



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112812188 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 202011297250.8

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.18

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

201911133187.1 2019.11.18 CN

201911132974.4 2019.11.18 CN

(71) 申请人 康融东方(广东)医药有限公司

地址 510530 广东省广州市广州高新技术
产业开发区科学城科学大道162号创
意大厦B2栋第11层1101单元

(72) 发明人 李百勇 夏瑜 王忠民 金小平

(74) 专利代理机构 北京科穗律师事务所 11849

代理人 唐文静

(51) Int.Cl.

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

权利要求书3页 说明书15页
序列表5页 附图2页

(54) 发明名称

抗PCSK9抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及抗PCSK9抗体及其应用,优选用于
治疗高胆固醇血症。

1. 抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,用于治疗高胆固醇血症。
2. 权利要求1的抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PCSK9抗体包含:
HCDR1:GFTFSSYS (SEQ ID NO:5);
HCDR2:ISSSSSYI (SEQ ID NO:6);
HCDR3:EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO:7);
LCDR1:SRNIGGGND (SEQ ID NO:8);
LCDR2:GVI (SEQ ID NO:9);以及
LCDR3:QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO:10)。
3. 权利要求1的抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗PCSK9抗体包含重链可变区,所述重链可变区含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或者与其具有至少80%同源性、优选至少85%同源性、更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列;以及
轻链可变区,所述轻链可变区含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或者与其具有至少80%同源性、优选至少85%同源性、更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列。
4. 权利要求1的抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体,优选人源化抗体。
5. 药物组合物,优选用于治疗高胆固醇血症,其包含权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,和药学上可接受的载体。
6. 试剂盒,优选用于治疗高胆固醇血症,其包含权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段,优选地,所述试剂盒还包含他汀类药物(优选3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂,更优选选自洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀和匹伐他汀),和/或依折麦布。
7. 权利要求6所述的试剂盒,其中所述抗PCSK9抗体为适于胃肠外施用途径或非胃肠外施用途径的形式。
8. 治疗高胆固醇血症的方法,包括向有需要的受试者施用(例如胃肠外或非胃肠外施用)治疗有效量的权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段,优选地,所述受试者被联合施用他汀类药物,更优选地,所述受试者被联合施用他汀类药物和依折麦布。
9. 权利要求8的方法,其中所述抗PCSK9抗体或其抗原结合片段,所述他汀类药物和/或依折麦布被同时施用或分开施用。
10. 权利要求8的方法,其中所述治疗有效量为根据患者体重,0.1mg/kg以上,优选0.1-60mg/kg。
11. 权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段,权利要求5所述的药物组合物,权利要求6-7任一项所述的试剂盒,或权利要求8-9任一项所述的方法,其中所述高胆固醇血症为选自以下各项组成的组:
 - (1) 纯合型家族性高胆固醇血症,更优选地,所述高胆固醇血症是由LDLR、载脂蛋白B (ApoB)、PCSK9或低密度脂蛋白受体衔接蛋白1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)) 的基因中的1个(对)或者更多个(对)等位或非等位基因突变所导致的,优选地,所述等位基因突变包括LDLR功能缺陷型突变、影响LDL与LDLR的结合

的ApoB基因突变、导致PCSK9对LDLR亲和力增强的功能性突变以及导致LDL内化活性降低的LDLRAP1失功能型突变,和/或优选地,所述高胆固醇血症(更优选HoFH)在既往未经治疗时LDL-C $>13\text{mmol/L}$ (500mg/dL) 或(使用大剂量/最大耐受剂量的他汀类药物联合依折麦布)治疗后LDL-C $\geq 8\text{mmol/L}$ (300mg/dL),同时,合并10岁前出现皮肤或肌腱黄色瘤或父母双亲均携带有LDLR、ApoB、PCSK9或LDLRAP1基因中的1对或者更多对等位基因突变;

(ii) 杂合型家族性高胆固醇血症,优选地,所述杂合型家族性高胆固醇血症由LDLR、载脂蛋白B (ApoB)、PCSK9或低密度脂蛋白受体衔接蛋白1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)) 基因中的1个或者更多非成对等位基因突变所导致的,更优选地,所述等位基因突变包括LDLR功能缺陷型突变、影响LDL与LDLR的结合的ApoB基因突变、导致PCSK9对LDLR亲和力增强的功能性突变以及导致LDL内化活性降低的LDLRAP1失功能型突变;

(iii) 具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症,优选所述具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症是指同时符合以下条件1和条件2,其中条件1为符合a) - h) 中的任一条:a) 冠状动脉疾病史(如急性冠状动脉综合征、稳定性冠心病、血运重建术后、缺血性心肌病等),b) 缺血性卒中史(腔梗除外),c) 短暂性脑缺血发作,d) 外周动脉粥样硬化病(如颈动脉粥样硬化病、颈动脉内膜切除术后、颈动脉支架置入术后、血运重建术后、下肢动脉粥样硬化病、下肢动脉血运重建术后等),e) LDL-C $\geq 4.9\text{mmol/L}$ (190mg/dL) 或TC $\geq 7.2\text{mmol/L}$,f) 1.8mmol/L (70mg/dL) $\leq$ LDL-C $< 4.9\text{mmol/L}$ (190mg/dL) 且年龄在40岁及以上的2型糖尿病患者,g) 患有慢性肾脏疾病,分期为3期(即经检测计算的肾小球滤过率 $30\text{mL/min/1.73m}^2 \leq \text{eGFR} < 60\text{mL/min/1.73m}^2$),h) 存在下列至少3项危险因素:男性 ≥ 45 岁,女性 ≥ 55 岁;高血压;吸烟;有CVD家族史(一级亲属:男性 < 55 岁,女性 < 65 岁);HDL胆固醇 $< 40\text{mg/dL}$;肥胖($\text{BMI} \geq 28\text{kg/m}^2$);并且,同时满足条件2中的a) 或b) 中的任意一条:存在稳定4周基础降脂药物治疗后患者的血脂水平满足以下条件之一:a) 极高危患者LDL-C水平 $> 1.8\text{mmol/L}$ (70mg/dL) 或b) 高危患者LDL-C水平 $> 2.6\text{mmol/L}$ (100mg/dL) 的患者。

12. 治疗患有高胆固醇血症的患者的方法,所述方法包括:(i) 对所述患者进行基因型检测,(ii) 测量所述患者的样品(优选血清,血浆或全血)中的LDL-C水平,和(iii) 当所述患者被鉴定为纯合型或杂合型家族性高胆固醇血症时,给所述患者施用治疗有效量的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段,优选联合施用他汀类药物,更优选联合施用他汀类药物和依折麦布,优选地,所述治疗有效量为根据患者体重, 0.1mg/kg 以上,优选 $0.1-60\text{mg/kg}$ 。

13. 权利要求12所述的方法,其中纯合型或杂合型家族性高胆固醇血症如权利要求11中所定义。

14. 权利要求12-13任一项所述的方法,其中所述患者为杂合型家族性高胆固醇血症患者时,所述患者在既往未经治疗时未接受调脂药物治疗的患者血清LDL-C水平 $\geq 4.7\text{mmol/L}$ (180mg/dL),或者,

所述患者为杂合型家族性高胆固醇血症患者时,所述患者同时满足下述a) 和b) 的至少1条:a) 有皮肤/腱黄色瘤或 < 45 岁的人存在脂性角膜弓,和b) 一级亲属中有FH或早发成人动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD),特别是冠心病患者。

15. 权利要求8-12任一项所述的方法,其中抗PCSK9抗体或其抗原结合片段的施用治疗以2周(14天)或4周(28天)为一个周期,优选在每个周期第一天(D1)皮下给药。

16. 权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段在制备用于降低具有心血管极高危或高危风险的高胆固醇血症患者心血管疾病的发作及死亡风险的药物制剂(或药物组合物)中的应用。

17. 降低高血脂心血管疾病患者(更优选极高/高危心血管疾病风险患者)的血胆固醇或降低高血脂患者心血管疾病发作的风险的方法,包括给所述患者施用(例如胃肠外或非胃肠外施用)治疗有效量的权利要求1-4任一项所述的抗PCSK9抗体其抗原结合片段,优选地,所述受试者被联合施用他汀类药物,更优选地,所述受试者被联合施用他汀类药物和依折麦布,更优选地,所述他汀类药物选自洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀和匹伐他汀或其任意组合。

18. 权利要求17所述的方法,抗PCSK9抗体的施用治疗以2周(14天)或4周(28天)为一个周期,优选在每个周期第一天(D1)皮下给予抗PCSK9抗体。

抗PCSK9抗体及其应用

技术领域

[0001] 本申请属于医药技术领域,涉及可用于高胆固醇血症的治疗。具体的,本申请涉及抗PCSK9抗体的治疗高胆固醇血症的用途。

背景技术

[0002] PCSK9是一种分泌型丝氨酸蛋白酶,可与细胞表面低密度脂蛋白受体 (Low-density lipoprotein receptor, LDLR) 结合并内吞降解,从而导致细胞膜表面LDLR数目减少,PCSK9主要由肝脏合成并分泌释放至血液。LDLR广泛分布于肝脏细胞膜表面以及肝脏细胞系如HepG2、Hep3B表面。抑制PCSK9与LDLR的结合,可以保持细胞膜表面LDLR数目,进而介导血浆胆固醇的LDL进入细胞,维持血浆胆固醇水平。

[0003] 高胆固醇血症是一种以脂质代谢缺陷为特征的疾病,其中某些患者携带有常染色体显性遗传突变称为家族性高胆固醇血症 (Familial Hypercholesterolemia, FH), 主要表现为血浆低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平显著升高。FH可分为杂合子 (型) (Heterozygote)、纯合子 (型) (Homozygote)、复合杂合子和双重杂合子4种类型,以前两类居多。纯合子家族性高胆固醇血症 (Homozygote Familial Hypercholesterolemia, HoFH) 罕见,患病率为1/100万~3/100万。HoFH的疾病特点是LDL-C水平升高和早发动脉粥样硬化性心血管疾病风险升高。欧洲动脉粥样硬化学会 (EAS) 指出,若不加以干预, HoFH患者通常于20岁左右发生动脉粥样硬化性心血管疾病,30岁左右死亡。HoFH的主要治疗方式包括治疗性生活方式改变、药物治疗和其他治疗方式,比如血浆脂蛋白置换。药物治疗仍以他汀类为主,但是对于HoFH患者,血脂水平较高,常常需要他汀类与依折麦布联合治疗。

[0004] 杂合子 (型) 家族性高胆固醇血症 (HeFH) 的患病率约为1:500~1:200,全球范围内约有1400~3400万的HeFH患者。HeFH的主要治疗方式包括治疗性生活方式改变、药物治疗和其他治疗方式,比如血浆脂蛋白置换。药物治疗仍以他汀类为主,但是对于HeFH患者,血脂水平较高,常常需要他汀类与依折麦布联合治疗。

[0005] PCSK9抑制剂能直接阻止循环中PCSK9与LDLR相结合,减少PCSK9介导的LDLR的分解,加强其对LDL-C的清除能力,在基础降脂药物基础上,能进一步降低患者血脂水平。目前已经上市的靶向于PCSK9单克隆抗体有两个:Alirocumab和Evolocumab。Alirocumab (曾用名REGN727/SAR236553) 由美国公司Regeneron Pharmaceuticals发现的全人源PCSK9单克隆抗体,2015年FDA批准Alirocumab作为二线药物用于降低LDL-C,适用人群为遗传性高胆固醇血症成年患者以及饮食干预和他汀类药物无效而需要降低LDL-C的动脉粥样硬化成年患者。在2015年08月27日,美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准依洛尤单抗 (Evolocumab) 注射剂用于HoFH患者、及临床动脉粥样硬化性心血管疾病的成人患者,在饮食控制和最大耐受剂量他汀类药物治疗的基础上,联合使用Evolocumab来进行治疗。2018年07月31日,中国国家药品监督管理局 (NMPA) 批准Evolocumab注射液用于治疗成人或12岁以上青少年HoFH (即纯合子家族性高胆固醇血症)。

[0006] 心血管疾病是高血脂患者的主要死亡风险因素之一,目前研究结果提示有效的降

血脂治疗,如他汀类,可显著降低高血脂患者的心血管疾病发作及死亡风险。抗PCSK9抗体作为一种有效的降血脂药物,其在预防高血脂患者心血管疾病发作和降低死亡风险中的有效性亦得到了证实。抗PCSK9抗体药物Evolocumab的临床研究结果显示证实,罹患高血脂的患者接受Evolocumab治疗可显著降低高血脂患者心血管疾病发作的风险,相较于安慰剂对照组患者,接受Evolocumab治疗患者的心肌梗死、卒中及接受冠状动脉血运重建术的发生率显著降低。另一已上市抗PCSK9抗体Alirocumab的大规模临床研究亦证实其对心血管的保护作用,相较于安慰剂对照抗PCSK9抗体可使主要不良心血管事件,包括急性心肌梗死、缺血性卒中、冠心病(CHD)死亡或需要住院治疗的不稳定型心绞痛,总体发生风险降低15%。基于此类临床研究结果,两个抗PCSK9抗体分别于2017年及2019年获得FDA批准用于预防心血管疾病成年患者的心脏病、中风。

发明内容

[0007] 本申请的一个方面提供PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂,其优选为抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段,用于治疗高胆固醇血症(更优选纯合型家族性高胆固醇血症,也表示为“HoFH”,或者杂合型家族性高胆固醇血症,也表示为“HeFH”,或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)。

[0008] 在一些具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异地结合人PCSK9且阻断人PCSK9与LDLR的结合。

[0009] 在一些实施方案中,所述抗PCSK9抗体为人源化抗体。

[0010] 在一些实施方案中,所述抗PCSK9抗体包含:

[0011] 重链可变区,所述重链可变区含有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或者与其具有至少80%同源性、优选至少85%同源性、更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列;以及

[0012] 轻链可变区,所述轻链可变区含有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或者与其具有至少80%同源性、优选至少85%同源性、更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体的CDR序列如下:

[0014] HCDR1:GFTFSSYS (SEQ ID NO:5);

[0015] HCDR2:ISSSSSYI (SEQ ID NO:6);

[0016] HCDR3:EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO:7);

[0017] LCDR1:SRNIGGGND (SEQ ID NO:8);

[0018] LCDR2:GVI (SEQ ID NO:9);以及

[0019] LCDR3:QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO:10)。

[0020] 本申请的另一方面提供一种药物组合物,优选用于治疗高胆固醇血症(更优选HoFH、HeFH或具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症),其包含PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂(和他汀类)和药学上可接受的载体。

[0021] 在一些实施方案中,所述PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂为适于胃肠外施用途或非胃肠外施用途的形式。

[0022] 在本申请的另一个方面,提供试剂盒,其优选用于治疗高胆固醇血症(更优选

HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症), 其包含本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述试剂盒还包含他汀类药物, 和/或依折麦布。

[0023] 本申请的目的至少还在于提供一种治疗高胆固醇血症(更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)的方法, 包括向有需要的受试者施用(例如胃肠外或非胃肠外施用)治疗有效量的本发明所述的PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂(优选为抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段)。优选地, 所述受试者被联合施用他汀类药物。更优选地, 所述受试者被联合施用他汀类药物和依折麦布。在一些实施方案中, 所述抑制剂、他汀类药物和/或依折麦布被同时施用或分开施用。

[0024] 在一些具体实施方案中, 所述他汀类药物为3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂。

[0025] 在一些具体实施方案中, 所述他汀类药物, 即3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 包括洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀、瑞舒伐他汀和匹伐他汀, 或其任意组合等。

[0026] 在某些实施方案中, 所述的高胆固醇血症(更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)是由LDLR、载脂蛋白B (ApoB)、PCSK9或低密度脂蛋白受体衔接蛋白1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)) 等的基因中的1个(对)或者更多个(对)等位或非等位基因突变所导致的; 其中, 所述等位基因突变包括LDLR功能缺陷型突变、影响LDL与LDLR的结合的ApoB基因突变、导致PCSK9对LDLR亲和力增强的功能性突变以及导致LDL内化活性降低的LDLRAP1失功能型突变等。LDLR、APOB或PCSK9基因中已知导致FH的变体参见例如Canadian Journal of Cardiology, 34, (2018), 1553-1563, Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial Hypercholesterolemia: Update 2018。

[0027] 在某些实施方案中, 所述的高胆固醇血症(更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)在既往未经治疗时LDL-C $> 13 \text{ mmol/L}$ (500mg/dL) 或(使用大剂量/最大耐受剂量的他汀类药物联合依折麦布)治疗后LDL-C $\geq 8 \text{ mmol/L}$ (300mg/dL), 同时, 合并10岁前出现皮肤或肌腱黄色瘤或父母双亲均携带有LDLR、ApoB、PCSK9或LDLRAP1等基因中的1个(对)或者更多个(对)等位基因突变。

[0028] 在某些实施方案中, 所述的高胆固醇血症(更优选HeFH)满足以下a) 和b): a) 所述的高胆固醇血症是如上所述由LDLR、载脂蛋白B (ApoB)、PCSK9或低密度脂蛋白受体衔接蛋白1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1 (LDLRAP1)) 等的基因中的1个(对)或者更多(对)非成对等位基因突变所导致的, b) 在既往未经治疗时未接受调脂药物治疗的患者血清LDL-C水平 $\geq 4.7 \text{ mmol/L}$ (180mg/dL), 或者同时满足下述c) 和d) 的至少1条: c) 有皮肤/腱黄色瘤或 < 45 岁的人存在脂性角膜弓, 和d) 一级亲属中有FH或早发成人动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD), 特别是冠心病患者。

[0029] 本申请的目的至少还在于提供一种本发明所述的PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂(优选为抗PCSK9的抗体或其抗原结合片段)在制备治疗高胆固醇血症(更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)的药物中的用途。

[0030] 本申请也提供了一种治疗患有高胆固醇血症(更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管

极高危或高危风险患者的高胆固醇血症) 的患者的方法, 所述方法包括: (i) 对所述患者进行基因型检测, (ii) 测量所述患者的样品中的LDL-C水平, 和 (iii) 当所述患者被鉴定为纯合型 (或杂合型) 家族性高胆固醇血症时, 给所述患者施用治疗有效量的本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合部分, 优选联合施用他汀类药物, 更优选联合施用他汀类药物和依折麦布。

[0031] 在一些实施方案中, 所述样品为血清, 血浆或全血。

[0032] 在本发明的某些实施方案中, 所述的具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症是指同时符合以下条件1和条件2, 其中条件1为符合a) -h) 中的任一条 (参考《中国成人血脂异常防治指南 (2016年修订版) 》): a) 冠状动脉疾病史 (如急性冠状动脉综合征、稳定性冠心病、血运重建术后、缺血性心肌病等), b) 缺血性卒中史 (腔梗除外), c) 短暂性脑缺血发作, d) 外周动脉粥样硬化病 (如颈动脉粥样硬化病、颈动脉内膜切除术后、颈动脉支架置入术后、血运重建术后、下肢动脉粥样硬化病、下肢动脉血运重建术后等), e) $LDL-C \geq 4.9 \text{ mmol/L}$ (190 mg/dl) 或 $TC \geq 7.2 \text{ mmol/L}$, f) 1.8 mmol/L (70 mg/dl) $\leq LDL-C < 4.9 \text{ mmol/L}$ (190 mg/dl) 且年龄在40岁及以上的2型糖尿病患者, g) 患有慢性肾脏疾病, 分期为3期 (即经检测计算的肾小球滤过率 $30 \text{ mL/min/1.73 m}^2 \leq eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), h) 存在下列至少3项危险因素: 男性 ≥ 45 岁, 女性 ≥ 55 岁; 高血压; 吸烟; 有CVD家族史 (一级亲属: 男性 < 55 岁, 女性 < 65 岁); HDL胆固醇 $< 40 \text{ mg/dL}$; 肥胖 ($BMI \geq 28 \text{ kg/m}^2$); 并且, 同时满足条件2中的a) 或b) 中的任意一条: 存在稳定4周基础降脂药物治疗后患者的血脂水平满足以下条件之一: a) 极高危患者LDL-C水平 $> 1.8 \text{ mmol/L}$ (70 mg/dL) 或b) 高危患者LDL-C水平 $> 2.6 \text{ mmol/L}$ (100 mg/dL) 的患者。

[0033] 本申请的目的至少还在于提供一种制备用于治疗高胆固醇血症 (优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症) 的PCSK9与LDLR之间的相互作用的抑制剂 (优选抗PCSK9抗体或其抗原结合片段) 的药物制剂 (药物组合物) 的方法。

[0034] 在一些实施方案中, 抗PCSK9抗体的施用治疗以2周 (14天) 或4周 (28天) 为一个周期, 优选在每个周期第一天 (D1) 皮下给予抗PCSK9抗体。即, 所述抗PCSK9抗体以每两周一次 (q2w) 或者每四周一次 (q4w) 的频率施用。

[0035] 在一些实施方案中, 涉及单次药物剂量单元, 其包含0.1-60mg按照本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段, 优选用于治疗家族性高胆固醇血症 (更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症)。

[0036] 在本发明的另一个方面, 涉及0.1-60mg按照本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗家族性高胆固醇血症 (更优选HoFH, HeFH, 或者具有心血管极高危或高危风险患者的高胆固醇血症) 的单次药物剂量单元中的应用。

[0037] MAB1

[0038] 如本申请所用, MAB1是抗PCSK9单克隆抗体, 其序列和结构可以参见文献 (WO 2016/127912 A1)。在所述MAB1单克隆抗体中, HCDR1包含序列GFTFSSYS (SEQ ID NO:5), HCDR2包含序列ISSSSSYI (SEQ ID NO:6), HCDR3包含序列EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO:7), LCDR1包含序列SRNIGGGND (SEQ ID NO:8), LCDR2包含序列GVI (SEQ ID NO:9), LCDR3包含序列QSFDFGSLSGSV (SEQ ID NO:10)。

[0039] 定义和说明

[0040] 除非另有说明,本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照本领域普通的含义去理解。当本申请中出现商品名时,意在指代其对应的商品、组合物或其活性成分。

[0041] 如本文所用,术语“抗体”是指具有至少一个抗原结合结构域的抗原结合蛋白。本申请的抗体和其片段可以是整个抗体或其任何片段。因此,本申请的抗体和其片段包括单克隆抗体或其片段和抗体变体或其片段,以及免疫缀合物。抗体和其片段还可以包括重组多肽、融合蛋白和双特异性抗体。本文公开的抗PCSK9抗体和其片段可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0042] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体种类。在一个实施方案中,本文公开的抗PCSK9抗体和其片段是IgG1或IgG4同种型。本申请的抗PCSK9抗体和其片段可以衍生自任何物种,其包括但不限于小鼠、大鼠、兔、灵长类动物、美洲驼和人。PCSK9抗体和其片段可以是嵌合抗体、人源化抗体或完整的人抗体。

[0043] 术语“人源化抗体”是指其中抗原结合位点来源于非人物种且可变区框架来源于人免疫球蛋白序列的抗体。人源化抗体在框架区中可包含置换,使得该框架可能不是所表达的人免疫球蛋白或种系基因序列的精确拷贝。

[0044] 术语“基因突变”是指基因组DNA分子发生的突然的、可遗传的变异现象。从分子水平上看,基因突变是指基因在结构上发生碱基对组成或排列顺序的改变。其包括碱基置换突变、移码突变、缺失突变和插入突变。

[0045] “分离的抗体”表示这样的抗体:其基本上不含有具有不同抗原特异性的其它抗体(例如,分离的特异性地结合PCSK9的抗体基本上不含有特异性地结合除PCSK9以外的抗原的抗体)。但是,分离的特异性地结合PCSK9的抗体可以具有与其它抗原(诸如来自不同物种的PCSK9分子)的交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含有其它细胞材料和/或化学物质。

[0046] 术语“单克隆抗体”(“mAb”)是指单分子组合物的抗体分子。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力,或就双特异性单克隆抗体而言,显示出对于两种不同表位的双重结合特异性。mAb是分离的抗体的一个例子。通过本领域技术人员已知的杂交瘤技术、重组技术、转基因技术或其它技术,可以生产mAb。

[0047] 抗体的“抗原结合部分”(也称为“抗原结合片段”)表示抗体的一个或多个片段,其保留特异性地结合被完整抗体结合的抗原的能力。抗原结合片段的实例包括Fab片段、Fab'片段、F(ab)'片段、Fv片段、分离的CDR区、单链Fv分子(scFv), F(ab')₂、Fd、dAb、Fab/c、双价抗体和结构域抗体。

[0048] 如本文所用,术语“衍生的”当用于指相对于参考抗体或其它结合蛋白的分子或多肽时,意指能够与参考抗体或其它结合蛋白特异性地结合相同表位的分子或多肽。

[0049] 如本文所用,术语“EC50”是指有效浓度,抗体的50%最大应答。如本文所用,术语“IC50”是指抑制浓度,抗体的50%最大应答。EC50和IC50两者均可以通过ELISA或FACS分析或本领域已知的任何其它方法进行测量。

[0050] 术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应的操作。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状,可以是预防性的;和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用,可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治

疗,包括:(a) 预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状;(b) 抑制疾病的症状,即阻止其发展;或(c) 缓解疾病的症状,即,导致疾病或症状退化。

[0051] 如本文所用,术语“全身治疗”是指药物物质通过血流传送,到达并影响全身细胞的治疗。

[0052] 如本文所用,术语“受试者”表示哺乳动物,诸如啮齿动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。优选地,根据本申请的受试者是人。

[0053] “施用”表示使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任一种,向受试者物理引入包含治疗剂的组合物。免疫检查点抑制剂(例如,抗PCSK9抗体)的施用途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊柱或其它胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。本文中使用的短语“胃肠外施用”是指,通常通过注射进行的除了肠内和局部施用以外的施用模式,且包括但不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注、以及体内电穿孔。在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂(例如,抗PCSK9抗体)通过非胃肠外途径施用,在某些实施方案中,口服施用。其它非胃肠外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如,鼻内地、阴道地、直肠地、舌下地或局部地。还可以执行施用,例如,一次、多次,和/或在一个或多个延长的时间段中。

[0054] 本文中使用的“不良事件”(AE)是与医学治疗的应用有关的任何不利的和通常非故意的或不希望的迹象(包括异常的实验室发现)、征状或疾病。例如,不利事件可以与响应于治疗的分泌PCSK9的肝脏相关。医学治疗可以具有一种或多种相关的AE,并且每种AE可以具有相同或不同的严重性水平。对能够“改变不利事件”的方法的提及是指降低与不同治疗方案的应用相关的一种或多种AE的发生率和/或严重性的治疗方案。

[0055] 本文中使用的“给药间隔”是指在施用给受试者的本文公开的制剂的多个剂量之间逝去的时间的量。因而可以将给药间隔指示为范围。

[0056] 本文中使用的术语“给药频率”表示在给定时间中本文公开的制剂的施用剂量的频率。可以将给药频率指示为每个给定时间的给药次数,例如,每周1次或2周1次。

[0057] 术语“统一剂量(flat dose)”的应用是指,不考虑患者的重量或体表面积(BSA)施用给患者的剂量。因此将统一剂量规定为药剂(例如,抗PCSK9抗体)的绝对量,而不是规定为mg/kg剂量。例如,60kg人和100kg人将接受相同剂量的抗体(例如,240mg抗PCSK9抗体)。

[0058] 关于本申请的组合物的术语“固定剂量”的应用是指,单一组合物中的两种或更多种不同抗体彼此以特定(固定)比率存在于所述组合物中。在某些实施方案中,所述固定剂量是基于所述抗体的重量(例如,mg)。在某些实施方案中,所述固定剂量是基于所述抗体的浓度(例如,mg/ml)。在某些实施方案中,所述第一抗体(mg):第二抗体(mg)的比率是至少约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9、约1:10、约1:15、约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90、约1:100、约1:120、约1:140、约1:160、约1:180、约1:200、约200:1、约180:1、约160:1、约140:1、约120:1、约100:1、约90:1、约80:1、约70:1、约60:1、约50:1、约40:1、约30:1、约20:1、约15:1、约10:1、约9:1、约8:1、约7:1、约6:1、约5:1、约4:1、约3:1或约2:1。例如,第一抗体和第二抗体的3:1比率可以是指,瓶中可以含有约240mg第一抗体和80mg第二抗体,或约3mg/ml的第一抗体和1mg/ml的第二抗体。

[0059] “患者”(有时表示为“受试者”)包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不

限于脊椎动物诸如非人灵长类动物、绵羊、狗,和啮齿类动物诸如小鼠、大鼠和豚鼠。在某些实施方案中,所述患者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中的某些语境下可互换地使用。

[0060] 药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗上有效的剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时保护患者免于疾病发作或促进疾病消退的药物的任何量,所述疾病消退通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状阶段的频率和持续时间的增加、或由疾病折磨引起的损伤或失能的预防来证明。使用熟练的从业人员已知的多种方法可以评价治疗剂的促进疾病消退的能力,诸如在临床试验期间在人患者中,在预测对于人类的效力的动物模型系统中,或通过体外测定法中测定所述药剂的活性。

[0061] 术语“约”、“大约”或“基本上包含”表示在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成,即,测量系统的限制。例如,“约”、“大约”或“基本上包含”可以是指按本领域中的实践,在1个或超过1个标准差内。可替换地,“约”或“基本上包含”可以是指与由其修饰的参数或数值相差至多10%或20% (即, $\pm 10\%$ 或 $\pm 20\%$) 的范围。例如,约3mg可以包括2.7mg至3.3mg之间 (对于10%) 或2.4mg至3.6mg (对于20%) 之间的任何数字。此外,特别是关于生物学系统或过程,该术语可以是指直到一个数量级或直到数值的至多5倍。当在本申请和权利要求中提供特定值或组成时,除非另有说明,否则“约”或“基本上包含”的含义应当假定在该特定值或组成的可接受误差范围内。

[0062] 本文中使用的术语“约每周一次”、“约每两周一次”或任意其它类似的给药间隔术语是指近似值。“约每周一次”可以包括每7天 $\pm$ 1天,即,每6天至每8天。“约每两周一次”可以包括每14天 $\pm$ 3天,即,每11天至每17天。类似的近似值适用于,例如,约每3周一次,约每4周一次,约每5周一次,约每6周一次,和约每12周一次。在某些实施方案中,约每6周一次或约每12周一次的给药间隔是指可以在第一周的任意天施用第一剂,然后可以分别在第六周或第十二周的任意天施用第二剂。在其它实施方案中,约每6周一次或约每12周一次的给药间隔是指在第一周的特定天 (例如,星期一) 施用第一剂,并然后分别在第六周或第十二周的相同天 (即,星期一) 施用第二剂。类似的原则适用于包括、但不限于“约每2周1次”,“约每月1次”等.....的短语。

[0063] 如本文中所述的,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应当理解为包括在列举的范围内的任意整数的值,且当适当时,包括其分数 (诸如整数的十分之一和百分之一),除非另外指出。

[0064] 除特别声明外,本申请中的“约”或“大约”是指在所给定的具体数值范围 $\pm 5\%$ 范围内波动,优选在 $\pm 2\%$ 范围内波动,更优选在 $\pm 1\%$ 范围内波动。例如pH值为约5.5表示pH为 $5.5 \pm 5\%$,优选pH为 $5.5 \pm 2\%$,更优选pH为 $5.5 \pm 1\%$ 。

[0065] 术语“药学上可接受的”是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0066] 术语“药物的制剂”、“药物组合物”是指一种本申请的活性成分 (例如抗PCSK9抗体) 与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对受试者给予本申请的活性成分。

[0067] 术语“单次药物剂量单元”表示在给药方案时刻, (优选按照受试者每kg体重) 待给

药于受试者的包含本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段的单次药物剂型,如安瓿瓶。

[0068] 施用方式

[0069] 下述内容并非限制本申请药物的施用方式。

[0070] 在一个实施方案中,本申请的药物可以配制成适合于单次或多次施用的药物组合物。

[0071] 本申请的药物以适合的各种途径施用,包括但不限于,口服或肠胃外(通过静脉内、肌内、局部或皮下途径)。在一些实施方案中,本申请的药物口服施用或注射施用,例如静脉注射或腹腔注射。

[0072] 本申请的药物适合的剂型,包括但不限于,片剂、含片、丸剂、胶囊剂(例如硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂)、酏剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂(肌肉内、静脉内、腹腔内)、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液、分散剂和用于口服或非口服给药的缓释制剂的剂型。

[0073] 本申请的药物组合物含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

附图说明

[0074] 图1.MAB1对小鼠血清LDL-C的影响。

[0075] 图2.MAB1对食蟹猴血清LDL-C的影响,s.c:皮下注射;i.v:静脉注射;male:雄性;;female:雌性。

[0076] 图3.MAB1对HepG2细胞的LDL的内吞作用的影响。

[0077] 图4.MAB1解除野生型PCSK9对LDL内吞的抑制。

[0078] 图5.MAB1解除功能增强突变型PCSK9 (PCSK9-D374Y) 对LDL内吞的抑制。

具体实施方式

[0079] 下面结合具体实施例对本申请进行进一步的描述,然而,本申请中这些实施例仅用于阐明而不限制本申请的范围。同样,本申请不限于本文描述的任何具体优选的实施方案。本领域技术人员应该理解,对本申请技术特征所作的等同替换、或相应的改进仍属于本申请的保护范围之内。除特别说明的以外,以下实施例采用的试剂均为市售产品,溶液的配制可以采用本领域常规技术。

[0080] 在本发明的下述实施例中,同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG,anti-HEL,即human IgG,简称hIgG),其序列来自于Acierno等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies(Acierno等人.J Mol Biol.2007;374(1):130-46.,其中重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:11所示,轻链的氨基酸序列为SEQ ID NO:12所示),设计为本研究的同型对照抗体,在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

[0081] 在本发明的下述实施例中,使用的C57BL/6小鼠购自广东省医学实验动物中心。

[0082] 实施例1.人源化抗PCSK9抗体的制备

[0083] 1.抗体的设计

[0084] 为制备单克隆抗体MAB1,本发明人根据已有的PCSK9蛋白序列(NP_777596.2)及其蛋白三维晶体结构等,人工设计了一系列的抗体序列。通过大量的筛选和检测,最终得到了

一种与PCSK9特异性结合的MAB1。该单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列及其编码序列如下面的SEQ ID NO:1-4。

[0085] 设计的MAB1重链VH的DNA序列如下 (369bp) :

[0086] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCC
GGAAGATCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCACCTTTA
GCTCCTACAGCATGAAGTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGCAAGGGGCT
GGAGTGGGTCTCCGGAATCTCTAGTTCAAGCTCCTACATTAGCTATG
CAGACTCCGTCCAGGGAAGGTTACCATCTCTCGCGATAACGGCAA
[0087] GAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCAGAGGACAC
AGCCCTGTACTTCTGTGCCAGAGAATATGACTTCTGGTCCGCCTATT
ACGACGCCTTCGATGTCTGGGGACAGGGGACTATGGTCACTGTCTC
AAGC(SEQ IDNO:1)

[0088] 其编码的VH蛋白序列如下 (123aa) :

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKG
[0089] LEWVSGISSSSSYISYADSVQGRFTISRDNGKNSLYLQMNSLRAEDTAL
YFCAREYDFWSAYYDAFDVWGQGTMTVTVSS(SEQ ID NO:2)

[0090] MAB1轻链VL的DNA序列如下 (333bp) :

CAGAGCGAACTGACTCAGCCAAGAAGCGTCAGTGGATCACCT
GGCCAGAGCGTGACAATCTCCTGCACCGGCACAAGCAGGAACATT
GGCGGGGGAAATGACGTCCACTGGTACCAGCAGCATCCAGGGAAG
GCCCCCAAAGTGTGATCTCCGGAGTGATTGAGCGGAGCTCCGGCG
[0091] TCCCCGATAGATTCAGCGGGTCCAAGTCTGGAAACACAGCTTCTCT
GACTATCAGTGGCCTGCAGGCAGAGGACGAAGCCGATTACTATTGC
CAGTCTTTCGACGGCAGTCTGTCAGGGAGCGTGTTTGGCACTGGGA
CCGATGTGACCGTCCTG (SEQ ID NO:3)

[0092] 其编码的VL蛋白序列如下 (111aa) :

QSELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSRNIGGGNDVHWYQQHPGKA
[0093] PKLLISGVIERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSF
SLSGSVFGTGTDTVTL (SEQID NO:4)

[0094] 所述抗体的CDR序列如下:

[0095] HCDR1:GFTFSSYS (SEQ ID NO:5) ;

[0096] HCDR2:ISSSSSYI (SEQ ID NO:6) ;

[0097] HCDR3:EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO:7) ;

[0098] LCDR1:SRNIGGGND (SEQ ID NO:8) ;

[0099] LCDR2:GVI (SEQ ID NO:9) ;以及

[0100] LCDR3:QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO:10)。

[0101] 2. 抗体的表达和纯化

[0102] 将MAB1的重链cDNA序列(编码序列如SEQ ID NO:1所示;恒定区是Ig gamma-1chain C region,ACCESSION:P01857)和轻链的cDNA序列(编码序列如SEQ ID NO:3所示;恒定区为Ig lambda-2 chain C regions;ACCESSION:POCG05.1)分别克隆到pUC57simple(金斯瑞公司提供)载体中,分别获得pUC57simple-MAB1H和pUC57simple-MAB1L质粒。分别将质粒pUC57simple-MAB1H和pUC57simple-MAB1L进行酶切(HindIII&EcoRI),电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到pcDNA3.1载体中,提取重组质粒共转染293F细胞。细胞培养7天后,将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至HiTrap MabSelect SuRe柱,用Elution Buffer一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至PBS。

[0103] 实施例2.MAB1对动物血清低密度脂蛋白胆固醇LDL-C的影响

[0104] (1) MAB1对小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇LDL-C的影响

[0105] 32只C57BL/6小鼠给药前通过眼眶采血分离血清,使用全自动生化分析仪(迈瑞,型号BS-180)检测小鼠低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。如表1所示,将小鼠分为4组,即正常组、模型组、MAB1低剂量组和MAB1高剂量组,每组8只,并按表1给药方案给药。并在给药前D0、给药后D3、D7、D10、D14、D18采血分离血清,进行血脂低密度脂蛋白胆固醇检测。

[0106] 实验结果如图1所示。实验结论,与模型组相比,MAB1低剂量60mg/kg组和MAB1高剂量120mg/kg组均能够明显降低小鼠血清中LDL-C含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

[0107] 表1:MAB1对小鼠的给药剂量和给药方案

[0108]	组别	动物数量	采血方案	给药方案 (包括给药名称、剂量、部位、频率等)
	正常组	8	给药前 D0、给药后 D3、	生理盐水, 皮下, D0
[0109]	模型组	8	D7、D10、D14、D18	hIgG, 60mg/kg, 皮下, D0
	MAB1 60mg/kg	8	采血分离血清, 进行血脂低密度脂蛋白胆固醇检测	MAB1, 60mg/kg, 皮下, D0
	MAB1 120mg/kg	8		MAB1, 120mg/kg, 皮下, D0

[0110] 注:第一次给药时间为D0,即第0天;皮下:即皮下注射;

[0111] (2) MAB1对食蟹猴血清低密度脂蛋白胆固醇LDL-C的影响

[0112] 选用从南宁市德恒生物科技有限公司(动物生产许可证:SCXK(桂)2011-0007,实验动物合格证编号:0005869)购买的12只雄性和12只雌性食蟹猴(普通级)进行本实验。所有涉及动物使用和福利的操作和活动都要在操作前经机构动物伦理委员会(IACUC)批准。IACUC批准编号为:ACU16-467。

[0113] 如表2所示,根据给药前测定的动物体重,使用计算机系统将动物按性别随机分配

到MAB1低剂量组、MAB1中剂量组、MAB1高剂量组和MAB1静脉给药组,并按表2给药方案给药。并在所有动物于药前D0、药后4h,D2、D4、D6、D8、D11、D15、D18、D22,空腹采集血样约0.5ml。血样采集后转移至离心管中,于2-8℃、3000g条件下离心10分钟。测定低密度脂蛋白 (LDL-C)。

[0114] 实验结果,如图2所示。实验结论,MAB1以3、10及30mg/kg剂量单次皮下注射给予食蟹猴,以10mg/kg单次静脉注射给予食蟹猴。食蟹猴体内的低密度脂蛋白,在给药后均显著下降。至药后约15天,3mg/kg剂量组动物血脂水平基本回复至药前水平,至药后22天,10mg/kg的皮下注射及静脉注射剂量组动物血脂水平也基本回复,而30mg/kg剂量组部分动物血脂水平仍明显低于药前。

[0115] 表2:MAB1对食蟹猴的给药剂量和给药方案

[0116]	组别	动物数量	采血方案	给药方案
	低剂量组	6	所有动物于药前 D0、药后 4h, D2、D4、D6、D8、D11、D15、D18、	MAB1 , 3mg/kg, 皮
[0117]			D22, 空腹采集血样约 0.5ml。采血分离血清, 进行血脂低密度脂蛋白胆固醇检测	下, D0
	中剂量组	6		MAB1 , 10mg/kg, 皮下, D0
	高剂量组	6		MAB1 , 30mg/kg, 皮下, D0
	静脉给药组	6		MAB1 , 10mg/kg, 静脉, D0

[0118] 注:第一次给药时间为D0,即第0天;皮下:即皮下注射;静脉;即静脉注射;根据给药前测定的动物体重,使用计算机系统将动物按性别随机分配到4组中。每组雌性3只,雄性3只;

[0119] 实施例3.MAB1对HepG2细胞的LDL的内吞作用的影响

[0120] PCSK9可以通过介导LDLR的内吞分解进而抑制HepG2细胞表面LDLR的表达。LDL可以结合LDLR进而被内吞入细胞,BODIPY荧光标记LDL (BODIPY-LDL,Life,货号:L3483)可作为标记物与LDLR结合并被内吞入细胞,通过检测细胞内BODIPY-LDL的荧光值,进而反映LDLR介导的LDL的内吞。如PCSK9存在并结合于LDLR,则会导致细胞表面的LDLR减少进而结合于LDLR的BODIPY-LDL减少,即抑制了LDL的内吞;反之,如抑制PCSK9则可以增强HepG2细胞对LDL内吞。因此,该实验体系可以通过检测HepG2细胞对BODIPY-LDL的内吞活性而衡量

抗PCSK9抗体的药理学活性。

[0121] 实验方法：每孔加入50 μ l多聚赖氨酸 (Poly-l-lysine) 溶液包被96孔黑底细胞培养板，置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中2小时，弃包被液，100 μ l PBS洗涤一次，晾干待用。HepG2细胞常规消化，以分析培养基 (1%NEAA的DMEM) 重悬细胞，计数 2×10^4 /孔接种于96孔黑底细胞培养板中，每孔加入80 μ l，置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中培养18小时。用分析培养基 (1%NEAA的DMEM) 预稀释PCSK9至6000nM，每孔加入10 μ l；抗体稀释成10 $\times$ ，每孔加入10 μ l，置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中培养6小时。之后，每孔加入10 μ l 0.1mg/ml的BODIPY-LDL溶液，置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中培养22小时。取出培养板，弃去培养基，每孔加入200 μ l PBS洗涤后弃去。加入甲醛溶液以固定细胞，室温放置20min。弃去甲醛，加入PBS洗涤。最后弃去PBS，每孔加入100 μ l PBS用多标记微孔板检测仪设置激发光波长490nm，发射波长520nm，cutoff为515nm读取BODIPY的相对荧光单位数值。

[0122] 结果如表3和图3所示，MAB1解除PCSK9抑制HepG2细胞内吞LDL活性的EC50值为12.99 μ g/ml。

[0123] 实验结论，MAB1能抑制PCSK9的活性，从而使HepG2细胞内吞LDL的量增加，MAB1的EC50为12.99 μ g/ml。

[0124] 表3 MAB1检测HepG2细胞的LDL的内吞作用结果

[0125]	MAB1 浓度 (μ g/ml)	RFU	平均值		SEM
	120	1432819	1501195	1467007	34188
	40	1421783	1233042	1327413	94370.5
	28	1294536	1179255	1236896	57640.5
	16	1145831	1002411	1074121	71710
	6.4	267495	227003	247249	20246
	2.56	412355	282301	347328	65027
	1.024	341749	236159	288954	52795
	0.4096	222579	229323	225951	3372
	0.16384	203970	192901	198435.5	5534.5

[0126] 实施例4.MAB1解除野生型和功能增强突变型PCSK9对的LDL内吞的抑制

[0127] PCSK9存在多种突变形式，根据突变对PCSK9调节LDL-C水平影响不同分为两类，功能获得型和功能缺失型。功能获得型突变可增强PCSK9上调LDL-C的能力，导致高胆固醇血症，主要形式有S127R、D129G、F216L、R218S、D374Y、N425S、R496W、H553R和E670G等。

[0128] 其中，D374Y (Asp374Tyr) 突变改变PCSK9、LDLR亲和力，使得PCSK9、LDLR亲和力增加5至30倍 (Lagace TA et al.J Clin Invest.2006,116(11):2995-3005;Cunningham D et al.Nat Struct Mol Biol,2007,14(5):413-419;Fisher TS et al.J Biol Chem,2007,282(28):20502-20512)。

[0129] 本实验以D374Y (Asp374Tyr) 突变蛋白为例，研究了MAB1对于抑制功能增强型PCSK9突变蛋白介导的LDLR的内吞的活性。实验结果提示，MAB1可有效解除功能获得型

PCSK9蛋白对LDL的内吞的抑制。

[0130] 实验材料:HepG2 (购自中国科学院,P14);DMEM (Gibco,货号:11995040);FBS (Excell bio,货号:FSP500);MEM NEAA (100X) (Gibco,货号:11140-050);POLY-L-LYSINE (SIGMA,货号:P4832);BODIPY-LDL (Life,货号:L3483);PCSK9-his (康方生物自产);PCSK9 (D374Y)-his (Acrobio,货号:PCY-H5225)。Evolocumab (购自AMGEN)。

[0131] 实验方法:50μL 0.01%的多聚赖氨酸包被黑色96孔细胞培养板,置于37℃,5%CO₂培养箱2h,弃包被液,100μL PBS洗涤一次,晾干待用。处于对数期的HepG2细胞,弃去培养皿中的生长培养基(12%FBS,1%NEAA的DMEM),胰蛋白酶消化后以分析培养基(1%NEAA的DMEM)重悬细胞,计数后,20000/well接种于黑色的96孔细胞培养板中,每孔80μL,37℃,5%CO₂条件下培养过夜。次日,以分析培养基稀释PCSK9和抗体(终浓度如图所示),加入到96孔板中,体系终体积为100μL。将细胞培养板放置到37℃,5%CO₂条件下培养21h。取出培养板,每孔加入10μL 0.1mg/mL BODIPY标记的LDL溶液,将培养板置于37℃,5%CO₂条件下培养9h。从培养箱取出培养板,弃去培养基,每孔加入200μL PBS洗涤培养板后弃去。每孔加入100μL PBS用多标记微孔板检测仪,以485nm为激发光波长,以535nm为发射光波长,在细胞培养板上读取相对荧光单位(Relative Fluorescence units,RFU)数值。

[0132] 实验结果:实验结果如表4,图4,图5所示,MAB1可有效的与野生型PCSK9及功能增强突变型PCSK9(PCSK9-D374Y)结合,有效阻断PCSK9对LDL内吞的抑制,其与同靶点已上市药物Evolocumab活性相当。

[0133] 表4.MAB1抑制野生型和功能增强突变型PCSK9对LDLR内吞的EC50

	EC50(μg/mL)	
	MAB1	Evolocumab
[0134] 野生型 PCSK9	32.87	30.79
功能增强突变型 PCSK9 (PCSK9-D374Y)	1.102	1.259

[0135] 实施例4.MAB1解除野生型PCSK9蛋白对突变型LDLR介导的LDL内吞的抑制

[0136] PCSK9蛋白结合于LDLR发挥调控LDL-C代谢的功能。LDLR基因突变的众多,以LDLR蛋白合成与功能为基础突变可划分为1)LDLR不表达型突变,包括LDLR等位基因不表达即细胞不表达LDLR,具体的有启动子序列突变、无义突变、移码突变、剪接突变等,以及LDLR转运缺陷即有缺陷的LDLR合成后无法从内质网向高尔基体的转运进而堆积胞内被分解;2)为结合缺陷型基因突变,即突变基因编码的异常LDLR可转运并在细胞表面表达,但是结合LDL-C的活性下降或者消失;3)内移缺陷型基因突变,即由于编码NPVY序列的密码子发生突变,受体能与LDL结合但不能被内吞从而聚集于被覆陷窝;4)再循环缺陷型基因突变,即受体能够结合LDL-C并介导内吞但是将会在溶酶体内与LDL-C同时降解,导致LDLR不能够再循环到细胞表面。本实验以野生型LDLR(即对应下面突变型LDLR(D227E)的第227位氨基酸为D),突变型LDLR(D227E) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3690/>)作为对照,评价不同突变型LDLR内吞LDL活性、PCSK9对不同突变型LDLR内吞LDL的抑制以及MAB1是否有效解除PCSK9介导的LDL内吞的抑制作用。

[0137] 实验方法:293T细胞常规消化铺板,5*10⁵/孔接种至6孔板中,2mL DMEM+10%FBS+

1%双抗(Penicillin Streptomycin,Gibco,货号:15140-122),置于培养箱孵育过夜;转染前2h换液,换成1mL的Opti-MEM无血清培养基;Opti-MEM分别稀释目的质粒DNA(中山康方生物医药有限公司构建,见表5,以野生型LDLR为基础,以起始密码子编码的氨基酸为位置1,按照表5进行相应位置的定点突变后,插入到购自YouBio公司的慢病毒质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-puro,获得表5中的各个质粒)和PEI(Polyscience,货号:23966),目的质粒与对照质粒(中山康方生物医药有限公司构建,见表5)(各2 μ g,PEI 10 μ g(单转的PEI用量5 μ g),稀释好的DNA和PEI混匀孵育15min后缓慢滴加到6孔板内,轻轻摇匀,置于培养箱孵育过夜;将6孔板内培养基换成2mL DMEM+10%FBS,置于培养箱继续培养;转染48h后,0.05%胰酶-EDTA消化离心收集细胞,计数;取部分细胞做reporter assay实验,2 $\times 10^5$ /孔,100 μ L DMEM+10%FBS,PBS和IL-6(康方生物,批号:20150421)(50ng/mL)组,孵育过夜后加50 μ L底物(Bright-GloTMluciferase assay system,Promega,货号:E2620)读取RLU值;取部分细胞做LDL内吞(FACS)实验,200 μ L Opti-MEM+1%NEAA,2 $\times 10^5$ /孔,PCSK-9、hIgG1(康方生物,批号:20170424)、MAB1终浓度分别为600nM、50 μ g/mL、50 μ g/mL,PCSK-9与抗体预孵育后给药,与细胞孵育过夜。

[0138] 按实验设计加入对应的LDL(BODIPY-LDL,Life,货号:L3483)(终浓度为0.001mg/mL),混匀孵育4h;

[0139] 收集细胞转移至尖底96孔板中,350 $\times$ g离心5min,弃上清;加200 μ L 1%PBSA重悬细胞沉淀,350 $\times$ g离心5min,弃上清,重复洗涤一次;加200 μ L 1%PBSA重悬细胞沉淀,转移至流式管中,上机检测。

[0140] 实验结果如表5,以野生型LDLR为例,LDL内吞率为11.50%,加入PCSK9后内吞率为7.23%,表明PCSK9阻断了LDLR对LDL的内吞,在LDL和PCSK9的基础上加入MAB1,内吞率为8.53%,表明MAB1可有效解除PCSK9介导的LDL内吞的抑制作用。表中突变序列信息均来源于文献及相关在线数据库(Liang L et al.,Scientific Reports.2015;5(1):17272.;<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)。

[0141] 表5野生型LDLR和不同突变型LDLR对BODIPY-LDL的内吞率%

突变位点	质粒	LDL 内吞率%				PCSK9抑制率%
		LDL	LDL+PCSK9	LDL+PCSK9+hlgG1	LDL+PCSK9+MAB1	
hLDLRFL (野生型)	pCDH-hLDLRFL-puro	11.50	7.23	6.27	8.53	37.13
Asp227Glu (hLDLR(D227E))	pCDH-hLDLR(D227E)-puro	11.30	6.72	7.63	11.60	40.53
Glu179Lys	pCDH-hLDLRmt2-puro	9.30	2.04	2.21	7.11	78.06
His583Asp	pCDH-hLDLRmt3-puro	7.56	2.88	2.96	6.06	61.90
Asp172Asn	pCDH-hLDLRmt4.1-puro	11.30	4.71	4.22	10.90	58.32
Leu575Phe	pCDH-hLDLRmt4.2-puro	7.18	5.01	5.08	5.93	30.22
Cys255Arg	pCDH-hLDLRmt6.2-puro	11.90	7.08	6.75	9.77	40.50
Gly636Val	pCDH-hLDLR020-puro	9.79	4.72	4.83	8.24	51.79
Gly98Ser	pCDH-hLDLR059.1-puro	11.60	7.11	7.47	9.96	38.71
Asp94Asn	pCDH-hLDLR0123.1-puro	11.60	3.98	3.34	7.42	65.69
Ala459Thr	pCDH-hLDLR0123.2-puro	9.69	6.74	7.40	8.90	30.44
His583Tyr	pCDH-hLDLR0160-puro	9.04	6.36	6.96	8.17	29.65

[0143] 研究结果显示,当突变型LDLR具有内吞LDL活性,且PCSK9能抑制其对LDL的内吞时,加入MAB1可显著增加LDL的内吞,即MAB1可有效解除PCSK9介导的LDL内吞的抑制作用。

SEQUENCE LISTING

<110> 康融东方(广东)医药有限公司

<120> 抗PCSK9抗体及其应用

<130> IB196939

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

gagggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ctggtgcagc ccggaagatc tctgagactg      60
agttgcgccg cttcaggatt caccttttagc tectacagca tgaactgggt gcggcaggct      120
cctggcaagg ggctggagtg ggtctccgga atctctagtt caagctccta cattagctat      180
gcagactccg tccaggaag gttcaccatc tctcgcgata acggcaagaa cagcctgtat      240
ctgcagatga acagcctgcg agcagaggac acagccctgt acttctgtgc cagagaatat      300
gacttctggt ccgcctatta cgacgccttc gatgtctggg gacaggggac tatggtcact      360
gtctcaagc

```

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<400> 2

```

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Glu Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Tyr Asp Ala Phe Asp Val
100          105          110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 3

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3
 cagagcgaac tgactcagcc aagaagcgtc agtggatcac ctggccagag cgtgacaatc 60
 tcctgcaccg gcacaagcag gaacattggc gggggaaatg acgtccactg gtaccagcag 120
 catccaggga agggccccc aaactgctgac tccggagtga ttgagcggag ctccggcgctc 180
 cccgatagat tcagcgggtc caagtctgga aacacagctt ctctgactat cagtggcctg 240
 caggcagagg acgaagccga ttactattgc cagtctttcg acggcagttc gtcaggggagc 300
 gtgttttgca ctgggaccga tgtgaccgtc ctg 333

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 4
 Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Arg Asn Ile Gly Gly Gly
 20 25 30
 Asn Asp Val His Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Ser Gly Val Ile Glu Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

[0002] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Gly Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Thr Gly Thr Asp Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 6
 Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 7

Glu Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Tyr Asp Ala Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Ser Arg Asn Ile Gly Gly Gly Asn Asp
 1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Gly Val Ile
 1

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Gln Ser Phe Asp Gly Ser Leu Ser Gly Ser Val
 1 5 10

[0003]

<210> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

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

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

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Val
 50 55 60

Lys Gly Lys Val Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Gly Phe Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115	120	125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr 130	Ser Glu Ser Thr 135	Ala Ala Leu Gly Cys Leu 140
Val Lys Asp Tyr Phe 145	Pro Glu Pro Val Thr 150	Val Ser Trp Asn Ser Gly 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly 165	Val His Thr Phe 170	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser 180	Val Val Thr Val Pro Ser Ser 185 190	Ser Leu
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr 195	Cys Asn Val Asp His Lys 200 205	Pro Ser Asn Thr
Lys Val Asp Lys Arg Val 210	Glu Ser Lys Tyr Gly 215 220	Pro Pro Cys Pro Pro
Cys Pro Ala Pro Glu Phe 225 230	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 235 240	Pro
Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 250 255	
Cys Val Val Val Asp Val Ser 260	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn 265 270	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 285	
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr 290 295	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 300	
Leu His Gln Asp Trp Leu 305 310	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 315 320	
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser 325	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 330 335	
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu 345 350	
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 355	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 360 365	
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370 375	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 380	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385 390	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 395 400	
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr 405	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly 410 415	
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		

[0004]

	420	425	430
	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	435	440	
<210>	12		
<211>	214		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<400>	12		
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn			
	20	25	30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile			
	35	40	45
Lys Tyr Thr Ser Gln Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr			
65	70	75	80
[0005]	Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Arg		
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210		

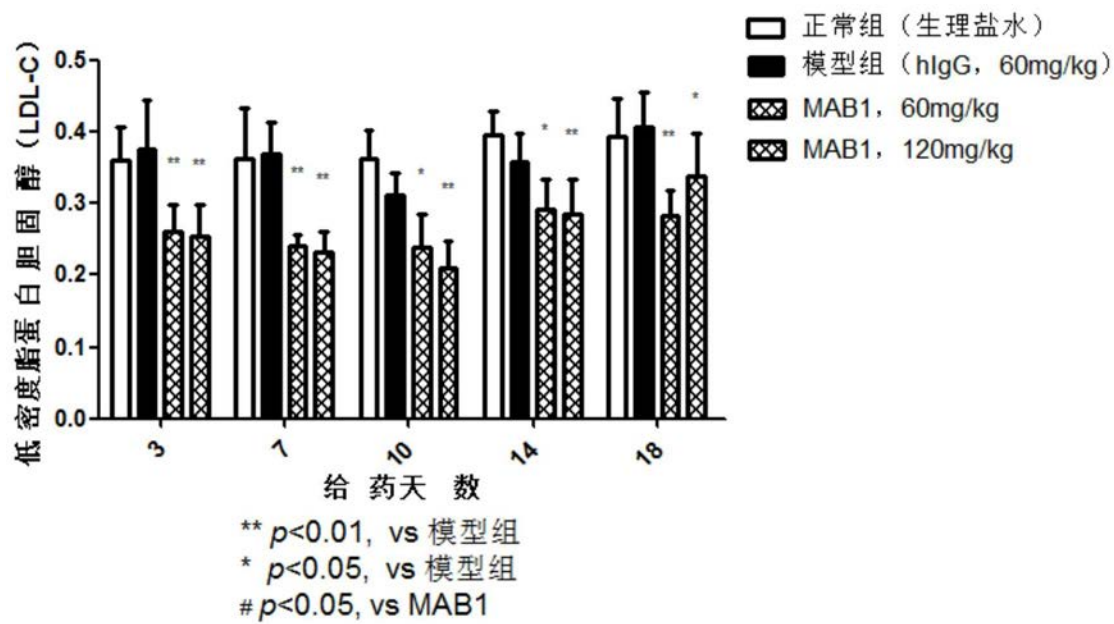


图1

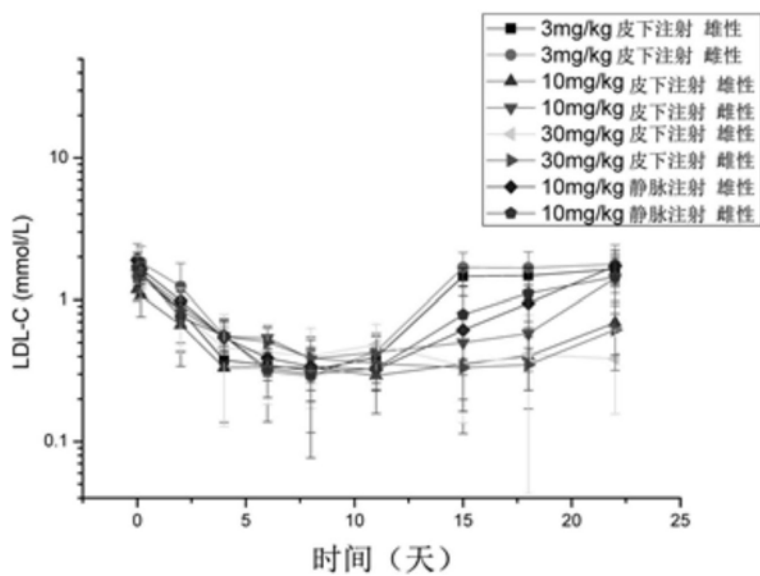


图2

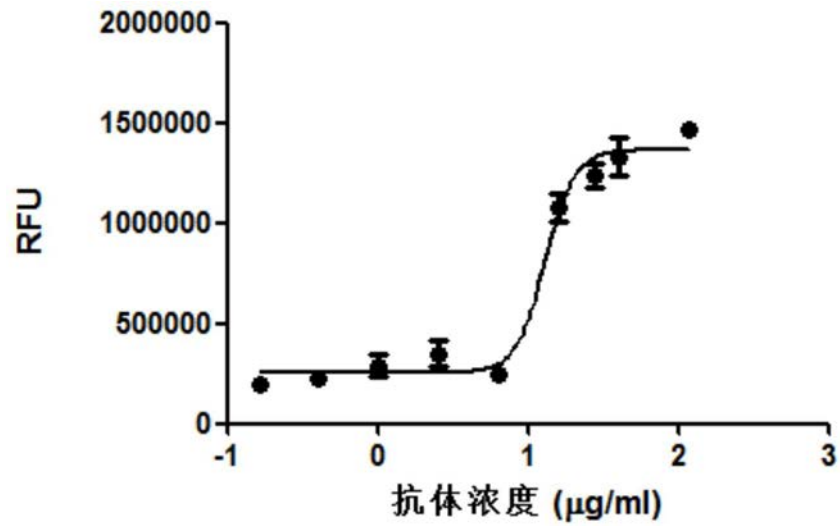


图3

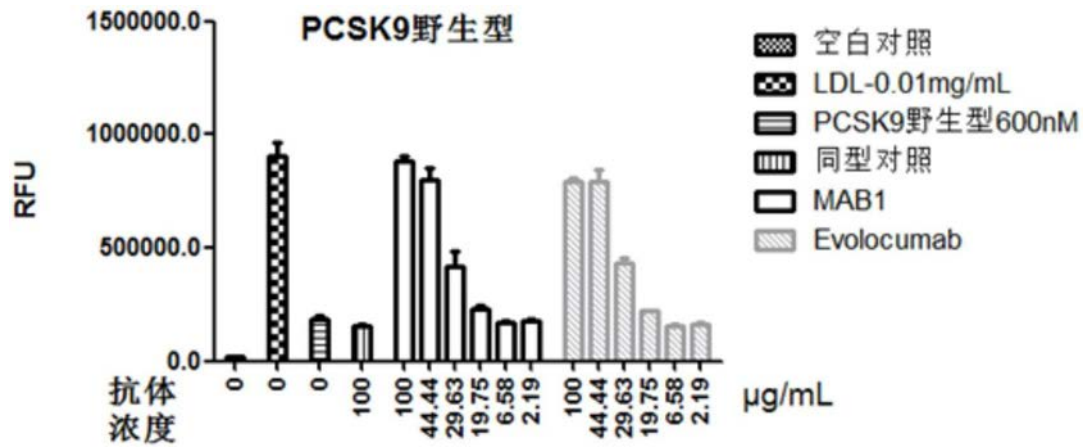


图4

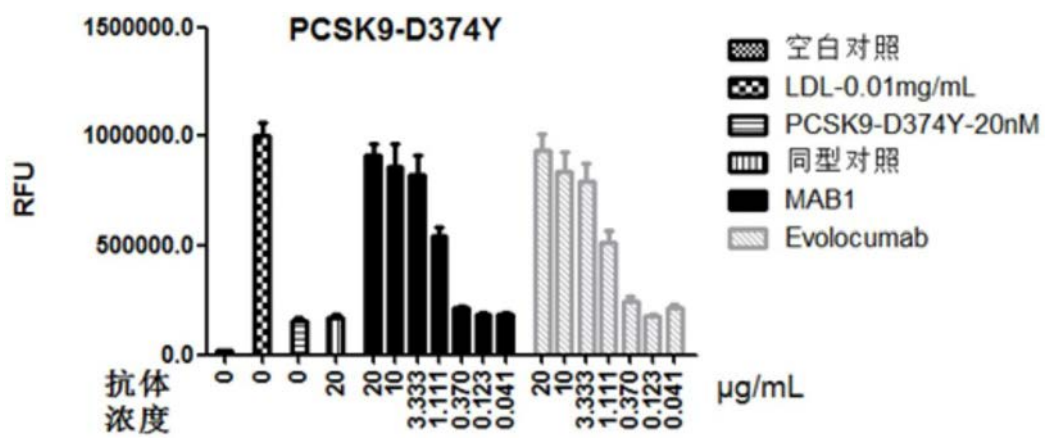


图5