



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I445716 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：098130562

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C12N5/12 (2006.01)

A61P3/06 (2006.01)

(30)優先權：2008/09/12 美國

61/096,716

2009/08/07 美國

61/232,161

2009/08/20 美國

61/235,643

(71)申請人：禮納特神經系統科學公司 (美國) RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION (US)  
美國

輝瑞股份有限公司 (美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：梁鴻 LIANG, HONG (US)；艾比迪奇 亞斯米納 ABDICHE, YASMINA NOUBIA (GB)；加帕洛瑞格斯 傑維爾 CHAPARRO RIGGERS, JAVIER FERNANDO (DE)；格姆斯 布魯斯 GOMES, BRUCE CHARLES (US)；赫金斯 茱莉 HAWKINS, JULIE JIA LI (US)；彭斯 佳米 PONS, JAUME (ES)；邱夏揚 QIU, XIAYANG (US)；史托普 帕維爾 STROP, PAVEL (US)；王宇莉 WANG, YULI (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

WO 2008057457A2

WO 2008057458A2

WO 2008057459A2

Alborn, WE., et al. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. Clinical chemistry, 2007, 53.10: 1814-1819.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：30 共 0 頁

(54)名稱

P C S K 9 拮抗劑類

PCSK9 ANTAGONISTS

(57)摘要

本發明提供與前蛋白轉化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin kexin type 9)(PCSK9)結合之拮抗抗體、彼之抗原結合部位和適體。本發明亦提供以肽為標靶之抗體，其中該抗體與 PCSK9 結合。本發明進一步提供一種獲得該等抗體及抗體編碼核酸之方法。本發明另關於使用該等抗體及彼等之抗原結合部位以減少低密度脂蛋白(LDL)-膽固醇量及/或供治療及/或預防心血管疾病(其包括治療高膽固醇血症)之治療方法。

The present invention provides antagonizing antibodies, antigen-binding portions thereof, and aptamers that bind to proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9). Also provided are antibodies directed to peptides, in which the antibodies bind to PCSK9. The invention further provides a method of obtaining

such antibodies and antibody-encoding nucleic acid. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and antigen-binding portions thereof to reduce LDL-cholesterol levels and/or for the treatment and/or prevention of cardiovascular disease, including treatment of hypercholesterolemia.

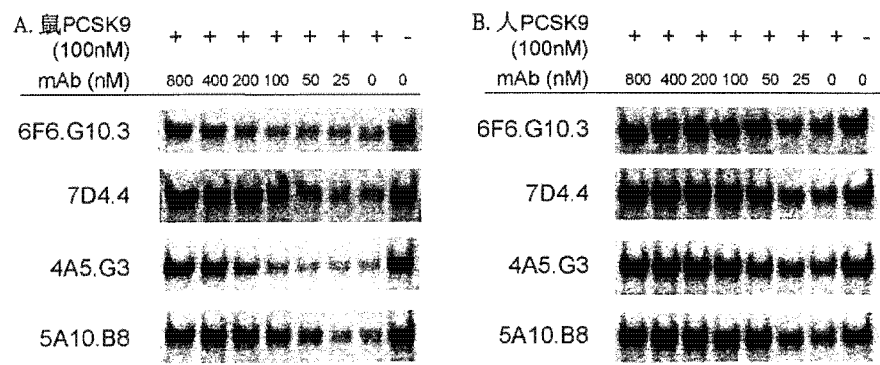


圖 1

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明關於拮抗細胞外前蛋白轉化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin kexin type 9)(PCSK9)之活性的抗體(例如全長抗體或彼之抗原結合部位)、肽及適體，該等活性包括 PCSK9 與低密度脂蛋白(LDL)受體(LDLR)之交互作用。更具體地說，本發明關於包含拮抗劑 PCSK9 抗體、肽及/或適體之組成物，及使用這些抗體及/或肽及/或適體以作為藥物之方法。拮抗劑 PCSK9 抗體、肽及適體可被治療性地使用以降低血中 LDL-膽固醇量，且可被用於預防及/或治療膽固醇及脂蛋白代謝異常，包括家族性高膽固醇血症、致動脈粥樣化之異常血脂症、動脈粥樣硬化症及更普遍地心血管疾病(CVD)。

### 【先前技術】

美國有數百萬人面臨心臟病之風險且導致心臟事件。CVD 和潛在動脈粥樣硬化症係所有人口族群之首要死因，儘管針對其多風險因子之治療是可得的。動脈粥樣硬化症係動脈之疾病，在工業化國家導致與許多死亡有關之冠狀動脈心臟病。數種冠狀動脈心臟病之風險因子現已被發現：包括異常血脂症、高血壓、糖尿病、抽菸、不良飲食、不活動及壓力。最具臨床相關性及常見之異常血脂症之特徵為伴隨高膽固醇血症之乙型脂蛋白(極低密度脂蛋白(VLDL)和 LDL)增加，不論是否有高三酸甘油脂血症

(Fredrickson et al., 1967, N Engl J Med. 276:34-42, 94-103, 148-156, 215-225 and 273-281)。一直以來有關 CVD 之需求明顯地未被滿足，因為即使使用他汀(statins)治療(目前動脈粥樣硬化症之標準治療)仍有 60 至 70%之心血管事件、心臟病發作及中風發生率。另外，新的準則建議應達到更低之 LDL 量以防止高風險病患發生早熟性 CVD [美國膽固醇教育計畫(NCEP), 2004]。

PCSK9 又名 NARC-1，係一在若干形式之家族性高膽固醇血症中被發現之基因突變蛋白質。PCSK9 被合成爲一酶原，其於內質網中進行模體(motif)LVFAQ 之自體催化處理。族群試驗顯示，若干 PCSK9 突變係「獲得功能」的突變且發生於體染色體顯性高膽固醇血症之個體，然而其他「失去功能(LOF)」的突變係與血漿膽固醇減少有關。此族群之發病率及死亡率試驗清楚地顯示，降低 PCSK9 之功能顯著地減少心血管疾病之風險。

在治療 CVD 上具有顯著重要性的是，LOF 突變使人對他汀敏感化，能以較低劑量得到療效(因此改善與安全性及耐受性有關之風險)且相較於現行治療可能達到較低之血漿膽固醇量。

PCSK9 主要係由肝細胞分泌至血漿。小鼠中 PCSK9 之基因調節證實 PCSK9 具有調節血脂肪之能力，且暗示其下調(down-regulate)肝臟 LDLR 蛋白量之作用。

PCSK9 下調 LDLR 蛋白所憑藉之機構及所發生之部位尚未被清楚建立。當過度表現時，PCSK9 可在肝細胞內作



用，同時可作為 LDLR 之分泌性配位體。有強烈證據顯示，細胞外 PCSK9 與細胞表面 LDLR 結合且促使 LDLR 於胞內部位降解。然而，PCSK9 亦有可能與 LDLR 發生交互作用，當二者係於內質網(ER)內轉譯且經由內體結構被運往細胞膜時。麥斯威爾等人(Maxwell et al., 2005, Curr. Opin. Lipidol. 16:167-172)的研究顯示，PCSK9 媒介性 LDLR 內攝作用和降解不會被蛋白酶體抑制劑改變，也不會受到不同類型的溶酶體及非溶酶體蛋白酶之調節。二個天然發生之家族性高膽固醇血症突變 S127R 和 D129G 已被報告為自加工及分泌缺陷，因為這些突變蛋白質在轉染細胞培養基中之量大幅降低或無法偵測。然而這些突變顯示增進下調 LDLR 之能力，與彼等可在高血漿 LDL 之個體中識別吻合(Homer et al., 2008, Atherosclerosis 196:659-666; Cameron et al., 2006 Human Molecular Genetics 15:1551-1558; Lambert et al., 2006, TRENDS in Endocrinology and Metabolism 17:79-81)。由於該些突變很明顯地不會被分泌至細胞外但仍下調 LDLR，因此強烈建議胞內作用部位具生理重要性。

在本發明以前從該領域可取得之訊息仍無法得知，導入以抗體、肽或適體為基底之 PCSK9 拮抗劑至血液循環以選擇性拮抗細胞外 PCSK9，是否能有效減少高膽固醇血症及相關 CVD 之發生率，且如果可以的話，PCSK9 拮抗劑之何種性質係為該活體內有效性之所必需。

## 【發明內容】

## 發明摘要

本發明關於選擇性地與 PCSK9 交互作用且抑制 PCSK9 功能之拮抗劑抗體、肽及適體。本發明首次證明特定 PCSK9 拮抗劑類可於活體內有效降低血中膽固醇。

在一實施態樣中，本發明提供一種經分離之 PCSK9 拮抗劑，其包含與 PCSK9 交互作用且對個體投予時降低該個體血中 LDL-膽固醇量之抗體、肽或適體。該拮抗劑可為抗體，例如單株抗體或人抗體、人化抗體、或嵌合抗體。

在另一實施態樣中，本發明提供一種經分離之抗 PCSK9 抗體，該抗體與 PCSK9 專一性結合且當利用文中所揭示之 Huh7 細胞之 LDLR 下調試驗進行活體外測量時，該抗體係 PCSK9 媒介效應 LDLR 量之完全拮抗劑。

在另一實施態樣中，本發明提供一種經分離之抗體，該抗體拮抗以活體外 PCSK9 與 LDLR 結合所測量之 PCSK9 與 LDLR 之細胞外交互作用，且對個體投予時降低該個體血中 LDL 膽固醇量。較佳的是，該抗體辨識人 PCSK9 上之表位，該表位係與 LDLR 之 EGF 樣結構域交互作用的 PCSK9 表面重疊超過約 75%，如 Kwon et al., 2008, PNAS, 105:1820-1825 所述。

在另一實施態樣中，本發明提供一種抗體，該抗體辨識 PCSK9 之第一表位，該第一表位與經單株抗體辨識之第二表位重疊，該單株抗體選自 5A10(其係由寄存於美國

菌種保存中心(ATCC)之登錄號 PTA-8986 的雜交瘤細胞系所產製)、4A5(其係由寄存於美國菌種保存中心之登錄號 PTA-8985 的雜交瘤細胞系所產製)、6F6(其係由寄存於美國菌種保存中心之登錄號 PTA-8984 的雜交瘤細胞系所產製)或 7D4(其係由寄存於美國菌種保存中心之登錄號 PTA-8983 的雜交瘤細胞系所產製)。

在另一實施態樣中，本發明提供一種抗人 PCSK9 抗體，其中該抗體辨識人 PCSK9 上之表位，該表位包含 PCSK9 胺基酸序列 SEQ ID NO: 53 之胺基酸殘基 153 至 155、194、195、197、237 至 239、367、369、374 至 379 和 381。較佳的是，該人 PCSK9 上之抗體表位不包含一或多個胺基酸殘基 71、72、150 至 152、187 至 192、198 至 202、212、214 至 217、220 至 226、243、255 至 258、317、318、347 至 351、372、373、380、382 和 383。

在另一實施態樣中，本發明提供一種與 PCSK9 專一性結合之抗體，該抗體包含具有 SEQ ID NO: 8(SYYMH)所示之胺基酸序列的 VH 互補決定區 1(CDR1)、具有 SEQ ID NO: 9(EISPFGGRTNYNEKFKS)所示之胺基酸序列的 VH CDR2、及/或具有 SEQ ID NO: 10(ERPLYASDL)所示之胺基酸序列的 VH CDR3、或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 之該等序列中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體，其中該變異體保留實質上與該等序列所定義之 CDR 相同之結合專一性。較佳的是，該變異體包含最多約 10 個胺基酸取代，且更佳的是最多約 4 個胺基酸取代。

本發明另關於一種抗體，該抗體包含具有 SEQ ID NO: 11(RASQGISSALA)所示之胺基酸序列的 VL CDR1、具有 SEQ ID NO: 12(SASYRYT)所示之胺基酸序列的 CDR2、及/或具有 SEQ ID NO: 13(QQRYSLWRT)所示之胺基酸序列的 CDR3、或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 之該等序列中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體，其中該變異體保留實質上與該等序列所定義之 CDR1 相同之結合專一性。較佳的是，該變異體包含最多約 10 個胺基酸取代，且更佳的是最多約 4 個胺基酸取代。

在另一實施態樣中，本發明提供一種抗體，該抗體包含專一性 VL CDR1、CDR2 及/或 CDR3 序列，或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體，且另包含具有 SEQ ID NO: 59、60 或 8 所示之胺基酸序列的 VH 互補決定區 CDR1、具有 SEQ ID NO: 61 或 9 所示之胺基酸序列的 VH CDR2、及/或具有 SEQ ID NO: 10 所示之胺基酸序列的 VH CDR3、或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 之該序列中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體，其中該變異體保留實質上與該等序列所定義之 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 相同之結合專一性。較佳的是，該變異體包含最多約 20 個胺基酸取代，且更佳的是最多約 8 個胺基酸取代。在另一較佳之實施態樣中，本發明之抗體具有包含 SEQ ID NO: 54 或由 SEQ ID NO: 54 所組成之可變重鏈序列及包含 SEQ ID NO: 53 或由 SEQ ID NO: 53 所組成之可變輕鏈序列。

本發明亦提供一種人化抗體，該抗體包含選自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、或 SEQ ID NO:14 及 SEQ ID NO:15 二者、或彼在該等序列中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體的多肽，其中該變異體保留實質上與該等序列所定義之抗體相同之結合專一性。該抗體亦包括在重鏈上缺乏末端離胺酸之抗體，因為在製造期間該離胺酸通常在一部分的抗體中喪失。

較佳的是，該變異體包含最多約 20 個胺基酸取代，且更佳的是，最多約 8 個胺基酸取代。較佳的是，該抗體另包含免疫惰性恆定區，及/或該抗體具有選自 IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgG<sub>2Δa</sub>、IgG<sub>4Δb</sub>、IgG<sub>4Δc</sub>、IgG<sub>4</sub> S228P、IgG<sub>4Δb</sub> S228P 或 IgG<sub>4Δc</sub> S228P 之同型。在另一較佳之實施態樣中，該恆定區係非糖基化 Fc。

在一實施態樣中，本發明提供一種供降低有此需要之個體之血液、血清或血漿中之 LDL、LDL-膽固醇或總膽固醇量的方法，該方法包含對該個體投予治療有效量之本發明之拮抗劑。

在一實施態樣中，本發明提供治療有效量之本發明之拮抗劑以用於降低有此需要之個體之血液、血清或血漿中之 LDL、LDL-膽固醇或總膽固醇量。本發明另提供治療有效量之本發明之拮抗劑於製造供降低有此需要之個體之血液、血清或血漿中之 LDL、LDL-膽固醇或總膽固醇量的藥物之用途。

在另一實施態樣中，本發明提供一種製備與 PCSK9

專一性結合之抗體的方法，該方法包含：a)提供 PCSK9 陰性宿主動物；b)以 PCSK9 對該 PCSK9 陰性宿主動物免疫接種；及 c)獲得抗體。來自該 PCSK9 陰性宿主動物之抗體產製細胞、或抗體編碼核酸，及自該抗體產製細胞或該抗體編碼核酸製備抗體。

本發明亦包含一種供降低有此需要之個體血中 LDL 量的方法，該方法包含對該個體投予治療有效量之本發明所製備之抗體。該個體可進一步藉由投予他汀治療。在較佳之實施態樣中，該個體係人個體。

在一實施態樣中，該抗體係以無菌含水溶液之調製劑投予，該調製劑具有介於約 5.0 至約 6.5 之 pH 值且包含自約 1 毫克/毫升至約 200 毫克/毫升之抗體、自約 1 毫莫耳至約 100 毫莫耳之組胺酸緩衝劑、自約 0.01 毫克/毫升至約 10 毫克/毫升之聚山梨醇酯 80、自約 100 毫莫耳至約 400 毫莫耳之海藻糖 (trehalose) 及自約 0.01 毫莫耳至約 1.0 毫莫耳之 EDTA 二鈉二水合物。

在另一實施態樣中，本發明提供治療有效量之本發明所製備之抗體以用於降低有此需要之個體之血中 LDL 量。本發明另提供治療有效量之本發明所製備之抗體於製造供降低有此需要之個體之血中 LDL 量的藥物之用途。該治療有效量可隨意地與治療有效量之他汀組合。

在另一實施態樣中，本發明提供一種產製 PCSK9 專一性抗體或彼之抗原結合部位之雜交瘤細胞系，其中該雜交細胞系選自：

ATCC 登錄號 PTA-8985 之 4A5；

ATCC 登錄號 PTA-8986 之 5A10；

ATCC 登錄號 PTA-8984 之 6F6；及

ATCC 登錄號 PTA-8983 之 7D4。

在另一實施態樣中，本發明提供一種細胞系，該細胞系重組產製與 PCSK9 專一性結合之抗體且該抗體包含具有 SEQ ID NO: 8、59 或 60 所示之胺基酸序列的重鏈可變區 (VH) 互補決定區 1 (CDR1)、具有 SEQ ID NO: 9 或 61 所示之胺基酸序列的 VH CDR2、及/或具有 SEQ ID NO: 10 所示之胺基酸序列的 VH CDR3、或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體，及/或包含具有 SEQ ID NO: 11 所示之胺基酸序列的輕鏈可變區 (VL) CDR1、具有 SEQ ID NO: 12 所示之胺基酸序列的 VL CDR2、及/或具有 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列的 VL CDR3、或彼在 CDR1、CDR2 及/或 CDR3 中具有一或多個保留性胺基酸取代之變異體。較佳的是，該細胞系重組產製包含 SEQ ID NO: 53 及/或 54 且更佳的是 SEQ ID NO: 14 及/或 15 之抗體。

#### 本發明之詳細說明

本發明關於拮抗細胞外 PCSK9 功能之抗體、肽及適體，該功能包括 PCSK9 與 LDLR 之交互作用。更具體地說，本發明關於製備拮抗劑 PCSK9 抗體、肽及適體之方法，包含該等抗體、肽及/或適體之組成物，及使用該等抗

體、肽及/或適體以作為藥物之方法。該拮抗劑 PCSK9 抗體及肽可被用於降低血中 LDL-膽固醇量，且可被用於預防及/或治療膽固醇及脂蛋白代謝異常，包括家族性高膽固醇血症、致動脈粥樣化之異常血脂症、動脈粥樣硬化症及更普遍地說之 CVD。

#### 一般技術

本發明之實施除非另外說明將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習知技術，彼等係屬於該技藝之技術範圍內。該等技術係於文獻中完全說明，諸如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition(Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis(M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J.E. Cellis, ed., 1998)Academic Press; Animal Cell Culture(R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998)Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures(A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998)J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987);



Current Protocols in Molecular Biology(F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons, 1999); Immunobiology(C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies(P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach(D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach(P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual(E. Harlow and D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies(M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)。

## 定義

「抗體」係能透過至少一個抗原辨識位專一性結合標靶，諸如碳水化合物、多核苷酸、脂質、多肽等之免疫球蛋白分子，該抗原辨識位係位於該免疫球蛋白分子之可變區。文中所使用之該用語不僅包含完整之多株或單株抗體，但亦包含彼等之片段(諸如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、單鏈(ScFv)及結構域抗體)及包含抗體部位之融合蛋白質及任何其他含有抗原辨識位之經修飾構型之免疫球蛋白分子。抗體包括任何類型之抗體，諸如 IgG、IgA 或 IgM(或彼之亞型)，且該抗體不需要是任何特定類型。根據抗體之重

鏈恆定結構域的胺基酸序列，免疫球蛋白可被分成不同類型。有五種主要的免疫球蛋白類型：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，彼等中之數個類型可進一步被分成亞型(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。對應不同類型之免疫球蛋白的重鏈恆定結構域分別被稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同類型之免疫球蛋白的次單位結構及三元構型係廣為周知。

文中所使用之「單株抗體」係指自實質上同源抗體之族群所獲得之抗體，意即該個別抗體包含一致之族群除了少量存在之可能自然發生之突變以外。單株抗體具高度專一性，其針對單一抗原部位。另外，和通常包括針對不同決定位(表位)之不同抗體的多株抗體製劑不同的是，各單株抗體係針對抗原上之單一決定基。修飾語「單株」表示抗體係自實質上同源族群之抗體所獲得之特徵，不應被視為需要藉由任何特定之方法以產製抗體。舉例來說，本發明所使用之單株抗體可藉由最早由 Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495 所描述之雜交瘤方法製備，或可藉由重組DNA方法諸如美國專利號 4,816,567 所述者製備。該單株抗體亦可自例如利用 McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554 所描述之技術所產製之噬菌體文庫分離。

文中所使用之「人化」抗體係指含有源自非人免疫球蛋白之最少序列之嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或彼之片段(諸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或抗體之其他抗原結合

子序列)的非人(例如鼠)抗體之形式。較佳的是，人化抗體係其中源自接受者之互補決定區(CDR)的殘基被源自非人物種(捐贈者抗體)諸如具有該所欲之專一性、親和性及能力之小鼠、大鼠或兔之 CDR 的殘基所取代之人免疫球蛋白(接受者抗體)。在一些實例中，人免疫球蛋白之 Fv 骨架區(FR)殘基被對應之非人殘基取代。另外，該人化抗體可能包含不見於接受者抗體或導入 CDR 或骨架序列中之殘基，該些殘基被包括以進一步改善及最佳化抗體之表現。整體而言，該人化抗體將包含實質上所有之至少一個且通常二個可變結構域，其中所有或實質上所有之對應非人免疫球蛋白之 CDR 區者及所有或實質上所有之 FR 區係人免疫球蛋白一致序列之該等區者。該人化抗體亦將理想地包含至少部分之免疫球蛋白恆定區或結構域(Fc)，通常為人免疫球蛋白之該恆定區或結構域。較佳的是具有如 WO 99/58572 所述經修飾之 Fc 區之抗體。其他形式之人化抗體具有一或多個相對於該原始抗體經改變之 CDR 類(CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2 及/或 CDR H3)，該等 CDR 類亦被稱為一或多個「源自」一或多個來自該原始抗體之 CDR 類的 CDR 類。

文中所使用之「人抗體」係指具有胺基酸序列之抗體，該胺基酸序列對應可由人所產製及/或利用任何該領域之技藝人士所知或本文所揭示之製造人抗體之技術所製備之抗體的胺基酸序列。此定義之人抗體包括包含至少一個人重鏈多肽或至少一個人輕鏈多肽之抗體。一個實例係包

含鼠輕鏈及人重鏈多肽之抗體。人抗體可利用該領域已知之多種技術製備。在一實施態樣中，該人抗體係選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人抗體 (Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:309-314; Sheets et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)。人抗體亦可藉由免疫接種動物加以製備，該動物體內之內源性基因座 (loci) 已被基因轉殖導入之人免疫球蛋白基因座所取代，例如內源性免疫球蛋白基因已被部分或完全不活化之鼠。此方法係於美國專利號 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425 及 5,661,016 中描述。或者，該人抗體可藉由永存化產製針對標靶抗原之抗體的人 B 淋巴細胞加以製備 (該 B 淋巴細胞可自個體收集或已在活體外被免疫)。參見例如 Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 及美國專利號 5,750,373。

抗體之「可變區」係指單獨或組合之抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區。如該領域所知，重鏈及輕鏈之可變區各由四個骨架區 (FR) 組成，該四個骨架區係由含有超可變區之三個互補決定區 (CDR) 所連接。各鏈中之 CDR 藉由 FR 緊密地拉靠在一起且與來自另一鏈中之 CDR 導致抗體之抗原結合位的形成。至少有二種技術用於決定 CDR：(1) 以跨種序列變異性為基礎之方式 (意即 Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5<sup>th</sup> ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)) ; 及 (2) 以 抗 原 - 抗 體 複 合 物 之 結 晶 學 試 驗 為 基 礎 之 方 式 (Al-lazikani et al, 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)。文 中 所 使 用 之 CDR 可 指 以 任 一 種 方 式 或 二 種 方 式 之 組 合 所 定 義 之 CDR。

該 技 藝 中 所 謂 之 抗 體 之 「 恆 定 區 」 係 指 單 獨 或 組 合 之 抗 體 輕 鏈 之 恆 定 區 或 抗 體 重 鏈 之 恆 定 區 。

文 中 所 使 用 之 用 語 「 PCSK9 」 係 指 保 留 至 少 部 分 之 PCSK9 活 性 之 任 何 形 式 之 PCSK9 及 彼 之 變 異 體 。 除 非 不 同 地 指 明 諸 如 特 指 人 PCSK9， 否 則 PCSK9 包 括 所 有 哺 乳 動 物 物 種 之 天 然 序 列 PCSK9， 例 如 人 、 犬 、 貓 、 馬 及 牛 。 一 個 示 範 性 之 人 PCSK9 係 見 於 Uniprot 登 錄 號 Q8NBP7 (SEQ ID NO: 16)。

文 中 所 使 用 之 「 PCSK9 拮 抗 劑 」 係 指 能 抑 制 PCSK9 生 物 活 性 及 / 或 由 PCSK9 信 號 所 媒 介 之 下 游 途 徑 的 抗 體 、 肽 或 適 體 ， 該 由 PCSK9 信 號 所 媒 介 之 下 游 途 徑 包 括 PCSK9 所 媒 介 之 LDLR 下 調 及 PCSK9 所 媒 介 之 LDL 血 液 清 除 減 少 。 PCSK9 拮 抗 劑 抗 體 包 含 阻 斷 、 拮 抗 、 抑 制 或 降 低 (至 任 何 程 度 包 括 顯 著 地 ) PCSK9 生 物 活 性 之 抗 體 ， 該 PCSK9 生 物 活 性 包 括 由 PCSK9 信 號 所 媒 介 之 下 游 途 徑 ， 諸 如 LDLR 交 互 作 用 及 / 或 誘 發 對 PCSK9 之 細 胞 反 應 。 就 本 發 明 之 目 的 而 言 ， 應 清 楚 了 解 的 是 ， 用 語 「 PCSK9 拮 抗 劑 抗 體 」 包 含 PCSK9 本 身 、 PCSK9 生 物 活 性 (包 括 但 不 限

於彼所媒介之與 LDLR 之交互作用、下調 LDLR 及血液 LDL 清除減少之任何態樣之能力)或該生物活性之結果藉以被實質上廢止、降低或中和至任何有意義之程度之先前確認之所有用語、標題及功能狀態及特徵。在一些實施態樣中，PCSK9 拮抗劑抗體與 PCSK9 結合且防止與 LDLR 之交互作用。本發明提供 PCSK9 拮抗劑抗體之實例。

文中所使用之「完全拮抗劑」係指有效濃度時可實質上完全阻斷 PCSK9 可測量效應之拮抗劑。部分拮抗劑係指能部分阻斷可測量效應之拮抗劑，但即使在最高濃度該拮抗劑亦非完全拮抗劑。實質上完全係指至少約 80%，較佳至少約 90%，更佳至少約 95%，且最佳至少約 98%或 99%之可測量效應被阻斷。適切之「可測量效應」係於文中描述且包括在活體外 Huh7 細胞中所測定之 PCSK9 拮抗劑之 LDLR 下調、活體內降低血中(或血漿中)總膽固醇量及活體內降低血中(或血漿中)LDL 量。

文中所使用之用語「臨床上有意義」係指人血中 LDL-膽固醇量至少降低 15%或鼠全血膽固醇降低至少 15%。很清楚的是，血漿或血清測量值可作為血液量測量值之替代值。

文中所使用之用語「PCSK9 拮抗劑肽」或「PCSK9 拮抗劑適體」包括任何習知之阻斷、拮抗、抑制或降低(至任何程度包括顯著地)PCSK9 生物活性之肽或多肽或適體，該 PCSK9 生物活性包括由 PCSK9 信號所媒介之下游途徑，諸如 LDLR 交互作用及/或誘發對 PCSK9 之細胞反應

。 PCSK9 拮抗劑肽類或多肽類包括包含 LDLR 及該 LDLR 之可溶性部分之 Fc 融合，或對 PCSK9 具有較高親和性之彼等之突變。

用語「多肽」、「寡肽」、「肽」及「蛋白質」在文中可交換使用以指稱任何長度較佳的是相對較短(例如 10 至 100 個胺基酸)之胺基酸鏈。該鏈可為線性或分支，其可包含經修飾之胺基酸及/或可被非胺基酸所中斷。該用語亦包含已經天然或人為介入修飾之胺基酸鏈；例如雙硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化或任何其他操作或修飾，諸如與標記成分共軛。該定義亦包括例如包含一或多個胺基酸類似物(包括例如非天然胺基酸等)以及該技藝習知之其他修飾之多肽。應了解的是，該多肽可以單鏈或結合之鏈存在。

如該技藝所習知之「多核苷酸」或「核酸」在文中可交換使用，係指任何長度之核苷酸之鏈，且包括 DNA 及 RNA。該核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基及/或彼等之類似物，或任何可藉由 DNA 或 RNA 聚合酶被納入鏈中之底物。多核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及彼等之類似物。若有的話，對核苷酸結構之修飾可在該鏈組合之前或之後進行。核苷酸之序列可被非核苷酸成分中斷。多核苷酸在聚合之後可進一步被修飾，諸如與標記成分共軛。其它類型之修飾包括例如「冠端(cap)」、以類似物取代一或多個天然發生之核苷酸、核苷酸間修飾諸如例如該些具有不帶電

連結(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸醯胺化物、胺甲酸酯等)及帶電連結(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)者、該些含有懸吊基團者,諸如例如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚離胺酸等)、該些具有嵌入劑(intercalator)者(例如吡啶、補骨脂素等)、該些具有螯合劑者(例如金屬、放射線活性金屬、硼、氧化性金屬等)、該些含有烷基化劑者、該些具有經修飾連結者(例如 $\alpha$ 反構核酸等)以及未經修飾之多核苷酸形式。另外,任何通常存在於糖類中之羥基團可能被例如磷酸基、磷酸基所取代、被標準保護基保護或被活化以製備與額外核苷酸之額外連結,或可能被共軛至固體支持物。該5'及3'端OH可被磷酸化或被胺類或自1至20個碳原子之有機封端基團取代。其他羥基亦可被衍生成為標準保護基團。多核苷酸亦可包含該領域通常已知之類似形式之核糖或去氧核糖糖類,包括例如2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基核糖、2'-氟代-核糖或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 $\alpha$ 或 $\beta$ 反構糖類、差向異構體糖類諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、吡喃糖糖類、呋喃糖糖類、景天酮庚糖、非環類似物及無鹼基核苷類似物諸如甲基核糖苷。一或多個磷酸二酯連結可被可選擇的連接基團取代。該些可選擇的連接基團包括但不限於其中磷酸鹽被 $P(O)S$ (「硫代鹽」)、 $P(S)S$ (「二硫代鹽」)、 $(O)NR_2$ (「醯胺化物」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、CO或 $CH_2$ (“formacetal”)取代之實施態樣,其中各R或R'係獨立地H或經取代或未經取代之烷基(1至20個碳),該烷基



可選擇的含有醚(-O-)連結、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基。在多核苷酸中之所有連結不需要完全相同。前面的敘述適用於文中所指稱之所有多核苷酸，包括 RNA 及 DNA。

包含核酸或蛋白質序列之「PCSK9 拮抗劑適體」係選自例如大量之隨機序列且與 PCSK9 專一性結合。該適體之核酸係雙股 DNA 或單股 RNA。核酸適體可包括經修飾之鹼基或官能基團，包括但不限於 2'-氟核苷酸及 2'-O-甲基核苷酸。適體可包括親水性聚合物，例如聚乙二醇。適體可藉由該領域已知之方法製造且可藉由例行性修飾實施例所揭示之方法選擇 PCSK9 拮抗劑活性。

如文中所使用，當以實施例 2 於文中所揭示之方法測量之平衡解離常數等於或小於 20 奈莫耳，較佳小於約 6 奈莫耳，更佳小於約 1 奈莫耳，最佳小於約 0.2 奈莫耳時，抗體、肽或適體與 PCSK9「交互作用」。

表位與抗體或多肽「優先性結合」或「專一性結合」(在文中可交換使用)之用語係該領域廣為周知，用於決定該專一性或優先性結合之方法亦為該領域所廣為周知。若分子與特定細胞或物質之交互作用或結合相較於彼與其他細胞或物質之該等作用更為頻繁、更為快速、作用期間更長及/或親和性(affinity)更高時，該分子被稱為展現「專一性結合」或「優先性結合」。若抗體以相較於彼與其他物質結合時更高之親和性、親合力(avidity)、更快速及/或更長期間地與標靶結合時，該抗體與標靶「專一性結合」。

或「優先性結合」。舉例來說，與 PCSK9 表位專一性或優先性結合之抗體係指相較於彼與其他 PCSK9 表位或非 PCSK9 表位結合時以更高之親和性、親合力、更快速及/或更長期間地與此表位結合之抗體。由閱讀此定義亦可了解，例如與第一標靶專一性或優先性結合之抗體(或基團或表位)可與或不可與第二標靶專一性或優先性地結合。因此，「專一性結合」或「優先性結合」不一定需要(雖然其可包括)排除性結合。一般來說但不是一定，所謂的結合係指優先性結合。

文中所使用之「實質上純的」係指其為至少 50%純的(也就是不含污染物)，更佳的是至少 90%純的，更佳的是至少 95%純的，甚至更佳的是至少 98%純的，且最佳的是至少 99%純的物質。

「宿主細胞」包括可為或已是用於導入多核苷酸插入物之載體之接受者的個別細胞或細胞培養。宿主細胞包括單一宿主細胞之後代，且因為天然、意外或蓄意突變使該後代(在形態學或基因 DNA 互補性上)不一定與原始親代細胞完全相同。宿主細胞包括以本發明之多核苷酸在活體內轉染之細胞。

如該領域所知，用語「Fc 區」係用於定義免疫球蛋白重鏈之 C 末端區。該「Fc 區」可為天然序列 Fc 區或變異 Fc 區。雖然免疫球蛋白重鏈之 Fc 區的邊界可能不同，人 IgG 重鏈 Fc 區通常被定義為從位置 Cys226 之胺基酸殘基或從 Pro230 延伸至彼之羧基末端。Fc 區中之殘基編號係

如卡巴 (Kabat) 中之 EU 指數。Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. 免疫球蛋白之 Fc 區通常包含二個恆定結構域 CH2 及 CH3。

該領域所使用之「Fc 受體」及「FcR」描述與抗體之 Fc 區結合之受體。較佳之 FcR 係天然序列之人 FcR。另外，較佳之 FcR 係與 IgG 抗體結合之受體( $\gamma$  受體)且包括 Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII 及 Fc $\gamma$  RIII 亞型受體，包括該等受體之對偶變異體及可選擇的剪接形式。Fc $\gamma$  RII 受體包括 Fc $\gamma$  RIIA(「活化受體」)及 Fc $\gamma$  RIIB(「抑制受體」)，該等受體具有類似之胺基酸序列，該些序列主要在彼等之細胞質結構域有所不同。FcR 係於 Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34 及 de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 中回顧。「FcR」亦包括新生兒受體 FcRn，該受體負責轉運母體 IgG 至胎兒 (Guyer et al., 1976, J. Immunol., 117:587; and Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249)。

文中關於抗體所使用之用語「競爭」係指第一抗體或彼之抗原結合部位以充分類似於第二抗體或彼之抗原結合部位之結合的方式與表位結合，使得該第二抗體存在時該第一抗體與彼之同源表位之結合的結果相較於該第二抗體不存在時該第一抗體之結合係可偵測地降低。或者，該情

況可為但不一定是當該第一抗體存在時，該第二抗體與彼之表位之結合亦可偵測地降低。也就是說，第一抗體可抑制第二抗體與彼之表位之結合，但第二抗體不抑制該第一抗體與彼之個別表位之結合。然而，當各抗體不論以相同、較高或較低程度可偵測地抑制另一抗體與彼之同源表位或配位體結合時，該等抗體被稱為彼此「交叉競爭」與彼等個別表位之結合。本發明包含競爭及交叉競爭抗體。不論該競爭或交叉競爭所藉以發生之機制為何（例如立體阻礙、形態變化、或與共同表位或彼之部分結合），技藝人士將了解根據文中所提供之教示，該競爭及/或交叉競爭抗體係包含且可用於文中所揭示之方法中。

抗體具有與其它(第二)表位或與 LDLR 之 EGF 樣結構域交互作用的 PCSK9 表面「重疊」之表位，係指分享就交互作用之 PCSK9 殘基而言之空間。為了計算重疊之百分比，舉例來說，該請求的抗體之 PCSK9 表位和與 LDLR 之 EGF 樣結構域交互作用的 PCSK9 表面之重疊百分比，意即當與 LDLR 形成複合物時被埋入之 PCSK9 之表面積係以每殘基為基礎計算。該被埋入之面積亦根據 PCSK9:抗體複合物中之該些殘基計算。為了避免超過 100%可能的重疊，在 PCSK9:抗體複合物中相較於 LDLR:PCSK9 複合物具有更高之埋入表面積的殘基表面積從 LDLR:PCSK9 複合物(100%)開始設定數值。面積重疊百分比係藉由加總所有 LDLR:PCSK9 交互作用之殘基加以計算且經交互作用面積之加權。

「功能性 Fc 區」具有天然序列 Fc 區之至少一個效應物功能。示範性「效應物功能」包括 C1q 結合、補體依賴性細胞毒性、Fc 受體結合、抗體依賴性細胞媒介性細胞毒性、吞噬作用、下調細胞表面受體(例如 B 細胞受體)等。該等效應物功能通常需要 Fc 區與結合結構域(例如抗體可變結構域)組合且可利用該領域已知之用於評估該抗體效應物功能之各種測定偵測。

「天然序列 Fc 區」包含與天然發現之 Fc 區的胺基酸序列完全相同之胺基酸序列。「變異 Fc 區」包含與天然序列 Fc 區有至少一個胺基酸修飾之差異的胺基酸序列，但仍保留該天然序列 Fc 區之至少一個效應物功能。較佳的是，該變異 Fc 區相較於天然序列 Fc 區或親代多肽之 Fc 區具有至少一個胺基酸取代，例如自約 1 個至約 10 個胺基酸取代，且較佳的是在天然序列 Fc 區或親代多肽之 Fc 區之自約 1 個至約 5 個胺基酸取代。文中之變異 Fc 區將較佳地具有與天然序列 Fc 區及/或與親代多肽之 Fc 區至少約 80%之序列一致性，最佳的是具有與彼等至少約 90%之序列一致性，更佳的是具有與彼等至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、至少約 99%之序列一致性。

文中所使用之「治療」係指得到有益或所欲臨床結果之方法。就本發明之目的而言，有益或所欲之臨床結果包括但不限於下列一或多項：增進 LDL 清除及降低異常膽固醇及/或脂蛋白量之發生率或改善異常膽固醇及/或脂蛋

白量，該異常膽固醇及/或脂蛋白量係因代謝及/或飲食失調所致或包括家族性高膽固醇血症、致動脈粥樣化之異常血脂症、動脈粥樣硬化症及更普遍地說之心血管疾病(CVD)。

「降低發生率」係指任何嚴重性之降低(其可包括降低對通常用於治療該狀況之其他藥物及/或治療的需要及/或量(例如暴露))。如該領域之技藝人士所了解的，個體就他們對治療的反應而言可能不同，因此舉例來說，「降低發生率之方法」顯示根據合理的期待投予 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可能造成該發生率在該特定個體降低而投予。

「改善」係指相較於不投予 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體時減少或改善一或多種症狀。「改善」亦包括縮短或減少症狀之期間。

文中所使用之藥物、化合物或醫藥組成物之「有效劑量」或「有效量」係指足以影響任何一種或多種有益或所欲結果之量。就預防性用途而言，有益或所欲結果包括消除或減輕風險、降低嚴重性或延遲該疾病之開始，包括該疾病之生化學、組織學及/或行為學症狀，彼之併發症及在疾病發展期間所表現之中間病理表現型。就治療用途而言，有益或所欲之結果包括諸如減少高膽固醇血症或異常血脂症、動脈粥樣硬化症、CVD 或冠狀動脈心臟病之一或多種症狀、降低治療該疾病所需之其他藥物的劑量、增進其他藥物之效果及/或延緩病患之疾病進展之臨床結果。

有效劑量可分一或多次投予。就本發明之目的而言，藥物、化合物或醫藥組成物之有效劑量係足以直接或間接完成預防性或治療性治療之量。如臨床意義上所了解的，藥物、化合物或醫藥組成物之有效劑量可能與或不與另一藥物、化合物或醫藥組成物組合達到。因此，「有效劑量」可能被認為是投予一或多種治療劑的情況下，且單一劑可被認為是給予有效量若與一或多種其他劑組合時可能或係經達成所欲之結果。

「個體」或「對象」係哺乳動物，更佳為人。哺乳動物亦包括但不限於農場動物、運動動物、寵物、靈長動物、馬、犬、貓、小鼠及大鼠。

文中所使用之「載體」係指建構物，其能在宿主細胞中傳送且較佳的是表現感興趣之一或多個基因或序列。載體之實例包括但不限於病毒性載體、裸 DNA 或 RNA 表現載體、質體、黏質體或噬菌體載體、與陽離子縮合劑有關之 DNA 或 RNA 表現載體、包封於脂質體中之 DNA 或 RNA 表現載體及特定真核細胞諸如生產細胞。

文中所使用之「表現控制序列」係指導核酸轉錄之核酸序列。表現控制序列可為啟動子，諸如持續性或誘導性啟動子或促進子。表現控制序列係可操作地與所欲轉錄之核酸序列連接。

文中所使用之「醫藥上可接受之載劑」或「醫藥上可接受之賦形劑」包括任何當與活性成分組合時能使該成分保留生物活性且不與該對象之免疫系統反應之任何物質。

實例包括但不限於任何標準醫藥載劑諸如磷酸鹽緩衝鹽水溶液、水、乳化液諸如油/水乳化液及各種類型之潤濕劑。較佳之用於噴霧或非經腸投予之稀釋劑係磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或生理(0.9%)鹽水。包含該等載劑之組成物係由眾所周知之習知方法調製(參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing, 2000)。

文中所使用之用語「 $K_{on}$ 」係指抗體與抗原之結合速率常數。具體地說，速率常數( $K_{on}$  及  $K_{off}$ )與平衡解離常數係利用 Fab 抗體片段(意即單價)及 PCSK9 測量。

文中所使用之用語「 $K_{off}$ 」係指抗體自抗體/抗原複合物解離之速率常數。

文中所使用之用語「 $K_D$ 」係指抗體-抗原交互作用之平衡解離常數。

#### A. 用於預防或治療與高膽固醇血症有關之異常之方法

在一方面中，本發明提供一種用於治療或預防個體之高膽固醇血症，及/或異常血脂症、動脈粥樣硬化症、CVD 或冠狀動脈心臟病之至少一種症狀之方法，該方法包含對該個體投予有效量之拮抗循環 PCSK9 之 PCSK9 拮抗劑抗體或肽或適體。

在另一方面中，本發明提供有效量之拮抗循環 PCSK9 之 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體以用於治療或預防個體



之高膽固醇血症，及/或異常血脂症、動脈粥樣硬化症、CVD 或冠狀動脈心臟病之至少一種症狀。本發明另提供有效量之拮抗細胞外或循環 PCSK9 之 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體於製造治療或預防個體之高膽固醇血症，及/或異常血脂症、動脈粥樣硬化症、CVD 或冠狀動脈心臟病之至少一種症狀上的藥物之用途。

有利的是，治療性投予該抗體、肽或適體導致較低之血中膽固醇及/或較低之血中 LDL。較佳的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予之前至少降低約 10% 或 15%。更佳的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低約 20%。甚至更佳的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低 30%。有利的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低 40%。更為有利的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低 50%。非常更佳的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低 60%。最佳的是，血中膽固醇及/或血中 LDL 相較於投予該抗體之前至少降低 70%。

就文中所描述之所有方法而言，提及 PCSK9 拮抗劑抗體、肽及適體亦包括包含一或多種額外劑類之組成物。該等組成物可能進一步包含適當之賦形劑，諸如醫藥上可接受之賦形劑包括該領域眾所周知之緩衝劑。本發明可被單獨或與其他習知之治療方法組合使用。

該 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可經由任何適當之

途徑對個體投予。對該領域之技藝人士顯而易見的是，文中所描述之實例不應意圖限制而是說明可取得之技術。因此，在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體係根據已知方法對個體投予，諸如靜脈內投予例如快速濃注或在一段時間內連續輸注、肌肉內、腹腔內、腦脊髓腔內、經皮、皮下、關節內、舌下、滑膜內、經吹氣、鞘內、經口、吸入或局部途徑。投予可為系統性例如靜脈內投予或局部性。市售之用於液體調製劑之噴霧器包括噴射噴霧器及超音波噴霧器可被用於投予。液體調製劑可經直接噴霧投予，冷凍乾燥之粉末在重建後可經噴霧投予。或者，PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可利用氟碳調製劑及定量噴霧吸入器被噴霧化或以經冷凍乾燥及磨細粉末被吸入。

在一實施態樣中，PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體係經位置特異性或標靶局部遞送技術投予。位置特異性或標靶局部遞送技術之實例包括各種 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體之植入式貯積來源或局部遞送導管，諸如輸注導管、留置導管、或針頭導管、合成性移植物、外膜包覆、分流器及支架或其他植入式裝置、位置特異性載劑、直接注射或直接施用。參見例如 PCT 公開號 WO 00/53211 及美國專利號 5,981,568。

PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體之各種調製劑可被用於投予。在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可被直接投予。在一些實施態樣中，PCSK9 拮抗劑抗

體、肽或適體與醫藥上可接受之賦形劑可製成各種調製劑。醫藥上可接受之賦形劑係為該領域所知，且係有助於投予藥理有效物質之相對惰性物質。舉例來說，賦形劑可給予外形或稠度，或作為稀釋劑。適當之賦形劑包括但不限於安定劑、潤濕及乳化劑、用於改變滲透性之鹽類、包封劑、緩衝劑及皮膚滲透增進劑。用於非經腸及經腸藥物遞送之賦形劑以及調製劑係闡明於 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing (2000)。

該等劑類可與醫藥上可接受之載劑諸如鹽水、林格氏液、葡萄糖溶液及該類似物組合。該特定之投藥方案意即劑量、時間及重複性將依特定個體及該個體之醫學史而定。

如文中所述，PCSK9 抗體亦可經吸入投予。一般來說，在投予 PCSK9 抗體時，初始候選劑量可為約 2 毫克/公斤。就本發明之目的而言，典型之每日劑量可根據上述因子介於約 3 微克/公斤至 30 微克/公斤至 300 微克/公斤至 3 毫克/公斤、至 30 毫克/公斤至 100 毫克/公斤或更高之任何範圍內。舉例來說，可使用約 1 毫克/公斤、約 2.5 毫克/公斤、約 5 毫克/公斤、約 10 毫克/公斤及約 25 毫克/公斤之劑量。視狀況而定重複投予數天或更久時，持續該治療直到所欲之症狀抑制發生或直到達成足夠之治療量，例如降低血中 LDL 量。示範性投藥方案包含投予約 2 毫克/公斤之 PCSK9 抗體之初始劑量，隨後約 1 毫克/公斤之

每週維持劑量，或隨後每二週約 1 毫克/公斤之維持劑量。然而，其他投藥方案可根據醫師所希望達成之藥物動力衰減模式而使用。舉例來說，在一些實施態樣中，每週投藥一至四次可被考慮。在其他實施態樣中，每個月投藥一次或每二個月或每三個月投藥一次可被考慮。此治療之進展可藉由習知之技術及測定被輕易地監測。該投藥方案(包括所使用之 PCSK9 拮抗劑)可隨時間而異。

就本發明之目的而言，PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體之適當劑量將依所採用之 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體(或彼等之組成物)、所欲治療之症狀的類型及嚴重性、該劑係以預防性或治療性目的投予、先前治療、病患之臨床病史及對該劑之反應、該病患之血中 PCSK9 量、該病患合成及清除 PCSK9 之速率、病患清除該投予之劑之速率及主治醫師之考量而定。通常醫師將投予 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體直到達到可完成所欲結果之劑量。劑量及/或頻率可依治療療程而異。經驗性考量諸如半衰期通常將影響該劑量之決定。舉例來說，可相容於人免疫系統之抗體諸如人化抗體或全人抗體可被用以延長該抗體之半衰期及防止該抗體被該宿主之免疫系統攻擊。投藥頻率可根據治療之療程加以決定及調整，通常但不一定根據症狀例如高膽固醇血症之治療及/或抑制及/或改善及/或延緩。或者，PCSK9 拮抗劑抗體之持續性連續釋放調製劑可為適當。各種用於達成持續釋放之調製劑及裝置係為該領域所知。

在一實施態樣中，拮抗劑抗體、肽或適體之劑量在已給予一或多次拮抗劑抗體、肽或適體投藥之個體中可憑經驗決定。個體係給予增量劑量之 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體。爲了評估療效，可追蹤疾病之指標。

根據本發明之方法投予 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可依例如該接受者之生理狀況、該投藥之目的係治療性或預防性及該技藝人士所知之其他因素而爲連續性或間歇性。PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體可以實質上連續一段預先決定之時間或以一系列間隔劑量投予。

在一些實施態樣中，可能存在超過一種拮抗劑抗體、肽或適體。至少一種、至少二種、至少三種、至少四種、至少五種不同或更多種拮抗劑抗體及/或肽可以存在。一般來說，該等 PCSK9 拮抗劑抗體或肽可能具有不會互相不良影響之互補活性。PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體亦可與其他 PCSK9 拮抗劑或 PCSK9 受體拮抗劑組合使用。舉例來說，可使用一或多種下列 PCSK9 拮抗劑：以 PCSK9 爲標靶之反義分子(包括以編碼 PCSK9 之核酸爲標靶之反義分子)、PCSK9 抑制化合物及 PCSK9 結構類似物。PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體亦可與其他用於增進及/或補充該等劑類之有效性的劑類組合使用。

可接受之載劑、賦形劑或安定劑在所採用之劑量及濃度下對接受者不具毒性，可包含緩衝劑諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；鹽諸如氯化鈉；抗氧化劑包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨、

六甲氯鉍、氯化苄甲烴鉍、氯化苄乙氧鉍、酚醇、丁醇或苄醇、烷基對羥苯甲酸酯類諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯、兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚)、低分子量(小於約 10 個殘基)多肽、蛋白質諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白、親水性聚合物諸如聚乙炔基吡咯烷酮、胺基酸諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸、單醣、雙醣及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精、螯合劑諸如 EDTA、糖類諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇、鹽形成反離子諸如鈉、金屬複合物(例如鋅蛋白質複合物)及/或非離子性介面活性劑諸如 TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup> 或聚乙二醇(PEG)。

含有 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體之脂質體系以該領域已知之方法製備；諸如 Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 及美國專利號 4,485,045 及 4,544,545 中所述。增進循環時間之脂質體系揭露於美國專利號 5,013,556。特別有用之脂質體可藉由逆相蒸發方法以包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及 PEG 衍生性磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組成物產製。脂質體被擠壓通過定義孔徑大小之濾網以產生具有所欲直徑之脂質體。

該活性成分亦可被包封於藉由例如凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊中例如分別於羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚甲基丙烯酸甲酯微膠囊中、於膠體藥物遞送系統中(例如脂質體、白蛋白微球、微乳化液、奈米微粒及

奈米微囊)或於巨乳化液中。該等技術係揭示於 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing(2000)。

持續釋放性製劑可被製備。持續釋放性製劑之適當實例包括含有該抗體之固相疏水性聚合物之半透性基質，該基質係呈形狀物件，例如膜或微囊。持續釋放性基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚乙醇醇)、聚交酯(美國專利號 3,773,919)、L-麩胺酸及 7 乙基-L-麩胺酸鹽之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物諸如 LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物及柳菩林(leuprolide acetate)所組成之注射型微球)、蔗糖乙酸異丁酸酯及聚-D-(-)-3-羥丁酸。

欲用於活體內投予之調製劑必須是無菌的。這可輕易地藉由例如經由無菌過濾膜過濾達成。治療性 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體組成物通常被置放於具有無菌出入孔之容器中，例如具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜脈溶液袋或小瓶。

適當之乳化液可利市售之脂肪乳化液製備，諸如 Intralipid<sup>TM</sup>、Liposyn<sup>TM</sup>、Infonutrol<sup>TM</sup>、Lipofundin<sup>TM</sup> 及 Lipiphysan<sup>TM</sup>。該活性成分可被溶解於預先混合之乳化液組成物中或其可被溶解於油中(例如大豆油、紅花子油、棉花子油、芝麻油、玉米油或杏仁油)而當與磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)及水混合時形成乳化液。將瞭解的是可添加其他成分例如甘油或葡萄糖以調整該乳

化液之張力。適當之乳化液通常將含有最高 20% 例如介於 5 至 20% 之油。該脂肪乳化物可包含介於 0.1 至 1.0 微米特別是 0.1 至 0.5 微米之脂肪液滴，且具有介於 5.5 至 8.0 範圍內之 pH。

該乳化液組成物可為該些藉由混合 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體與 Intralipid™ 或彼之成分(大豆油、卵磷脂、甘油及水)所製備者。

用於吸入或吹入之組成物包括於醫藥上可接受之含水或有機溶劑或彼等之混合物中之溶液及懸浮液和粉末。該流體或固體之組成物可能包含如前述之適當之醫藥上可接受之賦形劑。在一些實施態樣中，該組成物係以經口或經鼻呼吸途徑投予以供局部或系統性效應。在較佳之無菌醫藥上可接受之溶劑中之組成物可藉由氣體被噴霧化。經霧化之溶液可從霧化裝置被直接吸入或該霧化裝置可與面罩、帳篷或間歇性正壓呼吸器連接。溶液、懸浮液或粉末組成物可自以適當方式遞送該調製劑之裝置較佳地經口或經鼻投予。

## B. PCSK9 拮抗劑類

本發明之方法使用 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體，該等抗體、肽或適體係指任何阻斷、抑制或降低(包括顯著地降低)PCSK9 生物活性之肽或核酸分子，PCSK9 生物活性包括由 PCSK9 信號所媒介之下游途徑，諸如誘發對 PCSK9 之細胞反應。



PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體應具備下列特徵之任一或多項：(a)與 PCSK9 結合、(b)阻斷 PCSK9 與 LDLR 之交互作用、(c)阻斷或減少 PCSK9 所媒介之下調 LDLR、(d)抑制 PCSK9 所媒介之 LDL 血液清除減少、(e)增加經培養之肝細胞在培養中清除 LDL、(f)增加活體內肝臟所進行之血液 LDL 清除、(g)使對他汀(statins)敏感化及(h)阻斷 PCSK9 與其他仍待辨識之因子之交互作用。

就本發明之目的而言，該抗體、肽或適體較佳地以抑制 PCSK9 信號功能及 LDLR 交互作用之方式與 PCSK9 反應。在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體專一性地辨識靈長動物之 PCSK9。在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體與靈長動物及齧齒動物之 PCSK9 結合。

本發明所使用之抗體可包含單株抗體、多株抗體、抗體片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fc 等)、嵌合抗體、雙特異性抗體、異源共軛抗體、單鏈(ScFv)、彼之突變、包含抗體部位之融合蛋白質(例如結構域抗體)、人抗體、人化抗體及任何其他含有所需專一性之抗原辨識位之經修飾構型之免疫球蛋白分子，包括抗體之糖基化變異體、抗體之胺基酸序列變異體及經共價修飾之抗體。該抗體可為小鼠、大鼠、人或任何其他來源(包括嵌合或人化抗體)。

在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體係單株抗體。該 PCSK9 拮抗劑抗體亦可為人化抗體。在其他實施態樣中，該抗體係人抗體。

在一些實施態樣中，該抗體包含經修飾之恆定區，諸如免疫惰性之恆定區，意即引發免疫反應之能力降低。在一些實施態樣中，該恆定區係如 *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624；PCT 公開號 WO99/58572 及/或英國專利申請號 9809951.8 中所述修飾。該 Fc 可為人 IgG<sub>2</sub> 或人 IgG<sub>4</sub>。該 Fc 可為含有突變 A330P331 至 S330S331(IgG<sub>2</sub> $\Delta$ <sub>a</sub>)之人 IgG<sub>2</sub>，其中該胺基酸殘基係參照野生型 IgG<sub>2</sub> 序列編號。*Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624。在一些實施態樣中，該抗體包含 IgG<sub>4</sub> 之恆定區，該恆定區含有下列突變 (Armour et al., 2003, *Molecular Immunology* 40 585-593)：E233F234L235 至 P233V234A235(IgG<sub>4</sub> $\Delta$ <sub>c</sub>)，其中該編號係參照野生型 IgG<sub>4</sub>。在另一實施態樣中，該 Fc 係人 IgG<sub>4</sub> E233F234L235 至 P233V234A235 及缺失 G236(IgG<sub>4</sub> $\Delta$ <sub>b</sub>)。在另一實施態樣中，該 Fc 係任何含有絞鏈安定突變 S228 至 P228 之人 IgG<sub>4</sub> Fc(IgG<sub>4</sub>、IgG<sub>4</sub> $\Delta$ <sub>b</sub> 或 IgG<sub>4</sub> $\Delta$ <sub>c</sub>)(Aalberse et al., 2002, *Immunology* 105, 9-19)。在另一實施態樣中，該 Fc 可為非糖基化 Fc。

在一些實施態樣中，該恆定區係藉由使該寡醣連接殘基(諸如 Asn297)突變及/或使該恆定區中為糖基化辨識序列部分之殘基側翼化而被非糖基化。在一些實施態樣中，該恆定區之 N 連接糖基化係經酵素性非糖基化。該恆定區之 N 連接糖基化可經酵素性非糖基化或藉由在糖基化缺損宿主細胞中表現而被非糖基化。

PCSK9 拮抗劑抗體與 PCSK9(諸如人 PCSK9)之結合親

和性 ( $K_D$ ) 可為約 0.002 至約 200 奈莫耳。在一些實施態樣中，該結合親和性係約 200 奈莫耳、約 100 奈莫耳、約 50 奈莫耳、約 10 奈莫耳、約 1 奈莫耳、約 500 皮莫耳、約 100 皮莫耳、約 60 皮莫耳、約 50 皮莫耳、約 20 皮莫耳、約 15 皮莫耳、約 10 皮莫耳、約 5 皮莫耳或約 2 皮莫耳中之任一。在一些實施態樣中，該結合親和性係小於約 250 奈莫耳、約 200 奈莫耳、約 100 奈莫耳、約 50 奈莫耳、約 10 奈莫耳、約 1 奈莫耳、約 500 皮莫耳、約 100 皮莫耳、約 50 皮莫耳、約 20 皮莫耳、約 10 皮莫耳、約 5 皮莫耳或約 2 皮莫耳中之任一。

決定抗體與 PCSK9 之結合親和性的一個方法係測量抗體之單功能 Fab 片段之結合親和性。要得到單功能 Fab 片段，可利用木瓜酶剪切抗體 (例如 IgG) 或經重組表現。抗體之 PCSK9 Fab 片段的親和性可藉由裝設預先固定鍵黴抗生物素蛋白感應晶片 (SA) 之表面電漿共振 (Biacore3000™ 表面電漿共振 (SPR) 系統，紐澤西州皮斯卡塔維 Biacore, INC) 使用 HBS-EP 電泳緩衝液 (0.01 莫耳 HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 毫莫耳 EDTA, 0.005% 體積/體積界面活性劑 P20) 決定。生物素化之人 PCSK9 (或任何其他 PCSK9) 可經 HBS-EP 緩衝液稀釋至濃度低於 0.5 微克/毫升，並利用不同的接觸時間注射通過個別晶片槽以達到用於詳細動力學試驗之 50 至 200 反應單位 (RU) 抑或用於篩選測定之 800 至 1000 RU 之二種抗原密度範圍。再生試驗已顯示含 25 毫莫耳 NaOH 之 25% 體積/體積乙醇有效地移除該結合之

Fab 同時保持晶片上之 PCSK9 活性以供超過 200 次注射。一般來說，經純化之 Fab 樣本的連續稀釋液(0.1 至 10 倍預估  $K_D$  之橫跨濃度)係以 100 微升/分鐘注射 1 分鐘，且允許最高 2 小時之解離時間。該 Fab 蛋白之濃度係藉由使用已知濃度(以胺基酸分析測定)之 Fab 作為標準物之 ELISA 及/或 SDS-PAGE 電泳決定。使用 BIAevaluation 軟體將資料完整帶入 1:1 蘭繆爾(Langmuir)結合模型(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. *Methods Enzymology* 6. 99-110)以同時得到動力學結合速率( $k_{on}$ )及解離速率( $k_{off}$ )。平衡解離常數( $K_D$ )數值係以  $k_{off}/k_{on}$  計算。此程序適合用於決定抗體與任何 PCSK9 之結合親和性，包括人 PCSK9、其他哺乳動物之 PCSK9(諸如小鼠 PCSK9、大鼠 PCSK9、靈長動物 PCSK9)以及不同型式之 PCSK9(諸如  $\alpha$  及  $\beta$  型)。抗體之結合親和性通常在 25°C 測量，但亦可在 37°C 測量。

PCSK9 拮抗劑抗體可藉由任何該領域已知之方法包括實施例 1 中所提供之方法製備。免疫接種宿主動物之途徑及時程通常與已建立及習知之抗體刺激及產製技術一致，如文中進一步描述。用於產製人及小鼠抗體之通用技術係該領域所知及/或係於文中描述。目前製備抗體之較佳方法包含如文中所揭示之免疫接種 PCSK9<sup>-</sup>基因剔除(PCSK9<sup>-/-</sup>)動物。

應考慮的是，任何哺乳動物對象包括人或源自該動物之抗體產製細胞可經操作以作為產製哺乳動物(包括人)雜

交瘤細胞系之基礎。一般來說，該宿主細胞係經腹腔內、肌肉內、經口、皮下、腳掌內及/或皮內接種相當量之免疫原，包括如文中所述。

雜交瘤可自淋巴細胞及永存化之骨髓瘤細胞製備，使用 Kohler, B. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497 之常規體細胞雜交技術或由 Buck, D. W., et al., 1982, *In Vitro*, 18:377-381 所修飾之技術。可取得之骨髓瘤細胞系包括但不限於 X63-Ag8.653 及該些來自美國加州聖地牙哥沙克研究所細胞分布中心 (Salk Institute Cell Distribution Center) 之細胞可被用於雜交。一般來說，該技術涉及使用促融劑諸如聚乙二醇或藉由該領域之技藝人士眾所周知之電方法使骨髓瘤細胞與淋巴樣細胞融合。在融合後，將該等細胞自融合培養基中分離並於選擇性生長培養基 (諸如次黃嘌呤-胺喋呤-胸腺核苷 (HAT) 培養基) 中生長以除去未雜交之親代細胞。任何文中所描述之培養基不論有無補充血清皆可被用於培養分泌單株抗體之雜交瘤。在細胞融合技術之另一替代技術中，EBV 永存化 B 細胞可被用於產製本發明之 PCSK9 單株抗體。若需要的話該等雜交瘤係經擴展及次選殖，上清液藉由習知之免疫測定方法 (例如放射免疫測定法、酵素免疫測定法或螢光免疫測定法) 檢測抗免疫原之活性。

可被用來作為抗體來源之雜交瘤包含所有衍生物、產製對 PCSK9 具專一性之單株抗體或彼之部分的親代雜交瘤之後代細胞。

產製該等抗體之雜交瘤可利用已知方法在活體外或活體內生長。該單株抗體可藉由習知之免疫球蛋白純化方法自培養基或體液中分離，諸如硫酸銨沉澱法、膠體電泳法、透析法、色層分析法及若需要的話超過濾法。非所欲之活性若存在的話，可藉由例如使該製劑通過由免疫原連接固相所組成之吸附劑及使該所欲之抗體自該免疫原溶析或鬆脫以移除。以和蛋白質共軛之人 PCSK9 或含有該標靶胺基酸序列之片段免疫接種宿主動物可產生抗體族群（例如單株抗體），該蛋白質對所欲免疫接種之物種具致免疫性，例如鎗孔狀帽貝血藍素、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑，該共軛係利用雙功能或衍生劑例如順丁烯二亞胺基苯甲醯基磺酸基琥珀醯亞胺基酯（經由半胱胺酸殘基共軛）、N-羥琥珀二醯亞胺（經由離胺酸殘基）、戊二醛、琥珀酐、 $\text{SOCl}_2$  或  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ （其中 R 和  $\text{R}^1$  係不同的烷基基團）。

需要的話，可對感興趣之 PCSK9 拮抗劑抗體（單株或多株）定序且該多核苷酸序列接著可被選殖至載體以表現或繁殖。編碼該感興趣抗體之序列可被維持於宿主細胞之載體中且該宿主細胞接著可被擴展及冷凍以供未來使用。在細胞培養中產製重組單株抗體可透過藉由該領域已知之方法自 B 細胞選殖抗體基因加以進行。參見例如 Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112；美國專利號 7,314,622。

在替代態樣中，該多核苷酸序列可被用於基因操作以

「人化」該抗體或改善該抗體之親和性或其他特徵。舉例來說，該恆定區可經基因工程改造以更為近似人恆定區以避免若該抗體係用於人之臨床試驗及治療時之免疫反應。基因操作該抗體序列以得到較高之 PCSK9 親和性及較高之 PCSK9 抑制效用係為所欲。對該領域之技藝人士顯而易見的是，可在 PCSK9 拮抗劑抗體進行一或多個多核苷酸改變且仍維持彼與 PCSK9 之結合能力。

人化單株抗體有四個常規步驟。這些步驟為：(1)決定該起始抗體輕鏈及重鏈可變結構域之核苷酸及預測之胺基酸序列；(2)設計該人化抗體，意即決定在人化步驟期間將使用哪一個抗體骨架區；(3)實際人化方法/技術；及(4)轉染及表現該人化抗體。參見例如美國專利號 4,816,567；5,807,715；5,866,692；6,331,415；5,530,101；5,693,761；5,693,762；5,585,089；及 6,180,370。

一些包含源自非人免疫球蛋白之抗原結合位的「人化」抗體分子已被描述，包括具有融合至人恆定結構域之齧齒動物或經修飾之齧齒動物 V 區及彼等之相關 CDR 之嵌合抗體。參見例如 Winter et al., 1991, Nature 349:293-299; Lobuglio et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224; Shaw et al., 1987, J Immunol. 138:4534-4538 及 Brown et al., 1987, Cancer Res. 47:3577-3583。其它參考文獻描述在與適當之人抗體恆定結構域融合前移植齧齒動物 CDR 至人支持骨架區(FR)。參見例如 Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988,

Science 239:1534-1536 及 Jones et al., 1986, Nature 321:522-525。另一參考文獻描述由經基因工程重組改造之齧齒動物骨架區所支持之齧齒動物 CDR。參見例如歐洲專利公開號 0519596。該些「人化」分子係經設計以最小化對齧齒動物抗人抗體分子之非所欲免疫反應，該非所欲免疫反應限制該些部分在人接受者之治療應用的期間及有效性。舉例來說，該抗體恆定區可經基因工程改造以使其呈免疫惰性(例如不會誘發補體溶解)。參見例如 PCT 公開號 WO99/58572；英國專利申請號 9809951.8。其他亦可能被利用之人化抗體之方法係由 Daugherty et al., 1991, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 及美國專利號 6,180,377；6,054,297；5,997,867；5,866,692；6,210,671 及 6,350,861 及 PCT 公開號 WO 01/27160 所揭示。

在另一替代態樣中，全人抗體可藉由使用市售之小鼠獲得，該小鼠已經基因工程改造以表現特定人免疫球蛋白。經設計以產製更為所欲或更為強健之免疫反應的基因轉殖動物亦可被用於產製人化或人抗體。該技術之實例為艾比基因公司(Abgenix, Inc.)(加州費利蒙)的 Xenomouse<sup>TM</sup>、美德列斯公司(Medarex, Inc.)(紐澤西州普林斯頓)之 HuMAb-Mouse<sup>®</sup> 及 TC Mouse<sup>TM</sup> 和雷傑納龍製藥公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)(紐約州塔里敦)之 VelocImmune<sup>®</sup> 小鼠。

在替代態樣中，抗體可利用該領域已知之任何方法重組製備及表現。在另一替代態樣中，抗體可藉由噬菌體展



示技術被重組製備。參見例如美國專利號 5,565,332 ; 5,580,717 ; 5,733,743 及 6,265,150 及 Winter et al., 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455。或者，該噬菌體展示技術 (McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-553) 可被用於自未經免疫接種之捐贈者之免疫球蛋白可變區 (V) 結構域基因群活體外產製人抗體及抗體片段。根據此項技術，抗體 V 結構域基因依讀框順序地被選殖至絲狀噬菌體之主要或次要外殼蛋白基因諸如 M13 或 fd 中，且以功能性抗體片段被展示於該噬菌體顆粒之表面上。由於該絲狀顆粒包含該噬菌體基因組之單股 DNA 拷貝，根據該抗體之功能特性所進行之篩選亦導致篩選編碼展現該等特性之抗體之基因。因此，該噬菌體模擬 B 細胞之若干特性。噬菌體展示可以各種形式進行；參見例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571。V 基因區段之不同來源可被用於噬菌體展示。Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628 自免疫接種小鼠之脾臟衍生之 V 基因的小型隨機組合庫分離出各種類別之抗噁唑啉酮抗體。來自未經免疫接種之人捐贈者的 V 基因群可被建構且對抗各類抗原 (包括自體抗原) 之抗體可實質上依照 Mark et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 或 Griffith et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-734 所述之技術被分離。在天然之免疫反應中，抗體基因以高頻率地累積突變 (體細胞超突變)。若干被導入之改變將給予更高的親和性，且 B 細胞展示高親和性表面免疫球蛋白

在後續抗原挑戰期間被優先地複製及分化。此天然方法可藉由採取稱為「鏈洗牌(chain shuffling)」之技術模擬(Marks et al., 1992, Bio/Technol. 10:779-783)。在此方法中，由噬菌體展示所得到之「初級」人抗體的親和性可藉由以得自未經免疫接種之捐贈者之 V 結構域基因天然發生變異體(群)之群連續取代重鏈及輕鏈 V 區基因被改善。此技術允許產製親和性介於皮莫耳至奈莫耳範圍間之抗體及抗體片段。產製非常大型噬菌體抗體群(亦稱為「所有之母庫(the mother-of-all libraries)」)之策略已由 Waterhouse et al., 1993, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 描述。基因洗牌亦可被用於自齧齒動物抗體衍生人抗體，其中該人抗體具有類似該初始齧齒動物抗體之親和性及專一性。根據此亦稱為「表位印記」之方法，由噬菌體展示技術所得到之齧齒動物抗體之重鏈或輕鏈 V 結構域基因被人 V 結構域基因群取代，產生齧齒動物-人嵌合物。篩選抗原導致分離出能恢復功能性抗原結合位之人可變區，也就是掌管(印記)夥伴之選擇之表位。當該方法被重複以取代剩餘之齧齒動物 V 結構域時，得到人抗體(參見 PCT 公開號 WO 93/06213)。和慣用之 CDR 移植以人化齧齒動物抗體不同的是，此項技術提供完全人抗體，該抗體不具齧齒動物來源之骨架或 CDR 殘基。

很明顯的是，雖然上述討論係關於人化抗體，但所討論之通用原則適用於客製化用於例如犬、貓、靈長動物、馬或牛之抗體。另顯而易見的是，文中所描述之人化抗體

之一或多個態樣可被組合，例如 CDR 移植、骨架突變及 CDR 突變。

抗體可被重組製備，首先自宿主動物分離抗體及抗體產製細胞、取得基因序列及使用該基因序列於宿主細胞(例如 CHO 細胞)重組表現該抗體。另一可被採用之方法係於植物(例如菸草)或基因轉殖乳中表現該抗體序列。於植物或乳中重組表現抗體之方法已被揭示。參見例如 Peeters, 2001, et al. Vaccine 19:2756; Lonberg, N. and D. Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol 13:65 及 Pollock, et al., 1999, J Immunol Methods 231:147。製備抗體之衍生物例如人化、單鏈等之方法係為該領域所知。

免疫測定法及流式細胞分選技術諸如螢光活化細胞分選(FACS)亦可被用於分離對 PCSK9 具專一性之抗體。

抗體可與許多不同的載體結合。載體可為活性及/或惰性。廣為周知之載體實例包括聚丙稀、聚苯乙稀、聚乙稀、葡聚糖、尼龍、澱粉酶、玻璃、天然及經修飾之纖維素、聚丙稀醯胺、瓊脂精及磁鐵礦。該載體之性質就本發明之目的而言可為可溶性或不可溶性。該領域之技藝人士將了解或將可利用例行實驗查明其他用於結合抗體之適當載體。在一些實施態樣中，該載體包含以心肌為標靶之部分。

編碼單株抗體之 DNA 係易於利用習知方法(例如利用能與編碼該單株抗體之重鏈及輕鏈之基因專一性結合之寡核苷酸探針)分離及定序。雜交瘤細胞作為該 DNA 之較佳

來源。一經分離後，該 DNA 可被置入表現載體中（諸如 PCT 公開號 WO 87/04462 所揭示之表現載體），該表現載體接著被轉染至原本並不產製免疫球蛋白之宿主細胞諸如大腸桿菌細胞、類人猿 COS 細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞，以獲得單株抗體在該重組宿主細胞中之合成。參見例如 PCT 公開號 WO 87/04462。該 DNA 亦可藉由例如以人重鏈及輕鏈恆定結構域之編碼序列取代同源鼠序列 (Morrison et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851) 或藉由使非免疫球蛋白多肽之所有或部分之編碼序列與該免疫球蛋白編碼序列共價結合而加以修飾。在該方式中，「嵌合」或「雜交」抗體係經製備以具有文中之 PCSK9 單株抗體之結合專一性。

PCSK9 拮抗劑抗體及抗體衍生性多肽可利用該領域已知之方法識別或特徵化，藉此偵測及/或測量 PCSK9 生物活性之降低、改善或中和。在一些實施態樣中，PCSK9 拮抗劑抗體或多肽係藉由培養候選劑與 PCSK9 及監測結合及/或隨之而來之 PCSK9 生物活性之降低或中和加以識別。該結合測定可以純化之 PCSK9 多肽或以天然表現或經轉染以表現 PCSK9 多肽之細胞進行。在一實施態樣中，該結合測定係競爭結合測定，其中候選抗體與已知 PCSK9 拮抗劑競爭 PCSK9 結合之能力係經評估。該測定可以不同形式進行，包括 ELISA 形式。在其他實施態樣中，PCSK9 拮抗劑抗體係藉由培養候選劑與 PCSK9 及監測結合與隨之而來之 LDLR 表現抑制及/或血液膽固醇清除加以

識別。

在初步識別之後，候選 PCSK9 拮抗劑抗體之活性可進一步經已知用於測試該標靶生物活性之生物測定證實及精製。或者，生物測定可被直接用於篩選候選物。若干用於識別及特徵化 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體之方法係詳細描述於實施例中。

PCSK9 拮抗劑抗體可利用該領域眾所周知之方法特徵化。舉例來說，一個方法係用於識別彼所結合之表位或「表位定位」。該領域有許多已知之用於定位及特徵化蛋白質上表位之位置之方法，包括破解抗體-抗原複合物之晶體結構、競爭測定、基因片段表現測定及合成性基於肽測定，例如於 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999)中第 11 章所述。在另一實例中，表位定位可被用於決定 PCSK9 拮抗劑抗體所結合之序列。表位定位可自不同商業來源取得，例如 Pepscan 系統(荷蘭 8219 PH 萊利斯塔艾德賀威 15)。該表位可為線性表位，也就是包含在單段之胺基酸中，或由不一定包含在單段中之胺基酸三維交互作用所形成之構型表位。各種長度之肽(例如至少 4 至 6 個胺基酸長)可被分離或合成(例如重組)及用於 PCSK9 拮抗劑抗體之結合測定。在另一實例中，PCSK9 拮抗劑抗體所結合之表位可於系統性篩選中決定，其係藉由使用衍生自 PCSK9 序列之重疊肽並測定 PCSK9 拮抗劑抗體之結合。根據基因片段表現測定，編碼 PCSK9

之開放閱讀框係隨機或按特異性基因結構分段，且 PCSK9 之表現片段與所欲測試之抗體的反應性係經決定。該基因片段舉例來說可能由 PCR 產製，接著於活體外在放射活性胺基酸存在時被轉錄及轉譯成蛋白質。該抗體與該放射活性標記 PCSK9 片段之結合接著由免疫沉降反應及膠體電泳決定。特定表位亦可藉由使用噬菌體顆粒表面所展示之隨機肽序列之大型文庫(噬菌體文庫)識別。或者，經定義之重疊肽片段文庫可於簡單結合測定中被測試與該受測抗體之結合。在另一實施例中，抗原結合結構域之突變誘發、結構域替換實驗及丙胺酸掃描突變誘發可被進行以識別表位結合所需、足夠及/或必要之殘基。舉例來說，結構域替換實驗可利用突變 PCSK9 進行，其中 PCSK9 多肽之各種片段已被來自其他物種之 PCSK9 序列或密切相關但具抗原獨特性之蛋白(諸如前蛋白轉換酶家族之其他成員)取代(替換)。藉由檢測該抗體與該突變 PCSK9 之結合，可評估特定 PCSK9 片段對抗體結合之重要性。

另一可用於特徵化 PCSK9 拮抗劑抗體之方法係使用已知和相同抗原，也就是 PCSK9 之不同片段，結合之其他抗體的競爭試驗，以決定 PCSK9 拮抗劑抗體是否如其他抗體般與該相同表位結合。競爭試驗為該領域之技藝人士所廣為周知。

抗體及抗體：抗原複合物之晶體結構亦可被用於特徵化抗體。殘基藉由計算 L1L3:PCSK9 晶體結構與 PCSK9 單獨結構之可達表面積之間的差異而被識別。與 L1L3 抗體

形成複合物時顯示埋藏表面積之 PCSK9 殘基被包括為該表位之一部分。蛋白質之溶劑可達表面被定義為當探針微球(代表半徑 1.4 埃之溶劑分子)在蛋白質之凡得瓦表面上滾動時該探針微球之中心位置。該溶劑可達表面積係藉由在大約各原子之擴展球體上產生表面點(距離原子中心相當於該原子及探針半徑之總合)並刪除該些位於與鄰近原子有關之相等球體內者以利用軟體 AREAIMOL 計算(Briggs, P.J., 2000, CCP4 Newsletter No. 38, CCLRC, Daresbury)。

表現載體可被用於直接表現 PCSK9 拮抗劑抗體。該領域之技藝人士熟悉投予表現載體以獲得活體內外源性蛋白質之表現。參見例如美國專利號 6,436,908; 6,413,942 及 6,376,471。投予表現載體包括局部或系統性投予, 包括注射、經口投予、粒子槍或經導管投予及局部投予。在另一實施態樣中, 該表現載體係直接投予至交感神經幹或神經節, 或至冠狀動脈、心房、心室或心包膜中。

標靶遞送含有表現載體之治療性組成物或次基因組多核苷酸亦可被使用。受體媒介性 DNA 遞送技術係描述於例如 Findeis et al., 1993, Trends Biotechnol. 11:202; Chiou et al., 1994, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer(J.A. Wolff, ed.); Wu et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:621; Wu et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:542; Zenke et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3655; Wu et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:338。含有多核苷酸之治療性組成物係以約 100 奈克至約 200

毫克之 DNA 範圍投予以供基因治療療程中之局部投予。約 500 奈克至約 50 毫克、約 1 微克至約 2 毫克、約 5 微克至約 500 微克及約 20 微克至約 100 微克之 DNA 濃度範圍亦可被用於基因治療療程期間。該治療性多核苷酸及多肽可利用基因遞送載具被遞送。該基因遞送載具可為病毒性或非病毒性來源(一般參見 Jolly, 1994, *Cancer Gene Therapy* 1:51; Kimura, 1994, *Human Gene Therapy* 5:845; Connelly, 1995, *Human Gene Therapy* 1:185 及 Kaplitt, 1994, *Nature Genetics* 6:148)。該等編碼序列之表現可利用內源性哺乳動物或異源性啟動子被誘導。編碼序列之表現可為連續性或經調節的。

供遞送所欲多核苷酸及在所欲細胞中表現之病毒基底載體係該領域所熟知。示範性病毒基底載具包括但不限於重組反轉錄病毒(參見例如 PCT 公開號 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 美國專利號 5,219,740 及 4,777,127; GB 專利號 2,200,651 及 EP 專利號 0 345 242)、 $\alpha$  病毒基底載體(例如辛得比司(Sindbis)病毒載體、聖利基(Semliki)森林病毒(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、羅氏河病毒(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)及委內瑞拉馬腦炎病毒(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532))及腺病毒相關病毒(AAV)載體(參見例如 PCT 公開號 WO 94/12649、WO 93/03769、WO 93/19191、WO 94/28938、WO 95/11984 及 WO 95/00655)。如 Curiel,



1992, Hum. Gene Ther. 3:147 所述之投予與不具生命之腺病毒連接之 DNA 亦可被採用。

非病毒性遞送載具及方法亦可被採用，包括但不限於與單獨不具生命之腺病毒連接或未連接之多價陽離子縮合 DNA(參見例如 Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147)；與配位體連接之 DNA(參見例如 Wu, J., 1989, Biol. Chem. 264:16985)；真核細胞遞送載具細胞(參見例如美國專利號 5,814,482；PCT 公開號 WO 95/07994；WO 96/17072；WO 95/30763 及 WO 97/42338)及核電荷中和或與細胞膜融合。裸 DNA 亦可被採用。示範性裸 DNA 介導方法係於 PCT 公開號 WO 90/11092 及美國專利號 5,580,859 中描述。可作為基因遞送載具之脂質體系描述於美國專利號 5,422,120；PCT 公開號 WO 95/13796；WO 94/23697；WO 91/14445 及 EP 0524968。其他方法係描述於 Philip, 1994, Mol. Cell Biol., 14:2411 及 Woffendin, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581。

本發明包含組成物(包括醫藥組成物)，該組成物包含文中所述或由該方法產製且具有文中所述之特徵之抗體。文中所使用之組成物包含一或多種拮抗 PCSK9 與 LDLR 之交互作用之抗體、肽或適體，及/或一或多種包含編碼一或多種該等抗體或肽類之序列之多核苷酸。該等組成物可另包含適當之賦形劑，諸如醫藥上可接受之賦形劑包括緩衝劑，其為該領域所廣為周知。

本發明之 PCSK9 拮抗劑抗體及肽具有下列任何(一或

多項)特徵：(a)與 PCSK9 結合；(b)阻斷 PCSK9 與 LDLR 之交互作用；(c)減少 PCSK9 所媒介之下調 LDLR；及(d)抑制 PCSK9 所媒介之 LDL 血液清除減少。較佳的是，PCSK9 抗體具有二或多項該等特徵。更佳的是，該等抗體具有三或多項特徵。最佳的是，該等抗體具有所有四項特徵。

因此，本發明提供下列任何序列，或包含具有表 1 所示之部分輕鏈序列及部分重鏈序列之任何抗體的組成物(包括醫藥組成物)。劃底線之序列係根據卡巴(Kabat)之 CDR 序列，粗體部分為根據柯西亞(Chothia)之 CDR 序列。

表1

單株抗體	輕鏈可變區	重鏈可變區
4A5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRV SVTCK <u>KASQNVGTNVAWYQ</u> QKPGQSPKALIY <u>SASYRYSG</u> VPDRFTGSGSGTDFTLTISN VLSEDLAEYFC <u>QQFYSPYT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIG <u>DINPNNGGTTYNQKFKG</u> KATLTVDKS YSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR <u>WL</u> <u>LFAY</u> WGQGTLLTVSA (SEQ ID NO: 20)
5A10	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVS ITCK <u>KASQDVSTAVAWYQQK</u> PGQSPKLLIY <u>SASYRYTGVP</u> DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYC <u>QQRYSTPRTF</u> GGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 17)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG <u>EINPSNGRTNYNEKFKS</u> KATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE <u>R</u> <u>PLYAMDY</u> WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 21)
6F6	DIQMTQTTSSLASLGDRVTI SCS <u>SASQGISNYLNWYQQK</u> DGTVKLLIY <u>YTSSLHSGVPS</u> RFSGSGSGTDYSLTISNLEP EDIATYYC <u>QQYSKLPFTFGS</u> GTKLEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIG <u>DINPNNGGTSYNQKFKG</u> KATLTVDK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAG <u>G</u> <u>GIYYRYDRNYFDY</u> WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 22)
7D4	DIVMTQSHKFMSTSFGDRVS ITCK <u>KASQDVSNALAWYQQK</u> PGHSPKLLIF <u>SASYRYTGVP</u> DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYC <u>QQHYSTPWTF</u> GGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTAS GFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVA <u>NINYDGSNTSYLDSLKS</u> RFIISRDNK NILYLQMSSSLKSEDTATYYCARE <u>KFA</u> <u>AMDY</u> WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 23)
L1L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITC <u>RASQGISSALAWYQQK</u> GKAPKLLIY <u>SASYRYTGVP</u> RFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYC <u>QQRYS LWRTFG</u> QGGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYMHWRQAPGQGLEWM <u>GEISPFGGRTNYNEKFKS</u> RVMTTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>RPLYASDL</u> WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 54)

本發明亦提供抗體抗 PCSK9 之 CDR 部分 (包括柯西亞

及卡巴之 CDR 序列)。CDR 區之決定係屬該領域所熟知之技藝。應了解在一些實施態樣中，CDR 可為卡巴及柯西亞 CDR 之組合(亦稱為「組合 CDR」或「延伸 CDR」)。在一些實施態樣中，該 CDR 係卡巴 CDR。在其他實施態樣中，該 CDR 係柯西亞 CDR。換句話說，在具有超過一個 CDR 之實施態樣中，該 CDR 可為任何卡巴、柯西亞、組合 CDR 或彼等之組合。

本發明亦提供製備任何該等抗體或多肽之方法。本發明之抗體可利用該領域已知之方法製備。多肽可藉由抗體之蛋白分解或其他降解、藉由如上所述之重組方法(意即單一或融合多肽)或藉由化學合成加以製備。抗體之多肽，特別是最多約 50 個胺基酸之較短多肽係方便地藉由化學合成製備。化學合成之方法係該領域所知且可為自市售者。舉例來說，抗體可藉由採用固相方法之自動多肽合成儀產製。亦參見美國專利號 5,807,715；4,816,567 及 6,331,415。

在另一替代態樣中，抗體及肽可利用該領域廣為周知之方法重組製備。在一實施態樣中，多核苷酸包含編碼抗體 4A5、5A10、6F6、7D4 或 L1L3 之重鏈及/或輕鏈可變區之序列。編碼感興趣之抗體之序列可被維持於宿主細胞之載體中，且該宿主細胞接著可經擴增及冷凍以供未來使用。載體(包括表現載體)及宿主細胞另於文中詳細說明。

本發明亦包含本發明之抗體之 scFv。單鏈可變區片段係藉由使用短連接肽連接輕鏈及/或重鏈可變區製備(Bird

et al., 1988, Science 242:423-426)。連接肽之實例係 (GGGGS)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:24)，其橋接一可變區之羧基端與另一可變區之胺基端間之大約 3.5 奈米。其它序列之連接子已被設計及使用(Bird et al., 1988, 同上)。連接子應為短且可彎曲之多肽，較佳包含少於約 20 個胺基酸殘基。連接子亦可經修飾以得到額外功能，諸如與藥物連接或與固態支持物連接。單鏈變異體可經重組或合成產製。就合成產製 scFv 而言，可使用自動化合成儀。就重組產製 scFv 而言，包含編碼該 scFv 之多核苷酸之適當質體可被導入適當之宿主細胞中，不論是真核諸如酵母菌、植物、昆蟲或哺乳動物細胞，抑或原核細胞諸如大腸桿菌。編碼感興趣之 scFv 之多核苷酸可藉由例行操作諸如連接多核苷酸以製備。該形成之 scFv 可利用該領域已知之標準蛋白質純化技術分離。

其他形式之單鏈抗體諸如雙價抗體(diabodies)亦被包含。雙價抗體係雙價、雙專一性之抗體，其中 VH 及 VL 結構域係表現於單一多肽鏈上，但使用過短以致無法使該相同鏈上之二個結構域配對之連接子，藉此強迫該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生二個抗原結合位(參見例如 Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123)。

舉例來說，雙專一性抗體(對至少二種不同抗原具有結合專一性之單株抗體)可利用文中所揭示之抗體製備。

製備雙專一性抗體之方法係該領域所知(參見例如 Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210)。傳統上，雙專一性抗體之重組產製係基於二個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，該二個重鏈具有不同之專一性(Millstein and Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539)。

根據一種製備雙專一性抗體之方法，具有所欲結合專一性之抗體可變結構域(抗體-抗原結合位)係與免疫球蛋白恆定結構域序列融合。該融合較佳係具有免疫球蛋白重鏈恆定結構域，包含至少部分之絞鏈、CH2及CH3區。較佳係具有存在至少一個融合中之第一重鏈恆定區(CH1)，該區包含輕鏈結合所必須之位置。編碼免疫球蛋白重鏈融合及如果需要的話該免疫球蛋白輕鏈之DNA係經插入分開之表現載體中，且被共轉染至適當之宿主生物體中。在用於建構之不相等比例之三個多肽鏈提供最佳產量之實施態樣中，這提供調整三個多肽片段之相互比例之高度靈活性。然而，當至少二個多肽鏈以相同比例表現而導致高產量或當該比例不具特殊重要性時，有可能在一個表現載體中插入二個或所有三個多肽鏈之編碼序列。

在一個方法中，該雙專一性抗體係由具有第一結合專一性之雜交免疫球蛋白重鏈之一臂及雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合專一性)之另一臂所組成。此種免疫球蛋白輕鏈僅位於該雙專一性分子之一半的不對稱結構，有利於自非所欲之免疫球蛋白鏈組合中分離該所欲之雙專一性化合物。此方法係描述於PCT公開號WO 94/04690

包含二個共價連結抗體之異源共軛抗體亦屬於本發明之範圍內。該等抗體已被用於使免疫系統細胞以非所欲細胞為標靶(美國專利號 4,676,980)及用於治療 HIV 感染(PCT 公開號 WO 91/00360 及 WO 92/200373 ; EP 03089)。

異源共軛抗體可利用任何方便之交聯方法製備。適當之交聯劑及技術係該領域所廣為周知且描述於美國專利號 4,676,980。

嵌合或雜交抗體亦可利用已知之合成蛋白質化學方法於活體外製備，包括該些涉及交聯劑之方法。舉例來說，免疫毒素可利用雙硫交換反應或藉由形成硫醚鍵被構築。供此目的使用之適當試劑實例包括亞胺基硫醇鹽(iminothiolate)及甲基-4-巯基丁亞胺酸酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

包含抗體 5A10 或 7D4 之一或多個 CDR 或衍生自抗體 5A10 或 7D4 之一或多個 CDR 之人化抗體可利用例如該領域已知之任何方法製備。舉例來說，四個常規步驟可被用於人化單株抗體。這些步驟為：(1)決定該起始抗體輕鏈及重鏈可變結構域之核苷酸及預測之胺基酸序列；(2)設計該人化抗體，意即決定在人化步驟期間將使用哪一個抗體骨架區；(3)使用實際人化方法/技術；及(4)轉染及表現該人化抗體。參見例如美國專利號 4,816,567 ; 5,807,715 ; 5,866,692 ; 6,331,415 ; 5,530,101 ; 5,693,761 ; 5,693,762 ; 5,585,089 ; 及 6,180,370。

在重組人化抗體中，Fc 部分可經修飾以避免與 Fc $\gamma$  受體及補體及免疫系統之交互作用。用於製備該等抗體之技術係描述於 WO 99/58572。舉例來說，恆定區可經基因工程改造以更為近似人恆定區以避免若該抗體用於人之臨床試驗及治療時之免疫反應。參見例如美國專利號 5,997,867 及 5,866,692。

包含表 1 所示之抗體或其變異體之輕鏈或重鏈可變區或一或多個 CDR，或衍生自表 2 所示之抗體或其變異體之一或多個 CDR 之人化抗體可利用該領域已知之任何方法製備。

人化抗體可利用該領域已知之任何方法製備。

本發明包含對抗體之修飾及表 1 所示之本發明之變異體多肽，包括不會顯著影響彼等之性質之功能相等性抗體及具有增進或降低活性及/或親和性之變異體。舉例來說，胺基酸序列可能經突變以得到具有所欲之 PCSK9 結合親和性之抗體。多肽之修飾係該領域之例行操作，不須在此詳細說明。多肽之修飾係於實施例中舉例說明。經修飾之多肽實例包括具有保留性取代之胺基酸殘基、一或多個刪除或加入不會顯著有害改變該功能活性或成熟(增進)該多肽對彼之配位體之親和性之胺基酸、或使用化學類似物之多肽。

胺基酸序列插入包括長度介於一個殘基至含有一百個或更多個殘基之多肽之胺基端及/或羧基端融合，以及序列內插入單一或多個胺基酸殘基。末端插入之實例包括具



有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體或與表位標記融合之抗體。抗體分子之其它插入變異體包括抗體之 N 或 C 端融合增加該抗體於血液循環中半衰期之酵素或多肽。

取代變異體在該抗體分子中具有至少一個胺基酸殘基移除且在該位置插入不同殘基。取代性突變誘發最感興趣之位置包括超可變區，但 FR 改變亦被考慮。保留性取代係顯示於表 2 中標題「保留性取代」之下。若該取代導致生物活性改變，那麼更多在表 2 中稱為「示範性取代」或另於下述參照胺基酸分類之實質上改變可被導入及篩選該產物。

表2：胺基酸取代

原始殘基	保留性取代	示範性取代
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

抗體生物性質之實質上修飾係藉由選擇彼等在維持下列之效果上顯著不同之取代加以完成：(a)取代區域之多肽骨架之結構，例如片狀或螺旋構型，(b)標靶位置之分子的電荷或疏水性或(c)側鏈之主體。天然發生之殘基根據常見

之側鏈性質分成下列群組：

- (1) 非極性：正白胺酸、甲硫胺酸 (Met)、丙胺酸 (Ala)、纈胺酸 (Val)、白胺酸 (Leu)、異白胺酸 (Ile)；
- (2) 極性不帶電荷：半胱胺酸 (Cys)、絲胺酸 (Ser)、蘇胺酸 (Thr)、天冬醯胺酸 (Asn)、麩醯胺酸 (Gln)；
- (3) 酸性 (負電荷)：天冬胺酸 (Asp)、麩胺酸 (Glu)；
- (4) 鹼性 (正電荷)：離胺酸 (Lys)、精胺酸 (Arg)；
- (5) 影響側鏈方向性之殘基：甘胺酸 (Gly)、脯胺酸 (Pro)；及
- (6) 芳香性：色胺酸 (Trp)、酪胺酸 (Tyr)、苯丙胺酸 (Phe)、組胺酸 (His)。

非保留性取代係藉由以該等分類之一中的成員與另一分類交換達成。

任何未涉及維持抗體適當構型之半胱胺酸殘基亦可被取代，通常由絲胺酸取代，以增進該分子之氧化穩定性及防止異常交聯。相反的，半胱胺酸鍵可被加入抗體以增進彼之穩定性，特別是當該抗體係抗體片段諸如 Fv 片段。

胺基酸修飾可從改變或修飾一或多個胺基酸至完全重新設計一區諸如可變區。可變區之變化可改變結合親和性及/或專一性。在一些實施態樣中，不超過一至五個保留性胺基酸取代發生在 CDR 結構域內。在其他實施態樣中，不超過一至三個保留性胺基酸取代發生在 CDR 結構域內。在其他實施態樣中，該 CDR 結構域係 CDR H3 及/或 CDR L3。

修飾亦包括糖基化及非糖基化之多肽，以及具有其他轉譯後修飾之多肽，諸如以不同糖類糖基化、乙醯化及磷酸化。抗體在彼等之恆定區之保留性位置被糖基化(Jefferis and Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32)。免疫球蛋白之寡糖側鏈影響該蛋白質之功能(Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180)及該糖蛋白之部分之間的分子內交互作用，該交互作用可影響該糖蛋白之構型及呈現的三維表面(Jefferis and Lund, 同上; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416)。寡糖亦可用於使給定糖蛋白根據專一性辨識結構以特定分子為標靶。亦指出抗體之糖基化會影響抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)。具體地說，已指出經四環素調節表現  $\beta(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶 III(GnTIII)之 CHO 細胞具有增強之 ADCC 活性(Umana et al., 1999, *Nature Biotech.* 17:176-180)， $\beta(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶 III 是一種由糖基轉移酶催化形成之平分型 GlcNAc。

抗體之糖基化通常不是 N 連接就是 O 連接。N 連接係指碳水化合物基團連接至天冬醯胺酸殘基之側鏈。天冬醯胺酸-X-絲胺酸、天冬醯胺酸-X-蘇胺酸及天冬醯胺酸-X-半胱胺酸之三肽序列係供碳水化合物基團與天冬醯胺酸側鏈酵素性連接之辨識序列，其中 X 係除脯胺酸以外之任何胺基酸。因此，多肽中有任一該等三肽序列之存在產生可能

之糖基化位置。O 連接糖基化係指連接糖類 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一至羥胺基酸，最常見的是絲胺酸或蘇胺酸，雖然 5-羥脯胺酸或 5-羥離胺酸亦可被使用。

加入糖基化位置至抗體係藉由改變胺基酸序列以方便地完成，使其包含一或多個上述之三肽序列(供 N 連接糖基化位置)。該改變亦可藉由加入或取代一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基至原始抗體之序列以完成(O 連接糖基化位置)。

抗體之糖基化模式亦可在不改變潛在核苷酸序列下加以改變。糖基化大部分依用於表現該抗體之宿主細胞而定。由於用於表現重組糖蛋白例如抗體以作為潛在治療劑之細胞種類鮮少為天然細胞，因此抗體糖基化模式之差異可被預期(參見例如 Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070)。

除了宿主細胞之選擇以外，在重組產製抗體期間影響糖基化之因素包括生長模式、培養基調製劑、培養密度、氧化、pH、純化方式及該類似因素。各種方法已被提出以改變在特定宿主生物體中所達成之糖基化模式，包括導入或過度表現與寡糖產製有關之特定酵素(美國專利號 5,047,335；5,510,261 及 5,278,299)。糖基化或特定種類之糖基化可自糖蛋白經酵素移除，舉例來說利用內切糖苷酶 H(Endo H)、N-糖苷酶 F、內切糖苷酶 F1、內切糖苷酶 F2、內切糖苷酶 F3。此外，該重組宿主細胞可經基因工程改造以於處理特定種類之多糖類為有缺陷的。這些及類

似技術係該領域所廣為周知。

其他修飾之方法包括使用該領域已知之偶聯技術，包括但不限於酵素方法、氧化性取代及螯合。修飾可被用於例如連接標記以供免疫測定。經修飾之多肽係利用該領域已建立之方法製備，且可利用該領域已知之標準測定篩選，這些方法中有些係於下列實施例中描述。

在本發明之一些實施態樣中，該抗體包含經修飾之恆定區，諸如免疫惰性或部分惰性之恆定區，例如不引起補體媒介性溶解、不刺激 ADCC 或不活化小神經膠質細胞；或在下列任一或多項中具有降低之活性（相較於未經修飾之抗體）：引起補體媒介性溶解、刺激 ADCC 或活化小神經膠質細胞。恆定區之不同修飾可被用於達到效應功能之最佳程度及/或組合。參見例如 Morgan et al., 1995, *Immunology* 86:319-324; Lund et al., 1996, *J. Immunology* 157:4963-4969; Idusogie et al., 2000, *J. Immunology* 164:4178-4184; Tao et al., 1989, *J. Immunology* 143:2595-2601 及 Jefferis et al., 1998, *Immunological Reviews* 163:59-76。在一些實施態樣中，該恆定區係經 *Eur J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624; PCT 公開號 WO99/58572 及/或英國專利申請號 9809951.8 所述之修飾。在其他實施態樣中，該抗體包含人重鏈 IgG2 恆定區，該恆定區包含下列突變：A330P331 至 S330S331(胺基酸編號係參照野生型 IgG2 序列)(*Eur. J. Immunol.*, 1999, 29:2613-2624)。在其他實施態樣中，該恆定區之 N 連接糖基化係經非糖基化。在一些

實施態樣中，該恆定區之 N 連接糖基化係藉由使該糖基化胺基酸殘基突變或使該恆定區中為 N 糖基化辨識序列部分之殘基側翼化而被非糖基化。舉例來說，N 糖基化位置 N297 可突變成 A、Q、K 或 H。參見 Tao et al., 1989, *J. Immunology* 143:2595-2601 及 Jefferis et al., 1998, *Immunological Reviews* 163:59-76。在一些實施態樣中，該恆定區之 N 連接糖基化係經非糖基化。該恆定區之 N 連接糖基化可經酵素(諸如藉由酵素 PNGase 移除碳水化合物)或藉由在糖基化缺損宿主細胞中表現而被非糖基化。

其他抗體修飾包括已如 PCT 公開號 WO 99/58572 所述修飾之抗體。該等抗體除了針對該標靶分子之結合結構域之外，還包含具有實質上與人免疫球蛋白重鏈之所有或部分恆定結構域同源之胺基酸序列的效應結構域。該等抗體能與該標靶分子結合但不引起顯著之補體依賴性溶解或細胞媒介性破壞該標靶。在一些實施態樣中，該效應結構域能專一性結合 FcRn 及/或 Fc $\gamma$ RIIb。這些作用通常是根據衍生自二或多個人免疫球蛋白重鏈 C<sub>H</sub>2 結構域之嵌合結構域。以此方式修飾之抗體特別適用於慢性抗體治療，以避免習知抗體治療之發炎及其他不良反應。

本發明包括親和性成熟實施態樣。舉例來說，親和性成熟抗體可利用該領域已知之方法產製(Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:779-783; Barbas et al., 1994, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813; Schier et al., 1995, *Gene*, 169:147-155; Yelton et al., 1995, *J. Immunol.*,

155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896 及 PCT 公開號 WO2004/058184)。

下列方法可被用於調整抗體之親和性及特徵化 CDR。一個特徵化抗體之 CDR 及/或改變(諸如增進)多肽諸如抗體之結合親和性之方法被稱為「文庫掃描突變誘發」。一般來說，文庫掃描突變誘發如下進行。該 CDR 中一或多個胺基酸位置利用該領域已建立之方法以二或多個(諸如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個)胺基酸取代。如此產生選殖之小型文庫(在一些實施態樣中，經分析之每個胺基酸位置有一個克隆)，各克隆具有二或多個成員之複雜性(若每個位置被二或多個胺基酸取代)。一般來說，該文庫亦包括包含天然(未經取代)胺基酸之克隆。來自各文庫之少量克隆例如約 20 至 80 克隆(依該文庫之複雜性而定)經篩選與該標靶多肽(或其他結合標靶)之結合親和性，並識別具有增加、相同、降低或不具結合性之候選克隆。決定結合親和性之方法係該領域所廣為周知。結合親和性可利用 Biacore 表面電漿共振分析決定，該分析偵測約 2 倍或更高之結合親和性差異。Biacore 特別適用於當起始抗體已經以相當高之親和性結合時，例如約 10 奈莫耳或更低之  $K_D$ 。利用 Biacore 表面電漿共振篩選係描述於文中之實施例。

結合親和性可利用金耐科薩(Kinexa)生物感測器、鄰近閃爍分析、ELISA、ORIGEN 免疫測定(IGEN)、螢光猝



滅、螢光轉移及/或酵母菌展示決定。結合親和性亦可利用適當之生物測定篩選。

在一些實施態樣中，CDR 中之每個胺基酸位置皆利用該領域已知之突變誘發方法(某些方法於文中描述)以所有 20 個天然胺基酸取代。如此產生克隆之小型文庫(在一些實施態樣中，經分析之每個胺基酸位置有一個克隆)，各克隆具有 20 個成員之複雜性(若每個位置皆被所有 20 個胺基酸取代)。

在一些實施態樣中，所欲篩選之文庫包含在二或多個位置之取代，該取代可能在相同 CDR 或在二或多個 CDR 中。因此，該文庫可能包含在一個 CDR 中之二或多個位置之取代。該文庫可能包含在二或多個 CDR 中之二或多個位置之取代。該文庫可能包含 3、4、5 或多個位置之取代，該等位置見於二、三、四、五或六個 CDR 中。該取代可利用低重複性密碼子製備。參見例如 Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18 之表 2。

該 CDR 可為 CDRH3 及/或 CDRL3。該 CDR 可為一或多個 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2 及/或 CDRH3。該 CDR 可為卡巴 CDR、柯西亞 CDR 或延伸 CDR。

具有增強結合之候選物可被定序，藉此識別導致增強親和性之 CDR 取代突變(亦稱為「增強」取代)。結合之候選物亦可被定序，藉此識別保持結合之 CDR 取代。

多次篩選可被進行。舉例來說，具有增強結合之候選

物(各在一或多個 CDR 之一或多個位置含有胺基酸取代)亦有用於設計在各增強之 CDR 位置(也就是在該 CDR 之胺基酸位置之取代突變顯示增強之結合)含有至少該原始及經取代之胺基酸之第二文庫。此文庫之製備、篩選及選擇另於下討論。

文庫掃描突變誘發亦提供特徵化 CDR 之方法，具有增強結合、相同結合、降低結合或不結合之克隆的頻率亦提供有關各胺基酸位置在抗體-抗原複合物安定性上之重要性的資訊。舉例來說，如果 CDR 之位置被改成所有 20 個胺基酸時仍保持結合，該位置被認為可能不是抗原結合所需之位置。相反的，如果 CDR 之位置只有在低百分比之取代時保持結合，該位置被認為是 CDR 功能上重要之位置。因此，文庫掃描突變誘發方法產生有關可被改變成許多不同胺基酸(包括所有 20 個胺基酸)之 CDR 中之位置及無法被改變或僅能改變成少數胺基酸之 CDR 中之位置的資訊。

具有增強親和性之候選物可被組合於第二文庫中，該文庫包括該增強之胺基酸、該原始之胺基酸，及可能另外視該所欲或使用所欲之篩選或選擇方法所允許之文庫的複雜性而包括該位置之額外取代。此外若有需要的話，鄰近之胺基酸位置可被隨機化成至少二或多個胺基酸。鄰近胺基酸之隨機化可允許該突變 CDR 之額外構型可塑性，這可能轉而允許或有助於導入較大量之增強突變。該文庫亦可包含未在第一次篩選時顯示增強親和性之位置的取代。

該第二文庫係利用該領域已知之任何方法篩選或選擇具有增強及/或改變之結合親和性之文庫成員，包括利用 Biacore 表面電漿共振分析之篩選及利用該領域已知之任何用於選擇之方法選擇，包括噬菌體展示、酵母菌展示及核糖體展示。

本發明亦包含融合蛋白質，該融合蛋白質包含一或多個來自本發明之抗體或多肽之片段或區。在一實施態樣中，提供包含 SEQ ID NO: 53、16、17、18 或 19 所示之輕鏈可變區之至少 10 個相鄰胺基酸及/或 SEQ ID NO: 54、20、21、22 或 23 所示之重鏈可變區之至少 10 個相鄰胺基酸的融合多肽。在其他實施態樣中，係提供包含至少約 10 個、至少約 15 個、至少約 20 個、至少約 25 個或至少約 30 個輕鏈可變區之相鄰胺基酸及/或至少約 10 個、至少約 15 個、至少約 20 個、至少約 25 個或至少約 30 個重鏈可變區之相鄰胺基酸之融合多肽。在另一實施態樣中，該融合多肽包含選自 SEQ ID NO: 53 及 54、16 及 20、17 及 21、18 及 22 與 19 及 23 之任何序列對所示之輕鏈可變區及/或重鏈可變區。在其他實施態樣中，該融合蛋白質包含一或多個 CDR。在其他實施態樣中，該融合多肽包含 CDR H3(VH CDR3)及/或 CDR L3(VL CDR3)。就本發明之目的而言，融合蛋白包含一或多個抗體及另一天然分子未連接之胺基酸序列，例如異源性序列或來自另一區之同源性序列。示範性異源序列包括但不限於「標籤」諸如 FLAG 標籤或 6His 標籤。標籤係該領域所廣為周知。

融合多肽可藉由該領域已知之方法產製，例如合成或重組。通常，本發明之融合蛋白係藉由使用文中所描述之重組方法表現編碼彼等之多核苷酸製備，雖然彼等亦可藉由該領域所知之其他方法製備，包括例如化學合成。

本發明亦提供包含與劑共軛(例如連接)以促使偶聯至固相支持物(諸如生物素或抗生物素蛋白)之抗體或多肽之組成物。爲了簡單起見，一般將提及抗體並瞭解該等方法適用於任何文中所述之 PCSK9 結合及/或拮抗劑實施態樣。共軛一般係指連接文中所述之該等成分。連接(連接一般係至少供投予時固定該等成分於鄰近相聯)可以任何數量之方式達成。舉例來說，當劑與抗體各自具有能與彼此反應之取代基時，二者間之直接反應係可能的。舉例來說，一成分上之親核基團諸如胺基或氫硫基可能與另一成分上之含羰基基團諸如酐或鹵化醯基，或與含有好的離去基團(例如鹵根基)之烷基基團反應。

本發明之抗體或多肽可能與標示劑諸如螢光分子、放射線活性分子或任何其他該領域已知之標記連接。標記係該領域所知之一般(直接地抑或間接地)提供信號。

本發明亦提供當此揭露清楚時包含文中所描述之任何或所有抗體及/或多肽之組成物(包括醫藥組成物)及套組。

本發明亦提供經分離之編碼本發明之抗體及肽之多核苷酸，及包含該多核苷酸之載體及宿主細胞。

因此，本發明提供多核苷酸(或組成物，包括醫藥組成物)，該多核苷酸包含編碼下列任何之多核苷酸：抗體

4A5、5A10、6F6、7D4、L1L3 或彼等之具有拮抗 PCSK9 之能力之任何片段或部分。

在另一方面中，本發明提供編碼文中所述之任何抗體(包括抗體片段)及多肽之多核苷酸，諸如具有受損效應功能之抗體及多肽。多核苷酸可利用該領域已知之方法製備及表現。

在另一方面中，本發明提供包含本發明之任何多核苷酸之組成物(諸如醫藥組成物)。在一些實施態樣中，該組成物包含表現載體，該表現載體包含編碼文中所述之抗體之多核苷酸。在其他實施態樣中，該組成物包含表現載體，該表現載體包含編碼文中所述之任何抗體或多肽之多核苷酸。在其他實施態樣中，該組成物包含 SEQ ID NO: 25 及 SEQ ID NO: 26 任一或二者所示之多核苷酸。表現載體及投予多核苷酸組成物另於文中描述。

在另一方面中，本發明提供製備文中所述之任何多核苷酸之方法。

與任何該等序列互補之多核苷酸亦包含於本發明中。多核苷酸可為單股(編碼或反義)或雙股，且可能為 DNA(基因組、cDNA 或合成)或 RNA 分子。RNA 分子包括 HnRNA 分子及 mRNA 分子，該 HnRNA 分子包含內含子且以一對一之方式對應 DNA，該 mRNA 分子不包含內含子。額外之編碼或非編碼序列可能但不一定存在於本發明之多核苷酸內，且多核苷酸可能但不一定連接其他分子及/或支持物質。

多核苷酸可能包含天然序列(意即編碼抗體或彼之部分之內源性序列)或可能包含該序列之變異體。多核苷酸變異體包含一或多個取代、添加、刪除及/或插入以使該編碼多肽之免疫活性相對於天然免疫活性分子而言不被減少。對該編碼多肽之免疫活性之影響一般係如文中所述檢測變異體較佳地展現與編碼天然抗體或彼之部分之多核苷酸序列至少約 70%之一致性，更佳至少約 80%之一致性，甚至更佳至少約 90%之一致性及最佳至少約 95%之一致性。

如果二個多核苷酸或多肽序列如下述排列以得到最佳對應性且其中的核苷酸或胺基酸序列係為相同時，該二個序列被稱為「一致」。二個序列之間的比較通常係藉由比較窗比較序列加以進行，以識別及比較序列相似性之局部區域。文中所使用之「比較窗」係指至少約 20 個連續位置之區段，通常為 30 個至約 75 個，或 40 個至約 50 個，當序列與具有相同數量之連續位置之參照序列經最佳排列後，二個序列可在比較窗中比較。

供比較之序列之最佳排列可使用 Lasergene 生物資訊套裝軟體中之 Megalign 程式(威斯康辛州麥迪遜 DNASTAR 公司)利用預設參數進行。此程式具體表達下列參考文獻中所述之數種排列方案：Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O.(ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure(National Biomedical

Research Foundation, Washington DC), Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183,(Academic Press, Inc., San Diego, CA); Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy(Freeman Press, San Francisco, CA); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

較佳的是，「序列一致性之百分比」係由在至少 20 個位置之比較窗中比較二個最佳排列之序列決定，其中多核苷酸或多肽序列在該比較窗中之部分可能包含相較於參考序列(其不包含添加或刪除)的百分之 20 或更少，通常為 5 至 15%，或 10 至 12%之添加或刪除(意即缺口)，當該二個序列以最佳排列時。該百分比之計算係藉由決定在二個序列中發生相同之核酸鹼基或胺基酸殘基之位置的數量以產生吻合位置之數量，將該吻合位置之數量除以參照序列中之位置的總數量(意即窗大小)並將該結果乘以 100 以得到序列一致性之百分比。

變異體亦可同時或選擇性地與天然基因或彼之部分或互補部分實質上同源。該等多核苷酸變異體能在中度嚴格

條件下與編碼天然抗體之天然發生之 DNA 序列(或互補序列)雜交。

適當之「中度嚴格條件」包括在 5 倍 SSC、0.5% SDS、1.0 毫莫耳 EDTA(pH 8.0)之溶液中預先清洗；於 50℃ 至 65℃ 之 5 倍 SSC 中隔夜雜交；接著於 65℃ 各以含有 0.1% SDS 之 2 倍、0.5 倍及 0.2 倍 SSC 清洗 20 分鐘二次。

文中所使用之「高度嚴格條件」或「高嚴格性條件」係該些：(1)採用低離子強度及高溫以清洗，例如於 50℃ 之 0.015 莫耳氯化鈉/0.0015 莫耳檸檬酸鈉/0.1%十二基硫酸鈉；(2)在 42℃ 之雜交期間採用變性劑，諸如甲醯胺，例如具有 0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙炔基吡咯烷酮/含有 750 毫莫耳氯化鈉、75 毫莫耳檸檬酸鈉之 pH 6.5 之 50 毫莫耳磷酸鈉緩衝液之 50%(體積/體積)甲醯胺；或(3)於 42℃ 採用 50%甲醯胺、5 倍 SSC(0.75 莫耳 NaCl、0.075 莫耳檸檬酸鈉)、50 毫莫耳磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5 倍丹哈德(Denhardt's)溶液、經超音波化之鮭魚精子 DNA(50 微克/毫升)、0.1% SDS 及 10%硫酸葡聚糖，並於 42℃ 以 0.2 倍 SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)清洗及於 55℃ 以 50%甲醯胺清洗，之後於 55℃ 以含有 EDTA 之 0.1 倍 SSC 進行高嚴格性清洗。技藝人士將知道如何調整溫度、離子強度等以爲適應諸如探針長度及該類似之因素所必須。

該領域之一般技藝人士將了解，由於基因密碼之簡併，有許多核苷酸序列編碼文中所述之多肽。一些該等多核



核苷酸與任何天然基因之核苷酸序列具有最小之同源性。然而，本發明特別考慮因為密碼子使用上的差異而不同之多核苷酸。另外，包含文中所提供之多核苷酸序列之基因的對偶基因係屬本發明之範圍內。對偶基因係因為一或多個突變，諸如核苷酸之刪除、添加及/或取代而被改變之內源性基因。該導致之 mRNA 及蛋白質可能但不一定具有改變之結構或功能。對偶基因可利用標準技術(諸如雜交、放大及/或資料庫序列比較)識別。

本發明之多核苷酸可利用化學合成、重組方法或 PCR 獲得。化學多核苷酸合成之方法係該領域所廣為周知，不需要在此詳細描述。該領域之技藝人士可利用文中所提供之序列及市售 DNA 合成儀，以產製所欲之 DNA 序列。

在利用如文中進一步討論之重組方法製備多核苷酸時，包含所欲序列之多核苷酸可被插入適當之載體中，該載體轉而被導入適當之宿主細胞以供複製及放大。多核苷酸可藉由該領域所知之任何方法被插入宿主細胞中。細胞藉由直接吸收、細胞吞噬作用、轉染、F 交配 (F-mating) 或電穿孔以導入外源性多核苷酸而被轉形。當導入後，該外源性多核苷酸可以非整合性載體(諸如質體)或整合至該宿主細胞之基因組中而被維持於該細胞內。經此放大之多核苷酸可利用該領域所熟習之方法自該宿主細胞分離。參見例如 Sambrook et al., 1989, 同上。

可選擇的，PCR 允許 DNA 序列之複製。PCR 技術係該領域所廣為周知且係描述於美國專利號 4,683,195、

4,800,159、4,754,065 及 4,683,202 以及 PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al., 1994, eds.(Birkaswer Press, Boston, MA)。

RNA 可藉由使用於適當載體中之經分離 DNA 且將其插入適當之宿主細胞以獲得。當該細胞複製且該 DNA 被轉錄成爲 RNA 時，可利用該領域之技藝人士所廣爲周知之方法分離 RNA，例如 Sambrook et al., 1989，同上所述。

適當之選殖載體可根據標準技術建構，或可選自該領域可取得之大量選殖載體。雖然該經選擇之選殖載體可能因所意圖使用之宿主細胞而異，適用之選殖載體通常具有自我複製之能力、可能具有特定限制核酸內切酶之單一標靶及/或可能帶有可用於選擇含有該載體之克隆之標記基因。適當實例包括質體及細菌性病毒，例如 pUC18、pUC19、Bluescript(例如 pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌體 DNA 及穿梭載體諸如 pSA3 及 pAT28。這些及許多其他選殖載體可購自商業賣方諸如拜瑞公司(BioRad)、斯川特基公司(Stratogene)及英維特基公司(Invitrogen)。

表現載體通常是可複製之多核苷酸建構物，其包含本發明之多核苷酸。這暗示著表現載體必需能在宿主細胞中如附加體(episome)抑或如染色體 DNA 之整體部分般複製。適當之表現載體包括但不限於質體、病毒性載體(包括腺病毒、腺相關病毒、反轉錄病毒)、黏質體及 PCT 公開

號 WO 87/04462 中所揭示之表現載體。載體成分通常包括但不限於下列一或多種：信號序列；複製起點；一或多種標記基因；適當之轉錄控制元件（諸如啟動子、增強子及終止子）。在表現（也就是轉譯）上，通常也需要一或多種轉譯控制元件，諸如核糖體結合位置、轉譯起始位置及終止密碼子。

含有感興趣多核苷酸之載體可藉由一些適當之任何方法被導入宿主細胞，包括電穿孔、使用氯化鈣、氯化銣、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質之轉染、微彈撞擊、脂質體轉染(lipofection)及感染（例如該載體為致病原諸如牛痘病毒）。導入載體或多核苷酸之選擇通常將視該宿主細胞之特徵而定。

本發明亦提供包含文中所述之任何多核苷酸之宿主細胞。任何能過度表現異源性 DNA 之宿主細胞可被使用以分離編碼該感興趣之抗體、多肽或蛋白質之基因。哺乳動物宿主細胞之非限制性實例包括但不限於 COS、HeLa、NSO 及 CHO 細胞。亦參見 PCT 公開號 WO 87/04462。適當之非哺乳動物宿主細胞包括原核生物（諸如大腸桿菌或枯草桿菌）及酵母菌（諸如啤酒酵母、分裂酵母(*S. pombe*)或乳克魯維酵母(*K. lactis*))。較佳的是，該宿主細胞較該對應之感興趣內源性抗體或蛋白質（若存在於宿主細胞中）高出約 5 倍、更佳為高出 10 倍、甚至更佳為高出 20 倍之量表現 cDNA。篩選與 PCSK9 或 PCSK9 結構域專一性結合之宿主細胞係由免疫測定或 FACS 所進行。過度表現感

興趣抗體或蛋白質之細胞可被識別。

### C. 組成物

用於本發明之方法中之組成物包含有效量之 PCSK9 拮抗劑抗體、PCSK9 拮抗劑抗體衍生多肽或其他文中所討論之 PCSK9 拮抗劑。該等組成物以及如何調製彼等之實施例也被描述於較早章節及以下。在一實施態樣中，該組成物另包含 PCSK9 拮抗劑。在另一實施態樣中，該組成物包含一或多種 PCSK9 拮抗劑抗體。在其他實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體辨識人 PCSK9。在其他實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體係人化抗體。在其他實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體包含不引起不需要或非所欲免疫反應(諸如抗體媒介性溶解或 ADCC)之恆定區。在其他實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體包含抗體之一或多個 CDR(諸如一、二、三、四、五或在一些實施態樣中所有六個 CDR)。在一些實施態樣中，該 PCSK9 拮抗劑抗體係人抗體。

應了解的是，組成物可包含超過一個 PCSK9 拮抗劑抗體(例如辨識 PCSK9 不同表位之 PCSK9 拮抗劑抗體之混合物)。其它示範性組成物包含超過一個辨識該相同表位之 PCSK9 拮抗劑抗體，或與 PCSK9 之不同表位結合之不同種類之 PCSK9 拮抗劑抗體。

本發明所使用之組成物可進一步包含呈冷凍乾燥調製劑或含水溶液形式之醫藥上可接受之載劑、賦形劑或安定

劑 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>th</sup> Ed., 2000, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover)。可接受之載劑、賦形劑或安定劑在所採用之劑量及濃度下對接受者不具毒性，且可能包含緩衝劑諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八基二甲基苄基氯化銨、六甲銨、氯化苄甲烴銨、氯化苄乙氧銨、酚醇、丁醇或苄醇、烷基對羥苯甲酸酯類諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯、兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚)；低分子量(小於約 10 個殘基)多肽；蛋白質諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物諸如聚乙炔基吡咯烷酮；胺基酸諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖；螯合劑諸如 EDTA；糖類諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成反離子諸如鈉；金屬複合物(例如鋅蛋白質複合物)；及/或非離子性介面活性劑諸如 TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup> 或聚乙二醇(PEG)。醫藥上可接受之賦形劑另於文中說明。

在一實施態樣中，該抗體係以無菌含水溶液之調製劑投予，其具有介於約 5.0 至約 6.5 之 pH 且包含自約 1 毫克/毫升至約 200 毫克/毫升之抗體、自約 1 毫莫耳至約 100 毫莫耳之組胺酸緩衝劑、自約 0.01 毫克/毫升至約 10 毫克/毫升之聚山梨醇酯 80、自約 100 毫莫耳至約 400 毫莫耳之海藻糖及自約 0.01 毫莫耳至約 1.0 毫莫耳之二水

EDTA 二鈉。

該 PCSK9 拮抗劑抗體及彼之組成物亦可與其他劑類一起使用，以用於增進及/或補充該等劑類之有效性。

#### D. 套組

本發明亦提供用於快速方法之套組。本發明之套組包括一或多個含有 PCSK9 拮抗劑抗體(諸如人化抗體)或文中所述之肽之容器及根據文中所述之本發明之任何方法之使用指示。一般來說，這些指示包含投予 PCSK9 拮抗劑抗體、肽或適體以供上述治療性治療之說明。

在一些實施態樣中，該抗體係人化抗體。在一些實施態樣中，該抗體係人抗體。在其他實施態樣中，該抗體係單株抗體。有關使用 PCSK9 拮抗劑抗體之指示通常包括該意圖治療之劑量、投藥方案及投予途徑之資訊。該容器可為單位劑量、大量包裝(例如多劑量包裝)或次單位劑量。本發明之套組所提供之指示通常為在標籤或包裝仿單(例如套組中所包括之紙張)上之書面指示，但機器讀取之指示(例如磁性或光學儲存磁碟所載之指示)亦可被接受。

本發明之套組具有適當之包裝。適當之包裝包括但不限於小玻璃瓶(vial)、瓶子(bottle)、罐(jar)、可塑性包裝(例如密封之美拉或塑膠袋)及類似物。亦考慮的是與特殊裝置組合使用之包裝，諸如吸入器、經鼻投予裝置(例如霧化器)或輸注裝置諸如小型泵。套組可能具有無菌出入孔(例如該容器可為具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜

脈溶液袋或小瓶)。該容器亦可能具有無菌出入孔(例如該容器可為具有可被皮下注射針穿刺之塞子的靜脈溶液袋或小瓶)。該組成物中至少一種活性劑係 PCSK9 拮抗劑抗體。該容器(例如預先填充之針筒或自動注射器)可能進一步包含第二醫藥活性劑。

套組可能可選擇的提供額外成分諸如緩衝劑及說明資訊。正常來說，該套組包含容器及在該容器上或與該容器有關之標籤或包裝仿單。

#### 突變及修飾

要表現本發明之 PCSK9 抗體，編碼  $V_H$  及  $V_L$  區之 DNA 片段可先利用上述之任何方法獲得。各種修飾例如突變、刪除及/或添加亦可利用該領域之技藝人士所知之標準方法被導入該 DNA 序列。舉例來說，可利用標準方法進行突變誘發，諸如 PCR 媒介性突變誘發，其中該突變之核苷酸被納入 PCR 引子以使該 PCR 產物包含該所欲之突變或定點突變誘發。

可能被製造之一種取代舉例來說係改變抗體中一或多個半胱胺酸，其可能對另一殘基諸如但不限於丙胺酸或絲胺酸具化學反應性。舉例來說，可以進行非正則半胱胺酸之取代。該取代可於可變結構域之 CDR 或骨架區或於抗體之恆定結構域中發生。在一些實施態樣中，該半胱胺酸係正則。

抗體之例如重鏈及/或輕鏈之可變結構域亦可被修飾

，以例如改變該抗體之結合特性。舉例來說，突變可被製造於一或多個 CDR 區以增加或降低該抗體對 PCSK9 之  $K_D$ 、增加或降低  $K_{off}$  或改變該抗體之結合專一性。定點突變誘發之技術係該領域所廣為周知。參見例如 Sambrook et al. 及 Ausubel et al.，同上。

修飾或突變亦可被製造於骨架區或恆定結構域以增加 PCSK9 抗體之半衰期。參見例如 PCT 公開號 WO 00/09560。在骨架區或恆定結構域之突變亦可被製造以改變該抗體之致免疫性、提供與另一分子共價或非共價結合之位點或改變諸如補體固定、FcR 結合及抗體依賴性細胞媒介性細胞毒性之該等特性。根據本發明，單一抗體可能在可變結構域之任一或多個 CDR 或骨架區或在恆定結構域中具有突變。

在稱為「生殖細胞化」之過程中，在  $V_H$  及  $V_L$  序列中之特定胺基酸可經突變以符合該些在生殖細胞  $V_H$  及  $V_L$  序列中所天然發現者。特別是，在  $V_H$  及  $V_L$  序列中之骨架區之胺基酸序列可經突變以符合生殖細胞序列以降低當投予抗體時致免疫性之風險。人  $V_H$  及  $V_L$  基因之生殖細胞 DNA 序列係該領域所知(參見例如 Vbase 人生殖細胞序列資料庫；亦參見 Kabat, E. A., et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798 及 Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836)。



可能被製造之另一種胺基酸取代係移除抗體中潛在之蛋白分解位點。該等位點可能發生於抗體之可變結構域之 CDR 或骨架區或恆定結構域中。取代半胱胺酸殘基及移除蛋白分解位點可能降低抗體產物異質性之風險且因而增加其同質性。另一類型之胺基酸取代清除天冬醯胺酸-甘胺酸對，其藉由改變一或二個殘基以形成潛在之脫醯胺位點。在另一實例中，本發明之 PCSK9 抗體之重鏈的 C 端離胺酸可被剪切。在本發明之不同實施態樣中，PCSK9 抗體之重鏈及輕鏈可選擇的包括信號序列。

當獲得編碼本發明之  $V_H$  及  $V_L$  區段之 DNA 片段後，該等 DNA 片段可利用標準重組 DNA 技術進一步操作，例如轉換該可變區基因成為全長抗體鏈基因、成為 Fab 片段基因或成為 scFv 基因。在該等操作中， $V_L$  或  $V_H$  編碼 DNA 片段係可操作地與編碼另一蛋白質之另一 DNA 片段連接，諸如抗體恆定區或柔性連接子。在本文中所使用之用語「可操作地連接」係意圖指連接二個 DNA 片段以使由該二個 DNA 片段所編碼之胺基酸序列依照讀框順序。

編碼  $V_H$  區之經分離 DNA 可藉由可操作地連接該  $V_H$  編碼 DNA 與編碼重鏈恆定區(CH1、CH2 及 CH3)之另一 DNA 分子以被轉換成全長重鏈基因。人重鏈恆定區基因之序列係該領域所知(參見例如 Kabat, E. A., et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242)且包含該些區之 DNA 片段可藉由

標準 PCR 放大獲得。該重鏈恆定區可為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恆定區，但最佳的是 IgG1 或 IgG2 恆定區。IgG 恆定區序列可為任何已知發生在不同個體之各種對偶基因或異型 (allotype)，諸如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3) 及 Gm(17)。該些異型代表在 IgG1 恆定區中天然發生之胺基酸取代。就 Fab 片段重鏈基因而言，該  $V_H$  編碼 DNA 可與僅編碼重鏈 CH1 恆定區之另一 DNA 分子可操作地連接。該 CH1 重鏈恆定區可源自任何重鏈基因。

編碼  $V_L$  區之經分離 DNA 可藉由可操作地連接該  $V_L$  編碼 DNA 與編碼輕鏈恆定區 ( $C_L$ ) 之另一 DNA 分子以被轉換成全長輕鏈基因 (以及 Fab 輕鏈基因)。人輕鏈恆定區基因之序列係該領域所知 (參見例如 Kabat, E. A., et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242) 且包含該些區之 DNA 片段可藉由標準 PCR 放大獲得。該輕鏈恆定區可為  $\kappa$  或  $\lambda$  恆定區。 $\kappa$  恆定區可為任何已知發生在不同個體之各種對偶基因，諸如 Inv(1)、Inv(2) 及 Inv(3)。 $\lambda$  恆定區可源自任何三個  $\lambda$  基因。

要產生 scFv 基因，該  $V_H$  及  $V_L$  編碼 DNA 片段係可操作地與編碼柔性連接子例如編碼胺基酸序列  $(Gly_4-Ser)_3$  之另一片段連接，以使該  $V_H$  及  $V_L$  序列可表現為具有以柔性連接子連接之  $V_L$  及  $V_H$  區之連續單鏈蛋白質 (參見例如 Bird

et al., 1988, *Science* 242:423-426; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-554)。該單鏈抗體可為單價(若僅使用單一個  $V_H$  及  $V_L$ )、雙價(若使用二個  $V_H$  及  $V_L$ )或多價(若使用超過二個  $V_H$  及  $V_L$ )。雙價或多價抗體可被產製以專一性地結合 PCSK9 與另一分子。

在另一實施態樣中，融合抗體或免疫黏附素可被製造，其包含與另一多肽連接之所有或部分之本發明之 PCSK9 抗體。在另一實施態樣中，只有 PCSK9 抗體之可變結構域係與該多肽連接。在另一實施態樣中，PCSK9 抗體之  $V_H$  結構域係與第一多肽連接，同時 PCSK9 抗體之  $V_L$  結構域係與第二多肽連接，該第二多肽與第一多肽係以使該  $V_H$  及  $V_L$  結構域得以彼此交互作用以形成抗原結合位之方式相聯。在另一較佳之實施態樣中，該  $V_H$  結構域與  $V_L$  結構域被連接子分開，以使該  $V_H$  及  $V_L$  結構域可彼此交互作用。該  $V_H$ -連接子- $V_L$  抗體接著與感興趣之多肽連接。此外，融合抗體可被產製，其中二個(或多個)單鏈抗體係彼此相連。這有用於如果想要在單一多肽鏈上產製雙價或多價抗體或想要產製雙專一性抗體。

在其他實施態樣中，其他經修飾之抗體可利用編碼核酸分子之 PCSK9 抗體被製備。舉例來說，「 $\kappa$  抗體」(Ill et al., 1997, *Protein Eng.* 10:949-57)、「微型抗體」(Martin et al., 1994, *EMBO J.* 13:5303-9)、「二聚抗體」(Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448)或

「亞魯斯抗體 (Janusins)」 (Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 及 Traunecker et al., 1992, Int. J. Cancer (Suppl.)7:51-52)可依照說明書之教示利用標準分子生物技術製備。

雙專一性抗體或抗原結合片段可藉由多種方法產製，包括雜交瘤之融合或連接 Fab'片段。參見例如 Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553。此外，雙專一性抗體可被形成為「二聚抗體」或「亞魯斯抗體」。在一些實施態樣中，該雙專一性抗體與 PCSK9 之二個不同的表位結合。在一些實施態樣中，上述經修飾之抗體係利用來自文中所提供之人 PCSK9 抗體之一或多個可變結構域或 CDR 區製備。

#### 抗原專一性抗體之產製

評估超過 500 種拮抗重組全長人 PCSK9、重組全長鼠 PCSK9 及各種合成肽所產生之多株及單株抗體於 Huh7 人肝臟細胞培養中下調總 LDLR 蛋白質之能力。在這些抗體中有一組抗體係針對一組 12 至 20 個胺基酸殘基多肽所產生且與之反應，該組多肽根據 PCSK9 之結構，係預計覆蓋該蛋白質之大部分表面。在最高濃度中，最佳抗體展現僅約 60%之阻斷活性。

因此，採用可選擇且在這之前未被發現之方法，也就是藉由以重組全長 PCSK9 蛋白質免疫接種 PCSK9 裸鼠以

產製單株抗體。此種抗體產製方式所產生之拮抗劑抗體顯示完全阻斷 PCSK9 與 LDLR 之結合、完全阻斷 Huh7 細胞中 PCSK9 所媒介之 LDLR 量下降，及降低活體內包括小鼠之 LDLc 至相當於 PCSK9-/-小鼠之量，如實施例 7 所示。

本發明之代表性抗體(雜交瘤)係於 2008 年 2 月 28 日寄存於美國菌種保存中心(ATCC)，且被分配表 3 之登錄號。產製抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 之雜交瘤被寄存。

表 3

<u>抗 體 名 稱</u>	<u>ATCC 登 錄 號</u>
4A5	PTA-8985
5A10	PTA-8986
6F6	PTA-8984
7D4	PTA-8983

【 實 施 方 式 】

實施例 1：產製及篩選 PCSK9 拮抗劑抗體

免疫接種動物以產製單株抗體之一般方法：

Balb/c 或 129/bl6 之 pcsk9-/-小鼠在 13 天中接受 100 微克抗原注射 5 次。PCSK9-/- (意即裸鼠或基因剔除小鼠) 可得自或如 Rashid et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:5374 所述。亦參見美國專利號 7,300,754。前 4 次注射之抗原係藉由混合該重組蛋白質與佐劑製備。免疫原係經由注射頸背、足掌及腹腔內，在 11 天期間約每 3 天給

予一次，最後補強注射不含佐劑經靜脈給予。在第 13 天時，小鼠被安樂死並移除它們的脾臟。淋巴細胞藉由與已建立之細胞系融合以利用標準之雜交瘤技術製備分配至 96 孔盤中之雜交瘤克隆而被永存化。允許克隆生長，接著如下述利用免疫接種抗原進行 ELISA 篩選選擇。

#### ELISA 篩選抗體：

來自生長雜交瘤克隆之上清液培養基經分開篩選彼等與重組人 PCSK9 或重組鼠 PCSK9 結合之能力。該測定係以被 100 微升之含有抗原之一之 1 微克/毫升溶液隔夜覆蓋 96 孔盤進行。在各步驟間以含有 0.05% Tween-20 之 PBS 將多餘試劑自孔槽中洗去。接著以含有 0.5% BSA 之 PBS 封閉盤。將上清液加入盤並於室溫中培養 2 小時。加入經辣根過氧化酶 (HRP) 共軛之羊抗鼠 Fc 以與已結合抗原之鼠抗體結合。接著加入四甲基聯苯胺作為 HRP 之受質以偵測存在於上清液中之鼠抗體量。停止該反應並藉由讀取 450 奈米之吸光度以定量抗體之相對量。選擇分泌能與鼠或人 PCSK9 結合之抗體之雜交瘤克隆以供進一步分析。

#### Huh7 細胞中 PCSK9 媒介性 LDLR 下調：

分泌人或鼠 PCSK9 結合抗體之雜交瘤克隆係經擴增及收集上清液。利用蛋白質 A 微珠自約 10 毫升之上清液純化總 IgG，透析至 PBS 緩衝液，最終體積減少以產生具

有 0.7 至 1 毫克/毫升抗體之溶液。經純化之抗體接著被用於測試彼等於 Huh7 細胞中抑制 PCSK9 所媒介之 LDLR 下調之能力。Huh7 細胞被接種至 96 孔盤中並允許其於含有 10% FBS、4 毫莫耳麩醯胺酸及青黴素與鏈黴抗生物素蛋白之 RPMI 培養基中長滿至 80%。該培養基被換成含有 10% 去脂 FBS 之培養基 8 至 16 小時以誘發 LDLR 表現。細胞接著在含有或不含 70 至 100 微克/毫升之測試抗體的情形下，於添加 6 微克/毫升之人(較佳)或鼠 PCSK9 之 40 微升/孔之 293 表現培養基中培養 8 至 16 小時。培養結束時移除含有 PCSK9 及抗體之培養基，將細胞以 17 微升溶解緩衝液於 4°C 震盪 1 小時溶解。該溶解緩衝液係由 50 毫莫耳磷酸甘油、10 毫莫耳 HEPES pH 7.4、1% Triton X-100、20 毫莫耳 NaCl 及蛋白酶抑制劑(羅氏(Roche))之混和液所組成。收集細胞溶解產物並經由西方墨漬法染色及隨後的 SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析 LDLR 蛋白量。產製可部分或完全救援 LDLR 量之抗體的雜交瘤克隆被選擇以供進一步分析。所謂的「LDLR 下調試驗」係指上述使用 Huh7 細胞之試驗。

圖 1 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 7D4.4、4A5.G3、6F6.G10.3 及 5A10.B8 於培養之 Huh7 細胞中對於人及鼠 PCSK9 下調 LDLR 之能力之影響。使用 100 奈莫耳之鼠或人重組 PCSK9 及 25 至 800 奈莫耳之抗體連續稀釋液。A) 鼠 PCSK9。B) 人 PCSK9。該圖係西方墨漬之結果，其顯示抗體大致上更為有效地阻斷人 PCSK9(相較於鼠 PCSK9)之

功能。這些抗體對人 PCSK9 之親和性大致類似，但是對鼠 PCSK9 之親和性相異。

## 實施例 2：決定抗體結合親和性

PCSK9 抗體對 PCSK9 之親和性可在設有研究級感應器晶片之表面電漿共振 Biacore 3000 生物感測器上使用 HBS-EP 電泳緩衝液測量(瑞典烏普薩拉 Biacore AB 公司，現為 GE Healthcare 醫療公司)。兔抗鼠 IgG 多株抗體係利用標準 N-羥琥珀二醯亞胺/乙基二甲基胺基丙基碳二醯亞胺(NHS/EDC)化學以飽和量胺偶合至晶片上。緩衝液被換成 HBS-EP + 1 毫克/毫升 BSA + 1 毫克/毫升 CM-葡聚糖。全長 PCSK9 IgG 被稀釋至約 15 微克/毫升且以 5 微升/分鐘被捕捉 1 分鐘以得到每個流動細胞約 500RU 之量，留下一空白以作為參考槽。3.73 至 302 奈莫耳人 PCSK9 或 2.54 至 206 奈莫耳鼠 PCSK9 係以 5 次 3 倍系列以 100 微升/分鐘注射 1 分鐘。監測解離 5 分鐘。該晶片在每次滴定最後注射後以 100 毫莫耳磷酸二次 30 秒脈衝再生。緩衝液循環提供空白以供資料之雙參照，接著使用 Biaevaluation 軟體 v.4.1 將資料整體帶入簡單結合模型。自動力學速率常數之商( $K_D = k_{off}/k_{on}$ )推算出親和性。實施例 2 之結果係顯示於表 4。該些資料顯示抗體對鼠 PCSK9 或人 PCSK9 具有絕佳親和性。



表4

單株 抗體	配位體	抑制LDLR-PCSK9 結合 (IC <sub>50</sub> )	PCSK9 之 K <sub>on</sub> (1/毫秒)	PCSK9 之 K <sub>off</sub> (1/秒)	PCSK9 之 K <sub>D</sub> (奈莫耳)
4A5	人	0.4 nM	6.66 x 10 <sup>4</sup>	1.89 x 10 <sup>-4</sup>	2.8
5A10	人	0.4 nM	8.47 x 10 <sup>4</sup>	8.55 x 10 <sup>-5</sup>	1
6F6	人	1.5 nM	9.15 x 10 <sup>4</sup>	5.84 x 10 <sup>-4</sup>	6.4
7D4	人	1.5 nM	1.25 x 10 <sup>5</sup>	7.94 x 10 <sup>-4</sup>	6.4
4A5	鼠	3 nM	1.41 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>-4</sup>	5.1
5A10	鼠	3 nM	1.27 x 10 <sup>5</sup>	4.89 x 10 <sup>-4</sup>	3.9
6F6	鼠	10 nM	1.11 x 10 <sup>5</sup>	1.97 x 10 <sup>-3</sup>	17.7
7D4	鼠	1 nM	3.92 x 10 <sup>4</sup>	5.23 x 10 <sup>-4</sup>	1.3

### 實施例 3：分析 PCSK9 抗體對 PCSK9-LDLR 交互作用之影響

PCSK9 已被顯示在中性 pH 下以 180 奈莫耳之親和性與 LDLR 結合 (Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5):413-9)。重組鼠或人 PCSK9 蛋白質之生物素化係利用皮爾斯 (Pierce) 試劑依照廠商說明進行。ELISA 板 (康寧 Mixisorb) 之每個槽係經 1 微克/毫升重組 LDLR 細胞外結構域溶液 (R&D 系統公司) 於 4℃ 隔夜覆蓋，以 2% BSA + PBS 在室溫中封閉 2 小時，接著以清洗緩衝液 (1 倍 PBS + 0.05% Tween-20) 清洗 5 次。孔槽加入 50 微升所示濃度之生物素化 PCSK9 蛋白質，於室溫中培養 1 小時。加入 50 微升之 4% FDH + 4% 蔗糖 + PBS 溶液培養 5 分鐘以安定 LDLR-PCSK9 結合。用清洗緩衝液清洗孔槽 5 次，加入 1:2000 稀釋之 HRP 共軛鏈黴抗生物素蛋白 (英維特基公司 (Invitrogen))，於室溫中培養 1 小時，用清洗緩衝液清洗 5 次。將 TMB 受質加入孔槽，令該溶液於室溫中培

養 20 至 30 分鐘，使用 1 莫耳之磷酸終止該反應。以 450 奈米讀取信號。

圖 2 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 6F6.G10.3、7D4.4、4A5.G3 及 5A10.B8、陰性對照抗體 42H7 及 PBS 於活體外阻斷重組生物素化人 PCSK9 及鼠 PCSK9 與固定化重組 LDLR 細胞外結構域結合之劑量反應。A 圖顯示人 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域結合，且 7D4、4A5、5A10 及 6F6 能有效阻斷結合，但是 42H7 及 PBS 則否。B 圖顯示鼠 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域結合。

該交互作用亦可在中性 pH 之自由溶液中評估。圖 3 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 6F6.G10.3、7D4.4、4A5.G3 及 5A10.B8 於活體外中性 pH 之溶液中阻斷重組生物素化人 PCSK9(30 奈莫耳)與銻標記重組 LDLR 細胞外結構域(10 奈莫耳)結合之劑量反應。此試驗測量中性 pH 之自由溶液中之結合。

實施例 4：利用 L1L3:PCSK9 複合物晶體結構之表位定位 / 抗體結合、Biacore 及突變誘發

a. L1L3:PCSK9 複合物之晶體結構。殘基藉由計算 L1L3:PCSK9 晶體結構與 PCSK9 單獨結構之可達表面積之間的差異而被識別。與 L1L3 抗體形成複合物時顯示埋藏表面積之 PCSK9 殘基被包括為該表位之一部分。蛋白質之溶劑可達表面被定義為當探針微球(代表半徑 1.4 埃之溶劑分子)在蛋白質之凡得瓦表面上滾動時該探針微球之中

心位置。該溶劑可達表面積係藉由在大約各原子之擴展球體上產生表面點(距離原子中心相當於該原子及探針半徑之總合)並刪除該些位於與鄰近原子有關之相等球體內者以在軟體 AREAIMOL 計算 (Briggs, P.J., 2000, CCP4 Newsletter No. 38, CCLRC, Daresbury)。

晶體結構分析之結果係顯示於圖 23。圖 23A 顯示與 L1L3 抗體(黑色動畫圖示)結合之 PCSK9(淡灰色表面圖示)之晶體結構。供 L1L3 結合之 PCSK9 表位涉及 PCSK9 胺基酸序列(SEQ ID NO: 53)之殘基 153 至 155、194、197、237 至 239、367、369、374 至 379 和 381。比較起來,供 LDLR EGF 結構域結合 PCSK9 之表位涉及殘基 153 至 155、194、238、367、369、372、374 至 375 和 377 至 381(Kwon et al., 2008, PNAS 105:1820-1825)。

b.基於 PCSK9 結合之競爭之群組抗體及表位。全長 IgG 係利用標準 EDC/NHS 媒介性胺偶合化學被胺偶合至 CM5 感應器晶片(每個晶片三個 IgG,最後約 7000RU)。一個流動細胞未經修飾以提供參照槽。人 PCSK9(100 奈莫耳)係與 IgG 陣列(終濃度 500 奈莫耳)預先混合且這些複合物利用 1 分鐘注射以 10 微升/分鐘被注射至晶片。與競爭表位結合之抗體將阻斷 PCSK9 與固定在晶片上之抗體之結合。可選擇的是,使用經典三明治方式,先以 50 奈莫耳之人 PCSK9 以 10 微升/分鐘注射 1 分鐘(以藉由晶片上之 IgG 繫留人 PCSK9)接著結合 IgG 陣列(終濃度各為 500 奈莫耳)各 2 分鐘。固定化之 IgG 係以溫和酸再生(皮爾斯溫

和溶析緩衝液 + 1 莫耳 NaCl)。以已知之不同表位為標靶之抗體在此試驗中被用來作為陽性三明治形成之對照。

c. 結構導向之突變誘發以定位抗體結合表位。根據 PCSK9 之晶體結構及 LDLR 結合可能涉及 D374 (Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5):413-419)，十九個與位置 D374 相近或遠離之 PCSK9 表面殘基突變 (F379A、I369A、R194A、D374Y、D238R、T377R、K222A、R199A、F216A、R218A、R237A、D192R、D367R、R165A、R167A、A443T、A53V、I474V、H449A) 被選擇用於突變以定位抗體結合表位。

d. 突變及抗體產製。該 19 個單點突變係利用標準 DNA 技術自先前描述之野生型 DNA 建構物 (Cunningham et al., 2007, 同上) 產製。該突變蛋白質之表現係利用 HEK293T 細胞中之過渡性轉染及分泌至細胞培養基。該突變蛋白質係以高產量 AKTA Xpress 系統 (GE Healthcare 公司)，藉由  $\text{Ni}^{2+}$  及大小排阻層析步驟，使用類似早先所描述之條件純化。蛋白質濃度使用 LabChip 儀器 (拜瑞公司 (BioRad)) 決定。PCSK9 拮抗鼠抗體 4A5、7D4、5A10 及 6F6 係由 HEK293F 細胞過渡性轉染表現及蛋白質 G 管柱純化，其以 0.1 莫耳甘胺酸緩衝液 pH2.8 溶析並經 1.0 莫耳 Tris 中和至 pH 9.0。

PCSK9 之與單株抗體 5A10 及 7D4 (製備於文中稍後描述) 接觸之區域係由蛋白質斷層掃描 (瑞典斯德哥爾摩西帝克公司 (Sidelc AB)) 決定。在 PCSK9 位置 186 至 200、371

至 379、176 至 181、278 至 283、449 至 453、402 至 406 及 236 至 245 之環靠近該抗體之胺基酸殘基。對應該些環之序列係顯示於表 5，且在較佳之實施態樣中，本發明之拮抗劑結合一或多個 PCSK9 之該等序列。

表5

PCSK9 環	序列	SEQ ID NO.
186-200	DTSIQSDHREIEGRV	1
236-245	GRDAGVAKGA	2
371-379	ASSDCSTCF	3
176-181	GGSLVE	4
278-283	QPVGPL	5
449-453	HGAGW	6
402-406	AEPEL	7

f.突變物與固定化 LDLR 之 Biacore 結合。重組 LDLR 細胞外結構域蛋白質被固定於 Biacore SA 晶片上。每個突變蛋白質以 25 毫莫耳至 0.012 毫莫耳之 5 個濃度被注射二次至 Biacore-3000(自 1℃，電泳緩衝液為 50 毫莫耳 Tris pH 7.5，2 毫莫耳 CaCl<sub>2</sub>，200 毫莫耳 NaCl，0.02% P20 及 1 毫克/毫升 BSA)。所有結果良好適用於 1:1 結合動力學模型。如預期的，與 EGF-A 結構域直接接觸之殘基的突變(F379A、R194A、I369A、T377R、D238R)顯著減弱(10 至 100 倍)LDLR 結合。另外，三個不與 EGF-A 接觸之突變(R199A、R218A、K222A)顯示較弱之結合(5 至 15 倍)。這個新發現顯示彼等係與結合 LDLR 之其他結構域有關。整體來說，這些實驗證實突變之完整性及活性以供後續表位定位實驗所用。

g.突變物與固定之 4A5、7D4、5A10 及 6F6 抗體之結合。生物素化抗 PCSK9 抗體係利用標準方法固定於 SA 晶片上。利用 Biacore 3000 於 25℃ 進行突變結合試驗，電泳緩衝液為 50 毫莫耳 Tris-HCl pH 7.5，150 毫莫耳 NaCl 及 0.02% P20。突變係以 333 奈莫耳或 111 奈莫耳之濃度測試二次，結果相較於野生型產生減弱之結合因為該等殘基涉及單株抗體之結合(見下列)。

單株抗體	突變效果呈遞減順序之結合殘基
4A5	R237、F379、369、R194、R199 及 D238
5A10	R194、R237、I369、D238、R199
6F6	R237、R194、F379、D238、I369、T377、R199
7D4	R237、R194、F379、I369、R199

#### 實施例 5：抗體之選殖及定序

將一百萬個雜交瘤細胞利用 QIAshredder 離心管柱均質化並根據凱捷公司(QIAGEN)之 RNAeasy Micro 套組抽取總 RNA。使用來自英維特基公司(Invitrogen)之 SuperScript III RT 套組合成 cDNA。使用諾維基公司(Novagen)之鼠 IgG 引子組選殖 PCSK9 抗體之可變區，該引子組係由用於選殖鼠 IgG 重鏈基因及鼠  $\kappa$  或  $\lambda$  輕鏈之簡併引子組成。PCR 循環條件如下：92℃ 2 分鐘，1 個循環；94℃ 30 秒、44℃ 30 秒及 72℃ 2 分鐘，2 個循環；94℃ 30 秒、46℃ 30 秒及 72℃ 2 分鐘，2 個循環；94℃ 30 秒、48℃ 30 秒及 72℃ 2 分鐘，2 個循環；94℃ 30 秒、50℃ 30 秒及 72℃ 2 分鐘，2 個循環；94℃ 30 秒、52℃ 30 秒及 72℃ 2 分鐘，2 個循

環；接著為 94℃ 30 秒、54℃ 30 秒及 72℃ 45 秒，35 個循環。該形成之 PCR 產物被選殖至英維特基公司 (Invitrogen) 之 Topo-TA 克隆載體並經過定序。該選殖之抗體序列藉由 N 端定序產自腹水之原始抗體的前 10 個胺基酸證實。

#### 實施例 6：產製抗原以供免疫接種

重組人 PCSK9 蛋白質係如 Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5):413-9 所指示者產製。要產製重組鼠 PCSK9 蛋白質，藉由該領域已知之方法將鼠 PCSK9 之 cDNA 選殖至哺乳動物表現載體 PRK5 並在 C 端加上 6-His 標記，過渡轉染及表現於 HEK293 細胞。重組蛋白質係利用鎳管柱自條件培養基純化。

人及鼠 PCSK9 之表面肽係根據 PCSK9 蛋白質結構選擇，並由以琳生物醫藥公司 (Elim Biopharmaceuticals) 合成。

#### 實施例 7：作為 PCSK9 拮抗劑之 PCSK9 專一性抗體

##### 1. 識別 PCSK9 專一性拮抗劑抗體

##### a. 識別 PCSK9 阻斷抗體

抗人及/或鼠 PCSK9 之鼠抗體係以實施例 6 所製備之人 PCSK9 及鼠 PCSK9 合成肽或重組蛋白質免疫接種小鼠產製，且藉由利用人及/或鼠 PCSK9 重組蛋白質作為如實施例 1 所述之抗原之 ELISA 測定法及其他標準雜交瘤方法

以篩選抗體。獲得超過 500 個克隆，令其於 6 槽孔盤之 10 毫升培養基中長滿。收集培養基上清液，使用 mAb Select(皮爾斯公司(Pierce))純化條件培養基中之總 IgG。純化及濃縮鼠 IgG 以抑制鼠及人 PCSK9 功能之能力係使用實施例 1 所述之方法於 Huh7 細胞中測試。顯示若干阻斷程度之 IgG 表現雜交瘤克隆被擴增及再測試。60 個有希望之克隆被次選殖、擴增及注射至 Balb/c 或裸鼠以產製腹水。自腹水液體純化之抗體被再測試彼等於 Huh7 細胞中抑制人或鼠 PCSK9 所媒介之 LDLR 下調之能力。四個雜交瘤克隆 4A5、5A10、6F6 及 7D4 被識別為能完全抑制人 PCSK9 之功能，及至少部分抑制鼠 PCSK9 之功能。要測定這些阻斷抗體之個別 IC<sub>50</sub>，從 100 微克/毫升至 3.125 微克/毫升之 IgG 連續稀釋被用於該試驗中，人及鼠 PCSK9 之濃度則固定為 6 微克/毫升。

#### b.PCSK9 拮抗劑對 PCSK9-LDLR 結合之效果

PCSK9 已被顯示為與 LDLR 共位於細胞隔室中 (Lagace et al., 2006, J Clin Inv, 116(11):2995-3005)。重組 PCSK9 蛋白質在活體外亦與 LDLR 細胞外結構域結合 (Fisher et al., 2007, JBC, 282(28):20502-12)。要決定抗體抑制 PCSK9 媒介性下調 LDLR 與抑制 PCSK9-LDLR 結合之間的關係，申請人測試部分或完全阻斷 PCSK9 對 LDLR 功能之 PCSK9 抗體及不阻斷之代表性抗體。所有部分拮抗劑抗體亦部分抑制 LDLR 細胞外結構域與 PCSK9 之結合



，除了一個抗體以外。可完全阻斷 PCSK9 功能之拮抗劑抗體，也就是 4A5、5A10、6F6 及 7D4 亦完全抑制 LDLR 細胞外結構域與 PCSK9 之結合(表 5)。這四個抗體之 IC<sub>50</sub> 值與彼等對 PCSK9 之結合親和性有關。

c.阻斷抗體之表位決定

圖 4 說明抗 PCSK9 抗體之表位結合。A 部分顯示抗 PCSK9 單株抗體之表位資訊，藉由結合合成性 13 至 18 員肽或經由 Biacore 表位結合測定。B 部分顯示藉 Biacore 分析的固定抗體 6F6、5A10 及 4A5 結合預先混合 y 軸所顯示之單株抗體之人 PCSK9 之能力。

另一名為 6G7 之抗 PCSK9 單株抗體與重組鼠 PCSK9 結合但不與人 PCSK9 結合。見表 6。6G7、4A5、5A10、6F6 及 7D4 互相排除彼此與鼠 PCSK9 之結合。鼠與人 PCSK9 之嵌合體分析顯示 6G7 與 PCSK9 結合需要催化結構域。見表 6。因此 4A5、5A10、6F6 及 7D4 之結合位置與 6G7 所結合之催化位置及/或表位重疊。

表 6

重組蛋白質	6G7 結合
人 PCSK9	否
人前蛋白(pro)+人催化+鼠 C 端	否
人前蛋白(pro)+鼠催化+鼠 C 端	是
鼠前蛋白(pro)+人催化+人 C 端	否
鼠前蛋白(pro)+鼠催化+人 C 端	是
鼠 PCSK9	是

d. 決定抗 PCSK9 抗體之序列物種專一性

要決定抗 PCSK9 抗體之物種專一性，抗體係與來自不同物種之血漿一起培養且該形成之複合物被純化並以獨立之抗 PCSK9 抗體在西方墨漬上探測。抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 辨識人、馬來猴(cynomolgus monkey)、小鼠及大鼠之 PCSK9。見圖 5。抗體 6G7 僅辨識鼠 PCSK9，不相干之對照抗體 42H7 無法辨識任何受測之 PCSK9。

e. 決定拮抗劑 PCSK9 抗體之序列

PCSK9 抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 之可變結構域之胺基酸序列係利用實施例 5 所述之方法決定。該等序列顯示抗體相關但彼此相異。表 1 顯示各抗體之可變區之胺基酸序列。表 7 顯示以卡巴(Kabat)及柯西亞(Chotia)方法所識別之表 1 之輕鏈及重鏈 CDR 序列。

表7.根據卡巴(劃底線)及柯西亞(粗體)之阻斷PCSK9抗體及抗原結合CDR序列。

	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
<b>4A5</b>	<u>KASQNVGTNVA</u> (SEQ ID NO:27)	<u>SASYRYS</u> (SEQ ID NO:28)	<u>QQFYSPYPT</u> (SEQ ID NO:29)
<b>5A10</b>	<u>KASQDVSTAVA</u> (SEQ ID NO:30)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQRYSTPRT</u> (SEQ ID NO:31)
<b>6F6</b>	<u>SASQGISNYLN</u> (SEQ ID NO:32)	<u>YTSSLHS</u> (SEQ ID NO:33)	<u>QQYSKLPFT</u> (SEQ ID NO:55)
<b>7D4</b>	<u>KASQDVSNALA</u> (SEQ ID NO:34)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQHYSTPWT</u> (SEQ ID NO:35)
<b>L1L3</b>	<u>RASQGISSALA</u> (SEQ ID NO:11)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQRYS LWRT</u> (SEQ ID NO:13)

	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
<b>4A5</b>	<u>GYTFTDYYMN</u> (SEQ ID NOs: 56( 全部 ), 36 及 37)	<u>DINPNNGGTTYNQKFKG</u> (SEQ ID NOs:38 及 39)	<u>WLLFAY</u> (SEQ ID NO:40)
<b>5A10</b>	<u>GYTFTSYWMH</u> (SEQ ID NOs: 57( 全部 ), 41 及 42)	<u>EINPSNGRTNYNEKFKS</u> (SEQ ID NO:43 及 44)	<u>ERPLYAMDY</u> (SEQ ID NO:45)
<b>6F6</b>	<u>GYTFTDYYMN</u> (SEQ ID NOs: 56( 全部 ), 36 及 37)	<u>DINPNNGGTSYNQKFKG</u> (SEQ ID NO:38 及 46)	<u>GGIYYRYDRNYFDY</u> (SEQ ID NO:47)
<b>7D4</b>	<u>GFTFSDYYMA</u> (SEQ ID NOs: 58( 全部 ), 48 及 49)	<u>NINYDGSNTSYLDSLKS</u> (SEQ ID NOs:50 及 51)	<u>EKFAAMDY</u> (SEQ ID NO:52)
<b>L1L3</b>	<u>GYTFTSYMH</u> SEQ ID NOs: 59( 全部 ), 60, 及 8.	<u>EISPFGGRTNYNEKFKS</u> (SEQ ID NO:9 及 61)	<u>ERPLYASDL</u> (SEQ ID NO:10)

抗 PCSK9 IgG 4A5、5A10 及 6F6 係胺偶合至 Biacore 晶片。將人 PCSK9(100 奈莫耳)與 500 奈莫耳之 4A5、5A10、6F6 或 7D4 以各種比例混合並以 10 微升/分鐘注射 1 分鐘。該四種抗體互相阻斷彼此，不論所測試之分析方向為何，顯示彼等均與競爭表位結合。相較之下，彼等能與其他利用合成肽定位專一性區域之不完全阻斷抗體形成

三明治複合物。

## 2.PCSK9 專一性抗體作為活體內 PCSK9 拮抗劑之效果

### a.PCSK9 拮抗劑抗體降低小鼠血清膽固醇

要決定 PCSK9 拮抗劑單株抗體是否能藉由抑制細胞外 PCSK9 之功能而影響活體內膽固醇量，測試 7D4 於活體外針對小鼠 PCSK9 及當被注射至小鼠時對血清膽固醇之作用。6 至 7 週齡 C57/b16 公鼠被飼養於 12 小時光/暗循環下，第 -7 天採血以收集約 70 微升之血清。拮抗劑 PCSK9 抗體 7D4 及對照同型吻合單株抗體於第 0、1、2 及 3 天經腹腔內注射至 7 週齡 C57/b16 公鼠。小鼠於第 4 天不禁食犧牲，收集血清樣本。所有冷凍血清樣本寄送至 IDEXX 實驗室以測量總膽固醇、三酸甘油脂、高密度脂蛋白(HDL)膽固醇及 LDL 膽固醇。圖 6 顯示 7D4 降低 48% 之血清膽固醇，然而對照抗體不具任何顯著效果。降低之量及百分比皆與 PCSK9<sup>-/-</sup>小鼠(PCSK9 基因剔除小鼠)所指出者類似，顯示藉由僅阻斷細胞外 PCSK9 可達到完全或接近完全抑制 PCSK9 功能，且細胞內 PCSK9 在正常生理條件下對下調 LDLR 具有很少或沒有影響。如預期的，7D4 治療動物之肝臟 LDLR 量相較於對照抗體治療者降低(圖 6)。

### b.部分阻斷抗體對血中膽固醇量無影響

圖 7 說明部分拮抗劑抗 PCSK9 多株抗體 mAb CRN6

不影響小鼠膽固醇量。二組 8 週齡 C57/b16 小鼠 (n=10 隻小鼠/組) 於第 -7 天採血及測量膽固醇量；於第 0、1、2 及 3 天經靜脈注射投予 15 毫克/公斤/天之 CRN6 或對照抗體；接著在最後一劑之 24 小時後採血及測量膽固醇量。圖 7A 顯示 CRN6 抗體於活體外 Huh7 細胞中部分阻斷 PCSK9 媒介性下調 LDLR。圖 7B 顯示投予 CRN6 抗體不影響小鼠血清膽固醇量。

c. 拮抗劑 PCSK9 單株抗體對小鼠血清膽固醇具有延長效果

進行時間進程試驗以決定 PCSK9 拮抗劑抗體於小鼠之膽固醇降低效果之起始時間及作用期間。單株抗體 7D4 或鹽水對照各以 10 毫克/公斤或 3 毫升/公斤經靜脈注射至 48 隻 6 週齡 C57/b16 小鼠。各治療組中 8 隻小鼠於注射後第 1、2、4、7、14 及 21 天犧牲。單次注射 7D4 產生快速且延長之血清膽固醇降低效果。注射後 24 小時可見血清膽固醇降低 25%。見圖 8。血清膽固醇最大下降在第 7 天時間點觀察到。在第 21 天時，膽固醇下降不再具有統計顯著性。B 部分顯示 HDL 膽固醇。LDL 膽固醇非常低。

圖 9 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 7D4 劑量依賴性降低小鼠血清總膽固醇、HDL 及 LDL。六組 8 週齡 C57/b16 小鼠 (n=8/組) 於第 -7 天採血及測量基礎膽固醇量，並於第 0、1、2 及 3 天經腹腔內快速濃注以投予所示劑量之抗體或鹽水。在最後一劑之 24 小時後收集血清樣本及測量膽固醇量。圖 9A 顯示總膽固醇量，在投予 3 至 30

毫克/公斤/天之後總膽固醇量降低至低於對照組之 60%。對總膽固醇之最大效果見於 10 毫克/公斤，在 1 毫克/公斤見到統計顯著性降低。圖 9B 顯示 HDL 量，在投予 3 至 30 毫克/公斤/天之後 HDL 量降低至低於 70%。圖 9C 顯示 LDL 量，0.3 毫克/公斤/天及以上之所有測試劑量使 LDL 量降低至接近零。

d. 在小鼠中對 PCSK9 具專一性之拮抗劑抗體的劑量反應

圖 10 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 5A10 劑量依賴性降低小鼠膽固醇量。圖 10A 顯示六組 8 週齡 C57/b16 小鼠 (n=8/組) 於第 0、1、2 及 3 天每天經靜脈快速濃注以投予所示劑量之抗體或鹽水。在最後一劑之 24 小時後收集血清樣本及測量膽固醇量，結果顯示膽固醇量隨抗體劑量增加而逐漸降低。圖 10B 顯示五組 8 週齡 C57/b16 小鼠 (n=8/組) 於第 0 天經腹腔內快速濃注以投予所示劑量之抗體或鹽水。於第 7 天收集及測試血清樣本，結果亦顯示隨抗體劑量增加而逐漸降低。

圖 11 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 4A5 及 6F6 以劑量依賴方式降低小鼠膽固醇量。8 週齡 C57/b16 小鼠 (n=8/組) 於第 0 天經腹腔內快速濃注以投予所示劑量之抗體或鹽水。於第 7 天收集血清樣本及測試膽固醇量。在圖 11A 中，抗體 4A5 顯示隨抗體劑量增加逐漸降低總血清膽固醇量。在圖 11B 中，抗體 6F6 顯示 10 毫克/公斤/天降低總血清膽固醇。

藉由西方墨漬分析發現，抗 PCSK9 拮抗劑抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 增加小鼠肝臟 LDLR 量。見圖 12。在 4A5、5A10 及 6F6 之例中，8 週齡 C57/b16 小鼠於第 0 天經靜脈快速濃注以投予 10 毫克/公斤之抗體或鹽水，動物於第 7 天犧牲，利用西方墨漬法分析 3 隻個別動物之全肝臟溶解產物之 LDLR 及 GAPDH 蛋白質量。在 7D4 之例中，8 週齡 B16/c57 小鼠於第 0、1、2 及 3 天經腹腔內快速濃注以投予 10 毫克/公斤之抗體，動物於第 4 天犧牲，利用西方墨漬法分析 3 隻個別動物之全肝臟溶解產物之 LDLR 及 GAPDH 蛋白質量。所有抗體處理小鼠相較於 PBS 對照小鼠顯示高量之 LDLR。

圖 13 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體對 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠沒有影響。8 週齡 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 (LDLR KO 小鼠) 於第 0 天經腹腔內快速濃注以投予 10 毫克/公斤之 4A5 或鹽水。於第 7 天收集血清樣本 (來自 n=9 至 10 隻小鼠) 及測試膽固醇量。投予抗體不明顯地改變總血清膽固醇、HDL 或 LDL 之量。

圖 14 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體之多次治療可實質上降低小鼠之總血清膽固醇。8 週齡 C57/b16 小鼠於第 0、7、14 及 21 天經靜脈快速濃注以投予所示劑量之抗體或 PBS。第 28 天收集血清樣本 (n=5 至 11 隻小鼠) 及測量膽固醇量。

實施例 8：PCSK9 拮抗劑抗體降低非人靈長動物之血清 LDL

要測試抗體對 PCSK9 之活體內效果，於馬來猴 (*cynomolgus monkey*) 中測試抗體 7D4。四隻 3 至 4 歲之馬來猴於第 0 天注射載體 (PBS+0.01% Tween 20)，於第 7 天注射 10 毫克/公斤 7D4。第 0、2、7、9、11、14、21 及 28 天隔夜禁食後分析血漿脂肪特性。單次注射 10 毫克/公斤 7D4 在所有 4 隻動物中產生血漿 LDL(60%)(圖 15A)及 LDL 顆粒數(圖 15D)之大幅降低，但是對彼等之 HDL 量(圖 15B)及 HDL 顆粒數(圖 15E)具有極小影響。在 7D4 治療後總膽固醇(圖 15C)亦降低，但三酸甘油脂量(圖 15F)並未受到顯著影響。亦測量總 7D4(G)及總 PCSK9 量(H)。

圖 16 說明抗 PCSK9 抗體 7D4 對馬來猴血清膽固醇量之劑量反應。每組各有二隻年齡 3 至 5 歲之公及母馬來猴，於第 7 天經靜脈快速濃注以給予所示劑量之 7D4 及第 0 天給予相等體積之鹽水。在所示時間點採集血漿樣本及測量血漿 LDL 量。

圖 17 說明抗 PCSK9 抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 對馬來猴血清膽固醇量之比較。每組各有二隻年齡 3 至 6 歲之公及母馬來猴，於第 0 天經靜脈快速濃注以給予 1 毫克/公斤之所示抗體。在所示時間點採集血漿樣本，測量血漿 LDL 量並常態化至第 -2 天之血漿 LDL 量。

圖 18 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 7D4 對於餵食補充 0.1% 膽固醇之 33.4% 仟卡高脂飲食之馬來猴的血漿膽固醇量之影響。六隻 3 至 5 歲馬來猴接受高脂飲食達 16 週。三隻猴子在所示日期以 10 毫克/公斤 7D4 治療，三隻猴子



以鹽水治療。測量個別猴子之 LDL 量並常態化至治療當天之 LDL 量。

#### 實施例 9：人化抗 PCSK9 抗體

鼠單株抗體 5A10 係經人化及親和性成熟以提供 L1L3 抗體。以 Biacore 測量時，L1L3 對鼠 PCSK9 之親和性為 200 皮莫耳，對人 PCSK9 之親和性為 100 皮莫耳。當與 100 奈莫耳人或鼠 PCSK9 抗體一起培養時，L1L3 完全抑制培養 Huh7 細胞中 PCSK9 媒介性下調 LDLR。見圖 19。

圖 20 說明 L1L3、鼠前驅 5A10 及陰性對照抗體 42H7 於活體外阻斷重組生物素化人 PCSK9 及鼠 PCSK9 與固定化重組 LDLR 細胞外結構域之結合的劑量反應。圖 20A 顯示人 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域在 pH 7.5 之結合。圖 20B 顯示人 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域在 pH 5.3 之結合。圖 20C 顯示鼠 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域在 pH 7.5 之結合。圖 20D 顯示鼠 PCSK9 與人 LDLR 細胞外結構域在 pH 5.3 之結合。

圖 21 顯示以 10 毫克/公斤 L1L3 治療對鼠血清膽固醇之效果。二組 (n=8/組) 8 週齡 C57/bl6 小鼠於第 0 天經腹腔注射投予 10 毫克/公斤 L1L3 或相同體積之鹽水。第 2、4 及 7 天收集血清樣本並分析膽固醇量。L1L3 於第 2 及 4 天降低約 40% 之總血清膽固醇。在另一試驗中，當 10 毫克/公斤之 L1L3 係以單次腹腔內 (IP) 劑量投予至餵食正常飲食之 C57/bl6 小鼠時 (n=10)，治療後 4 天之血清膽固醇

量相較於鹽水治療對照組被降低 47%。當 L1L3 係以 0、0.1、1、10 及 80 毫克/公斤 (n=6/組) 之單次 IP 劑量在劑量反應試驗中投予至餵食正常飲食之 Sprague-Dawley 公鼠時，投予後 48 小時之血清膽固醇量被劑量依賴性降低，最大效果為見於 10 及 80 毫克/公斤之 50%。膽固醇抑制之期間亦為劑量依賴性的介於 1 至 21 天之範圍。

L1L3 全人化重鏈之胺基酸序列 (SEQ ID NO:15) 係顯示於表 8。該可變區之序列係劃底線之部分 (SEQ ID NO:54)。

表8

<u>qvqlvqsgae</u>	<u>vk kpgasvk v</u>	<u>sckasqytft</u>	<u>syymhwvrqa</u>	<u>pggglewmqe</u>
<u>ispfgqrtny</u> 60				
<u>nekfksrvtm</u>	<u>trdtststvy</u>	<u>melsslr sed</u>	<u>tavyycarer</u>	<u>plyasdlwgg</u>
<u>gtttvtvssas</u> 120				
<u>tkgpsvfpla</u>	<u>pcsrstsest</u>	<u>aalgclv kdy</u>	<u>fpepvtvsw n</u>	<u>sgaltsgvht</u>
<u>fpavlgssgl</u> 180				
<u>yslssvvtvp</u>	<u>ssnfgtq tyt</u>	<u>cnvdhkps nt</u>	<u>kvdktverkc</u>	<u>cvecppcpap</u>
<u>pvagpsvflf</u> 240				
<u>ppkpkdtlmi</u>	<u>srtpevtcv v</u>	<u>vdvshedpe v</u>	<u>qfnwyvdgve</u>	<u>vhnaktkpre</u>
<u>eqfnstfrvv</u> 300				
<u>svltvvhqdw</u>	<u>lngkeykck v</u>	<u>snkglpssie</u>	<u>ktisktkgqp</u>	<u>repqvytlpp</u>
<u>sreemtknqv</u> 360				
<u>sltclvkgfy</u>	<u>psdiavewes</u>	<u>ngqpennykt</u>	<u>tppmldsdgs</u>	<u>fflyskltvd</u>
<u>ksrwqqgnvf</u> 420				
<u>scsvmhealh</u>	<u>nhytqkslsl</u>	<u>spgk</u> 444		

L1L3 全人化輕鏈之胺基酸序列 (SEQ ID NO:14) 係顯示於表 9。該可變區係劃底線之部分 (SEQ ID NO:53)。

表9

<u>diqmtqspss</u>	<u>lsasvgdrvt</u>	<u>itcrasqgis</u>	<u>salawyqqkp</u>	<u>gkapklliys</u>
<u>asyrytgups</u>	60			
<u>rfsqsgsgtd</u>	<u>ftftisslqp</u>	<u>ediatyyvcg</u>	<u>ryslwrftfq</u>	<u>gtnleikrtv</u>
aapsvfifpp	120			
sdeqlkshta	svvcllnfy	preakvqkv	dnalqsgnSq	esvteqdskd
styslsstlt	180			
lskadyekhk	vyacevthqg	lsspvtksfn	rgec	214

圖 22 顯示於第 0 天靜脈投予有效劑量(3 毫克/公斤)之抗體 5A10(實心圓圈)或抗體 L1L3(實心方塊)至四隻馬來猴之每一隻的效果。血清 HDL(圖 22A)及血清 LDL(圖 22B)之改變係從 -2 至 +28 天測量。二種抗體在約第 7 天導致血清 LDL 量降低超過約 70%，該效果在投予 L1L3 之動物中實質上持續約多於 6 天。所有動物顯示正常肝臟及腎臟功能及近乎正常之血容比。

L1L3 劑量依賴性降低 LDL 膽固醇之最大效果係見於 10 毫克/公斤組，其維持降低 70%之 LDL 膽固醇量直到投予後第 21 天，至第 31 天完全回復。在所有劑量組中，HDL 膽固醇量不受 L1L3 治療之影響。3 毫克/公斤劑量組之動物(n=4)在試驗第 42 及 56 天(相隔二週)亦給予二次額外之 3 毫克/公斤 L1L3 靜脈注射劑量。該二次額外劑量再度降低 LDL 膽固醇且維持 LDL 膽固醇量低於 50%達 4 週。LDL 膽固醇量在二週後回到正常。血清 HDL 膽固醇量在整個試驗期間維持不變。

L1L3 對非人靈長動物之高膽固醇血症之療效及 L1L3 與 HMG-CoA 還原酶抑制他汀(statins)之間的藥物動力學

交互作用係經研究。在試驗開始之前，藉由餵食含有 35% 脂肪(重量/重量)及 600 ppm 膽固醇之飲食超過 18 個月，使馬來猴同齡群(n=12)之 LDL 膽固醇量被提高至平均 120 毫克/分升，相較於正常平均值為 50 毫克/分升。意外的是，每天投予中等劑量(10 毫克/動物)之 Crestor®(羅蘇伐他汀鈣)達 6 週及之後每天投予高劑量(20 毫克/公斤)達 2 週後並未觀察到對血清總膽固醇或 LDL 膽固醇量之效果。單次投予 3 毫克/公斤 L1L3 合併 Crestor®或載體治療 2 週，在治療後 5 天有效降低 56%之血清 LDL 膽固醇量且在 2.5 至 3 週後逐漸回復，同時不影響 HDL 膽固醇。將動物換成每日投予 50 毫克/公斤 Zocor®(辛伐他汀)時，彼等之 LDL 膽固醇量在第 5 天達到最多降低 43%，且之後呈穩定狀態。以 50 毫克/公斤/天之 Zocor®投予 3 週後，這些動物接受單次劑量 3 毫克/公斤 L1L3 之治療且仍接受 50 毫克/公斤/天之 Zocor®。除了 Zocor®在第 5 天所降低之 43%，投予 L1L3 導致 LDL 膽固醇再額外降低 65%，且在 2 週內回復至投予前的量。

其他 CDR 胺基酸取代在 5A10 人化及親和性成熟之過程中進行，以達到特定性質。該經修飾之 CDR 序列及含有這些修飾 CDR 之抗體對 PCSK9 之結合親和性係列於圖 24A 至 G。圖 24A 至 G 之每個序列後面的數字代表該序列之 SEQ ID NO。

文中所引述之所有參考文獻之揭示以引用方式納入本文。

**【圖式簡單說明】**

圖 1 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 7D4.4、4A5.G3、6F6.G10.3 及 5A10.B8 於培養之 Huh7 細胞中對於鼠 PCSK9(A)及人 PCSK9(B)下調 LDLR 之能力之影響。6F6.G10.3 係 6F6 之次克隆、7D4.4 係 7D4 之次克隆、4A5.G3 係 4A5 之次克隆及 5A10.B8 係 5A10 之次克隆。

圖 2 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 6F6.G10.3、7D4.4、4A5.G3 及 5A10.B8、陰性對照抗體 42H7 及 PBS 於活體外阻斷重組生物素化人 PCSK9(A)及鼠 PCSK9(B)與固定化重組 LDLR 細胞外結構域結合之劑量反應。

圖 3 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 6F6.G10.3、7D4.4、4A5.G3 及 5A10.B8 於活體外中性 pH 之溶液中阻斷重組生物素化人 PCSK9(30 奈莫耳)與鎢標記重組 LDLR 細胞外結構域(10 奈莫耳)結合之劑量反應。

圖 4 說明抗 PCSK9 抗體之比較性表位結合。

圖 5 說明抗 PCSK9 抗體與來自不同物種之血清 PCSK9 結合之西方墨漬結果。

圖 6 說明抗 PCSK9 單株抗體 7D4 對小鼠血中膽固醇量之影響。

圖 7 說明 (A)部分拮抗劑抗 PCSK9 多株抗體 mAb CRN6 對 LDLR 下調之影響及 (B)不影響小鼠膽固醇量。

圖 8 說明在小鼠使用抗 PCSK9 拮抗劑抗體 7D4 得到之膽固醇降低效果之時間進程。

圖 9 說明抗 PCSK9 拮抗劑單株抗體 7D4 在降低小鼠血清總膽固醇、HDL 及 LDL 上之劑量依賴性。

圖 10 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 5A10 在小鼠之膽固醇降低效果之劑量依賴性。

圖 11 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 (A)4A5 及 (B)6F6 於小鼠之膽固醇降低效果之劑量依賴性。

圖 12 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體對肝臟 LDLR 量之影響的西方墨漬結果。

圖 13 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 4A5 在 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠模型中缺乏效果。

圖 14 說明在小鼠多次投予抗 PCSK9 拮抗劑抗體對總血清膽固醇之效果相較於單一劑量具有延長之時間進程。

圖 15 說明在馬來猴 (*cynomolgus monkey*) 模型中抗 PCSK9 拮抗劑抗體 7D4 對血脂參數之效果的時間進程。

圖 16 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 7D4 對馬來猴血清膽固醇量之劑量及時間反應。

圖 17 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 4A5、5A10、6F6 及 7D4 對馬來猴血清膽固醇量之比較。

圖 18 說明抗 PCSK9 拮抗劑抗體 7D4 影響餵食補充 0.1% 膽固醇之 33.4% 仟卡油脂飲食之馬來猴的血漿膽固醇量之時間進程。

圖 19 說明 L1L3 (人化抗 PCSK9 單株抗體) 於 Huh7 細胞中下調 LDLR 之效果。

圖 20 說明 L1L3 人化抗體、鼠前驅 5A10 及陰性對照

抗體 42H7 於活體外阻斷重組生物素化人 PCSK9(A 及 B)及鼠 PCSK9(C 及 D)與固定化重組 LDLR 細胞外結構域在 pH 7.5(A 及 C)及 pH 5.3(B 及 D)之結合的劑量反應。

圖 21 說明以 10 毫克/公斤 L1L3 對鼠治療血清膽固醇之效果。

圖 22 說明投予 5A10 抗體或 L1L3 至馬來猴之效果及測量與時間有關之血清 HDL(A)及血清 LDL(B)之變化。

圖 23A 顯示與 L1L3 抗體(黑色動畫圖示)結合之 PCSK9(淡灰色表面圖示)之晶體結構。圖 23B 顯示與 LDLR 之 EGF 樣結構域(黑色動畫圖示)結合之 PCSK9(淡灰色表面圖示)之晶體結構(Kwon et al., PNAS, 105, 1820-1825, 2008)。圖 23C 顯示 PCSK9 之表面積圖示及以深灰色表示之 L1L3 表位。圖 23D 顯示 PCSK9 之表面積圖示及以深灰色表示之 LDLR EGF 樣結構域表位。

圖 24A 至 G 說明在親和性成熟及最佳化之過程中在抗體 5A10 之 CDR 所進行之取代以達到特定性質。與具有這些 CDR 取代之抗體有關之 PCSK9 結合亦被表示。每個序列後面的數字係各序列之 SEQ ID NO。

序列表

<110> 奈特神經科學公司  
輝瑞公司

<120> PCSK9 拮抗劑

<130> PC33718A

<160> 187

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 1

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val  
1 5 10 15

<210> 2  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 2

Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 3

Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe  
1 5

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 4

Gly Gly Ser Leu Val Glu  
1 5



<210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 5

Gln Pro Val Gly Pro Leu  
 1 5

<210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 6

His Gly Ala Gly Trp  
 1 5

<210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 7

Ala Glu Pro Glu Leu  
 1 5

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

<220>  
 <223> 可變重鏈CDR

<400> 8

Ser Tyr Tyr Met His  
 1 5

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 可變重鏈CDR

<400> 9

Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可變重鏈CDR

<400> 10

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu  
1 5

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可變輕鏈CDR

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可變輕鏈CDR

<400> 12

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 可變輕鏈CDR

<400> 13

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr  
1 5

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化L1L3輕鏈

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu 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

<210> 15

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化L1L3重鏈

<400> 15

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys  
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr  
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 16  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Leu Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 17  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 18  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 19  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Phe Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 20  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 20



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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ala  
115

<210> 21  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 21

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser 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 Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 22  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 22

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Gly Gly Gly Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr  
100 105 110

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

<210> 23  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 23

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

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

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接肽

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化輕鏈核苷酸序列

<400> 25

gatatacaaa tgacacaatc tccatcctct ctttcgcgat cagtcggcga ccgcgtaacc	60
atcacatgta gagcttctca aggcattctcc tccgcctcgc catggtacca acaaaaacca	120
ggtaaagccc caaaactcct catatactca gttcataca gatacaccgg cgtaccctca	180
agattctcag gttcaggctc tggaacagac tttactttca ccatttcac actccaaccc	240
gaagacatag ctacatatta ctgccaacaa agatacagcc tctggagaac atttgccaa	300
ggaacaaaac tcgagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642

<210> 26

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化重鏈核苷酸序列

<400> 26

caagttcaac tcgttcaatc tggagcagaa gtaaaaaaac ctggcgcctc tgttaaagta	60
agttgtaaag catccgggtta cacattcaca tcatattaca tgcattgggt aagacaagcc	120
cctggacaag gactcgaatg gatgggtgaa atctctcctt ttggcggccg aacaaactat	180
aatgaaaaat ttaaattccc cgtaactatg acccgagaca catccacatc tactgtttat	240
atggaacttt cctcactgcg ttctgaagac actgctgttt attactgtgc acgcgaaaga	300
cctctctacg cttccgatct ctggggccaa ggaacaacgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catctgtctt cccactggcc ccatgctccc gcagcacctc cgagagcaca	420
gccgccttgg gctgcctggt caaggactac ttcccagaac ctgtgaccgt gtcctggaac	480
tctggcgcctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctgcagtc ctcaggctctc	540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc	600
tgcaacgtag atcacaagcc aagcaacacc aaggtagata agaccgtgga gagaaagtgt	660
tgtgtggagt gtccaccttg tccagcccct ccagtggccg gaccatccgt gttcctgttc	720

cctccaaagc caaaggacac cctgatgatc tccagaaccc cagaggtgac ctgtgtggtg 780  
 gtggacgtgt cccacgagga cccagaggtg cagttcaact ggtatgtgga cggagtggag 840  
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccaagagag gagcagttca actccacctt cagagtgggtg 900  
 agcgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggaa aggagtataa gtgtaagggtg 960  
 tccaacaagg gactgccatc cagcatcgag aagaccatct ccaagaccaa gggacagcca 1020  
 agagagccac aggtgtatac cctgccccca tccagagagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080  
 tccctgacct gtctggtgaa gggattctat ccattccgaca tcgccgtgga gtgggagtcc 1140  
 aacggacagc cagagaacaa ctataagacc acccctccaa tgctggactc cgacggatcc 1200  
 ttcttcctgt attccaagct gaccgtggac aagtccagat ggacgaggga aaacgtgttc 1260  
 tcttgttccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactata cccagaagag cctgtccctg 1320  
 tctccaggaa ag 1332

<210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 27

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 28

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 29

Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 30

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 30

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 31

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 32

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 33

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
 1 5

<210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala Leu Ala  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> 小鼠

<400> 35

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
1 5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 37

Asp Tyr Tyr Met Asn  
1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 38

Asn Pro Asn Asn Gly Gly  
1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 39

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 40

Trp Leu Leu Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 1 5

<210> 42  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 42

Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 43  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 43

Asn Pro Ser Asn Gly Arg  
 1 5

<210> 44  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 44

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser



<210> 45  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 45

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5

<210> 46  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 46

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 47  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 47

Gly Gly Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 1 5

<210> 49  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 49

Asp Tyr Tyr Met Ala

1 5

<210> 50  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 50

Asn Tyr Asp Gly Ser Asn  
 1 5

<210> 51  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 51

Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

<210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 52

Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr  
 1 5

<210> 53  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 54  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 54

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 55  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 55

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe Thr  
1 5

<210> 56  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220> 合成性  
<223>

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn  
1 5 10

<210> 57  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220> 合成性  
<223>

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His  
1 5 10

<210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala  
1 5 10

<210> 59  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 59

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His  
1 5 10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 60

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
1 5

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 61

Ser Pro Phe Gly Gly Arg  
1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 62

Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 63

Gly Gly Thr Arg Val Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 64

Arg Gly Asp Phe Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 65

Glu Ile Asn Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 66

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 67  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 67

Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser

<210> 68  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 68

Glu Ile Asn Pro Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser

<210> 69  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 69

Glu Ile Asn Pro Ser Asp Ser Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser

<210> 70  
 <211> 17

<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 70

Glu Ile Asn Pro Ser Gly Asn Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 71  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 71

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 72

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 73



Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ala Asp Tyr  
1 5

<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 74

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ile Asp Tyr  
1 5

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 75

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Arg Asp Tyr  
1 5

<210> 76  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 76

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Gly Asp Tyr  
1 5

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 77

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 78

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr  
1 5

<210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 79

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr  
1 5

<210> 80  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 80

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr  
1 5

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 81

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Val Asp Tyr

1 5

<210> 82  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 82

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Trp Asp Tyr  
 1 5

<210> 83  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 83

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Tyr  
 1 5

<210> 84  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 84

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 85  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 85

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Tyr  
 1 5

<210> 86  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 86

Gln Gln Arg Phe Ser Thr Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 87  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 87

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 88  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 88

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 89  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 89

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ala Arg Thr  
 1 5

<210> 90  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 90

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Tyr Arg Thr  
 1 5

<210> 91  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 91

Gln Gln Arg Tyr Ser Phe Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 92  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 92

Gln Gln Arg Tyr Ser Pro Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 93  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 93

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 94  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 94

Gln Gln Arg Tyr Ser Ile Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 95  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 95

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 96  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 96

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Phe Arg Thr  
 1 5

<210> 97  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 97

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Arg Arg Thr  
 1 5

<210> 98

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 98

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Leu Tyr Thr  
 1 5

<210> 99  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 99

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Trp Arg Thr  
 1 5

<210> 100  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 100

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Ala Arg Thr  
 1 5

<210> 101  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 101

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr  
 1 5

<210> 102  
 <211> 9

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 102

Gln Gln Arg Tyr Gly Thr Ala Arg Thr  
1 5

<210> 103  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 103

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ala Arg Thr  
1 5

<210> 104  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 104

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr  
1 5

<210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 105

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Val Arg Thr  
1 5

<210> 106  
<211> 9  
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 106

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ser Arg Thr  
1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 107

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Glu Arg Thr  
1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 108

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Phe Arg Thr  
1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 109

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Arg Arg Thr  
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 110

Gln Gln Arg Tyr Ser Cys Ser Arg Thr  
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 111

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Asn Arg Arg  
1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 112

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Trp Arg Thr  
1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 113

Gln Gln Arg Tyr Ser Pro Tyr Arg Thr  
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 114

Gln Gln Arg Tyr Ser Tyr Trp Arg Thr  
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 115

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Phe Arg Thr  
1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 116

Gln Gln Arg Tyr Ser Tyr Trp Arg Thr  
1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 117

Gln Gln Arg Tyr Ser Phe Lys Arg Thr  
1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 118

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Arg Arg Thr  
1 5

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 119

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Tyr Arg Thr  
1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 120

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr  
1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 121

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ser Arg Thr  
1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 122

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr  
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 123

Gln Gln Arg Tyr Ser Lys Tyr Arg Thr  
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 124

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ser Arg Thr  
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 125

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ala Phe Thr  
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 126

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Cys Cys Thr  
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 127

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Asp Arg Thr  
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 128

Gln Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Arg Thr  
1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 129

Gln Gln Arg Tyr Val Gly Arg Thr  
1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 130

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Ser Arg Thr  
1 5

<210> 131  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 131

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gly Arg Thr  
1 5

<210> 132  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 132

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Ala Arg Thr  
1 5

<210> 133  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 133

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr  
1 5

<210> 134  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 134

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Asp Thr  
1 5

<210> 135  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 135

Gln Gln Arg Tyr Gln Gln Pro Arg Thr  
1 5

<210> 136  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 136

Glu Ile Gln Val Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 137  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 137

Glu Ile Asn Pro Trp Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 138  
<211> 17  
<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 138

Glu	Ile	Asn	Pro	Val	Gln	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 139

Glu	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 140

Glu	Ile	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 141

Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 142

Glu	Ile	Asn	Pro	Glu	His	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 143

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 143

Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Glu	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 144

Glu Ile Asn Pro Trp Met Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 145  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 145

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 146  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 146

Glu Ile Asn Pro Val Lys Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 147  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 147

Glu Ile Gly Pro Trp Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 148  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 148

Glu Ile Asn Pro Ile Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 149  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 149

Glu Ile Gln Ile Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 150  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成性  
  
<400> 150

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 151  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 151

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser  
 1 5

<210> 152  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 152

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg  
 1 5

<210> 153  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 153

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Arg  
 1 5

<210> 154  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 154

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ala  
 1 5

<210> 155  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 155

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Val  
 1 5

<210> 156  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 156

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val  
 1 5

<210> 157  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 157

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr  
 1 5

<210> 158  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 158

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val  
 1 5

<210> 159  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 159

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ala  
 1 5

<210> 160  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 160

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ser  
 1 5

<210> 161  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 161

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Leu  
 1 5

<210> 162  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 162

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser  
 1 5

<210> 163  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 163

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Met  
 1 5

<210> 164  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 164

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Leu  
 1 5

<210> 165  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 165

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Ile  
 1 5

<210> 166  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 166

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Val  
 1 5

<210> 167



<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 167

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr  
 1 5

<210> 168  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 168

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg  
 1 5

<210> 169  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 169

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val  
 1 5

<210> 170  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 170

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val  
 1 5

<210> 171  
 <211> 9

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 171

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Met  
1 5

<210> 172  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 172

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Leu  
1 5

<210> 173  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 173

Glu Ile Asn Pro Trp Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 174  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 174

Glu Ile Asn Pro Val Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 175  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 175

Glu	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 176  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 176

Glu	Ile	Gly	Pro	Trp	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 177  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 177

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Asp	Trp	Arg	Thr
1				5				

<210> 178  
 <211> 9

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 178

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Trp Arg Thr  
1 5

<210> 179  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 179

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Glu Arg Thr  
1 5

<210> 180  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 180

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr  
1 5

<210> 181  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成性

<400> 181

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr  
1 5

<210> 182  
<211> 9  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 182

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr  
1 5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 183

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Arg Arg Thr  
1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 184

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr  
1 5

<210> 185

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性

<400> 185

Glu Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 186  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 186

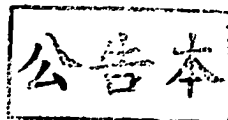
Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr
1				5				

<210> 187  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成性

<400> 187

Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
1			5			



860146

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98130562

※申請日：98年09月10日

※IPC分類：

C07K 16/28  
A61K 39/395  
C12N 5/2  
A61P 3/06  
(2006.01)

## 一、發明名稱：(中文／英文)

P C S K 9 拮抗劑類

PCSK9 antagonists

## 二、中文發明摘要：

本發明提供與前蛋白轉化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin kexin type 9)(PCSK9)結合之拮抗抗體、彼之抗原結合部位和適體。本發明亦提供以肽為標靶之抗體，其中該抗體與 PCSK9 結合。本發明進一步提供一種獲得該等抗體及抗體編碼核酸之方法。本發明另關於使用該等抗體及彼等之抗原結合部位以減少低密度脂蛋白(LDL)-膽固醇量及/或供治療及/或預防心血管疾病(其包括治療高膽固醇血症)之治療方法。

### 三、英文發明摘要：

The present invention provides antagonizing antibodies, antigen-binding portions thereof, and aptamers that bind to proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9). Also provided are antibodies directed to peptides, in which the antibodies bind to PCSK9. The invention further provides a method of obtaining such antibodies and antibody-encoding nucleic acid. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and antigen-binding portions thereof to reduce LDL-cholesterol levels and/or for the treatment and/or prevention of cardiovascular disease, including treatment of hypercholesterolemia.



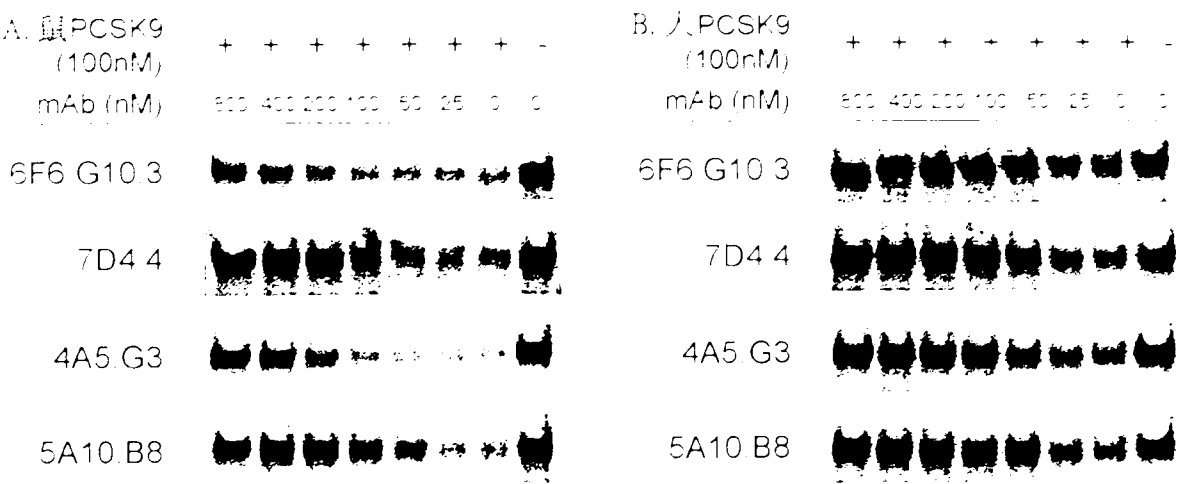


圖 1

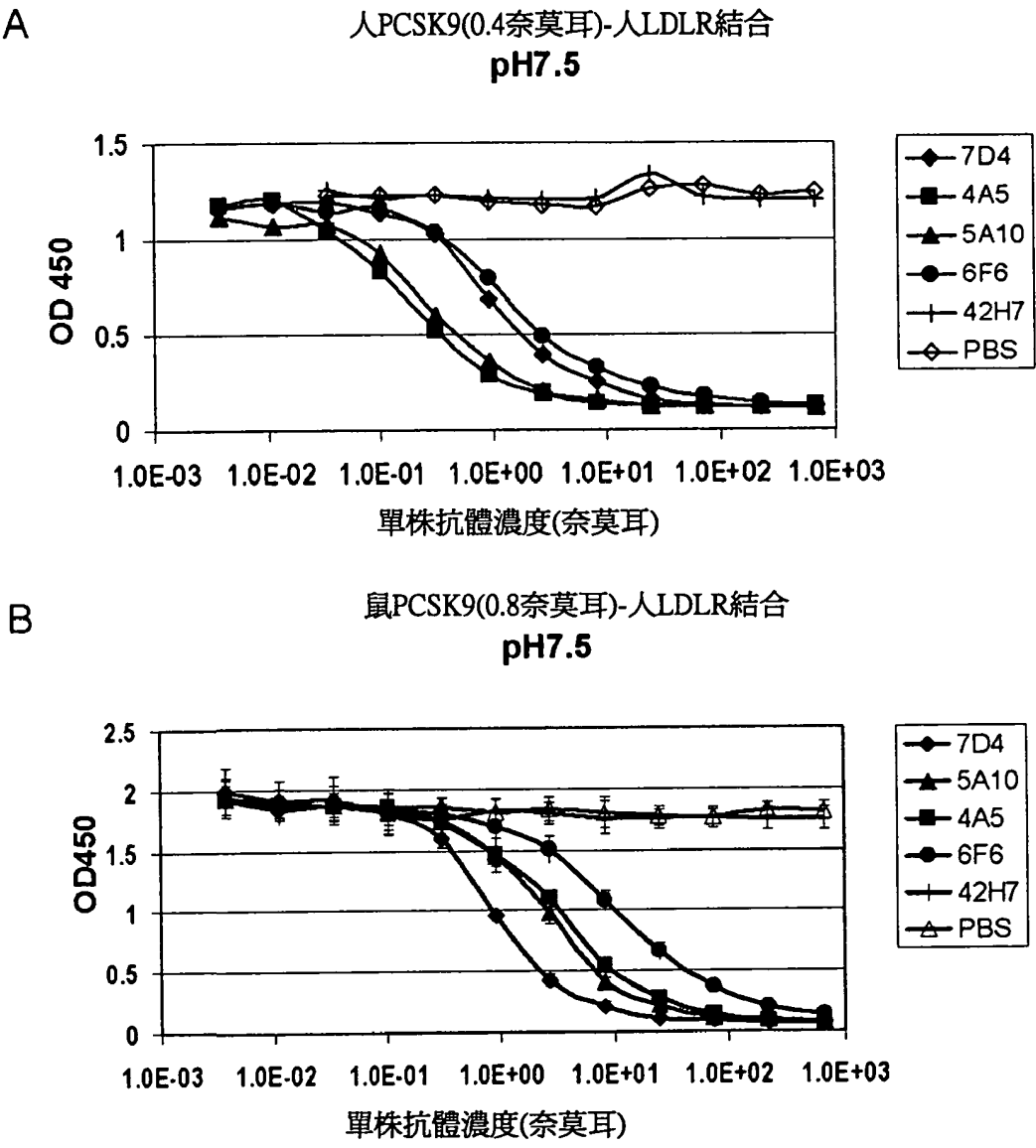


圖2

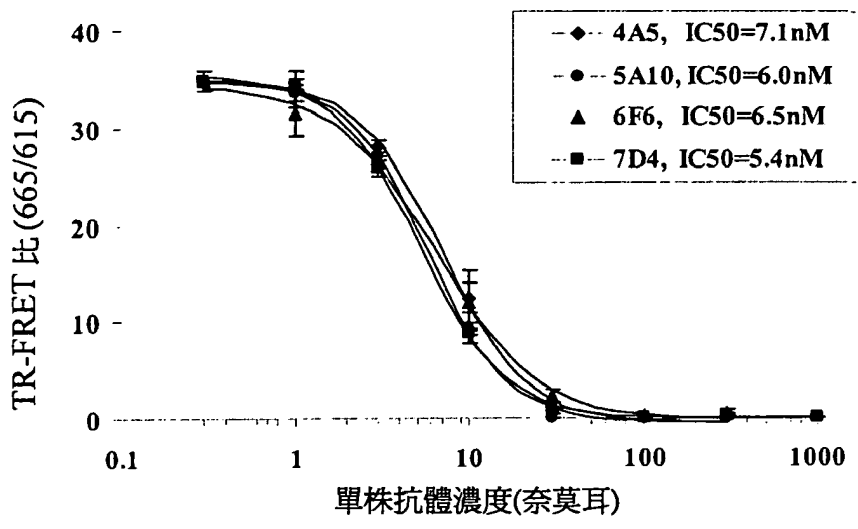


圖 3

A

單株抗體	表位
3E1	ERITTPRY
4F1	S PWINLERITPPRYRADE YQPPDG
5F6	未知第1組
6D6	未知第1組
4E1	未知
15F5	QEDEDGDYEEVLALRSEEDG LAEA
4G12	未知第1組
4E4	AKDVINEAWFEDQRVLTPNL
4A5	未知第4組
5A10	未知第4組
6F6	未知第4組
7D4	未知第4組

B 預先混合29.7奈莫耳人PCSK9與IgG之常態結合

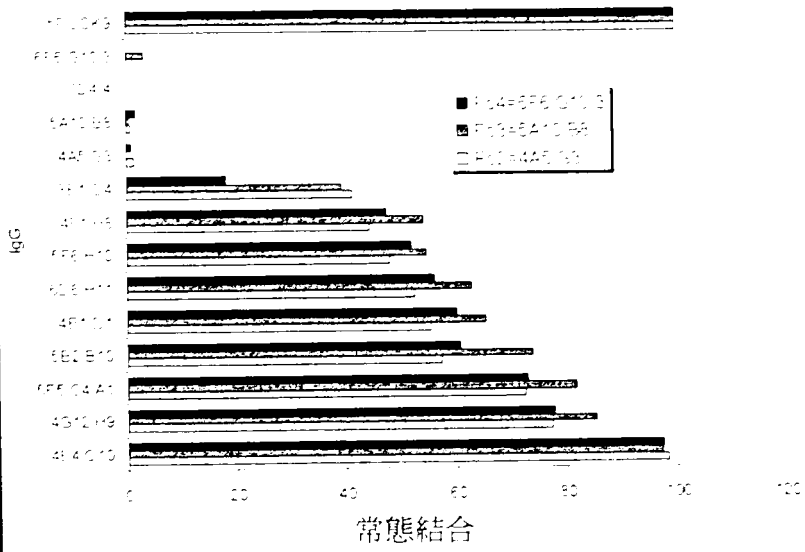


圖 4

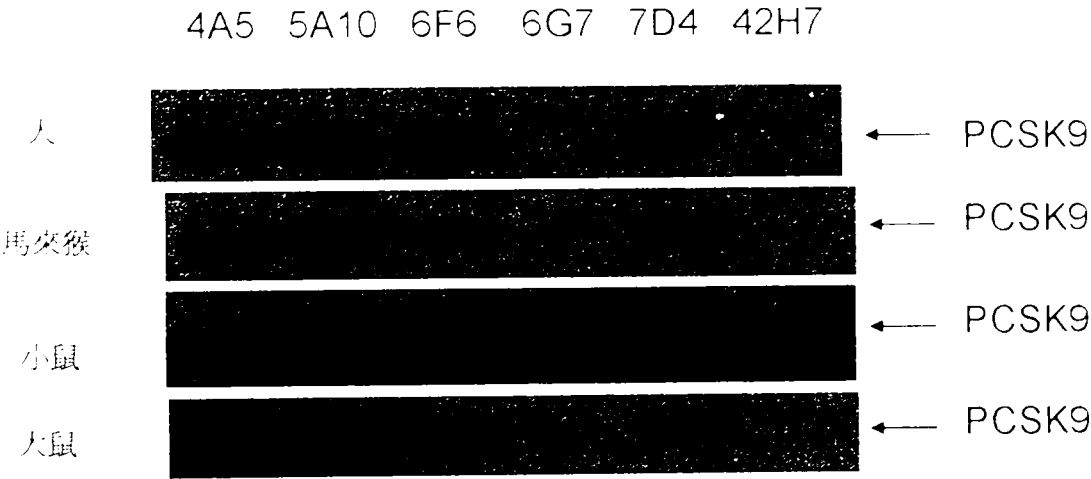


圖5

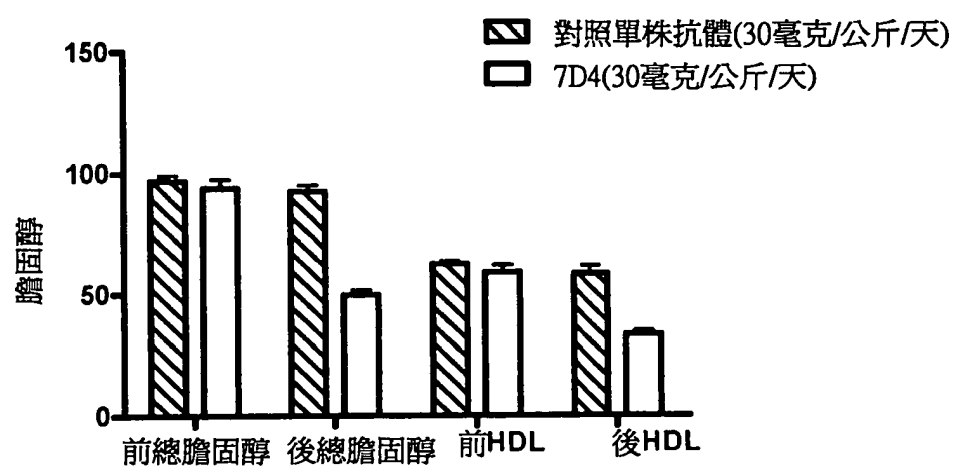


圖 6

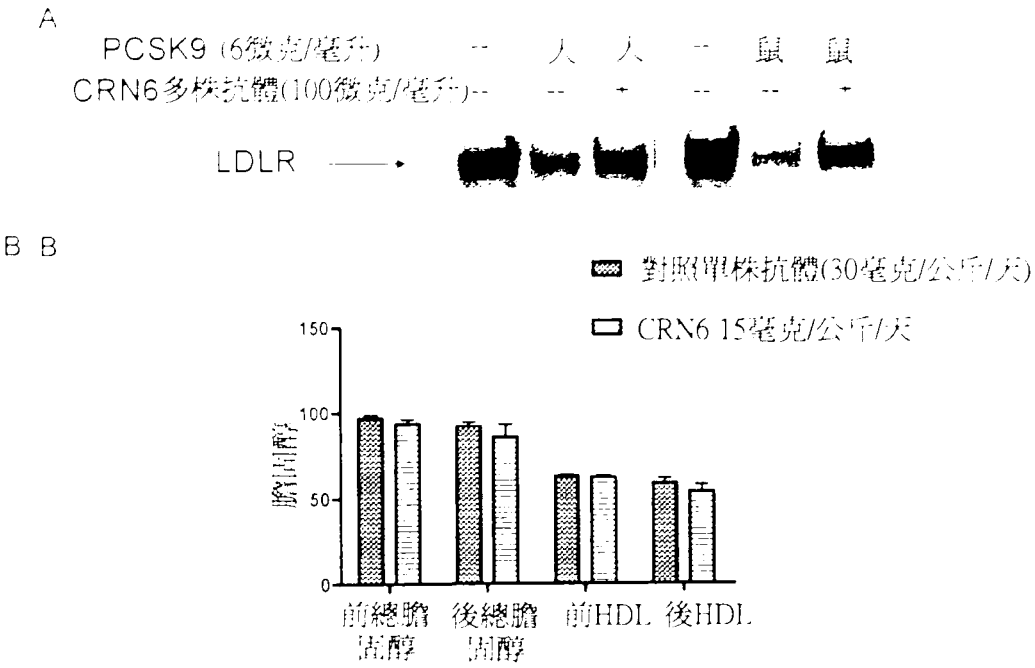


圖 7

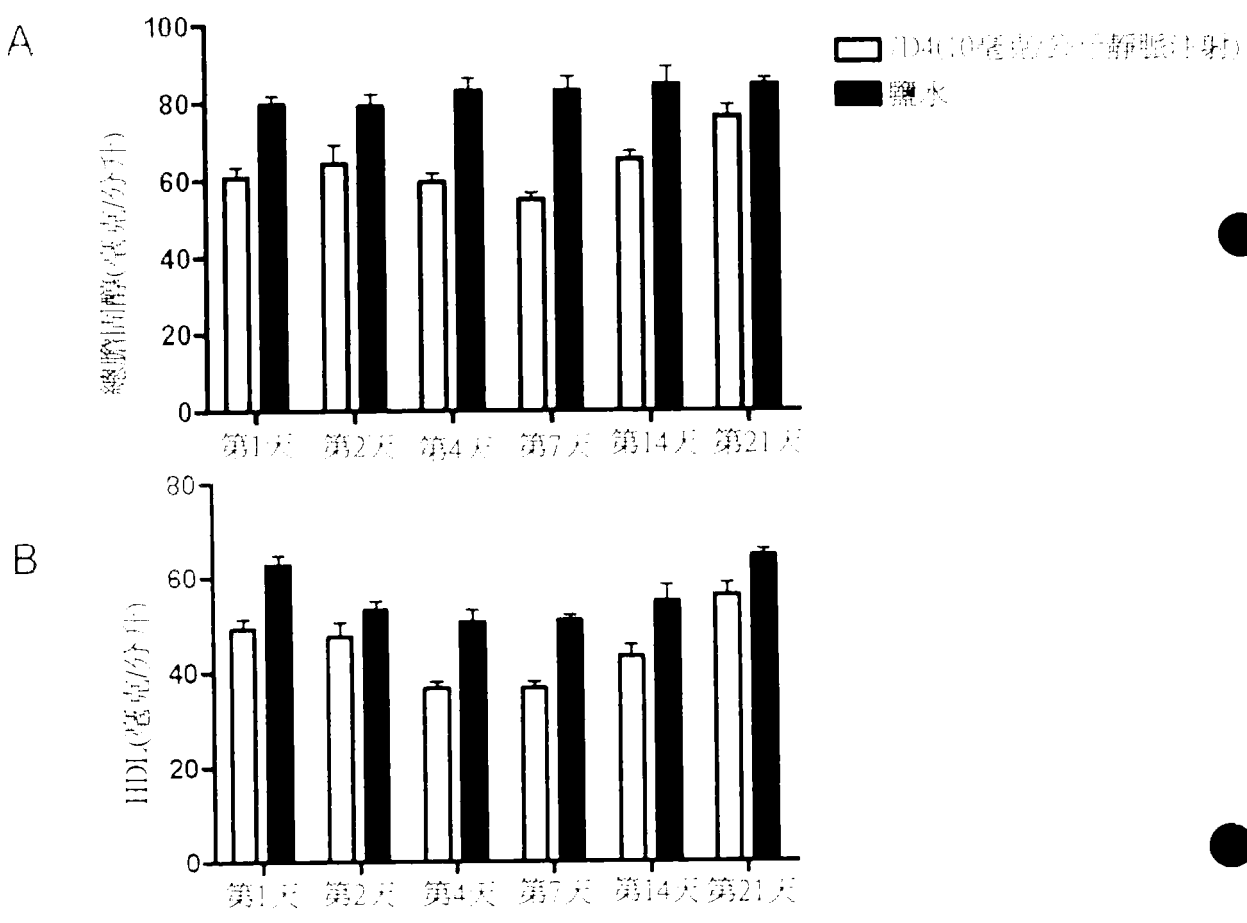


圖 8



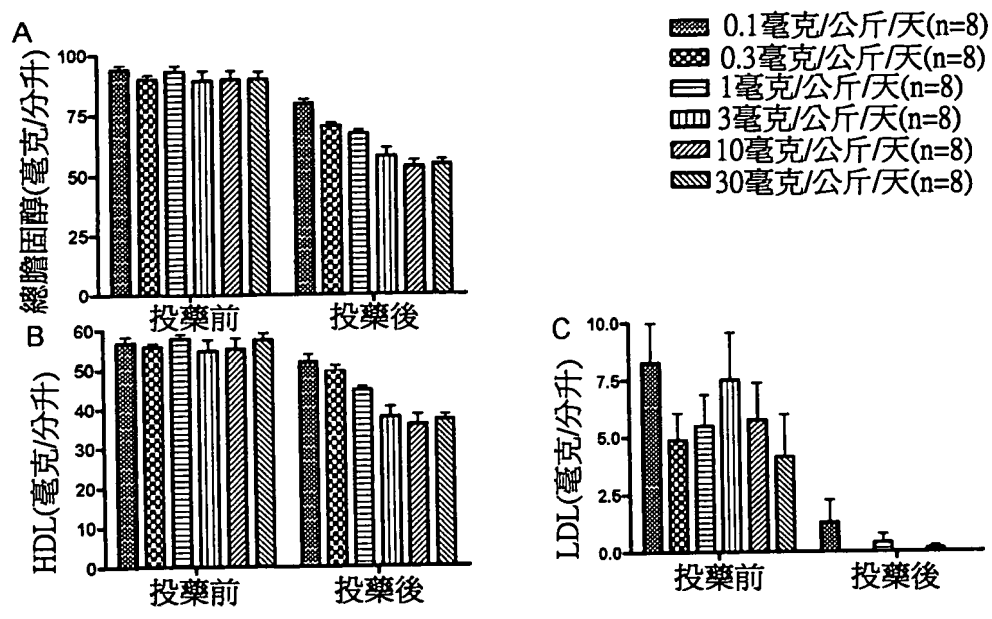


圖 9

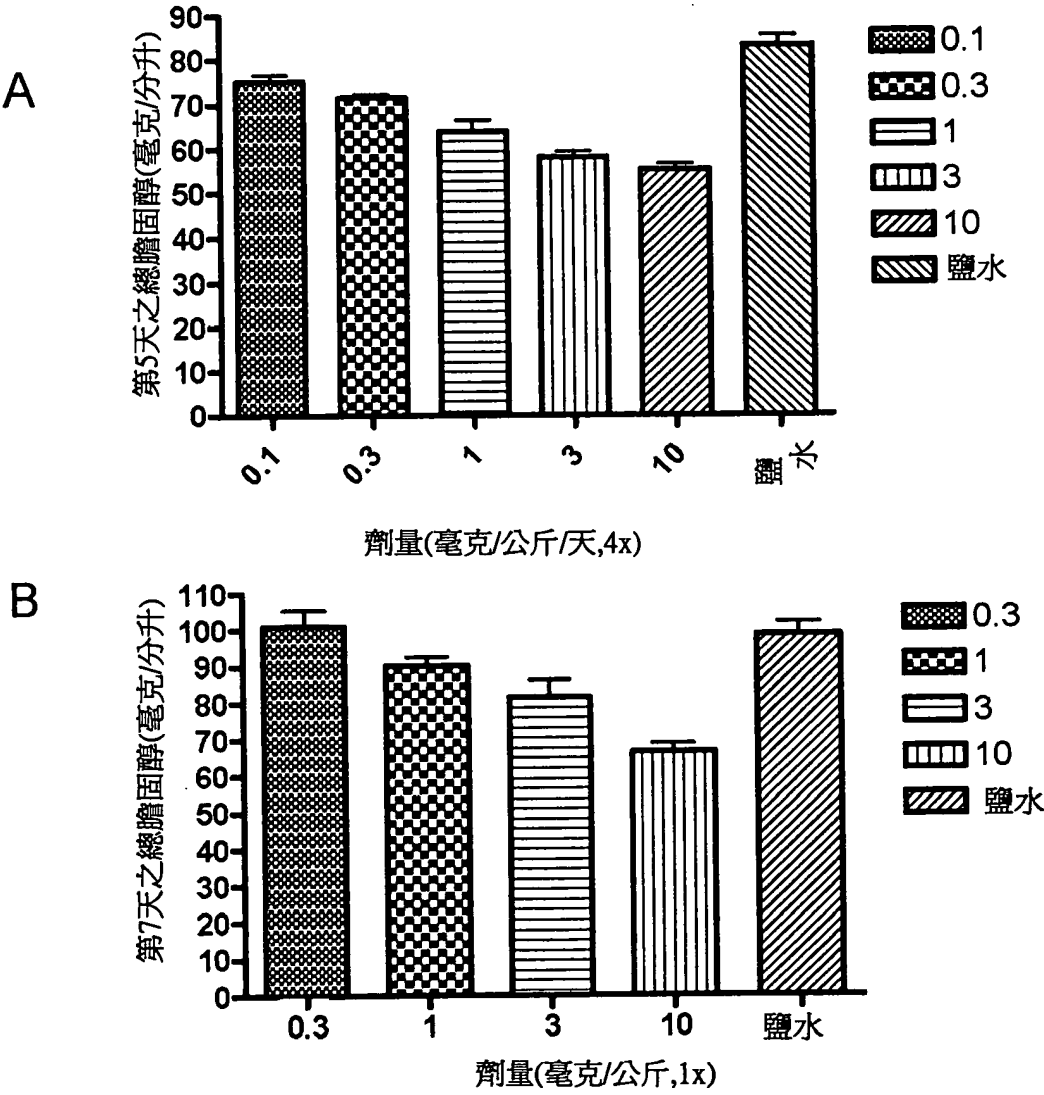


圖10

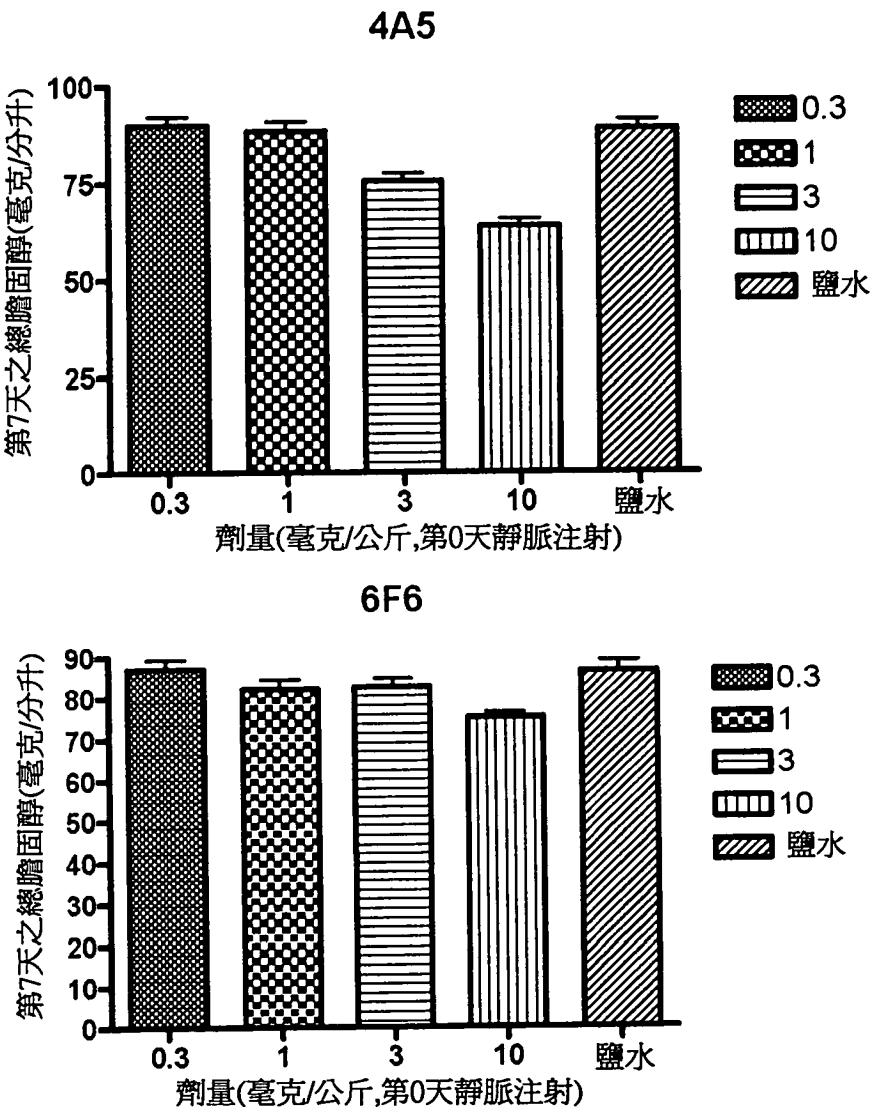


圖 11

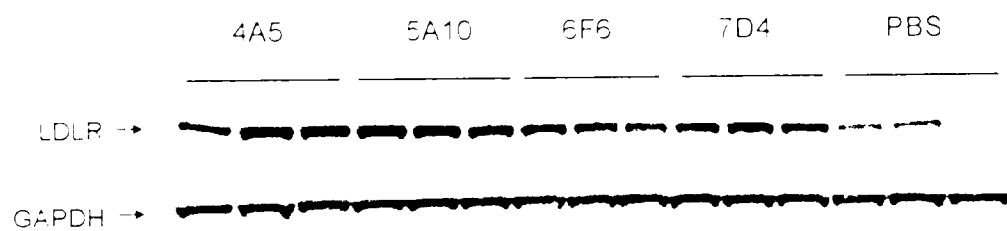


圖12

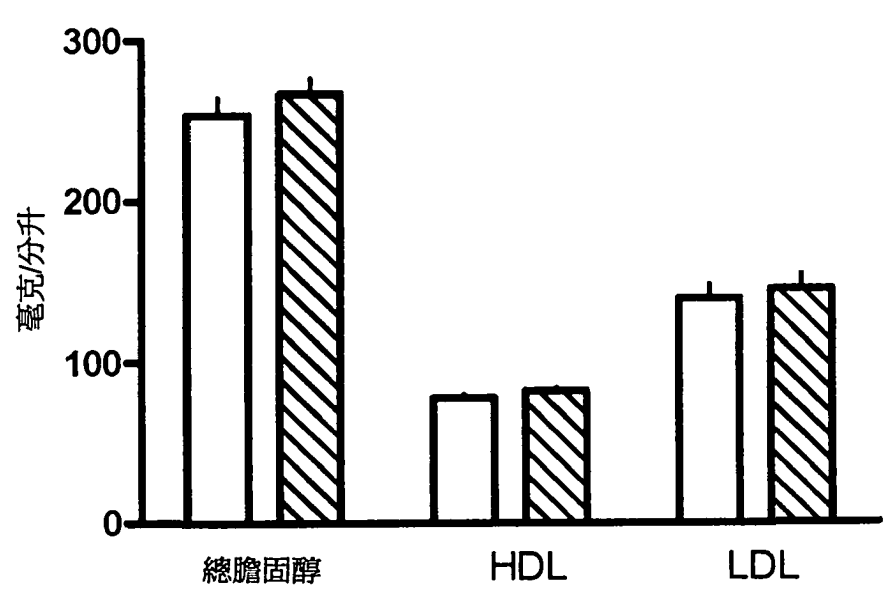


圖 13

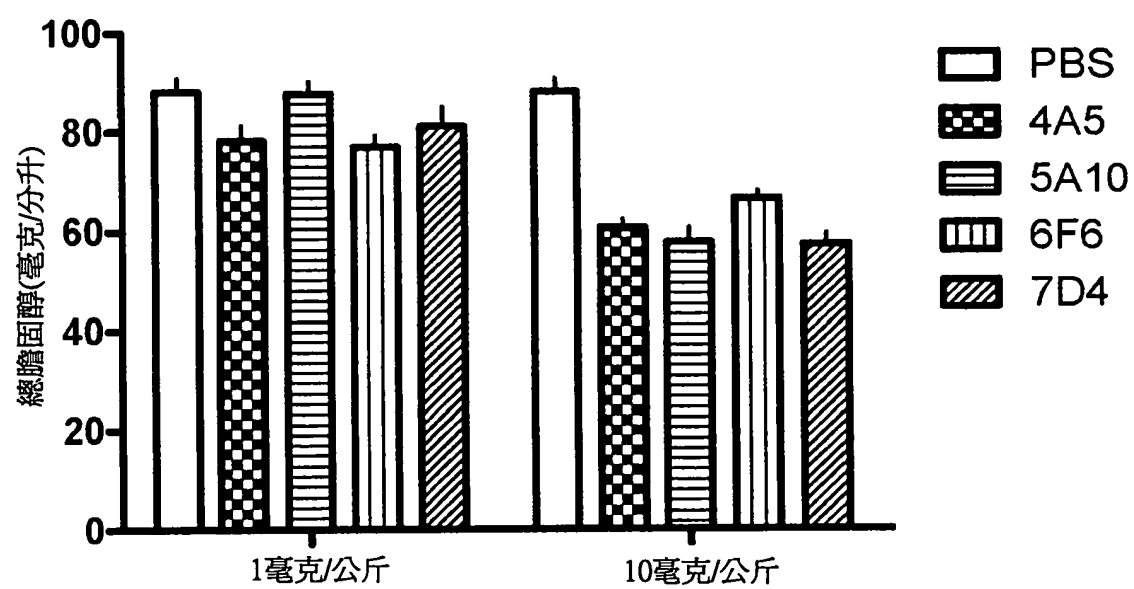


圖14

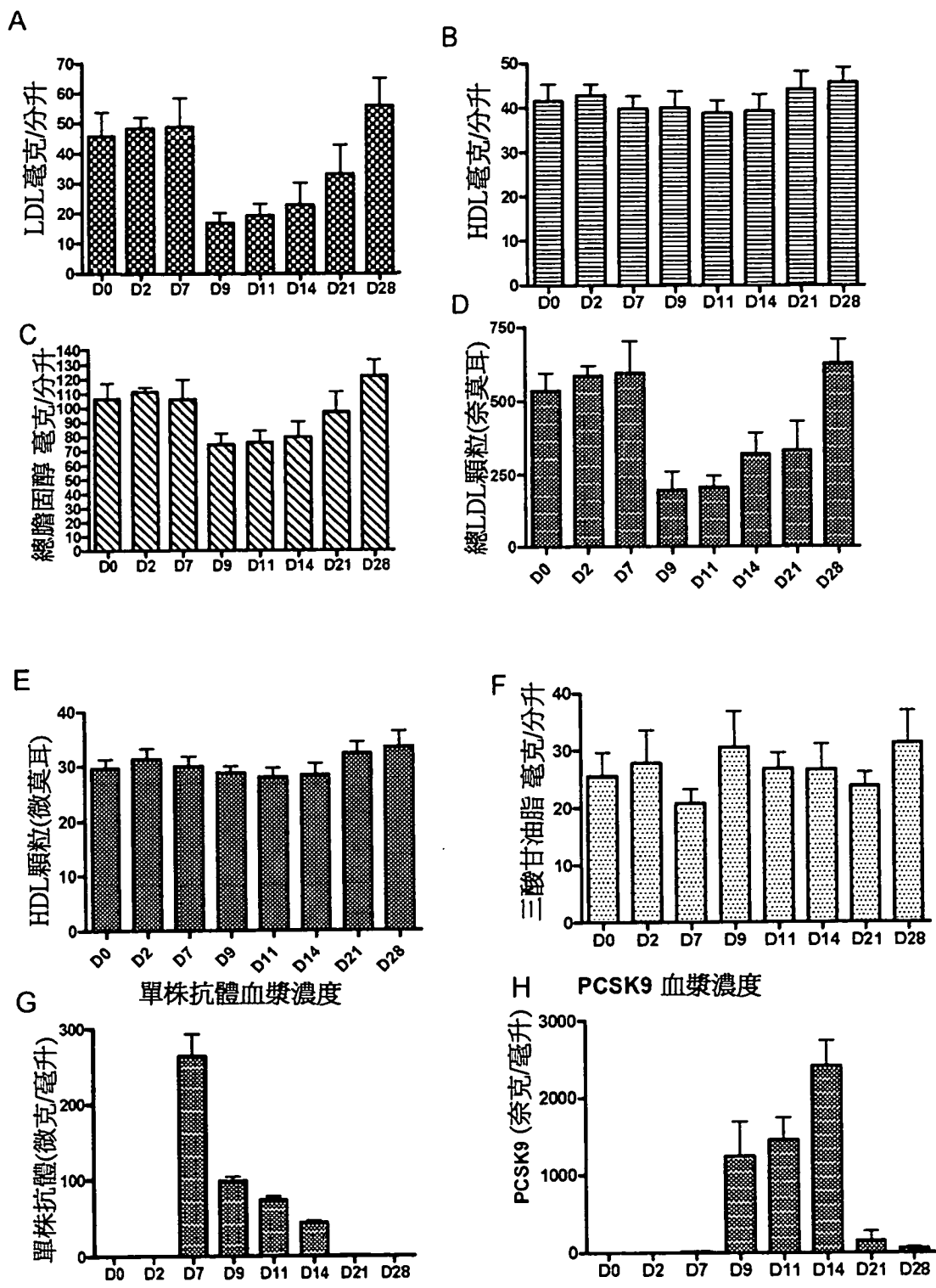


圖 15

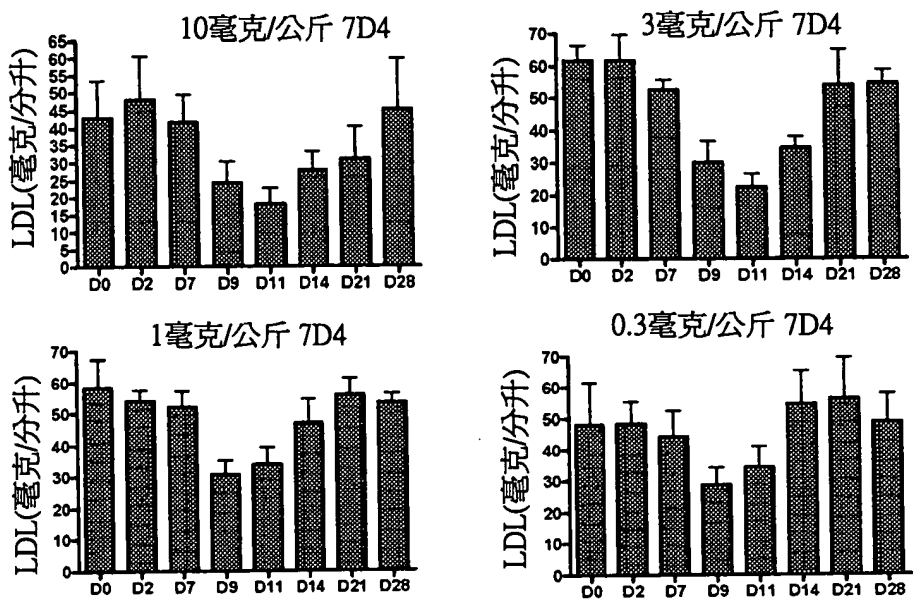


圖 16



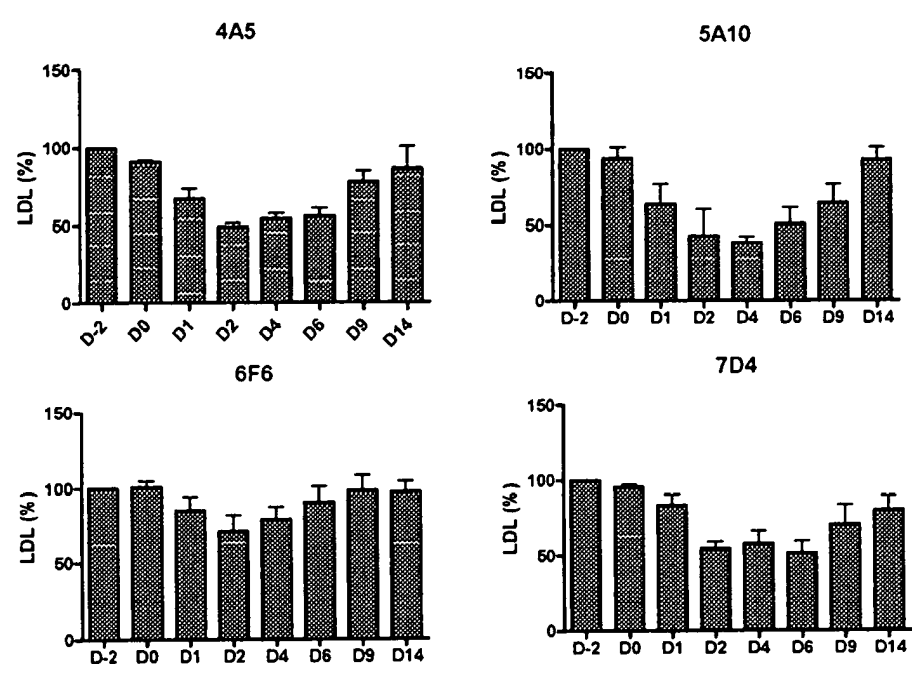


圖17

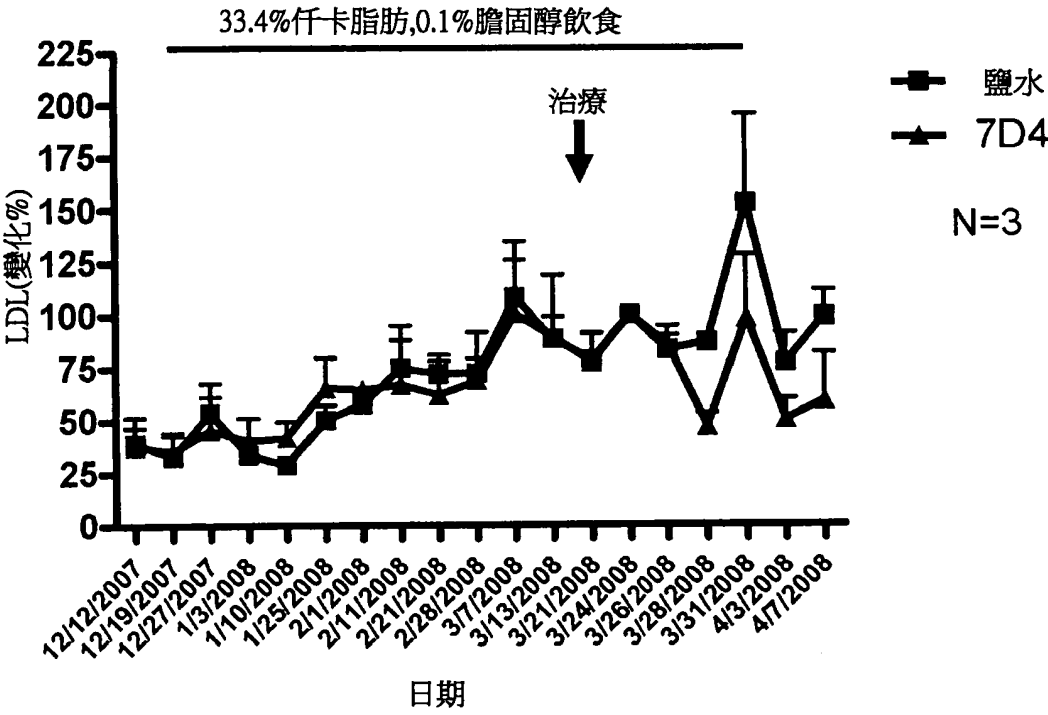


圖18

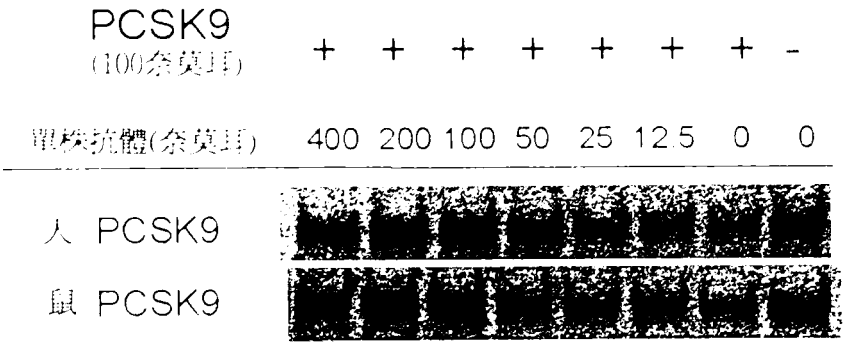


圖 19

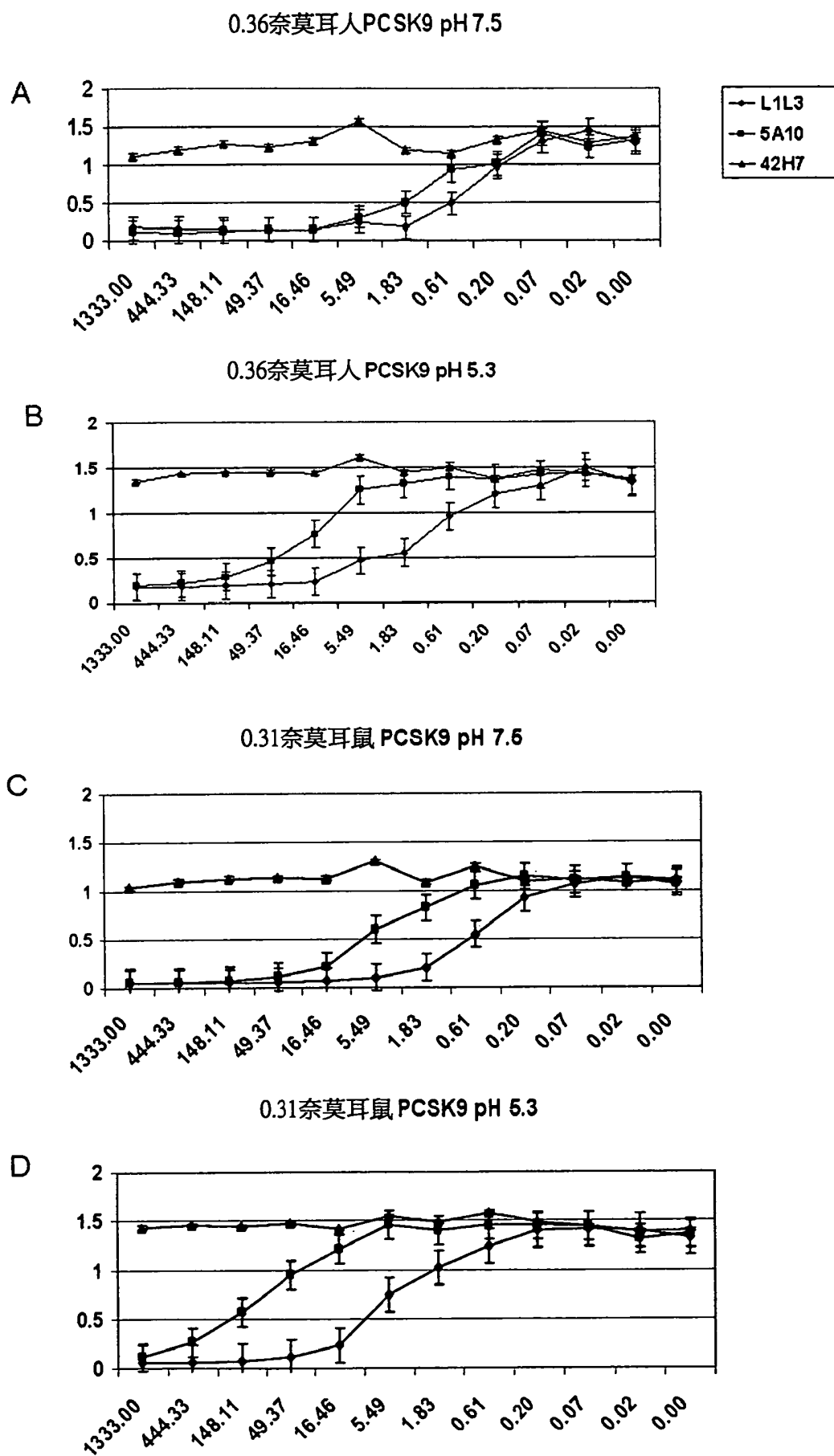


圖 20

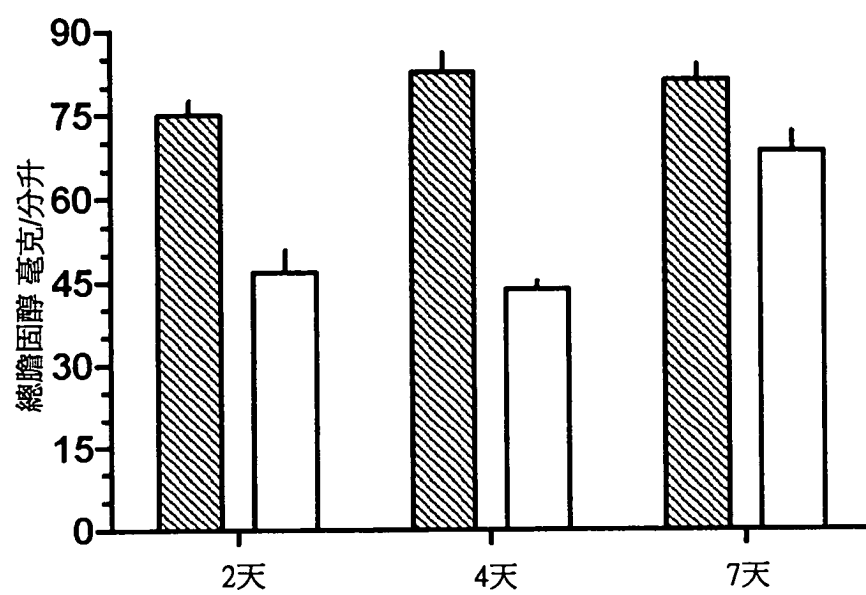


圖21

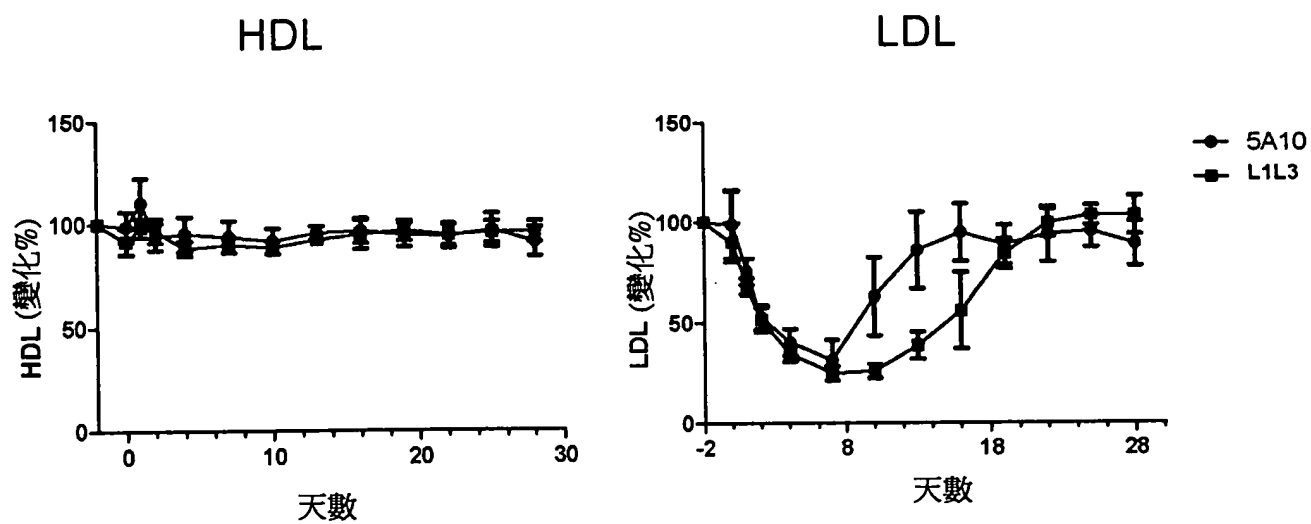


圖22

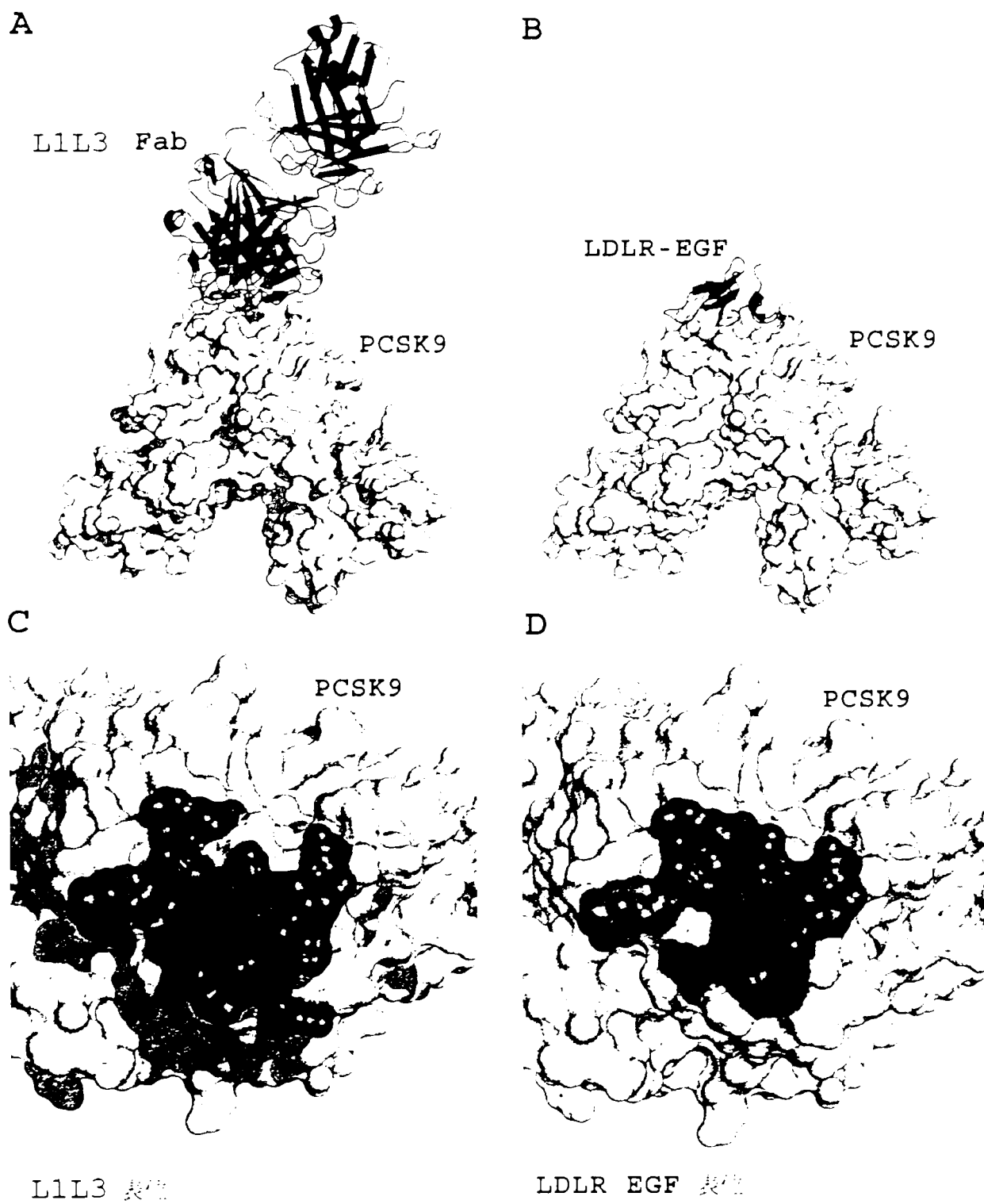


圖 23

圖 24A

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [pM]
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45		1100
QDVSTAVA 62							620000
GGTRWSTAVA 63							
RGDFVSTAVA 64							
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45	9x10 <sup>-4</sup>	
				EINPSGGRTNYNEKFKS 65		1x10 <sup>-3</sup>	
				EINPSSGRTNYNEKFKS 66		1x10 <sup>-3</sup>	
				EINPSTGRTNYNEKFKS 67		1x10 <sup>-3</sup>	
				EINPSIGRTNYNEKFKS 68		8x10 <sup>-4</sup>	
				EINPSDSRTNYNEKFKS 69		1x10 <sup>-3</sup>	
				EINPSGNGRTNYNEKFKS 70		1x10 <sup>-3</sup>	
				EINPSSSRTNYNEKFKS 71		1x10 <sup>-3</sup>	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 72	9x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAADY 73	9x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAIDY 74	3x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYARDY 75	5x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAGDY 76	1x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAKDY 77	1x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAPDY 78	7x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYASDY 79	8x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYALDY 80	1x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAVDY 81	2x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAWDY 82	2x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYAHDY 83	9x10 <sup>-3</sup>	



圖24B

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>cr</sub> [1/s]	K <sub>o</sub> [pM]
					ERPLYAFDY 84	2x10 <sup>-3</sup>	
					ERPLYATDY 85	1x10 <sup>-3</sup>	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSPTPT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRFPPTPT 86				2x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 87				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 88				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 89				7x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 90				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 13				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 91				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 92				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 93				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 94				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 95				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 96				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 97				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 98				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 99				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 100				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 101				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 102				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 103				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSWRT 104				6x10 <sup>-4</sup>	

圖24C

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [pM]
		QQRYSGVRT 105				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSQSRT 106				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSAERT 107				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSQFRT 108				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSSRRT 109				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSCSRT 110				3x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTNRR 111				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSRWRT 112				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSPYRT 113				4x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSYWRT 114				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSGFRT 115				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSYWRT 116				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSFKRT 117				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSAART 118				5x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSRYRT 119				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSLQRT 120				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTSRT 121				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSHART 122				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSKYRT 123				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSQSRT 124				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTAFT 125				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTCCT 126				6x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTDRT 127				7x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSEDRT 128				7x10 <sup>-4</sup>	

圖 24D

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>on</sub> [1/s]	K <sub>o</sub> [pM]
		QQRVVGRT 129				7x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSLSRT 130				7x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSLGRT 131				7x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSRART 132				8x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSHART 133				8x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSTPDT 134				9x10 <sup>-4</sup>	
		QQRYSQAPRT 135				9x10 <sup>-4</sup>	
KASQDVSTAVA 30	SASVRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 <sup>-4</sup>	
				EIQVSGGRTNYNEKFKS 136		9x10 <sup>-4</sup>	
				EINPWQGGRTNYNEKFKS 137		4x10 <sup>-4</sup>	
				EINPVQGGRTNYNEKFKS 138		6x10 <sup>-4</sup>	
				EISPFGGRTNYNEKFKS 9		2x10 <sup>-4</sup>	
				EISPYGGRTNYNEKFKS 139		3x10 <sup>-4</sup>	
				EIQESGGRTNYNEKFKS 140		3x10 <sup>-4</sup>	
				EISPIGGRTNYNEKFKS 141		4x10 <sup>-4</sup>	
				EINPEHGGRTNYNEKFKS 142		4x10 <sup>-4</sup>	
				EINPSEGGRTNYNEKFKS 143		4x10 <sup>-4</sup>	
				EINPWMGGRTNYNEKFKS 144		5x10 <sup>-4</sup>	
				EINPQGGRTNYNEKFKS 145		5x10 <sup>-4</sup>	
				EINPVKGGRTNYNEKFKS 146		5x10 <sup>-4</sup>	
				EIGPWGGRTNYNEKFKS 147		5x10 <sup>-4</sup>	
				EINPIGGRTNYNEKFKS 148		6x10 <sup>-4</sup>	
				EIQISGGRTNYNEKFKS 149		7x10 <sup>-4</sup>	

圖 24E

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>on</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [pM]
				EINPQGTRTNYNEKFS 150		8x10 <sup>-4</sup>	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDS 151	2x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDR 152	2x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAMDR 153	2x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYANDA 154	3x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYANDV 155	3x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAHDV 156	4x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDY 157	4x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDL 10	3x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDV 158	5x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDA 159	5x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYANDS 160	5x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYATDL 161	3x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYASDS 162	6x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYANDM 163	3x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAHDL 164	4x10 <sup>-4</sup>	
					ERPLYAHDl 165	6x10 <sup>-4</sup>	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45		1470
					ERPLYANDV 166		342
					ERPLYASDY 167		755
					ERPLYASDL 10		343
					ERPLYASDR 168		271

圖 24F

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [pM]
					ERPLYASDV 169		286
					ERPLYAHDV 170		385
					ERPLYANDM 171		413
					ERPLYAHDL 172		376
				EINPWQGRRTNYNEKFS 173			1390
				EINPVQGRRTNYNEKFS 174			439
				EISPYGGRRTNYNEKFS 175			216
				EISPFGRRTNYNEKFS 9			239
				EIGPWGGRRTNYNEKFS 176			363
		QQRYSDWRT 177					616
		QQRYSSWRT 178					728
		QQRYSAERT 179					345
		QQRYSLHRT 180					228
		QQRYSLWRT 13					94
		QQRYSSERT 181					886
		QQRYSLQRT 182					497
		QQRYSTRRT 183					297
							KD at 37C
		QQRYSLWRT 13		EISPFGRRTNYNEKFS 9			343
		QQRYSLWRT 13			ERPLYASDL 10		384
				EISPFGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		253
		QQRYSLWRT 13		EISPFGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		183
		QQRYSDWRT 184			ERPLYASDL 10		466

圖24G

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k <sub>off</sub> [1/s]	K <sub>D</sub> [pM]
					ERPLYASDL 10		703
							KD at 37C
				EISPFGGRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		155
		QQRYS LWRT 13		EISPFGGRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		79
				EISPYGGRTNYNEKFS 185	ERPLYASDL 10		215
		QQRYSRSRT 186			ERPLYASDL 10		621
					ERPLYASDL 10		968
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45		1470
RASQGISSALA 11							1660
	GASYLHS 186						9890
	DASNRAT 187						105000
RASQGISSALA 11	SASYRYT 12	QQRYS LWRT 13	GYTFTSYMH 59	EISPFGGRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		7

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無



## 七、申請專利範圍：

1.一種經分離之抗前蛋白轉化酶枯草溶菌素 9(PCSK9) 抗體，其中該抗體辨識人 PCSK9 上之表位，該表位包含 Uniprot 登錄號 Q8NBP7 之 PCSK9 胺基酸序列的胺基酸殘基 153 至 155、194、195、197、237 至 239、367、369、374 至 379 和 381，其中該抗體包含 6 個互補決定區 (CDR)，且當利用 Huh7 細胞之低密度脂蛋白受體 (LDLR) 下調 (down-regulation) 試驗進行活體外測量時該抗體係 PCSK9 媒介效應 LDLR 量之完全拮抗劑。

2.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中該抗體拮抗以活體外 PCSK9 與 LDLR 結合所測量之 PCSK9 與 LDLR 之細胞外交互作用且對個體投予時降低該個體血中低密度脂蛋白 (LDL) 膽固醇。

3.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中該抗體係人化抗體、人抗體或嵌合抗體。

4.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中人 PCSK9 上之表位不包含一或多個 Uniprot 登錄號 Q8NBP7 之 PCSK9 胺基酸序列的胺基酸殘基 71、72、150 至 152、187 至 192、198 至 202、212、214 至 217、220 至 226、243、255 至 258、317、318、347 至 351、372、373、380、382 和 383。

5.如申請專利範圍第 1 項之抗體，其中該抗體辨識人 PCSK9 上之表位，該表位與 LDLR 之 EGF 樣結構域交互作用的 PCSK9 之表面重疊超過 75%。

6.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之抗體，其包含

具有 SEQ ID NO: 8、59 或 60 所示之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)互補決定區 1(CDR1)、

具有 SEQ ID NO: 9 或 61 所示之胺基酸序列的 VH CDR2、

具有 SEQ ID NO: 10 所示之胺基酸序列的 VH CDR3、

具有 SEQ ID NO: 11 所示之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)CDR1、

具有 SEQ ID NO: 12 所示之胺基酸序列的 VL CDR2、  
及

具有 SEQ ID NO: 13 所示之胺基酸序列的 VL CDR3、

其中該 VH CDR1 可選擇地包含在 SEQ ID NO: 59 之胺基酸位置 8 上的取代，該 VH CDR2 可選擇地包含在 SEQ ID NO: 9 之一或多個胺基酸位置 3、4、5、6 及 7 上的取代，且該 VH CDR3 可選擇地包含在 SEQ ID NO: 10 之一或二個胺基酸位置 7 及 9 的取代。

7.如申請專利範圍第 6 項之抗體，其包含

具有 SEQ ID NO: 8 或 59 所示之胺基酸序列的 VH CDR1、

具有 SEQ ID NO: 9 或 61 所示之胺基酸序列的 VH CDR2、及

具有 SEQ ID NO: 10 所示之胺基酸序列的 VH CDR3。

8.如申請專利範圍第 6 項之抗體，其包含

具有 SEQ ID NO: 53 所示之胺基酸序列的 VL 區和具有 SEQ ID NO: 54 所示之胺基酸序列的 VH 區。

9.如申請專利範圍第 8 項之抗體，其包含輕鏈和重鏈，該輕鏈具有 SEQ ID NO: 14 所示之胺基酸序列且該重鏈具有 SEQ ID NO: 15 所示之胺基酸序列，其含或不含 SEQ ID NO: 15 之 C 端離胺酸。

10.如申請專利範圍第 9 項之抗體，其中該抗體另包含免疫惰性恆定區。

11.如申請專利範圍第 10 項之抗體，其中該抗體係選自 IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgG<sub>2Δa</sub>、IgG<sub>4Δb</sub>、IgG<sub>4Δc</sub>、IgG<sub>4</sub> S228P、IgG<sub>4Δb</sub> S228P 或 IgG<sub>4Δc</sub> S228P 之同型。

12.如申請專利範圍第 11 項之抗體，其中該恆定區係非糖基化 Fc。

13.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之抗體。

14.一種套組，其包含第一容器和第二容器，該第一容器包含治療有效量之如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之抗體且該第二容器包含治療有效量之他汀(statin)。

15.一種如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之抗體於製備藥物之用途，該藥物係用於降低個體血中 LDL 膽固醇量。

16.如申請專利範圍第 15 項之用途，其係用於減輕高膽固醇血症且降低心血管疾病(CVD)之發生。

17.一種核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 12 項中

任一項之抗體。

18. 一種宿主細胞，其重組產製如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項之抗體。