシウムの散在性蓄積と沈着を含む。

【0145】

本発明はまた、心疾患の危険度上昇に関連する血液コレステロールマーカーを改善するための方法を提供する。これらのマーカーは、高い総コレステロール、高いLDL、高い総コレステロール対HDL比および高いLDL対HDL比を含む。

【0146】

一般に、200mg/dL未満の総コレステロールが望ましいとみなされ、200~239mg/dLは高境界値とみなされ、そして240mg/dL以上は高いとみなされる。

【0147】

一般に、100mg/dL未満の血中LDLレベルが最適とみなされる；100~129mg/dLは最適に近い/最適よりは高いとみなされ、130~159mg/dLは高境界値とみなされ、160~189mg/dLは高いとみなされ、そして190mg/dL以上は非常に高いとみなされる。

【0148】

一般に、正常とみなされるHDLレベルは少なくとも35~40mg/dLである。

【0149】

心疾患危険度のもう1つの指標は、総コレステロールのHDLに対する比率である。一般に、心疾患の非常に低い危険度は、<3.4（男性）または<3.3（女性）の比率と相関する；低い危険度は4.0（男性）または3.8（女性）の比率に結びつき、平均的な危険度は5.0（男性）または4.5（女性）の比率に結びつき、中等度の危険度は9.5（男性）または7.0（女性）の比率に結びつき、そして高い危険度は>23（男性）または>11（女性）の比率に結びつく。

【0150】

心疾患危険度のさらなる指標は、LDLのHDLに対する比率である。一般に、非常に低い危険度は、1（男性）または1.5（女性）の比率に結びつき、平均的な危険度は3.6（男性）または3.2（女性）の比率に結びつき、中等度の危険度は6.3（男性）または5.0（女性）の比率に結びつき、そして高い危険度は8（男性）または6.1（女性）の比率に結びつく。

【0151】

本発明の1つの実施形態では、本発明の抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントまたはEGF-Aポリペプチドは、医薬的に許容される担体を含む医薬製剤に製剤化される。製剤に関する一般的な情報については、例えば、Gilmanら（編集）（1990）、The Pharmacological Bases of Therapeutics、第8版、Pergamon Press；A. Gennaro（編集）、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版（1990）、Mack Publishing Co.、Easton, Penns

10

20

30

40

50

ylvania.; Avisら(編集)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York; Liebermanら(編集)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York; および Liebermanら(編集)(1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New York; Kenneth A. Walters(編集)(2002) Dermatologies and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), Vol 119, Marcel Dekker 参照。

10

【0152】

本発明の抗PCSK9抗体およびその抗原結合フラグメントまたはEGF-Aポリペプチドは、医薬的に有用な組成物を製造するための公知の方法に従って製剤化でき、それにより抗体またはフラグメントを医薬的に許容される担体と混合して組み合わせる。担体、賦形剤または安定剤は、使用される用量および濃度で受容者に無毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリン類を含む単糖類、二糖類および他の糖質；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および/またはTween(商標)、Pluronic(商標)またはPEGなどの非イオン性界面活性剤を含む。インビボ投与のために使用される製剤は無菌でなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前または後に、滅菌ろ過膜を介したろ過によって容易に達成される。本明細書の治療もしくは医薬組成物または製剤は一般に、滅菌アクセス口を有する容器、例えば、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを備えた静脈内溶液バッグまたはバイアル中に収められる。

20

【0153】

本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントの投与の経路は、本発明の1つの実施形態では、非経口経路(例えば、静脈内、皮下、動脈内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内)によるものである。

30

【0154】

本発明の医薬組成物の用量および所望の抗PCSK9濃度またはEGF-Aポリペプチド濃度は、想定される特定用途に依存して異なり得る。適切な用量または投与経路の決定は十分に一般的な医師の技術範囲内である。動物実験は、ヒト治療用の有効用量の決定のために信頼し得る指針を提供する。有効用量の種間スケーリング(scaling)は、Mordenti, J.とChappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら編集、Pergamon Press, New York 1989, pp. 4296によって規定された原則に従って実施できる。

40

【0155】

被験者(例えば、本明細書で論じるような)において障害を治療するために使用される場合、抗PCSK9抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたはEGF-Aポリペプチドの治療有効用量または治療有効量を被験者に投与する。本発明の1つの実施形態では、治療有効用量は、いかなる程度であれ総血清コレステロールを低下させる、血中LDLレベルを低下させる、または血中HDLレベルを上昇させるのに十分な用量である。本発明の1つの実施形態では、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症もしくは黄色腫の治療のため、または心疾患危険度の任意の血液マーカー(例えば、本明細

50

書で論じるような)の治療のための抗PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメント(例えば、本明細書で述べるような)の治療有効用量は、約0.1mg/kg(体重)/週~約1.0mg/kg/週である。可溶性PCSK9 EGF-Aポリペプチドの治療有効用量は、本発明の1つの実施形態では、約0.25mg/kg/週~約25mg/kg/週である。

【0156】

可能な場合、作用物質(例えば、本明細書で論じるさらなる治療薬)の投与および投薬は、Physicians' Desk Reference 2003(Physicians' Desk Reference, 第57版); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月)の中の、作用物質の製品情報シートに列挙されているスケジュール、ならびに当技術分野で周知の治療プロトコールに従って行われる。

10

【0157】

医師および臨床家は、抗PCSK9抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたはEGF-Aポリペプチドで治療されているまたは治療される予定である被験者において血中コレステロールレベルを監視し、有益な医学的結果に達するために必要に応じて被験者の治療レジメンに調整を加え得る。

【0158】

さらなる化学療法剤

本発明は、抗PCSK9抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたはEGF-Aポリペプチドの投与によって脂質およびコレステロールの代謝の障害(例えば、本明細書で述べるような)を治療するための方法および組成物を提供する。抗体は、本発明の1つの実施形態では、任意の付加的なまたはさらなる化学療法剤と共に提供または投与され得る。本発明の1つの実施形態では、さらなる化学療法剤は、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬またはアドレナリン刺激薬である。本発明の1つの実施形態では、さらなる治療薬は、HMG-CoAレダクターゼ阻害薬のようなコレステロール低下薬である。

20

【0159】

本発明に関連して使用し得る心臓血管薬は、脂質および/もしくはコレステロール障害または高血圧ならびに他の心臓血管障害および疾患の治療または予防のためのものを含む。脂質またはコレステロールの代謝の障害は、高血圧によって引き起こされ得るまたは悪化し得る。高血圧は、持続的に高い血圧と定義される。一般に、成人は、収縮期血圧が持続的に140mmHgより高い場合または拡張期血圧が90mmHgより高い場合に高血圧と分類される。心臓血管死亡率についての長期的な危険度は、持続的血圧と直接関係して上昇する。本発明において使用し得る抗高血圧薬の例としては、例えば、カルシウムチャネル遮断薬、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、利尿薬、アドレナリン受容体遮断薬およびアドレナリン受容体遮断薬を含むアドレナリン遮断薬、または利尿薬が挙げられる。

30

【0160】

抗PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントと共に提供され得る他の心臓薬としては、アドレナリン刺激薬または冠血管拡張薬などの抗狭心症薬およびHMG-CoAレダクターゼ阻害薬が挙げられる。

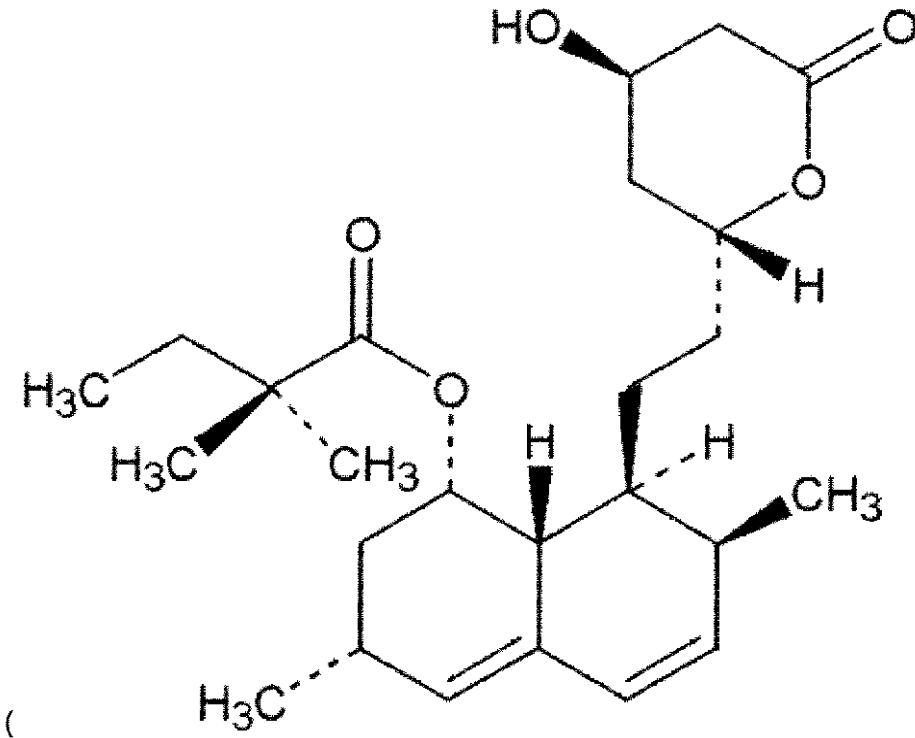
40

【0161】

HMG-CoAレダクターゼ阻害薬は、HMG-CoAレダクターゼ酵素を阻害し、それゆえ、被験者の体内でのコレステロールの産生を減少させる。HMG-CoAレダクターゼ阻害薬は、例えば、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチンおよびシンバスタチン:

【0162】

【化 3 4】



10

20

【0163】

を含む。

【0164】

アドレナリン遮断薬は、受容体阻害薬および/または受容体阻害薬である化合物を含む。受容体阻害薬であるアドレナリン遮断薬は、高血圧、狭心症および心不整脈におけるカテコールアミンの心臓血管作用に拮抗する薬剤のクラスを含む。アドレナリン受容体遮断薬は、塩酸ブノロール(1(2H)-ナフタレノン, 5-[3-(1,1-ジメチルエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロポキシ]-3,4-ジヒドロ-, 塩酸塩、Parke-Davisより入手できる、CAS RN 31969-05-8); アセプトロール(±N-[3-アセチル-4-[2-ヒドロキシ-3-[(1-メチルエチル)アミノ]プロポキシ]フェニル]-ブタンアミド、または(±)-3'-アセチル-4'-[2-ヒドロキシ-3-(イソプロピルアミノ)プロポキシ]ブチルアニリド); 塩酸アセプトロール(例えば、N-[3-アセチル-4-[2-ヒドロキシ-3-[(1-メチルエチル(methylethyle))アミノ]プロポキシ]フェニル]-, 一塩酸塩(monohydrococl chloride)、(±)-3'-アセチル-4'-[2-ヒドロキシ-3-(イソプロピルアミノ)プロポキシ]ブチルアニリド一塩酸塩、例えば、Wyeth-Ayerstより入手可能なSECTRAL(登録商標)カプセル); 塩酸アルプレノロール(2-プロパノール, 1-[(1-メチルエチル)アミノ]-3-[2-(2-プロペニル)フェノキシ]-, 塩酸塩、CAS RN 13707-88-5、オランダ特許出願第6,605,692号参照); アテノロール(例えば、ベンゼンアセトアミド4-[2'-ヒドロキシ-3'-[(1-メチルエチル)アミノ]プロポキシ]-、例えば、AstraZenecaより入手可能なTENORMIN(登録商標)I.V.注射剤); 塩酸カルテオロール(例えば、5-[3-[(1,1-ジメチルエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロポキシ]-3,4-ジヒドロ-2(1H)-キノリノン一塩酸塩、例えば、Abbottより入手可能なCartrol(登録商標)、Filmstab(登録商標)錠剤); 塩酸セリプロロール(3-[3-アセチル-4-[3-(tert-ブチルアミノ)-2-ヒドロキシプロポキシ]フェニル]-1,1-ジエチル尿素一塩酸塩、CAS RN 57470-78-7、米国特許第4,034,009号も参照のこと); 塩酸セタモロール(アセトアミド, 2-[2-[3-[(1,1-ジ

30

40

50

メチルエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロポキシ]-フェノキシ]-N-メチル-、一塩酸塩、CAS RN 77590-95-5、米国特許第4,059,622号も参照のこと)；塩酸ラベタロール(例えば、5-[1-ヒドロキシ-2-[(1-メチル-3-フェニルプロピル)アミノ]エチル]サリチルアミド一塩酸塩、例えば、Scheringより入手可能なNORMODYNE(登録商標)錠剤)；塩酸エスモロール((±)-メチルp-[2-ヒドロキシ-3-(イソプロピルアミノ)プロポキシ]ヒドロシナメート塩酸塩、例えば、Baxterより入手可能なBREVIBLOC(登録商標)注射剤)；塩酸レボベタキソロール(例えば、(S)-1-[p-[2-(シクロプロピルメトキシ)エチル]フェノキシ]-3-(イソプロピルアミノ)-2-プロパノール塩酸塩、例えば、Alconより入手可能なBETAXON(商標)眼科用懸濁剤)；塩酸レボブノロール(例えば、(-)-5-[3-(tert-ブチルアミノ)-2-ヒドロキシプロポキシ]-3,4-ジヒドロ-1(2H)-ナフタレノン塩酸塩、例えば、Allerganより入手可能なCCAP(登録商標)コンプライアンスキャップを有するBETAGAN(登録商標)Liquifilm(登録商標))；ナドロール(例えば、1-(tert-ブチルアミノ)-3-[(5,6,7,8-テトラヒドロ-シス-6,7-ジヒドロキシ-1-ナフチル)オキシ]-2-プロパノール、例えば、Mylanより入手可能なNadolol錠剤)；ブラクトロール(アセトアミド、N-[4-[2-ヒドロキシ-3-[(1-メチルエチル)アミノ]-プロポキシ]フェニル]-、CAS RN 6673-35-4、米国特許第3,408,387号も参照のこと)；塩酸プロプラノロール(1-(イソプロピルアミノ)-3-(1-ナフチルオキシ)-2-プロパノール塩酸塩、CAS RN 318-98-9)；塩酸ソタロール(例えば、d,l-1-N-[4-[1-ヒドロキシ-2-[(1-メチルエチル)アミノ]エチル]-フェニル]メタンスルホンアミド一塩酸塩、例えば、Berlexより入手可能なBETAPACE AF(商標)錠剤)；チモロール(2-プロパノール,1-[(1,1-ジメチルエチル)アミノ]-3-[4-4(4-ホルホルニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル]オキシ]-、半水和物、(S)-、CAS RN 91524-16-2)；マレイン酸チモロール((S)-1-[(1,1-ジメチルエチル)アミノ]-3-[4-(4-ホルホルニル)-1,2,5-チアジアゾール-3-イル]オキシ]-2-プロパノール(Z)-2-ブテンジオエート(1:1)塩、CAS RN 26921-17-5)；ピソプロロール(2-プロパノール,1-[4-[2-(1-メチルエトキシ)エトキシ]-メチル]フェノキシル]-3-[(1-メチルエチル)アミノ]-、(±)、CAS RN 66722-44-9)；フマル酸ピソプロロール(例えば、(±)-1-[4-[2-(1-メチルエトキシ)エトキシ]メチル]フェノキシ]-3-[(1-メチルエチル)アミノ]-2-プロパノール(E)-2-ブテンジオエート(2:1)(塩)、例えば、Lederle Consumerより入手可能なZEBETA(商標)錠剤)；ネビボロール(nebivalol)(2H-1-ベンゾピラン-2-メタノール,1-[イミノビス(メチレン)]ビス[6-フルオロ-3,4-ジヒドロ-、CAS RN 99200-09-6、米国特許第4,654,362号も参照のこと)；塩酸シクロプロロール、例えば、2-プロパノール,1-[4-[2-(シクロプロピルメトキシ)エトキシ]フェノキシ]-3-[(1-メチルエチル)アミノ]-、塩酸塩、A.A.S. RN 63686-79-3)；および塩酸デキシプロプラノロール(2-プロパノール,1-[(1-メチルエチル)-アミノ]-3-(1-ナフタレニルオキシ)-塩酸塩(CAS RN 13071-11-9)；塩酸ジアセトロール(アセトアミド、N-[3-アセチル-4-[2-ヒドロキシ-3-[(1-メチル-エチル)アミノ]プロポキシ][フェニル]-、一塩酸塩、CAS RN 69796-04-9)；塩酸ジレバロール(ベンズアミド、2-ヒドロキシ-5-[1-ヒドロキシ-2-[1-メチル-3-フェニルプロピル)アミノ]エチル]-、一塩酸塩、CAS RN 75659-08-4)；塩酸エキサプロロール(2-プロパノール,1-(2-シクロヘキシルフェノキシ)-3-[(1-メチルエチル)アミノ]-、塩酸塩、CAS RN 59333-90-3)；硫酸フレストロール(安息香酸,2-フルオロ(f l u r

10

20

30

40

50

o) - , 3 - [[2 - [アミノカルボニル) アミノ] - 1 - ジメチルエチル] アミノ] - 2 - ヒドロキシプロピルエステル , (±) - 硫酸塩 (1 : 1) (塩) 、 C A S R N 8 8 4 4 - 7 3 - 9 ; 塩酸メタロール (メタンスルホンアミド , N - [4 - [1 - ヒドロキシ - 2 - (メチルアミノ) プロピル] フェニル] - , 一塩酸塩 、 C A S R N 7 7 0 1 - 6 5 - 7) ; メトプロロール 2 - プロパノール , 1 - [4 - (2 - メトキシエチル) フェノキシ] - 3 - [1 - メチルエチル) アミノ] - 、 C A S R N 3 7 3 5 0 - 5 8 - 6) ; 酒石酸メトプロロール (例えば、 2 - プロパノール , 1 - [4 - (2 - メトキシエチル) フェノキシ] - 3 - [(1 - メチルエチル) アミノ] - 、例えば、 Novartis より入手可能な L O P R E S S O R (登録商標)) ; 硫酸パマトロール (カルバミン酸 , [2 - [4 - [2 - ヒドロキシ - 3 - [(1 - メチルエチル) アミノ] プロボキシ] フェニル] - エチル] - , メチルエステル , (±) 硫酸塩 (塩) (2 : 1) 、 C A S R N 5 9 9 5 4 - 0 1 - 7) ; 硫酸ペンブトロール (2 - プロパノール , 1 - (2 - シクロペンチルフェノキシ) - 3 - [1 , 1 - ジメチルエチル) アミノ] 1 , (S) - , 硫酸塩 (2 : 1) (塩) 、 C A S R N 3 8 3 6 3 - 3 2 - 5) ; プラクトロール (アセトアミド , N - [4 - [2 - ヒドロキシ - 3 - [(1 - メチルエチル) アミノ] - プロボキシ] フェニル] - 、 C A S R N 6 6 7 3 - 3 5 - 4) ; 塩酸チプレノロール (プロパノール , 1 - [(1 - メチルエチル) アミノ] - 3 - [2 - (メチルチオ) - フェノキシ] - , 塩酸塩 , (±) 、 C A S R N 3 9 8 3 2 - 4 3 - 4) ; トラモロール (ベンズアミド , 4 - [2 - [[2 - ヒドロキシ - 3 - (2 - メチルフェノキシ) - プロピル] アミノ] エトキシ] - 、 C A S R N 3 8 1 0 3 - 6 1 - 6) を含むが、これらに限定されない。

10

20

【 0 1 6 5 】

受容体阻害薬であるアドレナリン受容体は、内因性カテコールアミンによって誘導される血管収縮をブロックするように働く。生じる末梢抵抗の減少は平均血圧の低下を導く。この作用の大きさは、アンタゴニストが投与される時点での交感神経緊張の程度に依存する。

【 0 1 6 6 】

受容体阻害薬である適切なアドレナリン受容体は、塩酸フェンスピリド (参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 3 , 3 9 9 , 1 9 2 号に開示されているように製造され得る) ; プロロキサ (C A S R N 3 3 7 4 3 - 9 6 - 3) ; 塩酸アルフゾシン (C A S R N 8 1 4 0 3 - 6 8 - 1) ; および前述した塩酸ラベタロールまたはそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。

30

【 0 1 6 7 】

本発明と共に使用し得る および 受容体阻害剤活性を有するアドレナリン遮断薬は、プレチリウムトシレート (C A S R N 6 1 - 7 5 - 6) ; ジヒドロエルゴタミンメシレート (dihydroergtamine mesylate) (例えば、エルゴタミン - 3 ' , 6 ' , 1 8 - トリオン , 9 - 1 0 - ジヒドロ - 1 2 ' - ヒドロキシ - 2 ' - メチル - 5 ' - (フェニルメチル) - , (5 ' ()) - , モノメタンスルホン酸塩、例えば、 Novartis より入手可能な D H E 4 5 (登録商標) 注射剤) ; カルベジロール (例えば、 (±) - 1 - (カルバゾール - 4 - イルオキシ) - 3 - [[2 - (o - メトキシフェノキシ) エチル] アミノ] - 2 - プロパノール、例えば、 SmithKline Beecham より入手可能な C O R E G (登録商標) 錠剤) ; ラベタロール (例えば、 5 - [1 - ヒドロキシ - 2 - [(1 - メチル - 3 - フェニルプロピル) アミノ] エチル] サリチルアミド一塩酸塩、例えば、 Schering より入手可能な N O R M O D Y N E (登録商標) 錠剤) ; プレチリウムトシレート (ベンゼンメタンアミニウム , 2 - プロモ - N - エチル - N , N - ジメチル , 4 - メチルベンゼンスルホン酸との塩 (1 : 1) 、 C A S R N 6 1 - 7 5 - 6) ; フェントラミンメシレート (フェノール , 3 - [[(4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) メチル] (4 - メチルフェニル) アミノ] - , モノメタンスルホン酸塩 (塩) C A S R N 6 5 - 2 8 - 1) ; 酒石酸ソリベルチン (5 H - 1 , 3 - ジオキソロ [4 , 5 - f] インドール , 7 - [2 - [4 - (2 -

40

50

メトキシフェニル) - 1 - ピペラジニル] エチル] - , (2 R , 3 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシブタンジオエート (1 : 1)、C A S R N 5 5 9 1 - 4 3 - 5) ; 塩酸ゾレルチン (ピペラジン , 1 - フェニル - 4 - [2 - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) エチル] - , 一塩酸塩 (8 C l , 9 C l)、C A S R N 7 2 4 1 - 9 4 - 3) を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 6 8 】

アンギオテンシン系阻害薬は、アンギオテンシン I I の機能、合成または異化に干渉する作用物質である。本発明において使用し得るこれらの作用物質は、アンギオテンシン変換酵素 (A C E) 阻害薬、アンギオテンシン I I アンタゴニスト、アンギオテンシン I I 受容体アンタゴニスト、アンギオテンシン I I の異化を活性化作用物質、およびそこからアンギオテンシン I I が最終的に誘導されるアンギオテンシン I の合成を妨げる作用物質を含むが、これらに限定されない。レニン - アンギオテンシン系は血行力学および水と電解質のバランスの調節に關与する。血液量、腎プロフュージョン (r e n a l p r o f u s i o n)、または血漿中の $N a ^ { + }$ の濃度を低下させる因子はこの系を活性化する傾向があり、一方これらのパラメータを上昇させる因子はその機能を抑制する傾向がある。アンギオテンシン I およびアンギオテンシン I I は、酵素的レニン - アンギオテンシン経路によって合成される。合成プロセスは、レニン酵素が、血漿中の偽性グロブリンであるアンギオテンシノゲンに作用して、デカペプチド (c e c a p e p t i d e) アンギオテンシン I を生成するときに開始される。アンギオテンシン I はアンギオテンシン変換酵素 (A C E) によってアンギオテンシン I I に変換される。後者は、様々な哺乳動物種においていくつかの形態の高血圧の原因物質として関係づけられてきた活性昇圧物質である。

【 0 1 6 9 】

アンギオテンシン I I 受容体アンタゴニストは、アンギオテンシン I I 受容体に結合し、その活性を妨げることによってアンギオテンシン I I の活性に干渉する化合物である。本発明において使用し得るアンギオテンシン I I 受容体アンタゴニストは周知であり、ペプチド化合物および非ペプチド化合物を含む。アンギオテンシン I I 受容体アンタゴニストの非限定的な例としては、カンデサルタンシレキセチル (1 H - ベンズイミダゾール - 7 - カルボン酸 , 2 - エトキシ - 1 - [[2 ' - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] メチル] - , 1 - [[(シクロヘキシルオキシ) カルボニル] オキシ] エチルエステル)、C A S R N 1 4 5 0 4 0 - 3 7 - 5) ; テルミサルタン ([1 , 1 ' - ビフェニル] - 2 - カルボン酸 , 4 ' - [(1 , 4 ' - ジメチル - 2 ' - プロピル [2 , 6 ' - ビ - 1 H - ベンズイミダゾール] - 1 ' - イル) メチル] - 、C A S R N 1 4 4 7 0 1 - 4 8 - 4) ; カンデサルタン (1 H - ベンズイミダゾール - 7 - カルボン酸 , 2 - エトキシ - 1 - [[2 ' - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] メチル] - 、C A S R N 1 3 9 4 8 1 - 5 9 - 7) ; ロサルタンカリウム (1 H - イミダゾール - 5 - メタノール , 2 - ブチル - 4 - クロロ - 1 - [[2 ' - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] - メチル] - , 一カリウム塩 ; イルベサルタン (1 , 3 - ジアザスピロ [4 . 4] ノン - 1 - エン - 4 - オン , 2 - ブチル - 3 - [[2 ' - (1 H - テトラゾール - 5 - イル) [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] メチル] - 、C A S R N 1 3 8 4 0 2 - 1 1 - 6) が挙げられる。

【 0 1 7 0 】

アンギオテンシン変換酵素 (A C E) は、アンギオテンシン I のアンギオテンシン I I への変化を触媒する酵素である。本発明において使用し得る A C E 阻害薬は、A C E の活性を阻害することによってレニン - アンギオテンシン系に干渉し、それにより昇圧物質アンギオテンシン I I の形成を低減するまたは排除する、アミノ酸およびその誘導体、ジペプチドおよびトリペプチドを含むペプチドならびに A C E に対する抗体を含む。A C E 阻害薬は、高血圧、うっ血性心不全、心筋梗塞および腎疾患を治療するために医学的に使用されてきた。適切な A C E 阻害薬としては、塩酸ベナゼプリル (例えば、3 - [[1 - (

10

20

30

40

50

エトキシカルボニル) - 3 - フェニル - (1 S) - プロピル] アミノ] - 2 , 3 , 4 , 5
 - テトラヒドロ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - (3 S) - ベンザゼピン - 1 - 酢酸一塩酸塩、
 例えば、Novartisより入手可能なLOTREL (登録商標) カプセル) ; カプト
 プリル (例えば、1 - [(2 S) - 3 - メルカプト - 2 - メチルプロピオニル] - L - プ
 ロリン、例えば、Mylanより入手可能なCAPTOPRIL錠剤) ; フォシノプリル
 (例えば、L - プロリン、4 - シクロヘキシル - 1 - [[[2 - メチル - 1 - (1 - オキ
 ソプロボキシ) プロボキシ] (4 - フェニルブチル) ホスフィニル] アセチル] - , ナト
 リウム塩、トランス - 、例えば、Bristol-Myers Squibbより入手可
 能なMONOPRIL (登録商標) 錠剤) ; 塩酸モエキシプリル (例えば、[3 S - [2
 [R* (R*)] , 3 R*]] - 2 - [2 - [[1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェ
 ニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 ,
 7 - ジメトキシ - 3 - イソキノリンカルボン酸、一塩酸塩、例えば、Schwarzより
 入手可能なUNIRETIC (登録商標) 錠剤) ; ペリンドプリルエルブミン (例えば、
 (2 S , 3 a S , 7 a S) - 1 - [(S) - N - [(S) - 1 - カルボキシブチル] アラ
 ニル] ヘキサヒドロ - 2 - インドリンカルボン酸、1 - エチルエステル、tert - ブチ
 ルアミンとの化合物 (1 : 1)、例えば、Solvayより入手可能なACEON (登録
 商標) 錠剤) ; キナプリル (例えば、[3 S - [2 [R* (R*)] , 3 R*]] - 2 -
 [2 - [[1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソ
 プロピル] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 3 - イソキノリンカルボン酸、一塩酸塩、
 例えば、Parkes-Davisより入手可能なACCURETIC (登録商標) 錠剤)
 ; ラミプリル (例えば、2 - アザビシクロ [3 . 3 . 0] - オクタン - 3 - カルボン酸誘
 導体、例えば、Monarchより入手可能なALTACE (登録商標) カプセル) ; マ
 レイン酸エナラプリル (例えば、(S) - 1 - [N - [1 - (エトキシカルボニル) -
 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル] - L - プロリン、(Z) - 2 - ブタンジオエー
 ト塩 (1 : 1)、例えば、Merckより入手可能なVASOTEC (登録商標) 錠剤)
 ; リシノプリル (例えば、(S) - 1 - [N2 - (1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピ
 ル) - L - リシル] - L - プロリン二水和物、例えば、Merckより入手可能なPRIN
 ZIDE (登録商標) 錠剤) ; デラプリル (米国特許第 4 , 3 8 5 , 0 5 1 号に開示さ
 れているように製造され得る) ; およびスピラプリル (米国特許第 4 . 4 7 0 , 9 7 2 号
 に開示されているように製造され得る) ; ベナザプリラート (1 H - 1 - ベンザゼピン -
 1 - 酢酸、3 - [[(1 S) - 1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 2 ,
 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 2 - オキソ、(3 S) - 、CAS RN 8 6 5 4 1 - 7 8
 - 8) ; 塩酸デラプリル (グリシン、N - [(1 S) - 1 - (エトキシカルボニル) -
 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル - N - (2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 2
 - イル) - , 一塩酸塩、CAS RN 8 3 4 3 5 - 6 7 - 0) ; フォシノプリルナトリ
 ウム (L - プロリン、4 - シクロヘキシル - 1 - [[(R) - [(1 S) - 2 - メチル -
 1 - (1 - オキソプロボキシ) プロボキシ] (4 - フェニルブチル) ホスフィニル] アセ
 チル] - , ナトリウム塩、(4 S) - 、CAS RN 8 8 8 8 9 - 1 4 - 9) ; リベン
 ザプリル (1 H - 1 - ベンザゼピン - 1 - 酢酸、3 - [[(1 S) - 5 - アミノ - 1 - カ
 ルボキシベンチル] アミノ] - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 2 - オキソ - , (3 S)
 - 、CAS RN 1 0 9 2 1 4 - 5 5 - 3) ; ペントプリル (1 H - インドール - 1 -
 ペンタン酸、2 - カルボキシ - 2 , 3 - ジヒドロ - , - ジメチル - - オキソ - ,
 - エチルエステル (R , R , 2 S) - 、CAS RN 8 2 9 2 4 - 0 3 - 6) ;
 ペリンドプリル (1 H - インドール - 2 - カルボン酸、1 - [(2 S) - 2 - [[(1 S)
) - 1 - (エトキシカルボニル) ブチル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] オクタヒド
 ロ - , (2 S , 3 a S , 7 a S) - 、CAS RN 8 2 8 3 4 - 1 6 - 0) ; 塩酸キナ
 プリル (3 - イソキノリンカルボン酸、2 - [(2 S) - 2 - [[(1 S) - 1 - (エト
 キシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 , 2 ,
 3 , 4 - テトラヒドロ - , 一塩酸塩、(3 S) - 、CAS RN 8 2 5 8 6 - 5 5 -)
 ; キナプリラート (3 - イソキノリンカルボン酸、2 - [(2 S) - 2 - [[(1 S) -

10

20

30

40

50

1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキシプロピル] - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ -, (3S) -, CAS RN 82768-85-2); 塩酸スピラプリル (1, 4 - ジチア - 7 - アザスピロ [4, 4] ノナン - 8 - カルボン酸, 7 - [(2S) - 2 - [[(1S) - 1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキシプロピル] -, 一塩酸塩, (8S) -, CAS RN 94841-17-5); スピラプリラート (1, 4 - ジチア - 7 - アザスピロ [4, 4] ノナン - 8 - カルボン酸, 7 - [(2S) - 2 - [[(1S) - 1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキシプロピル] -, (8S) -, CAS RN 83602-05-5); テプロチド (ブラジキニン増強剤 BPP9a, CAS RN 35115-60-7); リシノプリル (L - プロリン, N2 - [(1S) - 1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル] - L - リシル -, CAS RN 76547-98-3); ゴフェノプリル (L - プロリン, 1 - [(2S) - 3 - (ベンゾイルチオ) - 2 - メチル - 1 - オキシプロピル] - 4 - (フェニルチオ) -, カルシウム塩 (2:1), (4S) -, CAS RN 81938-43-4) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0171】

「カルシウムチャネル遮断薬」は、高血圧、狭心症および心不整脈などのいくつかの心臓血管障害を含む様々な疾患の管理において重要な治療的価値を有する化学的に多様なクラスの化合物である (Fleckenstein, *Cir. Res. V. 52 (suppl. 1)*, p. 13-16 (1983); Fleckenstein, *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, John Wiley, New York (1983); McCall, D., *Curr. Pract. Cardiol. v. 10*, p. 1-11 (1985))。カルシウムチャネル遮断薬は、細胞カルシウムチャネルを調節することによって細胞へのカルシウムの流入を防ぐまたは緩やかにする薬剤の不均一な群である (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版, Mack Publishing Company, Eaton, PA, p. 963 (1995))。本発明において有用なカルシウムチャネル遮断薬としては、アムロジピンのベシレート塩 (例えば、3 - エチル - 5 - メチル - 2 - (2 - アミノエトキシメチル) - 4 - (2 - クロロフェニル) - 1, 4 - ジヒドロ - 6 - メチル - 3, 5 - ピリジンジカルボキシレートベンゼンスルホン酸塩、例えば、Pfizerより入手可能なNORVASC (登録商標)); マレイン酸クレンチアゼム (1, 5 - ベンゾチアゼピン - 4 (5H) - オン, 3 - (アセチルオキシ) - 8 - クロロ - 5 - [2 - (ジメチルアミノ) エチル] - 2, 3 - ジヒドロ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - (2S - シス) -, (Z) - 2 - プテンジオエート (1:1)、米国特許第4, 567, 195号も参照のこと); イスラジピン (3, 5 - ピリジンジカルボン酸, 4 - (4 - ベンゾフラザニル) - 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル -, メチル 1 - メチルエチルエステル, (±) - 4 (4 - ベンゾフラザニル) - 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル - 3, 5 - ピリジンジカルボキシレート、米国特許第4, 466, 972号も参照のこと); ニモジピン (例えば、イソプロピル (2 - メトキシエチル) 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル - 4 - (3 - ニトロフェニル) - 3, 5 - ピリジン - ジカルボキシレート、例えば、Bayerより入手可能なNIMOTOP (登録商標)); フェロジピン (例えば、エチルメチル 4 - (2, 3 - ジクロロフェニル) - 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル - 3, 5 - ピリジンジカルボキシレート、例えば、AstraZeneca LPより入手可能なPLENDIL (登録商標) 持続放出錠); ニルバジピン (3, 5 - ピリジンジカルボン酸, 2 - シアノ - 1, 4 - ジヒドロ - 6 - メチル - 4 - (3 - ニトロフェニル) -, 3 - メチル 5 - (1 - メチルエチル) エステル、米国特許第3, 799, 934号も参照のこと); ニフェジピン (例えば、3, 5 - ピリジンジカルボン酸, 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル - 4 - (2 - ニトロフェニル) -, ジメチルエステル, 例えば、Pfizerより入手可能なPROCARDIA XL (登録商標) 持続放出錠); 塩酸ジルチアゼム (例えば、1, 5 - ベンゾチアゼピン - 4 (5H) - オン, 3 - (アセチルオキシ) - 5 [2 - (ジメチルアミノ) エチ

10

20

30

40

50

ル] - 2, 3 - ジヒドロ - 2 (4 - メトキシフェニル) - , 一塩酸塩, (+) - シス、例えば、Forestより入手可能なTIAZAC (登録商標) カプセル) ; 塩酸ベラパミル (例えば、ベンゼンアセトニトリル, () - [[3 - [[2 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) エチル] メチルアミノ] プロピル] - 3, 4 - ジメトキシ - () - (1 - メチルエチル) 塩酸塩, 例えば、Knoll Labsより入手可能なISOPTIN (登録商標) SR錠剤) ; 塩酸テルジピン (3, 5 - ピリジンジカルボン酸, 2 - [(ジメチルアミノ) メチル] - 4 - [2 - [(1E) - 3 - (1, 1 - ジメチルエトキシ) - 3 - オキソ - 1 - プロペニル] フェニル] - 1, 4 - ジヒドロ - 6 - メチル - , ジエチルエステル, 一塩酸塩)、CAS RN 108700 - 03 - 4) ; ベルホスジル (ホスホン酸, [2 - (2 - フェノキシエチル) - 1, 3 - プロパンジイル] ビス - , テトラブチルエステル、CAS RN 103486 - 79 - 9) ; ホステジル (ホスホン酸, [[4 - (2 - ベンゾチアゾリル) フェニル] メチル] - , ジエチルエステル、CAS RN 75889 - 62 - 2) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0172】

「抗狭心症薬」としての役割も果たす本発明の心臓血管薬は本発明において有用である。狭心症は、心筋酸素アベイラビリティが心筋酸素需要を満たすのに不十分であるときに起こる症状を含む。これらの薬剤の非限定的な例としては、ラノラジン (塩酸塩 1 - ピペラジンアセトアミド, N - (2, 6 - ジメチルフェニル) - 4 - [2 - ヒドロキシ - 3 - (2 - メトキシフェノキシ) プロピル] - , 二塩酸塩、CAS RN 95635 - 56 - 6) ; 塩酸ベタキソロール (2 - プロパノール, 1 - [4 - [2 (シクロプロピルメトキシ) エチル] フェノキシ] - 3 - [(1 - メチルエチル) アミノ] - , 塩酸塩、CAS RN 63659 - 19 - 8) ; 塩酸ブトプロジン (メタノン, [4 - [3 (ジブチルアミノ) プロポキシ] フェニル] (2 - エチル - 3 - インドリジニル) - , 一塩酸塩、CAS RN 62134 - 34 - 3) ; マレイン酸シネバゼト (1 - ピペラジン酢酸, 4 - [1 - オキソ - 3 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) - 2 - プロペニル] - , エチルエステル, (2Z) - 2 - プテンジオエート (1 : 1)、CAS RN 50679 - 07 - 7) ; トシフェン (ベンゼンスルホンアミド, 4 - メチル - N - [[[(1S) - 1 - メチル - 2 - フェニルエチル] アミノ] カルボニル] - , CAS RN 32295 - 18 - 4) ; 塩酸ベラパミル (ベンゼンアセトニトリル, - [3 - [[2 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) エチル] メチルアミノ] プロピル] - 3, 4 - ジメトキシ - (1 - メチルエチル) - , 一塩酸塩、CAS RN 152 - 11 - 4) ; モルシドミン (1, 2, 3 - オキサジアゾリウム, 5 - [(エトキシカルボニル) アミノ] - 3 - (4 - モルホリニル) - , 分子内塩、CAS RN 25717 - 80 - 0) ; 塩酸ラノラジン (1 - ピペラジンアセトアミド, N - (2, 6 - ジメチルフェニル) - 4 - [2 - ヒドロキシ - 3 - (2 - メトキシフェノキシ) プロピル] - , 二塩酸塩、CAS RN 95635 - 56 - 6) ; トシフェン (ベンゼンスルホンアミド, 4 - メチル - N - [[[(1S) - 1 - メチル - 2 - フェニルエチル] アミノ] カルボニル] - , CAS RN 32295 - 18 - 4) が挙げられる。

【0173】

「冠血管拡張薬」は、心臓への酸素供給を増大することによって狭心症のシステムを軽減するように作用し得る。本発明において有用な冠血管拡張薬としては、塩酸ジルチアゼム (例えば、1, 5 - ベンゾチアゼピン - 4 (5H) - オン, 3 - (アセチルオキシ) - 5 [2 - (ジメチルアミノ) エチル] - 2, - 3 - ジヒドロ - 2 (4 - メトキシフェニル) - , 一塩酸塩, (+) - シス、例えば、Forestより入手可能なTIAZAC (登録商標) カプセル) ; 二硝酸イソソルビド (例えば、1, 4 : 3, 6 - ジアンヒドロ - D - グルシトール 2, 5 - ジニトレート、例えば、Wyeth - Ayerstより入手可能なISORDIL (登録商標) TITRADOSE (登録商標) 錠剤) ; 一硝酸ソソルビド (例えば、1, 4 : 3, 6 - ジアンヒドロ - D - グルシトール, 5 - ニトレート, 有機硝酸塩、例えば、Wyeth - Ayerstより入手可能なIsmo (登録商標) 錠剤) ; ニトログリセリン (例えば、2, 3 プロパントリオールトリニトレート、例えば、Pa

10

20

30

40

50

r k e - D a v i s より入手可能な N I T R O S T A T (登録商標) 錠剤) ; 塩酸ベラパ
 ミル (例えば、ベンゼンアセトニトリル, (±) - () [3 - [[2 - (3 , 4 ジメト
 キシフェニル) エチル] メチルアミノ] プロピル] - 3 , 4 - ジメトキシ - () - (1
 - メチルエチル) 塩酸塩、例えば、S e a r l e より入手可能な C O V E R A H S (登
 録商標) 持続放出錠) ; クロモナール (米国特許第 3 , 2 8 2 , 9 3 8 号に開示されてい
 るように製造され得る) ; クロニテート (A n n a l e n 1 8 7 0 1 5 5) ; ドロブ
 レニラミン (ドイツ特許第 2 , 5 2 1 , 1 1 3 号に開示されているように製造され得る)
 ; リドフラジン (米国特許第 3 , 2 6 7 , 1 0 4 号に開示されているように製造され得る)
 ; プレニラミン (米国特許第 3 , 1 5 2 , 1 7 3 号に開示されているように製造され得
 る) ; 硝酸プロパチル (フランス特許第 1 , 1 0 3 , 1 1 3 に開示されているように製造
 され得る) ; 塩酸ミオフラジン (1 - ピペラジンアセトアミド, 3 - (アミノカルボニル
) - 4 - [4 , 4 - ビス (4 - フルオロフェニル) ブチル] - N - (2 , 6 - ジクロロフェ
 ニル) - , 二塩酸塩、C A S R N 8 3 8 9 8 - 6 7 - 3) ; ミキシジン (ベンゼン
 エタンアミン, 3 , 4 - ジメトキシ - N - (1 - メチル - 2 - ピロリジニリデン) - ピロ
 リジン, 2 - [(3 , 4 - ジメトキシフェネチル) イミノ] - 1 - メチル - 1 - メチル -
 2 - [(3 , 4 - ジメトキシフェネチル) イミノ] ピロリジン、C A S R N 2 7 7 3
 7 - 3 8 - 8) ; モルシドミン (1 , 2 , 3 - オキサジアゾリウム, 5 - [(エトキシカ
 ルボニル) アミノ] - 3 - (4 - モルホリニル) - , 分子内塩、C A S R N 2 5 7 1
 7 - 8 0 - 0) ; 一硝酸イソソルビド (D - グルシトール, 1 , 4 : 3 , 6 - ジアンヒド
 ロ - , 5 - ニトレート、C A S R N 1 6 0 5 1 - 7 7 - 7) ; 四硝酸エリトリチル (20
 1 , 2 , 3 , 4 - ブタンテトラール, 四硝酸塩, (2 R , 3 S) - レル - , C A S R
 N 7 2 9 7 - 2 5 - 8) ; クロニトレート (1 , 2 - プロパンジオール, 3 - クロロ -
 , ジニトレート (7 C 1 , 8 C 1 , 9 C 1) 、 C A S R N 2 6 1 2 - 3 3 - 1) ; ジ
 ピリダモール (エタノール, 2 , 2 ' , 2 ' ' , 2 ' ' ' - [(4 , 8 - ジ - 1 - ピペリ
 ジニルピリミド [5 , 4 - d] ピリミジン - 2 , 6 - ジイル) ジニトリロ] テトラキス -
 、 C A S R N 5 8 - 3 2 - 2) ; ニコランジル (C A S R N 6 5 1 4 1 - 4 6 -
 0 3) ; ピリジンカルボキサミド (N - [2 - (ニトロオキシ) エチル] - ニソルジピン
 3 , 5 - ピリジンジカルボン酸, 1 , 4 - ジヒドロ - 2 , 6 - ジメチル - 4 - (2 - ニト
 ロフェニル) - , メチル 2 - メチルプロピルエステル、C A S R N 6 3 6 7 5 - 7 2
 - 9) ; ニフェジピン (3 , 5 - ピリジンジカルボン酸, 1 , 4 - ジヒドロ - 2 , 6 - ジ
 メチル - 4 - (2 - ニトロフェニル) - , ジメチルエステル、C A S R N 2 1 8 2 9
 - 2 5 - 4) ; マレイン酸ペルヘキシリン (ピペリジン, 2 - (2 , 2 - ジシクロヘキシ
 ルエチル) - , (2 Z) - 2 - プテンジオエート (1 : 1) 、 C A S R N 6 7 2 4 -
 5 3 - 4) ; 塩酸オクスプレノロール (2 - プロパノール, 1 - [(1 - メチルエチル)
 アミノ] - 3 - [2 - (2 - プロペニルオキシ) フェノキシ] - , 塩酸塩、C A S R N
 6 4 5 2 - 7 3 - 9) ; ペントリニトロール (1 , 3 - プロパンジオール, 2 , 2 - ビ
 ス [(ニトロオキシ) メチル] - , 一硝酸塩 (エステル)、C A S R N 1 6 0 7 - 1
 7 - 6) ; ベラパミル (ベンゼンアセトニトリル, - [3 - [[2 - (3 , 4 - ジメト
 キシフェニル) エチル] メチルアミノ] プロピル] - 3 , 4 - ジメトキシ - (1 - メ
 チルエチル) - , C A S R N 5 2 - 5 3 - 9) が挙げられるが、これらに限定されな
 い。

【 0 1 7 4 】

「利尿薬」という用語は、溶質 (主として N a C l) と水の排泄を高める化合物である。
 一般に、利尿薬治療の主要な目的は、血圧を低下させるまたは過剰の間質液 (水腫) を
 身体から除去するために細胞外液量を減少させることである。本発明の範囲内で使用し得
 る利尿薬の非限定的な例としては、アルチアジド (英国特許第 9 0 2 , 6 5 8 号に開示され
 ているように製造され得る) ; ベンズチアジド (米国特許第 3 , 1 0 8 , 0 9 7 号に開
 示されているように製造され得る) ; プチアジド (英国特許第 8 6 1 , 3 6 7 号に開示され
 ているように製造され得る) ; クロロチアジド (米国特許第 2 , 8 0 9 , 1 9 4 号に開
 示されているように製造され得る) ; スピロノラクトン (C A S 番号 5 2 - 0 1 - 7) ;

10

20

30

40

50

およびトリウムテレン（C A S 番号 3 9 6 - 0 1 - 0 ）が挙げられる。

【 0 1 7 5 】

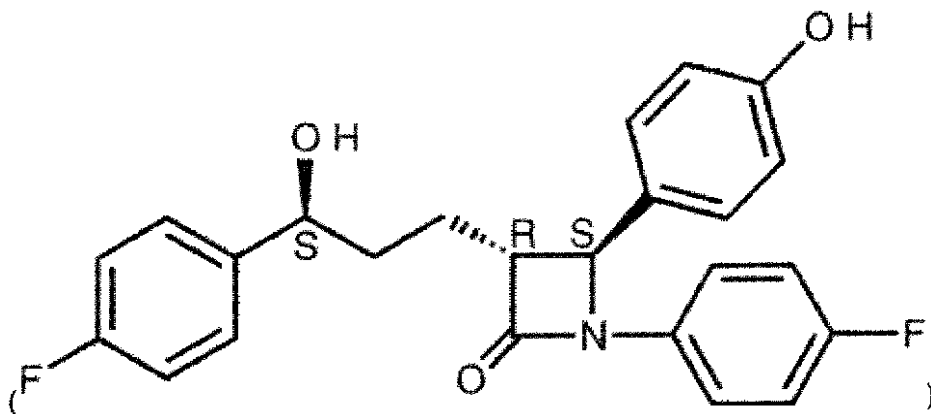
本発明における心臓血管薬として有用な「アドレナリン刺激薬」としては、塩酸グアンファシン（例えば、N - アミジノ - 2 - (2 , 6 - ジクロロフェニル) アセトアミド塩酸塩、例えば、R o b i n s より入手可能な T E N E X (登録商標) 錠剤）；ヒドロクロロチアジド（例えば、6 - クロロ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド 1 , 1 - ジオキシド）と組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド（例えば、レボ - 3 - (3 , 4 - ジヒドロキシフェニル) - 2 - メチルアラニン、例えば、M e r c k より入手可能な A L D O R I L (登録商標) 錠剤のような組合せ）；メチルドパ - クロロチアジド（例えば、6 - クロロ - 2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチア
10
ジアジン - 7 - スルホンアミド 1 , 1 - ジオキシドと前述したようなメチルドパ、例えば、M e r c k より入手可能な A L D O C L O R r (登録商標) 錠剤）；塩酸クロニジン（例えば、2 - (2 , 6 - ジクロロフェニルアミノ) - 2 - イミダゾリン塩酸塩とクロルタリドン（例えば、2 - クロロ - 5 - (1 - ヒドロキシ - 3 - オキソ - 1 - イソインドリニル) ベンゼンスルホンアミド）、例えば、B o e h r i n g e r I n g e l h e i m より入手可能な C O M B I P R E S (登録商標) 錠剤）；塩酸クロニジン（例えば、2 - (2 , 6 - ジクロロフェニルアミノ) - 2 - イミダゾリン塩酸塩、例えば、B o e h r i n g e r I n g e l h e i m より入手可能な C A T A P R E S (登録商標) 錠剤）；クロニジン（1 H - イミダゾール - 2 - アミン、N - (2 , 6 - ジクロロフェニル) - 4 , 5 - ジヒドロ - 、C A S R N 4 2 0 5 - 9 0 - 7 ）が挙げられるが、これらに限定され
20
ない。

【 0 1 7 6 】

抗 P C S K 9 抗体およびその抗原結合フラグメントならびに E G F - A ポリペプチドはまた、腸のコレステロール吸収を阻害する任意のアゼチジノンと共に投与し得る。そのようなアゼチジノンは、エゼチミブ：

【 0 1 7 7 】

【 化 3 5 】



【 0 1 7 8 】

を含む。

【 0 1 7 9 】

抗 P C S K 9 抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは E G F - A ポリペプチドと共に投与し得るさらなる化学療法剤としては、魚油、エイコサペンタエン酸 (e i c o s a e p e n a n o i c a c i d)、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、ナイアシン、フェノフィブラートなどのフィブラート、ゲムフィプロジル、ならびにコレスチラミン、コレスチポールおよびコレセベラムなどの胆汁酸吸着剤が挙げられる。

【 0 1 8 0 】

他の化学療法剤としては、アルチアジド (2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド , 6 - クロロ - 3 , 4 - ジヒドロ - 3 - [(2 - プロペニルチオ) メチル] - , 1 , 1 - ジオキシド、C A S R N 5 5 8 8 - 1 6 - 9) ；ベンズチアジド (

10

20

30

40

50

2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド , 6 - クロロ - 3 - [[(フェニルメチル) チオ] メチル] - , 1 , 1 - ジオキシド、C A S R N 9 1 - 3 3 - 8) ; カプトプリル (L - プロリン , 1 - [(2 S) - 3 - メルカプト - 2 - メチル - 1 - オキソプロピル] - 、C A S R N 6 2 5 7 1 - 8 6 - 2) ; カルベジロール (2 - プロパノール , 1 - (9 H - カルバゾール - 4 - イルオキシ) - 3 - [[2 - (2 - メトキシフェノキシ) エチル] アミノ] - 、C A S R N 7 2 9 5 6 - 0 9 - 3) ; クロロチアジド (2 - プロパノールナトリウム , 1 - (9 H - カルバゾール - 4 - イルオキシ) - 3 - [[2 - (2 - メトキシフェノキシ) エチル] アミノ] - 、C A S R N 7 2 9 5 6 - 0 9 - 3) ; 塩酸クロニジン (1 H - イミダゾール - 2 - アミン、N - (2 , 6 - ジクロロフェニル) - 4 , 5 - ジヒドロ - , 一塩酸塩、C A S R N 4 2 0 5 - 9 1 - 8) ; シクロチアジド (2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド , 3 - ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - イル - 6 - クロロ - 3 , 4 - ジヒドロ - , 1 , 1 - ジオキシド、C A S R N 2 2 5 9 - 9 6 - 3) ; 塩酸デラプリル (2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド , 3 - ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - イル - 6 - クロロ - 3 , 4 - ジヒドロ - , 1 , 1 - ジオキシド、C A S R N 2 2 5 9 - 9 6 - 3) ; 塩酸ジレパロール (2 H - 1 , 2 , 4 - ベンゾチアジアジン - 7 - スルホンアミド , 3 - ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - イル - 6 - クロロ - 3 , 4 - ジヒドロ - , 1 , 1 - ジオキシド、C A S R N 2 2 5 9 - 9 6 - 3) ; 塩酸デラプリル (グリシン , N - [(1 S) - 1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] - L - アラニル - N - (2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 2 - イル) - , 一塩酸塩、C A S R N 8 3 4 3 5 - 6 7 - 0) ; ドキサゾシンメシレート (ピペラジン , 1 - (4 - アミノ - 6 , 7 - ジメトキシ - 2 - キナゾリニル) - 4 - [(2 , 3 - ジヒドロ - 1 , 4 - ベンゾジオキシン - 2 - イル) カルボニル] - , モノメタンスルホン酸塩、C A S R N 7 7 8 8 3 - 4 3 - 3) ; フォシノプリルナトリウム (L - プロリン , 4 - シクロヘキシル - 1 - [[(R) - [(1 S) - 2 - メチル - 1 - (1 - オキソプロボキシ) プロボクス (p r o p o x)] ; 塩酸モエキシプリル (3 - イソキノリンカルボン酸 , 2 - [(2 S) - 2 - [[(1 S) - 1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 , 7 - ジメトキシ - , 一塩酸塩 , (3 S) - 、C A S R N 8 2 5 8 6 - 5 2 - 5) ; マレイン酸モナテピル (1 - ピペラジンブタンアミド , N - (6 , 1 1 - ジヒドロジベンゾ (b , e) チエピン - 1 1 - イル) - 4 - (4 - フルオロフェニル) - , (±) - , (Z) - 2 - ブテンジオエート (1 : 1) (±) - N - (6 , 1 1 - ジヒドロジベンゾ (b , e) チエピン - 1 1 - イル) - 4 - (p - フルオロフェニル) - 1 - ピペラジンブチルアミドマレエート (p i p e r a d i n e b u t y r a m i d e m a l e a t e) (1 : 1) 、C A S R N 1 3 2 0 4 6 - 0 6 - 1) ; コハク酸メトプロロール (ブタン二酸 , 1 - [4 - (2 - メトキシエチル) フェノキシ] - 3 - [(1 - メチルエチル) アミノ] - 2 - プロパノールとの化合物 (1 : 2) 、C A S R N 9 8 4 1 8 - 4 7 - 4) ; 塩酸グアンファシン (ベンゼンアセトアミド , N - (アミノイミノメチル) - 2 , 6 - ジクロロ - , 一塩酸塩、C A S R N 2 9 1 1 0 - 4 8 - 3) ; メチルドパ (L - チロシン , 3 - ヒドロキシ - - メチル - 、C A S R N 5 5 5 - 3 0 - 6) ; キナプリラート (3 - イソキノリンカルボン酸 , 2 - [(2 S) - 2 - [[(1 S) - 1 - カルボキシ - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - , (3 S) - 、C A S R N 8 2 7 6 8 - 8 5 - 2) ; 塩酸キナプリル (3 - イソキノリンカルボン酸 , 2 - [(2 S) - 2 - [[(1 S) - 1 - (エトキシカルボニル) - 3 - フェニルプロピル] アミノ] - 1 - オキソプロピル] - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - , 一塩酸塩 , (3 S) - 、C A S R N 8 2 5 8 6 - 5 5 - 8) ; プリミドロール (2 , 4 (1 H , 3 H) - ピリミジンジオン , 1 - [2 - [[2 - ヒドロキシ - 3 - (2 - メチルフェノキシ) プロピル] アミノ] エチル] - 5 - メチル - 、C A S R N 6 7 2 2 7 - 5 5 - 8) ; 塩酸プラゾシン (ピペラジン , 1 - (4 - アミノ - 6 , 7 - ジメトキシ - 2 - キナゾリニル) - 4 - (2 - フラニルカルボニル) -

、一塩酸塩、CAS RN 19237-84-4)；塩酸ペランセリン(2, 4(1H, 3H)-キナゾリンジオン, 3-[3-(4-フェニル-1-ピペラジニル)プロピル]-, 一塩酸塩、CAS RN 42877-18-9)；塩酸フェノキシベンズアミン(ベンゼンメタンアミン, N-(2-クロロエチル)-N-(1-メチル-2-フェノキシエチル)-, 塩酸塩、CAS RN 63-92-3)；カンデサルタンシレキセチル(1H-ベンズイミダゾール-7-カルボン酸, 2-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)[1, 1'-ビフェニル]-4-イル]メチル]-, 1-[[(シクロヘキシルオキシ)カルボニル]オキシ]エチルエステル、CAS RN 145040-37-5)；テルミサルタン([1, 1'-ビフェニル]-2-カルボン酸, 4'-[(1, 4'-ジメチル-2'-プロピル[2, 6'-ビ-1H-ベンズイミダゾール]-1'-イル)メチル]-, CAS RN 144701-48-4)；カンデサルタン(1H-ベンズイミダゾール-7-カルボン酸, 2-エトキシ-1-[[2'-(1H-テトラゾール-5-イル)[1, 1'-ビフェニル]-4-イル]メチル]-, CAS RN 139481-59-7)；アムロジピンベシレート(3, 5-ジピリジンカルボン酸, 2-[(2-アミノエトキシ)メチル]-4-(2-クロロフェニル)-1, 4-ジヒドロ-6-メチル-, 3-エチル5-メチルエステル, モノベンゼンスルホン酸塩、CAS RN 111470-99-6)；マレイン酸アムロジピン(3, 5-ピリジンジカルボン酸, 2-[(2-アミノエトキシ)メチル]-4-(2-クロロフェニル)-1, 4-ジヒドロ-6-メチル-, 3-エチル5-メチルエステル, (2Z)-2-ブテンジオエート(1:1)、CAS RN 88150-47-4)；塩酸テラゾシン(ピペラジン, 1-(4-アミノ-6, 7-ジメトキシ-2-キナゾリニル)-4-[(テトラヒドロ-2-フラニル)カルボニル]-, 一塩酸塩、CAS RN 63074-08-8)；塩酸ベパントロール(2-プロパノール, 1-[[2-(3, 4-ジメトキシフェニル)エチル]アミノ]-3-(3-メチルフェノキシ)-, 塩酸塩、CAS RN 42864-78-8)；ラミプリル(シクロペンタ[b]ピロール-2-カルボン酸, 1-[(2S)-2-[[(1S)-1-(エトキシカルボニル)-3-フェニルプロピル]アミノ]-1-オキソプロピル]オクタヒドロ-, (2S, 3aS, 6aS)-, CAS RN 87333-19-5)が挙げられる。

【0181】

スクリーニングアッセイ

本発明は、PCSK9阻害剤もしくはPCSK9/LDL受容体結合の阻害剤もしくはPCSK9/EGF-Aドメイン結合の阻害剤である物質；または総コレステロールレベル、低密度リポタンパク質コレステロールレベル、アポリポタンパク質Bレベル、総コレステロール/高密度リポタンパク質の比率もしくは低密度リポタンパク質/高密度リポタンパク質の比率を低下させる物質；または被験者において高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠動脈性心疾患、血管炎症または黄色腫を治療するまたは予防する物質を同定するための方法であって、PCSK9ポリペプチドまたはその機能的フラグメントおよびLDL受容体EGF-Aドメイン(例えば、配列番号3)を含むポリペプチドと、前記物質の存在に関して試験する試料を接触させ、試料の非存在下よりも試料の存在下の方がPCSK9およびLDL受容体EGF-Aドメインを含むポリペプチドのより少ない結合が認められる場合に前記物質が同定される方法をさらに提供する。そのようなアッセイにおいて同定されるいかなるそのような物質も本発明の一部を形成する。

【0182】

本発明の実施形態は、前記PCSK9およびEGF-Aポリペプチドを、PCSK9およびLDL受容体またはそのEGF-Aドメインの結合を阻害しないことが公知の物質と接触させ、前記結合の阻害剤の存在下よりも多いPCSK9およびLDL受容体またはそのEGF-Aドメインの結合が認められる場合、アッセイは適切に機能していると決定される、陰性対照アッセイをさらに含む。

【0183】

本発明の1つの実施形態は、前記PCSK9およびEGF-Aポリペプチドを、PCSK9およびLDL受容体またはそのEGF-Aドメインの結合を阻害することが公知の物質と接触させ、前記結合の阻害剤の存在下よりも少ないPCSK9およびLDL受容体またはそのEGF-Aドメインの結合が認められる場合、アッセイは適切に機能していると決定される、陽性対照アッセイをさらに含む。

【0184】

物質の結合は、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかを使用して測定できる。

【実施例】

【0185】

以下の情報は本発明をより明瞭に説明するために提供されるものであり、本発明を限定すると解釈されるべきではない。以下で述べるありとあらゆる組成物および方法が本発明の範囲内に含まれる。

【0186】

(実施例1)

LDL受容体の可溶性EGF-Aドメインまたは抗PCSK9抗体はLDLR-PCSK9の相互作用をブロックする。

【0187】

この実施例では、ヒトLDL受容体のEGF-Aドメインをコードする可溶性ペプチドならびに様々な抗PCSK9抗体がPCSK9と受容体の間の相互作用をブロックすることが示される。

【0188】

以下は、PCSK9-LDLR相互作用に対する抗体およびEGF-A阻害実験のためのアルファスクリーン法と材料である。

【0189】

C末端FLAGタグを担持する精製PCSK9を、PCSK9を安定に発現するHEK293細胞から精製した。純度は、銀染色法により、>90%と推定された。抗PCSK9触媒ドメイン抗体は、Cayman Chemical (ウサギ抗マウスPCSK9ポリクローナル抗体、Cayman Chemical; Ann Arbor, MI; カタログ番号10008811)より購入した。このウサギ抗マウス/ヒトPCSK9触媒ドメイン抗体は、以下のアミノ酸配列：VFASIPWNLER (配列番号8)を有するエピトープを認識する。ウサギ抗ヒトPCSK9 C末端ドメイン抗体 (SRSGKRREGERMEA (配列番号4のアミノ酸490~502)に特異的に結合する)およびウサギ抗ヒトPCSK9全長タンパク質抗体も使用した。

【0190】

可溶性EGF-Aドメインペプチドは、標準的な方法を用いて合成によって作製した。緩衝液 (25mM HEPES、0.1M NaCl 0.1% BSA、pH7.5) 2.5μl中の精製C末端FLAG標識PCSK9 2.5ng (2.5ng/2.5μl/ProxiPlate-384 Plus (Perkin-Elmer; Waltham, Mass)のウェル)を、指示されている濃度の抗PCSK9抗体またはEGF-Aドメインペプチドのいずれか2.5μlと共に室温で30分間ブレインキュベートした。次に、精製HIS標識可溶性LDLR (R&D Systems; Minneapolis, MN; カタログ番号2148-LD/CF; 配列番号2) 2.5ngとビオチニル化抗FLAG抗体 (BioM2モノクローナル抗体、Sigma; St. Louis, MO; カタログ番号F9291) 5ngを含む緩衝液5μlおよび前記混合物を室温でさらに30分間インキュベートした。最後に、弱光条件下で、ドナー/アクセプタービーズ混合物 (アルファスクリーンヒスチジン検出キット、Perkin-Elmer; Waltham, Mass.; カタログ番号6760619C) 5μlを添加し、2103 EnVision Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer; Waltham, Mass)を使用してアルファスクリーンシグナルを検出した。ドナー/アクセプタービーズ混合物は、1つの384ウェルプレートについてニッケル

10

20

30

40

50

- アクセプタービーズ 10 μ l および SA - ドナービーズ 10 μ l を緩衝液 2.2 ml に添加することによって暗条件下で調製し、室温で少なくとも 2 時間、暗所にてインキュベートした。

【0191】

これらの実験で生成されたデータを以下の表 1 ~ 3 に示す。

【0192】

【表 1】

表1. 添加したカルシウムの存在下またはカルシウム非存在下での可溶性LDLR-EGF-AドメインによるPCSK9-LDLR相互作用の阻害*。数値は3回の反復実験の平均値である。

log[EGFA] μ M	カルシウムなし (平均計数)	2mMカルシウム (平均計数)
2.30103	8476	4098.333
1.823909	25291	6320.667
1.346787	74404.33	27519
0.869666	132192.7	80542.67
0.392545	182225.3	143204.7
-0.08458	205094.7	202404.3
-0.5617	214258	234140.3
-1.03882	219281	246093.7
-1.51594	221429	240820.7
-1.99306	220878	257794
-2.47018	206909.3	254980.3

* より少ない数の計数は、認められるPCSK9/LDL受容体結合がより少ないことを示す。

【0193】

これらのデータは、PCSK9-LDLR相互作用がカルシウムの存在下または非存在下で可溶性EGF-Aドメインによって阻害されることを示す。カルシウムの非存在下よりもカルシウムの存在下でわずかに高いレベルの阻害が認められた。カルシウムの存在下では、IC50は約3 μ molであり、カルシウムの非存在下ではIC50は約12 μ molであった。

【0194】

【表 2】

表2. 抗PCSK9抗体(触媒ドメイン(Cat)およびC末端ドメイン(CT))によるPCSK9-LDLR相互作用の阻害

log[抗体] μ g/ml	対照IgG	抗PCSK9(Cat)	抗PCSK9(CT)
1.826075	113607.7	6840	37878
1.348954	135127.7	25815	87575.33
0.871832	139744.7	55616	108605.7
0.394711	135829.3	93545.67	119019.3
-0.08241	140328.3	94768	127197
-0.55953	139224.7	128021.3	127770.3
-1.03665	127405.7	124136.7	129751.7
-1.51377	133565.3	126417.7	131044.3
-1.9909	135194.7	129937.3	131160.7
-2.46802	140051.7	131985.3	128822.3

【0195】

これらのデータは、抗PCSK9触媒ドメイン抗体および抗PCSK9 C末端ドメイン抗体がPCSK9とLDL受容体の間の相互作用を阻害することを明らかにする。C末端ドメインに対して惹起した抗PCSK9は、相互作用を阻害するうえで効果がより低かった。非特異的IgG対照は相互作用を阻害するうえで無効であり、比較のために示している。この表の数値は3回の反復実験の平均値である。

【0196】

【表 3】

表3. 抗PCSK9抗体(触媒ドメイン(Cat)および全長タンパク質(全長)によるPCSK9-LDLR相互作用の阻害

log[抗体] $\mu\text{g/ml}$	対照IgG	抗PCSK9(Cat)	抗PCSK9(全長)
1.826075	61920.67	2101.33	1005.33
1.348954	74394.33	12259.00	1435.00
0.871832	79625.67	33347.33	14236.67
0.394711	79552.00	60074.00	52994.00
-0.08241	82751.00	70040.00	75020.33
-0.55953	88110.00	77438.00	85241.00
-1.03665	84421.00	79789.00	82679.00
-1.51377	83144.67	85603.67	87349.33
-1.9909	80747.33	81462.67	80731.67
-2.46802	78151.33	80556.33	83171.00
-2.94514	82101.00	85405.33	80429.00

10

【0197】

これらのデータは、PCSK9-LDLR相互作用が、PCSK9触媒ドメインペプチドに結合する抗体および全長PCSK9タンパク質に対して惹起した抗体によって阻害されることを明らかにする。非特異的IgG対照は相互作用を阻害するうえで無効であり、比較のために示している。これらの数値は3回の反復実験の平均値である。

20

【0198】

(実施例2)

細胞の抗PCSK9抗体処理はLDL取込みの増強を導く。

【0199】

可溶性PCSK9との細胞のインキュベーションは、細胞が培地から低密度リボタンパク質(LDL)を吸収し、清掃する能力の低下を導く。この実施例は、抗PCSK9抗体によるPCSK9の阻害がPCSK9のこの作用に拮抗し、LDLの取込みとクリアランスのレベル上昇を導くことを明らかにする。

【0200】

取込みアッセイを以下のように実施した：384穴のI型コラーゲンを被覆したプレートにおいて10,000細胞/ウエルのHepG2細胞を接種し、一晚増殖させた。その翌日、MEM-1%BSA中のbacu-PCSK9-WTの段階希釈溶液を作製し、固定濃度の抗マウスcatドメインPCSK9ポリクローナル抗体(Cayman Chemical; Ann Arbor, MI; カタログ番号10008811; マウスPCSK9抗原VFAQSI PWNLER(配列番号8)に対して惹起され、ヒトPCSK9と交差反応する)と、または抗ヒトPCSK9ポリクローナル抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ番号AF3888)と、100 $\mu\text{g/ml}$ の最終濃度で、それぞれ混合した。これらの混合物を4で1時間インキュベートし、次に培地をHepG2細胞から吸引して除き、混合物25 μl /ウエルを384穴プレート中のHepG2細胞に添加し、それぞれ6時間および18時間インキュベートした。指示されたインキュベーション時間後、混合物をHepG2細胞から取り出し、PBSで1回洗浄して、次にDil-LDL(Dil標識は、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸塩である)をMEM-1%BSA中10 $\mu\text{g/ml}$ で細胞に添加し、続いて室温で90分間インキュベートした。その後Dil-LDLを除去し、細胞をPrefer固定液(グリオキサール、エタノール、緩衝液; Anatech LTD.; Hayward, CA; カタログ番号414)で20分間固定して、次に細胞をPBSで2回洗浄し、蛍光強度リーダーAnalystを使用して細胞へのDil-LDL取込みを読み取った。これらのアッセイで生成されたデータを以下の表4に示す。

30

40

【0201】

50

【表 4】

表4. PCSK9および抗PCSK9抗体の存在下でのLDL取込み

6時間のインキュベーション

[PCSK9] ug/ml	対照	抗CAT	抗全長
15	20675218	22419420	18606777
5	21873226	25617426	31744993
1.67	23647886	29483684	30994715
0	29824887	28736616	30124921

18時間のインキュベーション

[PCSK9] ug/ml	対照	抗CAT	抗全長
15	20163100	21843043	17106209
5	24214957	25921384	27741479
1.67	27777510	32019111	29054521
0	31232393	32526668	28127286

10

【0202】

表4は、指示されている量の精製組換えPCSK9（対照）で処理した、または触媒ドメインペプチドに対して惹起したポリクローナル抗体（抗CAT）で処理した、もしくは全長タンパク質に対して惹起した抗体（抗全長）の存在下でのPCSK9で処理したヒトHepG2肝細胞によるdil標識LDLの取込みを示す。細胞によるLDLのPCSK9依存性取込みは、混合物中の抗PCSK9抗体の存在に依存する様式で増加した。より大きな数は、PCSK9の存在にもかかわらず、より大きなLDL取込みとLDLRの保存を示した。

20

【0203】

（実施例3）

抗PCSK9抗体の特徴づけ。

【0204】

75B9、77D10、11B5、22D11、1F11/1G11および29C10の抗PCSK9抗体を特徴づけた。抗体は、PCSK9とLDL受容体の間の相互作用を有効に阻害し、ならびにPCSK9を介したLDL受容体分解を阻害することが認められた。インビボで、抗体はPCSK9を阻害し、それによって存在するLDL受容体のレベルを上昇させることが認められた。さらに、抗体は、外因性PCSK9を添加したときに認められるインビボでのコレステロール上昇を中和した。

30

【0205】

抗PCSK9抗体によるPCSK9を介したLDLR分解の阻害。

【0206】

75B9、77D10、11B5、22D11、1F11/1G11および29C10抗体を、細胞内ウエスタンアッセイにおいてHepG2細胞でのPCSK9によるLDL受容体の分解を阻害するそれらの能力に関して評価した。

【0207】

細胞内ウエスタン法は、PCSK9を介したLDLR分解の抗PCSK9抗体による阻害を定量するために実施した。HepG2細胞を384ウェルのI型コラーゲンを被覆したプレートに接種し、抗PCSK9抗体および/またはPCSK9（100nM）で18時間処理した。LDLRおよびアクチンの検出を、IRDye 800CWヤギ抗ウサギ（Li-Cor）およびIRDye 680ヤギ抗マウス（Li-Cor）と共に上記の抗体を使用して、製造者のプロトコール（Li-Cor Biosciences; Lincoln, Nebraska）に従って実施した。アッセイをOdyssey赤外イメージングシステム（Li-Cor）で読み取り、各々のウェル中のLDLRタンパク質についてのシグナルをアクチン含量に対して基準化した。これらの実験からのデータを以下の表5に示す。

40

50

【 0 2 0 8 】

【 表 5 】

表5. 細胞内ウエスタンアッセイにおいて認められた各々の抗PCSK9抗体の
阻害のレベル

処理	認められたLDLR分解の阻害の相対的レベル*
75B9抗PCSK9抗体(IgG2a)	++
77D10抗PCSK9抗体(IgG2b)	++
11B5抗PCSK9抗体(IgG2a)	++
22D11抗PCSK9抗体(IgG1)	+
1F11/1G11抗PCSK9抗体(IgG2a)	+++
29C10抗PCSK9抗体(IgG2a)	+
PCSK9なし対照	100%
+PCSK9/抗体なし対照	0%

*より多い数の+記号は、他の処理に比べてより大きな阻害のレベルを示す。

【 0 2 0 9 】

「 + P C S K 9 / 抗体なし 」対照と比較して、試験した抗体はH e p G 2 細胞において
様々な効力でP C S K 9 を介したL D L 受容体の分解を阻害した。

【 0 2 1 0 】

アルファスクリーン結合アッセイ

P C S K 9 - F L A G と推定上の結合パートナーとの間の相互作用を直接測定することが
できる増幅ルミネセンス近接ホモジニアスアッセイ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) (ALPH
A , Perkin - Elmer ; Waltham , Massachusetts) を使用
して、この相互作用への抗P C S K 9 抗体の作用を測定した。この手法は、「ドナー」ビ
ーズと「アクセプター」ビーズをタンパク質間相互作用によって近接させ、ルミネセンス
上昇を生じさせることを必要とした (Ullmanら、Proc. Nat. Acad. Sci. (1994) 91 : 5426 - 5430) 。基本アッセイでは、P C S K 9 へのL
D L 受容体結合を以下のように測定した：適切な濃度の組換え受容体5 μ l をP C S K 9
- F L A G (1 . 4 μ g / m l) 2 . 5 μ l と共に30分間インキュベートした。ビオチ
ニル化抗F l a g - M 2 抗体 (1 . 8 μ g / m l) 約2 . 5 μ l を添加し、その混合物を
1時間インキュベートした。その後ストレプトアビジンドナービーズとニッケルキレート
アクセプタービーズ (1 : 1 混合物) 5 μ l を添加し、その検定物を一晩インキュベート
した。アルファスクリーンシグナル (計数 / 秒) を、EnVisionマイクロプレート
リーダー (Perkin - Elmer) を用いて分析した。すべてのデータポイントを3
回ずつ測定した。アッセイは、25 mM HEPES、0 . 1 M NaCl、pH 7 . 4
、0 . 1 % BSAを含む緩衝液中23℃で実施した。阻害アッセイは、アッセイ容量とタ
ンパク質濃度にわずかな調整を加えて同様に測定した。簡単に述べると、1 . 25 μ g /
m l のP C S K 9 - F l a g および1 . 25 μ g / m l のHis標識L D L 受容体5 μ l
を適切な濃度の抗体2 . 5 μ l と共に30分間インキュベートし、その後抗F l a g - B
i o M 2 (1 . 8 μ g / m l) 2 . 5 μ l を添加して、1時間インキュベートした。これ
らのアッセイからのデータを以下の表6に示す。

【 0 2 1 1 】

10

20

30

40

【表 6】

表6. PCSK9/LDLR相互作用に対する抗PCSK9抗体を介した阻害のレベル

処理	IC ₅₀ (nM)	450nMの抗体での阻害%
75B9抗PCSK9抗体(IgG2a)	0.5	100
77D10抗PCSK9抗体(IgG2b)	38	62
11B5抗PCSK9抗体(IgG2a)	0.4	100
22D11抗PCSK9抗体(IgG1)	ND	ND
1F11/1G11抗PCSK9抗体(IgG2a)	0.049*	88*
29C10抗PCSK9抗体(IgG2a)	13	71

* 2回の測定の平均値。

【0212】

試験した抗体は様々な効力でPCSK9/LDL受容体相互作用を阻害した(IC₅₀および抗体を添加せずに実施したアッセイと比較した阻害%として表している)。

【0213】

LDLR分解のインビボ阻害および血漿コレステロールへの抗PCSK9の作用

マウスにおいてLDL受容体分解を阻害する抗PCSK9抗体(1F11/1G11)の能力を、コレステロールレベルを調節する抗体の能力と共にこれらのアッセイにおいて評価した。

【0214】

インビボ手順：

0時点：雄性C57BL/6jマウスに抗ヒトPCSK9抗体、1F11/1G11 400 μgを腹腔内注射した。

【0215】

2時間目の時点：次にヒトPCSK9タンパク質10 μgをマウスに静脈内注射した。

【0216】

4時間目の時点：マウスを犠死させ、血漿および肝臓試料を採取した。

【0217】

分析：

個々のマウスの血漿リポタンパク質プロフィール(血漿0.1 mL)を、Pharmacia Superose 6カラムによる高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)によって測定した。FPLC画分のコレステロールレベルを、Wakoコレステロール酵素比色法を用いて測定した。

【0218】

肝LDL受容体のタンパク質レベルをウエスタンブロット法によって測定した。各々の肝ホモジネート40 μgをInvitrogen 4~12% NuPAGEゲル上で分離し、PVDF膜に移して、ヤギ抗マウスLDL受容体抗体と共にインキュベートした(ウサギ抗GAPDH抗体を等しい負荷についての対照として使用した)。次に膜を対応するHRP結合抗体と共にインキュベートし、高性能化学発光フィルムで可視化を行った。ImageQuant 5.2ソフトウェアを使用してバンドの強さを定量した。

【0219】

LDL受容体レベルをLDL受容体のバンド強度のGAPDHのバンド強度に対する比率として任意単位(Arbitrary Units)(AU)で表した。LDL受容体測定の結果を以下の表7および8に示す。2つの別々の分析のデータを提示する。

【0220】

10

20

30

40

【表 7】

表7. LDLRパネル 対 GAPDHパネルの両方の最も明るい露光 (Lightest exposure)

マウス	LDLR	GAPDH	LDLR/GAPDH	平均	変化%
107	13714	50469	0.272	0.235 (抗体と PCSK9)	-48.0
108	13766	49467	0.278		
109	12508	47790	0.262		
110	5977	46744	0.128		
111	1724	46456	0.037	0.081 (食塩水と PCSK9)	-82.0
112	912	44130	0.021		
113	2631	51367	0.051		
114	10217	47345	0.216		
115	23237	48860	0.476	0.452 (食塩水のみ)	対照
116	18589	47694	0.390		
117	16577	47554	0.349		
118	27116	45755	0.593		

【 0 2 2 1 】

【表 8】

表8. より暗い露光のLDLRパネル対最も明るい露光のGAPDHパネル

マウス	LDLR	GAPDH	LDLR/GAPDH	平均	変化%
107	19883	45242	0.439	0.377 (抗体と PCSK9)	-35.2
108	18057	45634	0.396		
109	18642	43767	0.426		
110	10669	42898	0.249		
111	2817	43967	0.064	0.123 (食塩水と PCSK9)	-78.8
112	1204	43206	0.028		
113	4252	47846	0.089		
114	13848	44288	0.313		
115	27675	44510	0.622	0.582 (食塩水のみ)	対照
116	23016	45090	0.510		
117	19837	44526	0.446		
118	32897	43792	0.751		

【 0 2 2 2 】

1 F 1 1 / 1 G 1 1 抗体は、試験したマウスにおいて P C S K 9 を介した L D L 受容体分解のレベルを低下させた。

【 0 2 2 3 】

【表 9】

表9. 指示されている条件下で試験したマウスにおける血漿コレステロールレベル

処置	血漿総コレステロールレベル(mg/dl)
抗PCSK9とPCSK9	72.05
食塩水とPCSK9	83.28
食塩水のみ	74.88

【0224】

10

1F11/1G11抗体は、試験したマウスにおいてPCSK9を介したコレステロール上昇のレベルを低下させた。

【0225】

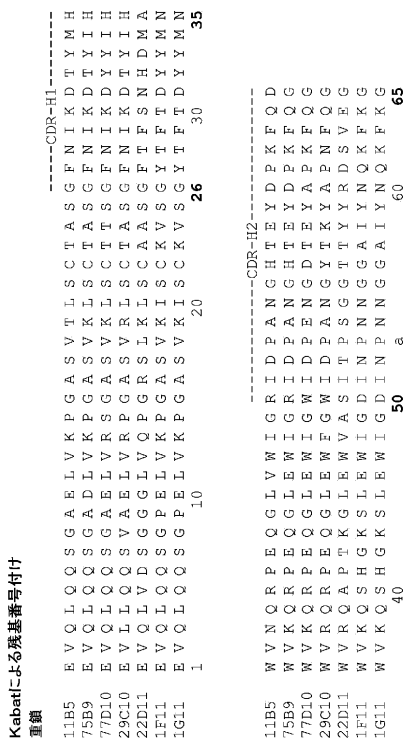
本発明は、本明細書で述べる特定実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際に、本明細書で述べるものに加えて本発明の様々な改変が前記説明から当業者に明らかになる。そのような改変は付属の特許請求の範囲に含まれることが意図されている。

【0226】

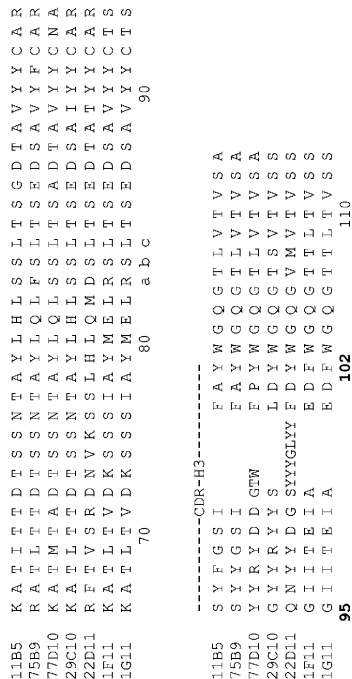
特許、特許出願、刊行物、製品説明書およびプロトコールが本出願全体を通じて引用され、それらの開示は、すべての目的に関してそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



【図 1 - 3】

軽鎖	11B5	Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S	1	24	20	24	56
	75B9	Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S	1	24	20	24	56
	77D10	D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G	1	24	20	24	56
	29C10	D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G	1	24	20	24	56
	22D11	D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G	1	24	20	24	56
	1F11	D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G	1	24	20	24	56
	1G11	D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G	1	24	20	24	56
	11B5	V S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	75B9	V S Y L Y W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	77D10	H S Y L A W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	29C10	S N Y L N W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	22D11	N T Y L H W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	1F11	G T N V V W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56
	1G11	G T N V V W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P	30	34	40	50	56

【図 1 - 4】

11B5	A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C	60	70	80	90	100
75B9	A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C	60	70	80	90	100
77D10	S R F S V S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C	60	70	80	90	100
29C10	S R F S V S G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C	60	70	80	90	100
22D11	D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C	60	70	80	90	100
1F11	D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C	60	70	80	90	100
1G11	D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C	60	70	80	90	100
11B5	H Q Y S Y P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
75B9	H Q Y S Y P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
77D10	H Q Y S Y P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
29C10	H Q Y S Y P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
22D11	L Q S T H F P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
1F11	L Q S T H F P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		
1G11	L Q S T H F P P T F G G G T K L E I K R A	89	97	100		

【配列表】

2011501952000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成22年6月7日(2010.6.7)

【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】

- (i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む 1 1 B 5 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む 7 5 B 9 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (i i i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む 7 7 D 1 0 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (i v) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む 2 9 C 1 0 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (v) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む 2 2 D 1 1 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (v i) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む 1 F 1 1 / 1 G 1 1 重鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ;
- (v i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む 1 1 B 5 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 ;

(v i i i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む 75B9 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;

(i x) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む 77D10 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;

(x) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む 29C10 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ;

(x i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む 22D11 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 ; および

(x i i) 配列番号 54 のアミノ酸配列を含む 1F11 / 1G11 軽鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - L1、CDR - L2 および CDR - L3 から成る群より選択されるメンバーを含む単離 ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 50 のアミノ酸配列を含む 1F11 / 1G11 重鎖免疫グロブリンの可変領域の CDR - H1、CDR - H2 および CDR - H3 を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド

。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドを含む、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 3 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v 二量体、d s f v、(d s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性 d s ダイアボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項 3 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

免疫グロブリンの定常領域 ポリペプチド に連結されている、請求項 1 に記載の ポリペプチド。

【請求項 7】

前記定常領域 ポリペプチド が 軽鎖、 1 重鎖、 2 重鎖、 3 重鎖または 4 重鎖である、請求項 6 に記載の ポリペプチド。

【請求項 8】

(i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y M H (配列番号 11) を含む HCDR1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (配列番号 12) を含む HCDR2 およびアミノ酸配列：S Y F G S I F A Y (配列番号 13) を含む HCDR3 ;

(i i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号 19) を含む HCDR1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号 20) を含む HCDR2 およびアミノ酸配列：S Y Y G S I F A Y (配列番号 21) を含む HCDR3 ;

(i i i) アミノ酸配列：G F N I K D Y Y I H (配列番号 27) を含む HCDR1、アミノ酸配列：W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号 28) を含む HCDR2 およびアミノ酸配列：Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号 29) を含む HCDR3 ;

(i v) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号 35) を含む HCDR1、アミノ酸配列：W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号 36) を含む HCDR2 およびアミノ酸配列：G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号 37) を含む HCDR3 ;

(v) アミノ酸配列：G F T F S N H D M A (配列番号 43) を含

む H C D R 1、アミノ酸配列：S I T P S G G T T Y Y R D
S V E G (配列番号 44) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：Q N Y Y
D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (配列番号 45) を含む H C D
R 3 ;

(v i) アミノ酸配列：G Y T F T D Y Y M N (配列番号 51) を
含む H C D R 1、アミノ酸配列：D I N P N N G G A I Y N Q
K F K G (配列番号 52) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：G I I
T E I A E D F (配列番号 53) を含む H C D R 3 ;

(v i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L Y (配列番号 15)
を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R S S H R A S (配列番号：16) を含
む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y Q S Y P P T (配列番号 17
) を含む L C D R 3 ;

(v i i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L F (配列番号 23)
を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R T S Y L A S (配列番号 24) を含
む L C D R 2 およびアミノ酸配列：H Q Y H T Y P P T (配列番号 25
) を含む L C D R 3 ;

(i x) アミノ酸配列：R A S G N I H S Y L A (配列番号 31)
を含む L C D R 1、アミノ酸配列：N A K T L P D (配列番号 32) を含
む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q H F W N T P W T (配列番号 33
) を含む L C D R 3 ;

(x) アミノ酸配列：R A S Q D I S N Y L N (配列番号 39)
を含む L C D R 1、アミノ酸配列：Y S S R L H S (配列番号 40) を含む
L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q G K T L P L T (配列番号 41)
を含む L C D R 3 ;

(x i) アミノ酸配列：R S S Q S L V Y S D G N T Y
L H (配列番号 47) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R V S N R F S
(配列番号 48) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：L Q S T H F P
P T (配列番号 49) を含む L C D R 3 ; および

(x i i) アミノ酸配列：K A S Q N V G T N V V (配列番号 5
5) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：S A S Y R Y S (配列番号 56) を
含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q Y K T Y P Y T (配列番号 5
7) を含む L C D R 3

から成る群より選択されるメンバーを含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 9】

アミノ酸配列：G Y T F T D Y Y M N (配列番号 51) を含む H C D
R 1、アミノ酸配列：D I N P N N G G A I Y N Q K F
K G (配列番号 52) を含む H C D R 2 およびアミノ酸配列：G I I T E I
A E D F (配列番号 53) を含む H C D R 3 を含む、請求項 8 に記載のポリペ
チド。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のポリペプチドを含む、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

ヒト化抗体である、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v 二量体、d s f v、(d
s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性 d s ダイアボディ、F v、F a b、F a

b'、 $F(ab')_2$ 、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項14】

免疫グロブリンの定常領域ポリペプチドに連結されている、請求項8に記載のポリペプチド。

【請求項15】

前記定常領域ポリペプチドが 軽鎖、 1重鎖、 2重鎖、 3重鎖または 4重鎖である、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項16】

(a) アミノ酸配列：

【化36】

```
EVQLQQSGAELVKPGASVTLSCITASGFNIKDTY
MHWVNQRPEQGLVWIGRIDPANGHTEYDPKFQD
KATITTDTSSENTAYLHLSLTSGLDTAVYYCARS
YFGSIFAYWGQGTLVTVSA
```

(配列番号10)

i

(b) アミノ酸配列：

【化37】

```
QIVLTQSPAIMSA SPGEKVTISCSASSSVSYLY
WYQQKPGSSPKPWIFRSSHRA SGVPARFSGSGS
GTSYSLTIS SM EAEDAATYYCHQYQSYPTTFGG
GTKLEIKRA
```

(配列番号14)

i

(c) アミノ酸配列：

【化38】

```
EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKDTY
IHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGHTEYDPKFQG
RATLTDTDTSSENTAYLQLFSLTSEDSAVYFCARS
YYGSI FAYWGQGTLVTVSA
```

(配列番号18)

i

(d) アミノ酸配列：

【化39】

```
QIVLTQSPAIMSA SPGEKVTISCSASSSVSYLF
WYQQKPGSSPKPWIFRTSYLASGVPARFSGSGS
GTSFSLTIS SM EAEDAATYYCHQYHTYPTTFGG
GTKLEIKRA
```

(配列番号22)

i

(e) アミノ酸配列：

【化40】

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTTSGFNIKDY
IHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQG
KATMTADTSSNTAYLQLSSSLTSA DTAVYYCNA
YYRYDDGTWFPYWGQGTLVTVSA

(配列番号26)

i

(f) アミノ酸配列:

【化41】

DIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHSYL
AWYQQKQKSPQFLVDNAKTL PDGVPSRFSVSG
SGTQYSLKINSLSLQPEDDFGTYYCQHFWNTPWTFG
GGTKLEIKRA

(配列番号30)

i

(g) アミノ酸配列:

【化42】

EVLLQQSVAELVRPGASVRLSCTASGFNIKDTY
IHWVRQRPEQGLEWFGWIDPANGYTKYAPNFFQG
KATLT TDTS SNTAYLHLSSSLTSEDSAIYYCARG
YYRYYS LDYWGQGTSVTVSS

(配列番号34)

i

(h) アミノ酸配列:

【化43】

DIQMTQTSSLSASSLGDRVTISCRASQDISNYL
NWKYQQKPDGTVKLLIYYSSRLHSGVPSRFSGRG
SGTDYSLTISTLEQEDIATYFCQQGKTLPLTFG
AGTKLELKRA

(配列番号38)

i

(i) アミノ酸配列:

【化44】

EVQLVDSGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNHD
MAWVRQAPTKELEWVASITPSGGTTYRDSVEG
RFTVSRDNLVKSSSLHLQMDSLTSEDTATYYCARQ
NYYDGSYYYGLEYFDYWGQGVMTVTVSS

(配列番号42)

i

(j) アミノ酸配列:

【化 4 5】

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
 G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
 F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
 P P T F G S G T K L E I K R A

(配列番号46)

;

(k) アミノ酸配列 :

【化 4 6】

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
 M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
 K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
 I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S

(配列番号50)

; および

(l) アミノ酸配列 :

【化 4 7】

D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S V T C K A S Q N V G T N V
 V W Y Q Q K P G Q S P K A L I H S A S Y R Y S G V P D R F K G S G
 S G T D F T L T I T N V Q S E D L A G F F C Q Q Y K T Y P Y T F G
 G G T Q L E I K R A

(配列番号54)

から成る群より選択されるメンバーを含む、請求項 1 に記載の ポリペプチド。

【請求項 1 7】

アミノ酸配列 :

【化 4 6】

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K V S G Y T F T D Y Y
 M N W V K Q S H G K S L E W I G D I N P N N G G A I Y N Q K F K G
 K A T L T V D K S S S I A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C T S G
 I I T E I A E D F W G Q G T T L T V S S

(配列番号50)

を含む、請求項 1 6 に記載の ポリペプチド。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に記載の ポリペプチドを含む、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 9】

ヒト化抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2 0】

モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 21】

ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、 $s c f v$ 、 $s c f v$ 二量体、 $d s f v$ 、 $(d s f v)_2$ 、 $d s F v - d s f v'$ 、二重特異性 $d s$ ダイアボディ、 $F v$ 、 $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ 、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、請求項 18 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 22】

免疫グロブリンの定常領域 ポリペプチド に連結されている、請求項 16 に記載の ポリペプチド。

【請求項 23】

前記定常領域 ポリペプチド が 軽鎖、 1 重鎖、 2 重鎖、 3 重鎖または 4 重鎖である、請求項 22 に記載の ポリペプチド。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の ポリペプチド をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の ポリヌクレオチド を含む単離ベクター。

【請求項 26】

請求項 24 に記載の ポリヌクレオチド を含む単離宿主細胞。

【請求項 27】

ヒト LDL 受容体のおよそアミノ酸位置 314 から始まり、およそアミノ酸位置 355 で終わるアミノ酸から成る、ヒト LDL 受容体フラグメントに対して約 90% またはそれより高いアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、場合により、

(i) PCSK9 に結合する；

(ii) PCSK9 への結合に関して LDL 受容体または抗 PCSK9 抗体もしくはその抗原結合フラグメントと競合する；

(iii) 動物に投与した場合、総コレステロールレベルを低下させる；

(iv) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質コレステロールレベルを低下させる；

(v) 動物に投与した場合、アポリタンパク質 B レベルを低下させる；

(vi) 動物に投与した場合、総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる；および

(vii) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる

ことから成る群より選択される 1 つまたはそれより多くの性質を含む単離ポリペプチド、または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

【請求項 28】

配列番号 3 のアミノ酸配列から成る請求項 27 に記載の ポリペプチド または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

【請求項 29】

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；または

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるための 組成物 であって、PCSK9 に特異的に結合する、PCSK9 アンタゴニストである EGF - A ポリペプチドまたは請求項 3 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を 含み、該組成物は、場合により、さらなる化学療法剤と組み合わせて 投与され、該抗体もしくはフラグメントまたは EGF - A ポリペプチドは、PCSK9 と LDL 受容体との間の結合を阻害する、組成物。

【請求項 30】

高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症または黄色腫を治療するまたは予防するための組成物であって、P C S K 9 に特異的に結合する、E G F - A ポリペプチドまたは請求項 3 に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を含み、該組成物は、場合により、さらなる化学療法剤と組み合わせて投与され、該抗体もしくはフラグメントまたは E G F - A ポリペプチドは、P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、組成物。

【請求項 3 1】

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリポタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；もしくは

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるため；または

高コレステロール血症；

高脂血症；

高トリグリセリド血症；

シトステロール血症；

アテローム性動脈硬化症；

動脈硬化症；

冠状動脈性心疾患；

血管炎症；もしくは

黄色腫

を治療するための組成物であって、請求項 3 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効量を含む組成物。

【請求項 3 2】

該組成物は、さらなる化学療法剤と組み合わせて投与するものとされていることを特徴とする、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または H M G - C o A レダクターゼ阻害薬である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセブトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、ブラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、ブラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、ブレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、ブレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、

ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニトレート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスプレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレパロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテビル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸ブラゾシン、塩酸ベランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記さらなる化学療法剤がエゼチミブおよび、場合により、シンバスタチンである、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドを作製するための方法であって、該ポリペプチドをコードし、その発現を指令するポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する工程；および該宿主細胞を該ポリペプチドが発現される条件下で増殖させる工程；ならびに場合により、該ポリペプチドを単離する工程を含む方法。

【請求項 3 8】

前記宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巢細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記宿主細胞が細菌細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記宿主細胞が真菌細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記宿主細胞が *P i c h i a* 細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記宿主細胞が *P i c h i a p a s t o r i s* 細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 8】

本発明はまた、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを作製するための方法であって、前記重鎖および / または軽鎖免疫グロブリンをコードし、その発現を指

令する1つまたはそれより多くのポリヌクレオチドを1つまたはそれより多くの宿主細胞に導入すること；ならびに前記宿主細胞を、前記重鎖および軽鎖免疫グロブリンが発現される条件下で増殖させることを含む方法を提供し、その方法では、例えば、前記軽鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドと、前記重鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドとは、別々の宿主細胞中に存在する。

本発明の好ましい実施形態によれば、例えば以下の単離抗体またはその抗原結合フラグメントなどが提供される：

(項目1) (i) 配列番号10のアミノ酸配列を含む11B5重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(ii) 配列番号18のアミノ酸配列を含む75B9重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(iii) 配列番号26のアミノ酸配列を含む77D10重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(iv) 配列番号34のアミノ酸配列を含む29C10重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(v) 配列番号42のアミノ酸配列を含む22D11重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(vi) 配列番号50のアミノ酸配列を含む1F11/1G11重鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3；

(vii) 配列番号14のアミノ酸配列を含む11B5軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3；

(viii) 配列番号22のアミノ酸配列を含む75B9軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3；

(ix) 配列番号30のアミノ酸配列を含む77D10軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3；

(x) 配列番号38のアミノ酸配列を含む29C10軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3；

(xi) 配列番号46のアミノ酸配列を含む22D11軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3；および

(xii) 配列番号54のアミノ酸配列を含む1F11/1G11軽鎖免疫グロブリンの可変領域のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3

から成る群より選択される1つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目2) さらに化学療法剤と組み合わせた項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。

(項目3) 前記さらに化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬またはHMG-CoAレダクターゼ阻害薬である、項目2に記載の組成物。

(項目4) 前記さらに化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルプレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール(nebi valol)、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール2-プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロールまたはトラモロールである、項目2に記載の組成物。

(項目5) さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、項目4に記載の組成物。

(項目6) ヒト化抗体である、項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目7) モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目8) ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v二量体、d s f v、(d s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性d s ダイアボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目9) 免疫グロブリンの定常領域に連結されている、項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目10) 前記定常領域が 軽鎖、 1重鎖、 2重鎖、 3重鎖または 4重鎖である、項目9に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目11) 医薬的に許容される担体と組み合わせて項目1に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

(項目12) (i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y M H (配列番号11)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q D (配列番号12)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：S Y F G S I F A Y (配列番号13)を含むH C D R 3；

(i i) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号19)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：R I D P A N G H T E Y D P K F Q G (配列番号20)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：S Y Y G S I F A Y (配列番号21)を含むH C D R 3；

(i i i) アミノ酸配列：G F N I K D Y Y I H (配列番号27)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：W I D P E N G D T E Y A P K F Q G (配列番号28)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：Y Y R Y D D G T W F P Y (配列番号29)を含むH C D R 3；

(i v) アミノ酸配列：G F N I K D T Y I H (配列番号35)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G (配列番号36)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：G Y Y R Y Y S L D Y (配列番号37)を含むH C D R 3；

(v) アミノ酸配列：G F T F S N H D M A (配列番号43)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：S I T P S G G T T Y Y R D S V E G (配列番号44)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：Q N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y (配列番号45)を含むH C D R 3；

(v i) アミノ酸配列：G Y T F T D Y Y M N (配列番号51)を含むH C D R 1、アミノ酸配列：D I N P N N G G A I Y N Q K F K G (配列番号52)を含むH C D R 2およびアミノ酸配列：G I I T E I A E D F (配列番号53)を含むH C D R 3；

(v i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L Y (配列番号15)を含むL C D R 1、アミノ酸配列：R S S H R A S (配列番号：16)を含むL C D R 2およびアミノ酸配列：H Q Y Q S Y P P T (配列番号17)を含むL C D R 3；

(v i i i) アミノ酸配列：S A S S S V S Y L F (配列番号23)を含むL C D R 1、アミノ酸配列：R T S Y L A S (配列番号24)を含むL C D R 2およびアミノ酸配列：H Q Y H T Y P P T (配列番号25)を含むL C D R 3；

(i x) アミノ酸配列：R A S G N I H S Y L A (配列番号31)

を含む L C D R 1、アミノ酸配列：N A K T L P D (配列番号 32) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q H F W N T P W T (配列番号 33) を含む L C D R 3；

(x) アミノ酸配列：R A S Q D I S N Y L N (配列番号 39) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：Y S S R L H S (配列番号 40) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q G K T L P L T (配列番号 41) を含む L C D R 3；

(x i) アミノ酸配列：R S S Q S L V Y S D G N T Y L H (配列番号 47) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：R V S N R F S (配列番号 48) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：L Q S T H F P P T (配列番号 49) を含む L C D R 3；および

(x i i) アミノ酸配列：K A S Q N V G T N V V (配列番号 55) を含む L C D R 1、アミノ酸配列：S A S Y R Y S (配列番号 56) を含む L C D R 2 およびアミノ酸配列：Q Q Y K T Y P Y T (配列番号 57) を含む L C D R 3

から成る群より選択される 1 つまたはそれより多くのメンバーを含む単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 13) さらに化学療法剤と組み合わせて項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。

(項目 14) 前記さらに化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または H M G - C o A レダクターゼ阻害薬である、項目 13 に記載の組成物。

(項目 15) さらに化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセブトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキシソロール、塩酸レボブノロール、ナドロロール、プラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、プラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサソ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ベルヘキシリン、オクスブレノロール、ペン

トリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレパロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フオシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテビル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベパントロールまたはラミプリルである、項目 13 に記載の組成物。

(項目 16) 前記さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、項目 15 に記載の組成物。

(項目 17) ヒト化抗体である、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 18) ヒト化抗体である、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 19) モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 20) ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v 二量体、d s f v、(d s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性 d s ダイアボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 21) 免疫グロブリンの定常領域に連結されている、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 22) 前記定常領域が 軽鎖、1 重鎖、2 重鎖、3 重鎖または 4 重鎖である、項目 21 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(項目 23) 医薬的に許容される担体と組み合わせて項目 12 に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

(項目 24) (a) アミノ酸配列：

【化 36】

```

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V T L S C T A S G F N I K D T Y
M H W V N Q R P E Q G L V W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q D
K A T I T T D T S S N T A Y L H L S S L T S G D T A V Y Y C A R S
Y F G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

```

(配列番号10)

を含む免疫グロブリン重鎖；

(b) アミノ酸配列：

【化 37】

```

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L Y
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R S S H R A S G V P A R F S G S G S
G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y Q S Y P P T F G G
G T K L E I K R A

```

(配列番号14)

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(c) アミノ酸配列：

【化38】

E V Q L Q Q S G A D L V K P G A S V K L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G H T E Y D P K F Q G
R A T L T T D T S S N T A Y L Q L F S L T S E D S A V Y F C A R S
Y Y G S I F A Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号18)

を含む免疫グロブリン重鎖；

(d) アミノ酸配列：

【化39】

Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C S A S S S V S Y L F
W Y Q Q K P G S S P K P W I F R T S Y L A S G V P A R F S G S G S
G T S F S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H T Y P P T F G G
G T K L E I K R A

(配列番号22)

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(e) アミノ酸配列：

【化40】

E V Q L Q Q S G A E L V R S G A S V K L S C T T S G F N I K D Y Y
I H W V K Q R P E Q G L E W I G W I D P E N G D T E Y A P K F Q G
K A T M T A D T S S N T A Y L Q L S S L T S A D T A V Y Y C N A
Y Y R Y D D G T W F P Y W G Q G T L V T V S A

(配列番号26)

を含む免疫グロブリン重鎖；

(f) アミノ酸配列：

【化41】

D I Q L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S G N I H S Y L
A W Y Q Q K Q G K S P Q F L V D N A K T L P D G V P S R F S V S G
S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G T Y Y C Q H F W N T P W T F G
G G T K L E I K R A

(配列番号30)

を含む免疫グロブリン軽鎖；

(g) アミノ酸配列：

【化 4 2】

E V L L Q Q S V A E L V R P G A S V R L S C T A S G F N I K D T Y
I H W V R Q R P E Q G L E W F G W I D P A N G Y T K Y A P N F Q G
K A T L T T D T S S N T A Y L H L S S L T S E D S A I Y Y C A R G
Y Y R Y Y S L D Y W G Q G T S V T V S S

(配列番号34)

を含む免疫グロブリン重鎖；(h) アミノ酸配列：

【化 4 3】

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S N Y L
N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y S S R L H S G V P S R F S G R G
S G T D Y S L T I S T L E Q E D I A T Y F C Q Q G K T L P L T F G
A G T K L E L K R A

(配列番号38)

を含む免疫グロブリン軽鎖；(i) アミノ酸配列：

【化 4 4】

E V Q L V D S G G G L V Q P G R S L K L S C A A S G F T F S N H D
M A W V R Q A P T K G L E W V A S I T P S G G T T Y Y R D S V E G
R F T V S R D N V K S S L H L Q M D S L T S E D T A T Y Y C A R Q
N Y Y D G S Y Y Y G L Y Y F D Y W G Q G V M V T V S S

(配列番号42)

を含む免疫グロブリン重鎖；(j) アミノ酸配列：

【化 4 5】

D V L M T Q T P V S L P V S L G G Q V S I S C R S S Q S L V Y S D
G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R F S G V P D R
F S G S G S G T D F T L K I S R V E P E D L G L Y Y C L Q S T H F
P P T F G S G T K L E I K R A

(配列番号46)

を含む免疫グロブリン軽鎖；(k) アミノ酸配列：

【化 4 6】

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKVSGYTFTDYY
 MNWVKQSHGKSLIEWIGDINPNNGGAIYNQKFKG
 KATLTVDKSSSIAYMELRSLTSEDSAVYYCTSG
 ITEIAEDFWGQGTTLTVSS

(配列番号50)

を含む免疫グロブリン重鎖；および(1) アミノ酸配列：

【化 4 7】

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCRASQNVGTNV
 VWYQQKPGQSPKALIHSAASYRYSQVPRDFKGS
 SGTDFTLTITNVQSEDLAAGFFCQQYKTYPTFG
 GGTQLEIKRA

(配列番号54)

を含む免疫グロブリン軽鎖から成る群より選択される 1 つまたはそれより多くのメンバーを含む、項目 1 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント。(項目 2 5) さらなる化学療法剤と組み合わせる項目 2 4 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含有する組成物。(項目 2 6) 前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または HMG - CoA レダクターゼ阻害薬である、項目 2 5 に記載の組成物。

(項目 2 7) 前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、ブラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、ブラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサン、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリベルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレチンアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル

、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスプレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラブリル、塩酸ジレパロール、塩酸デラブリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテビル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナブリラート、塩酸キナブリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミブリルである、項目 25 に記載の組成物。

（項目 28） 前記さらなる化学療法剤が、場合によりシンバスタチンと組み合わせたエゼチミブである、項目 27 に記載の組成物。

（項目 29） ヒト化抗体である、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 30） ヒト化抗体である、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 31） モノクローナル抗体、標識抗体、二価抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体または二重特異性抗体である抗体である、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 32） ラクダ化単ドメイン抗体、ダイアボディ、s c f v、s c f v 二量体、d s f v、(d s f v)₂、d s F v - d s f v'、二重特異性 d s ダイアボディ、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、またはドメイン抗体である抗原結合フラグメントである、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 33） 免疫グロブリンの定常領域に連結されている、項目 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 34） 前記定常領域が 軽鎖、1 重鎖、2 重鎖、3 重鎖または 4 重鎖である、項目 33 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

（項目 35） 医薬的に許容される担体と組み合わせて項目 24 に記載の抗体またはフラグメントを含有する医薬組成物。

（項目 36） P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、P C S K 9 に特異的に結合する単離抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは単離 E G F - A ポリペプチド、および医薬的に許容される担体を含有する医薬組成物。

（項目 37） 前記抗体が P C S K 9 触媒ドメインまたは L D L 受容体 E G F - A ドメインと相互作用する P C S K 9 のドメインに特異的に結合する、項目 36 に記載の医薬組成物。

（項目 38） ヒト L D L 受容体のおよそアミノ酸位置 314 から始まり、およそアミノ酸位置 355 で終わるアミノ酸から成る、ヒト L D L 受容体フラグメントに対して約 90 % またはそれより高いアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、場合により、

（i）P C S K 9 に結合する；

（i i）P C S K 9 への結合に関して L D L 受容体または抗 P C S K 9 抗体もしくはその抗原結合フラグメントと競合する；

(i i i) 動物に投与した場合、総コレステロールレベルを低下させる；

(i v) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質コレステロールレベルを低下させる；

(v) 動物に投与した場合、アポリポタンパク質 B レベルを低下させる；

(v i) 動物に投与した場合、総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる；および

(v i i) 動物に投与した場合、低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率を低下させる

ことから成る群より選択される 1 つまたはそれより多くの性質を含む単離ポリペプチド、または医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

(項目 3 9) 配列番号 3 のアミノ酸配列から成る項目 3 8 に記載のポリペプチドまたは医薬的に許容される担体を含有するその医薬組成物。

(項目 4 0) 被験者において、

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリポタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；または

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるための方法であって、P C S K 9 に特異的に結合する、P C S K 9 アンタゴニストである E G F - A ポリペプチドまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤と組み合わせて前記被験者に投与する工程を含み、該抗体もしくはフラグメントまたは E G F - A ポリペプチドは、P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、方法。

(項目 4 1) 前記抗体もしくはフラグメントが、P C S K 9 触媒ドメインまたは L D L 受容体 E G F - A ドメインと相互作用する P C S K 9 のドメインに特異的に結合する、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2) 被験者において高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症、シトステロール血症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、冠状動脈性心疾患、血管炎症または黄色腫を治療するまたは予防するための方法であって、P C S K 9 に特異的に結合する、E G F - A ポリペプチドまたは抗体もしくはその抗原結合フラグメントの治療有効量を、場合によりさらなる化学療法剤と組み合わせて前記被験者に投与する工程を含み、該抗体もしくはフラグメントまたは E G F - A ポリペプチドは、P C S K 9 と L D L 受容体との間の結合を阻害する、方法。

(項目 4 3) 前記抗体が、P C S K 9 触媒ドメインまたは L D L 受容体 E G F - A ドメインと相互作用する P C S K 9 のドメインに特異的に結合する、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4) 被験者において、

総コレステロールレベル；

低密度リポタンパク質コレステロールレベル；

アポリポタンパク質 B レベル；

総コレステロール / 高密度リポタンパク質の比率；もしくは

低密度リポタンパク質 / 高密度リポタンパク質の比率

を低下させるため；または

高コレステロール血症；

高脂血症；

高トリグリセリド血症；

シトステロール血症；

アテローム性動脈硬化症；

動脈硬化症；

冠状動脈性心疾患；

血管炎症；もしくは

黄色腫

を治療するための方法であって、項目 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効量を前記被験者に投与する工程を含む方法。

(項目 4 5) 項目 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをさらなる化学療法剤と組み合わせて投与する、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6) 前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬または H M G - C o A レダクターゼ阻害薬である、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7) 前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、ブラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール 2 - プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、ブラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサ、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリベルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル 1 H - インドール - 2 - カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸ブトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニテート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ベルヘキシリン、オクスブレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリウムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレバロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテビル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸ブラゾシン、塩酸ベランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8) 前記さらなる化学療法剤がエゼチミブおよび、場合により、シンバスタチンである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9) 前記抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、項目 4 4

に記載の方法。

(項目50) 被験者において、
総コレステロールレベル；
低密度リポタンパク質コレステロールレベル；
アポリポタンパク質Bレベル；
総コレステロール／高密度リポタンパク質の比率；もしくは
低密度リポタンパク質／高密度リポタンパク質の比率
 を低下させるため；または
高コレステロール血症；
高脂血症；
高トリグリセリド血症；
シトステロール血症；
アテローム性動脈硬化症；
動脈硬化症；
冠状動脈性心疾患；
血管炎症；もしくは
黄色腫

を治療するための方法であって、項目24に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効量を前記被験者に投与する工程を含む方法。

(項目51) 項目1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをさらなる化学療法剤と組み合わせて投与する、項目50に記載の方法。

(項目52) 前記さらなる化学療法剤が、心臓血管薬、アドレナリン遮断薬、抗高血圧薬、アンギオテンシン系阻害薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、冠血管拡張薬、利尿薬、アドレナリン刺激薬またはHMG-CoAレダクターゼ阻害薬である、項目51に記載の方法。

(項目53) 前記さらなる化学療法剤が、エゼチミブ、ロバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、リバスタチン、シンバスタチン、アゼチジノン、塩酸ブノロール、アセプトロール、塩酸アルブレノロール、アテノロール、塩酸カルテオロール、塩酸セリプロロール、塩酸セタモロール、塩酸ラベタロール、塩酸エスモロール、塩酸レボベタキソロール、塩酸レボブノロール、ナドロール、ブラクトロール、塩酸プロプラノロール、塩酸ソタロール、チモロール、マレイン酸チモロール、ピソプロロール、フマル酸ピソプロロール、ネビボロール、塩酸シクロプロロール、塩酸デキスプロプラノロール、塩酸ジアセトロール、塩酸ジレバロール、塩酸エキサプロロール、硫酸フレストロール、塩酸メタロール、メトプロロール2-プロパノール、酒石酸メトプロロール、硫酸パマトロール、硫酸ペンブトロール、ブラクトロール、塩酸チブレノロール、トラモロール、塩酸フェンスピリド、プロロキサン、塩酸アルフゾシン、塩酸ラベタロール、プレチリウムトシレート、ジヒドロエルゴタミンメシレート、カルベジロール、ラベタロール、プレチリウムトシレート、フェントラミンメシレート、酒石酸ソリペルチン、塩酸ゾレルチン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、ロサルタンカリウム、塩酸ベナゼプリル、カプトプリル、フォシノプリル、塩酸モエキシプリル、ペリンドプリルエルブミン、キナプリル、ラミプリル、マレイン酸エナラプリル、リシノプリル、デラプリル、スピラプリル、塩酸デラプリル、リベンザプリル、ペントプリル、ペリンドプリル1H-インドール-2-カルボン酸、キナプリラート、塩酸スピラプリル、スピラプリラート、テプロチド、ゾフェノプリル、アムロジピンベシレート、マレイン酸クレンチアゼム、イスラジピン、ニモジピン、フェロジピン、ニルバジピン、塩酸ジルチアゼム、塩酸ベラパミル、塩酸テルジピン、ベルホスジル、ホステジル、ラノラジン、塩酸プトプロジン、トシフェン、モルシドミン、塩酸ラノラジン、トシフェン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸ソソルビド、ニトログリセリン、塩酸ベラパミル、クロモナール、クロニテート、ドロブレニラミン、リドフラジン、ブレニラミン、硝酸プロパチル、塩酸ミオフラジン、ミキシジン、モルシドミン、一硝酸イソ

ソルビド、四硝酸エリトリチル、クロニトレート、ジピリダモール、ニコランジル、ピリジンカルボキサミド、ニフェジピン、マレイン酸ペルヘキシリン、オクスプレノロール、ペントリニトロール、ベラパミル、アルチアジド、ベンズチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、スピロノラクトン、トリアムテレン、塩酸グアンファシン、ヒドロクロロチアジドと組み合わせたメチルドパ - ヒドロクロロチアジド、メチルドパ - クロロチアジド、塩酸クロニジン、クロルタリドン、塩酸クロニジン、クロニジン、アルチアジド、ベンズチアジド、カプトプリル、カルベジロール、クロロチアジド、塩酸クロニジン、シクロチアジド、塩酸デラプリル、塩酸ジレパロール、塩酸デラプリル、ドキサゾシンメシレート、フォシノプリルナトリウム、塩酸モエキシプリル、マレイン酸モナテピル、コハク酸メトプロロール、塩酸グアンファシン、メチルドパ、キナプリラート、塩酸キナプリル、プリミドロール、塩酸プラゾシン、塩酸ペランセリン、塩酸フェノキシベンズアミン、カンデサルタンシレキセチル、テルミサルタン、カンデサルタン、マレイン酸アムロジピン、塩酸テラゾシン、塩酸ベバントロールまたはラミプリルである、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4) 前記さらなる化学療法剤がエゼチミブおよび、場合により、シンバスタチンである、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5) 前記抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 6) 項目 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを作製するための方法であって、前記重鎖および / または軽鎖免疫グロブリンをコードし、その発現を指令する 1 つまたはそれより多くのポリヌクレオチドを、1 つまたはそれより多くの宿主細胞に導入する工程 ; ならびに該宿主細胞を前記重鎖および軽鎖の免疫グロブリンが発現される条件下で増殖させる工程を含む方法。

(項目 5 7) 前記軽鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドと、前記重鎖をコードし、その発現を指令する前記ポリヌクレオチドが別々の宿主細胞中に存在する、項目 5 6 に記載の方法。

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成22年7月8日 (2010.7.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】配列表

【 補正方法 】追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2011501952000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2008/081311
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/40 A61K39/395 A61P3/06		
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 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAGACE THOMAS A ET AL: "Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 116, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 2995-3005, XP002493243 ISSN: 0021-9738 the whole document ----- -/--	1-35, 44-57
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 July 2009		31/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/081311

C(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BENJANNET SUZANNE ET AL: "The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 281, no. 41, 13 October 2006 (2006-10-13), pages 30561-30572, XP002508324 ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2006-08-15] page 30562	1-35
X,P	----- CAYMAN CHEMICAL COMPANY: "Product Information PCSK9 (murine) Polyclonal Antibody Catalog No. 10008811" INTERNET CITATION 12 December 2007 (2007-12-12), pages 1-2, XP002517273 Retrieved from the Internet: URL: http://www.caymaneurop.com/pdfs/10008811.pdf [retrieved on 2009-02-27] page 1	1-35
X,P	----- CAYMAN CHEMICAL COMPANY: "Product Information PCSK9 Polyclonal Antibody Catalog No. 10007185" INTERNET CITATION 10 December 2007 (2007-12-10), pages 1-2, XP002517274 Retrieved from the Internet: URL: http://www.caymaneurop.com/pdfs/10007185.pdf [retrieved on 2009-02-27] page 1	1-35
X,P	----- WO 2008/125623 A2 (NOVARTIS AG [CH]; MIKHAILOV DMITRI [US]; YOWE DAVID LANGDON [US]; FLEM) 23 October 2008 (2008-10-23) pages 1-9; figure 4; example 5	1-35, 44-57
X,P	----- WO 2008/057457 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) pages 3-6; figures 3-5; example 5	1-35, 44-57
X,P	----- WO 2008/057458 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) pages 3-6; figures 3-5; example 5 ----- -/--	1-35, 44-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/081311

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2008/057459 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) pages 3-6; figures 3-5; example 5	1-35, 44-57
A	CAYMAN CHEMICAL COMPANY: "Material Safety Data Sheet PCSK9 (murine) Polyclonal Antibody" INTERNET CITATION 5 September 2007 (2007-09-05), pages 1-4, XP002517275 Retrieved from the Internet: URL: http://www.caymaneurope.com/msdss/10008811m.pdf [retrieved on 2009-02-27] page 1	1-35
A	CAYMAN CHEMICAL COMPANY: "Material Safety Data Sheet PCSK9 (human) Polyclonal Antibody" INTERNET CITATION 26 July 2007 (2007-07-26), pages 1-3, XP002517276 Retrieved from the Internet: URL: http://www.caymaneurope.com/msdss/10007185m.pdf [retrieved on 2009-02-27] page 1	1-35
A	HORTON ET AL: "Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 32, no. 2, 6 February 2007 (2007-02-06), pages 71-77, XP005876225 ISSN: 0968-0004 page 75	1-35, 44-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/081311**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-35, 44-57(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008/081311

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 11B5, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 10 and 14; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

2. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 75B9, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 18 and 22; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

3. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 77D10, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 26 and 30; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

4. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 29C10, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 34 and 38; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

5. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 22D11, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 42 and 46; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

6. claims: 1-35, 44-57(partially)

An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising the 3 CDR sequences of the heavy or light chain of 1F11/1G11, which comprises the amino acid sequences of SEQ ID NO: 50 and 54; the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

International Application No. PCT/US2008 /081311

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 36-37, 40-43(partially)

A pharmaceutical composition comprising an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof which binds specifically to a PCSK9 catalytic domain and inhibits binding between PCSK9 and LDL receptor, the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

8. claims: 36-37, 40-43(partially)

A pharmaceutical composition comprising an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof which binds specifically to a domain of PCSK9 which interacts with an LDL receptor EGF-A domain and inhibits binding between PCSK9 and LDL receptor, the medical use of said antibody for lowering cholesterol and treating related diseases.

9. claims: 38-39(completely); 36-37, 40-43(partially)

A pharmaceutical composition comprising isolated EGF-A polypeptide which binds specifically PCSK9 and inhibits binding between PCSK9 and LDL receptor, and its medical use for lowering cholesterol and treating related diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/081311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008125623 A2	23-10-2008	NONE	
WO 2008057457 A2	15-05-2008	NONE	
WO 2008057458 A2	15-05-2008	NONE	
WO 2008057459 A2	15-05-2008	AU 2007322265 A1 WO 2008063382 A2	29-05-2008 29-05-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/397 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 K 31/397	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 0 7 D 205/08 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
	C 0 7 D 205/08 K	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヘドリック, ジョセフ エー.
アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 8 8 2, サウス リバー, デイビッド ストリート 6

(72)発明者 モンスマ, フレデリック ジェイムス ジュニア
アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 9 0 1, サミット, マウンテン アベニュー 1 5 9

(72)発明者 チャラコバ, タティアナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 6, サニーベール, サウス ガーランド テラス 6 7 6

(72)発明者 ホーレンバーグ, ダイアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 0, マウンテン ビュー, フォーダム ウェイ 1 5 3 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 BA63 CA04 DA02 DA06 DA11 EA04 GA11
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44
4C084 AA19 MA02 NA05 ZA361 ZA451 ZC331 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB42 CC05 CC22 CC23 DD62 EE01
GG01
4C086 AA01 AA02 BC03 MA02 MA04 NA05 ZA36 ZA45 ZC33 ZC75
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA27 FA74