

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-501745

(P2023-501745A)

(43)公表日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁)

(21)出願番号	特願2022-528582(P2022-528582)	(71)出願人	522192207
(86)(22)出願日	令和2年11月18日(2020.11.18)		エーディー ファーマシューティカルズ
(85)翻訳文提出日	令和4年7月19日(2022.7.19)		カンパニー, リミティド
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/129763		中華人民共和国, コアントン 5 1 0 5
(87)国際公開番号	WO2021/098720		3 0, コアンチョウ, コアンチョウ デ
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		イベロップメント ディストリクト サイ
(31)優先権主張番号	201911132974.4		エンス シティ, コーシュエタータオ ナ
(32)優先日	令和1年11月18日(2019.11.18)		ンバー 1 6 2, チョアンイー ビルディ
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		ング, ピー2, フロア 1 1, ユニット
			1 1 0 1
(31)優先権主張番号	201911133187.1	(74)代理人	100099759
(32)優先日	令和1年11月18日(2019.11.18)		弁理士 青木 篤
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100108903
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗P C S K 9抗体及びその使用

(57)【要約】

抗P C S K 9抗体及びその使用、好ましくは高コレステロール血症の治療のための使用を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高コレステロール血症を治療するための、抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記抗 P C S K 9 抗体が以下を含む、請求項 1 に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメント：

H C D R 1 : G F T F S S Y S (S E Q I D N O : 5) ;
H C D R 2 : I S S S S S Y I (S E Q I D N O : 6) ;
H C D R 3 : E Y D F W S A Y Y D A F D V (S E Q I D N O : 7) ;
L C D R 1 : S R N I G G G N D (S E Q I D N O : 8) ;
L C D R 2 : G V I (S E Q I D N O : 9) ; 及び
L C D R 3 : Q S F D G S L S G S V (S E Q I D N O : 10) .

10

【請求項 3】

前記抗 P C S K 9 抗体が以下を含む、請求項 1 に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメント：

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は、それと少なくとも 80 % の同一性、好ましくは少なくとも 85 % の同一性、より好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、及び

20

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列、又は、それと少なくとも 80 % の同一性、好ましくは少なくとも 85 % の同一性、より好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域。

【請求項 4】

前記抗体が、モノクローナル抗体、好ましくはヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物、好ましくは高コレステロール血症を治療するための医薬組成物。

30

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、キット、好ましくは高コレステロール血症を治療するためのキットであって、

好ましくは、前記キットが、スタチン（好ましくは 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A (HMG-CoA) レダクターゼ阻害剤、より好ましくは、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチンおよびピタバスタチンから選択される）、並びに／又はエゼチミブを更に含む、キット。

【請求項 7】

前記抗 P C S K 9 抗体が、腸管外又は非腸管外の投与経路に適した形態である、請求項 6 に記載のキット。

40

【請求項 8】

治療上有効量の請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗 P C S K 9 抗体又はその抗原結合フラグメントを、必要とする対象に投与すること（例えば、腸管外的に又は非腸管外的に）を含む、高コレステロール血症を治療するための方法であって、

好ましくは、スタチンが前記対象に同時に投与され、より好ましくは、スタチン及びエゼチミブが前記対象に同時投与される、方法。

【請求項 9】

50

前記抗PCSK9抗体若しくはその抗原結合フラグメント、前記スタチン及び／又はエゼチミブが、同時に又は別々に投与される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記治療上有効量が、患者の体重に基づいて、 0.1mg/kg 以上、好ましくは $0.1\sim 60\text{mg/kg}$ である、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記高コレステロール血症が、以下からなる群より選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメント、請求項5に記載の医薬組成物、請求項6若しくは7に記載のキット、請求項8若しくは9に記載の方法：

(i) ホモ接合型家族性高コレステロール血症、ここで、より好ましくは、前記高コレステロール血症が、LDLR、アポリポタンパク質B (ApoB)、PCSK9若しくは低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質1 (LDLRAP1)の遺伝子における1(対)又はそれ以上(対)の、対立遺伝子又は非対立遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされており、好ましくは前記対立遺伝子の遺伝子変異が、LDLR機能不全変異、LDLRへのLDLの結合に影響を与えるApoB遺伝子変異、LDLRに対するPCSK9の親和性の増加をもたらす機能変異、及びLDL内在化活性の低下をもたらすLDLRAP1機能不全変異を含み、並びに／又は好ましくは前記高コレステロール血症(より好ましくはHofH)が、10歳未満の皮膚若しくは腱黄色腫又はLDLR、ApoB、PCSK9若しくはLDLRAP1遺伝子における1対以上の対立遺伝子変異を持っている両親と組み合わせて、以前に未治療の場合は $\text{LDL-C} > 13\text{mmol/L}$ (500mg/dL)を示し、以前に(エゼチミブと組み合わせたスタチンの高用量／最大耐量で)治療した場合は $\text{LDL-C} \geq 8\text{mmol/L}$ (300mg/dL)を示し；

(ii) ヘテロ接合型家族性高コレステロール血症、ここで、好ましくは前記ヘテロ接合型家族性高コレステロール血症が、LDLR、アポリポタンパク質B (ApoB)、PCSK9若しくは低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質1 (LDLRAP1)の遺伝子における1つ以上の対になっていない対立遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされており、より好ましくは前記対立遺伝子の遺伝子変異が、LDLR機能不全変異、LDLRへのLDLの結合に影響を与えるApoB遺伝子変異、LDLRに対するPCSK9の親和性の増加をもたらす機能変異、及びLDL内在化活性の低下をもたらすLDLRAP1機能不全変異を含み；並びに

(iii) 心血管疾患のリスクが非常に高い若しくは高い患者の高コレステロール血症、ここで、心血管疾患のリスクが非常に高い若しくは高い前記患者の前記高コレステロール血症が、以下の条件1及び条件2を同時に満たすことを指し、ここで、前記条件1が、a)からh)のいずれかを満たし：a)冠状動脈疾患の病歴(例えば、急性冠症候群、安定冠状動脈性心臓病、血行再建術後、虚血性心筋症)、b)虚血性脳卒中の病歴(ラクナ梗塞を除く)、c)一過性脳虚血発作、d)末梢アテローム性動脈硬化症(例えば：頸動脈アテローム性動脈硬化症、頸動脈内膜剥離術後、頸動脈ステント留置後、血行再建術後、下肢アテローム性動脈硬化症、下肢動脈血管再生術後)、e) $\text{LDL-C} \geq 4.9\text{mmol/L}$ (190mg/dL)又は $\text{TC} \geq 7.2\text{mmol/L}$ 、f) 1.8mmol/L (70mg/dL) $\leq \text{LDL-C} < 4.9\text{mmol/L}$ (190mg/dL)の40歳以上の2型糖尿病患者、g)ステージ3の慢性腎疾患(すなわち、測定及び計算された糸球体濾過率 $30\text{mL/min/1.73m}^2 \leq \text{eGFR} < 60\text{mL/min/1.73m}^2$)、h)以下のリスクファクターのうちの少なくとも3つ：45歳以上の男性および55歳以上の女性；高血圧；喫煙；CVDの家族歴(一親等の親族の場合：55歳未満の男性および65歳未満の女性)；HDLコレステロール $< 40\text{mg/dL}$ ；肥満($\text{BMI} \geq 28\text{kg/m}^2$)；そして、前記条件2が、a)又はb)のいずれかを満たす：安定した基礎脂質低下剤治療の4週間後に：a)リスクが非常に高い患者の LDL-C レベル $> 1.8\text{mmol/L}$ (70mg/dL)、又はb)リスクが高い患者の LDL-C レベル $> 2.6\text{mmol/L}$ (100mg/dL)。

【請求項12】

以下を含む、高コレステロール血症の患者を治療するための方法：

(i) 前記患者をジェノタイピングすること、

(ii) 前記患者からのサンプル（好ましくは血清、血漿、又は全血）のLDL-Cレベルを測定すること、並びに

(iii) 前記患者がホモ接合型又はヘテロ接合型の家族性高コレステロール血症と特定された場合、前記患者に、治療上有効量の抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントを、好ましくはスタチンと組み合わせて、より好ましくはスタチンおよびエゼチミブと組み合わせて、投与すること、ここで、好ましくは前記治療上有効量が、前記患者の体重に基づいて、 0.1 mg/kg 以上、好ましくは $0.1\sim 60\text{ mg/kg}$ である。

【請求項13】

前記ホモ接合型又はヘテロ接合型の家族性高コレステロール血症が、請求項11に定義されているとおりである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記患者がヘテロ接合型家族性高コレステロール血症と特定された場合、前記患者が、以前に脂質調節薬で治療されていなかったとき、血清LDL-Cレベル $\geq 4.7\text{ mmol/L}$ (180 mg/dL)であり、あるいは

前記患者がヘテロ接合型家族性高コレステロール血症と特定された場合、前記患者が、以下のa)及びb)の少なくとも1つを同時に満たす：a)皮膚若しくは腱黄色腫を患っている患者、又はリポイド角膜環を有する45歳未満の患者、及びb)FHまたは早期成人アテローム性心血管疾患(ASCVD)、特に冠状動脈性心臓病と一親等の血縁者がいること、

請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

前記抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントが、2週間(14日)又は4週間(28日)のサイクルで投与され、好ましくは、各サイクルの初日(D1)に皮下投与される、請求項8～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

心血管疾患のリスクが非常に高い若しくは高い高コレステロール血症の患者の、心血管疾患の発作及び死亡のリスクを低減するための医薬製剤(又は医薬組成物)の調製における、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントの、使用。

【請求項17】

以下を含む、高脂血症性心血管疾患患者(より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高い／高い患者)の血中コレステロールを低下させるため、又は高脂血症性心血管疾患患者における心血管疾患発作のリスクを低減するための方法であって：

前記患者に、治療上有効量の請求項1～4のいずれか一項に記載の抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントを(腸管外的に又は非腸管外的に)、好ましくはスタチンと組み合わせて、より好ましくはスタチン及びエゼチミブと組み合わせて、投与すること、

ここで、より好ましくは、前記スタチンが、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチン及びピタバスタチン、又はこれらの任意の組み合わせから選択される、

方法。

【請求項18】

前記抗PCSK9抗体が、2週間(14日)又は4週間(28日)のサイクルで投与され、好ましくは、各サイクルの初日(D1)に皮下投与される、請求項17に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、医療技術の分野、特に高コレステロール血症の治療に関する。より具体的に

10

20

30

40

50

は、本出願は、高コレステロール血症の治療における抗PCSK9抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

PCSK9は、分泌型セリンプロテアーゼであり、細胞表面の低密度リポタンパク質受容体(LDLR)に結合して分解し、その結果細胞膜の表面のLDLRレベルを低下させる。PCSK9は、肝臓によって顕著に合成され、血液中に分泌される。LDLRは、肝細胞膜及びHepG2やHep3B等の肝細胞株の表面に広く分布している。PCSK9のLDLRへの結合を阻害すると、細胞膜の表面でLDLRのレベルを維持することができ、それによって、血漿コレステロールLDLの細胞への侵入を仲介し、血漿コレステロールレベルを維持する。

10

【0003】

高コレステロール血症は脂質代謝の欠陥を特徴とする疾患であり、一部の患者は家族性高コレステロール血症(FH)と呼ばれる常染色体優性遺伝子変異を持ち、主に血漿低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)レベルの有意な増加によって現れる。FHは、ヘテロ接合型(heterozygosity)、ホモ接合型(homozygosity)、複合ヘテロ接合型(compound heterozygosity)、ダブルヘテロ接合型(double heterozygosity)の4種類に分類でき、そのうち最初の2つが大部分を占める。ホモ接合型家族性高コレステロール血症(HoFH)は比較的まれであり、有病率は1/100万~3/100万である。HoFH疾患は、LDL-Cレベルの上昇、及び初期のアテローム性動脈硬化症(atherosclerotic cardiovascular disease)のリスクの増加を特徴としている。欧州アテローム性動脈硬化症協会(EAS)は、HoFH患者は通常、20歳前後でアテローム性動脈硬化症を発症し、介入なしで30歳前後で死亡すると述べている。HoFHの主な治療法は、治療的なライフスタイルの変更、投薬、および血漿リポタンパク質交換などの他の治療を含む。スタチンは、今でも主な治療薬である。しかしながら、HoFH患者の場合、血中脂質レベルが高い場合は、スタチンとエゼチミブとの併用療法の併用が必要になることがよくある。

20

【0004】

ヘテロ接合型家族性高コレステロール血症(HeFH)の有病率は約1:500から1:200であり、これは世界中で約1,400万から3,400万人のHeFH患者を意味する。HeFHの主な治療法は、治療的なライフスタイルの変更、投薬、および血漿リポタンパク質交換などの他の治療を含む。スタチンは、今でも主な治療薬である。しかしながら、HeFH患者の場合、血中脂質レベルが高い場合は、スタチンとエゼチミブとの併用療法の併用が必要になることがよくある。

30

【0005】

PCSK9阻害剤は、循環PCSK9がLDLRに結合するのを直接防ぎ、PCSK9を介したLDLRの分解を減らし、LDL-Cへの除去能力を高め、基本的な脂質低下剤(lipid-lowering agents)に基づいて患者の血中脂質レベルをさらに下げることができる。市場にはPCSK9を標的とする2つのモノクローナル抗体がある：アリロクマブ(alirocumab)及びエボロクマブ(evolocumab)。米国のRegeneron Pharmaceuticalsによって開発された完全ヒト抗PCSK9モノクローナル抗体であるアリロクマブ(旧REGN727/SAR236553)は、LDL-Cを低減するための二次治療として、2015年に米国食品医薬品局(FDA)によって承認されて、遺伝性高コレステロール血症の成人患者および食事療法の介入及びスタチンによる治療に失敗し、LDL-Cの低下を必要とするアテローム性動脈硬化症の成人患者に適応される。2015年8月27日に、米国FDAは、HoFH患者および臨床的アテローム性動脈硬化性心血管疾患の成人患者において、食事管理およびスタチンの最大耐量と組み合わせたエボロクマブ注射の使用を承認した。2018年7月31日、中国国家医療製品管理局(NMPA)は、12歳以上の成人または若年者におけるHoFH(すなわち、ホモ接合型家族性高コレステロール血症)の治療のため

40

50

のエボロクマブ注射を承認した。

【0006】

心血管疾患 (r d i o v a s c u l a r d i s e a s e s) は、高脂血症患者の主な死亡リスク要因の1つであり、現在の研究結果は、スタチンなどの強力な低脂血症治療が高脂血症患者の心血管疾患発作及び死亡リスクを大幅に低減できることを示唆している。抗PCSK9抗体は強力な脂質低下剤であり、心血管疾患の発作を予防し、高脂血症患者の死亡リスクを軽減する効果も実証されている。抗PCSK9抗体エボロクマブの臨床研究結果は、エボロクマブ治療を受けることで、高脂血症患者の心血管疾患発作のリスクを大幅に減らすことができ、プラセボ対照群と比較して、エボロクマブ治療を受けている患者では、心筋梗塞、脳卒中、および冠状動脈血行再建術を必要とする状態の発生率が大幅に減少していることを示した。別の市販の抗PCSK9抗体であるアリロクマブの大規模な臨床研究でも、心血管系に対する保護効果が実証された。プラセボ対照と比較して、抗PCSK9抗体は、急性心筋梗塞、虚血性脳卒中、冠状動脈性心臓病 (CHD) の死亡、または入院を必要とする不安定狭心症を含む主要な心血管有害事象を発症する全体的なリスクを15%減らすことができる。これらの臨床研究の結果に基づいて、この2つの抗PCSK9抗体は、心血管疾患の成人患者の心臓病と脳卒中を予防するために、それぞれ2017年と2019年にFDAによって承認された。

10

【発明の概要】

【0007】

本出願の一態様は、高コレステロール血症（より好ましくは、ホモ接合型家族性高コレステロール血症若しくは「H o F H」、またはヘテロ接合型家族性高コレステロール血症若しくは「H e F H」、または心血管疾患のリスクが非常に高い若しくは高い患者における高コレステロール血症）を治療するために、PCSK9とLDLRとの間の相互作用の阻害剤、好ましくは抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

20

【0008】

いくつかの特定の実施形態では、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、それは、ヒトPCSK9に特異的に結合し、ヒトPCSK9のLDLRへの結合を遮断する。

【0009】

いくつかの実施形態において、抗PCSK9抗体は、ヒト化抗体である。

30

【0010】

いくつかの実施形態において、抗PCSK9抗体は、以下を含む：

配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は、それと少なくとも80%の相同性 (h o m o l o g y)、好ましくは少なくとも85%の相同性、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、及び

配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は、それと少なくとも80%の相同性、好ましくは少なくとも85%の相同性、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域。

40

【0011】

いくつかの実施形態において、抗体のCDR配列は以下のとおりである：

HCDR1： G F T F S S Y S (S E Q I D N O : 5) ；

HCDR2： I S S S S S Y I (S E Q I D N O : 6) ；

HCDR3： E Y D F W S A Y Y D A F D V (S E Q I D N O : 7) ；

LCDR1： S R N I G G G N D (S E Q I D N O : 8) ；

LCDR2： G V I (S E Q I D N O : 9) ； 及び

LCDR3： Q S F D G S L S G S V (S E Q I D N O : 10) 。

【0012】

本出願の別の態様は、好ましくは高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患

50

のリスクが非常に高い若しくは高い患者における、H o F H、H e F H又は高コレステロール血症）を治療するための医薬組成物を提供し、それは以下を含む：P C S K 9とL D L Rとの間の相互作用の阻害剤（およびスタチン）、および薬学的に許容可能な担体。

【0013】

いくつかの実施形態において、P C S K 9とL D L Rとの間の相互作用の阻害剤は、腸管外（parenteral）又は非腸管外（non-parenteral）の投与経路に適した形態である。

【0014】

本出願の他の態様は、本明細書に記載の抗P C S K 9抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、キット、好ましくは高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高い若しくは高い患者における、H o F H、H e F H又は高コレステロール血症）を治療するためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、スタチン及び／又はエゼチミブを更に含む。

【0015】

本出願は、少なくとも、高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるH o F H、H e F Hまたは高コレステロール血症）を治療するための、次を含む方法を提供することを更に意図している：本明細書に記載のP C S K 9とL D L Rとの間の相互作用の治療上有効量の阻害剤（好ましくはP C S K 9抗体又はその抗原結合フラグメント）を必要とする対象に（例えば、腸管外的に又は非腸管外的に）投与すること。好ましくは、スタチンは、組み合わせて対象に投与される。より好ましくは、スタチン及びエゼチミブは、組み合わせて対象に投与される。いくつかの実施形態において、阻害剤、スタチンおよび／またはエゼチミブは、同時にまたは別々に投与される。

【0016】

いくつかの実施形態において、スタチンは、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤である。

【0017】

いくつかの実施形態において、スタチン、すなわち、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤は、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチンおよびピタバスタチンまたはそれらの任意の組み合わせなどを含む。

【0018】

特定の実施形態において、高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるH o F H、H e F Hまたは高コレステロール血症）は、L D L R、アポリポタンパク質B（ApoB）、P C S K 9若しくは低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質1（low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1）（LDLRAP1）等の遺伝子における1（対）又はそれ以上（対）の、対立遺伝子（allelic）又は非対立遺伝子（non-allelic gene）の遺伝子変異によって引き起こされる。ここで、対立遺伝子の遺伝子変異は、L D L R機能不全変異、L D L RへのL D Lの結合に影響を与えるApoB遺伝子変異、L D L Rに対するP C S K 9の親和性の増加をもたらす機能変異、及びL D L内在化活性の低下をもたらすL D L R A P 1機能不全変異を含む。L D L R、A P O B、またはP C S K 9遺伝子でF Hを引き起こすことが知られている変異体は、例えば、Canadian Journal of Cardiology、34、（2018）、1553-1563、Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial Hypercholesterolemia：Update 2018に記載されている。

【0019】

特定の実施形態において、コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスク

10

20

30

40

50

が非常に高いまたは高い患者におけるH o F H、H e F Hまたは高コレステロール血症)は、10歳未満の皮膚若しくは腱黄色腫又はLDLR、ApoB、PCSK9若しくはLDLRAP1遺伝子等における1対以上の対立遺伝子変異を持っている両親と組み合わせ、以前に未治療の場合はLDL-C $\geq$ 13mmol/L(500mg/dL)を示し、又は、以前に(エゼチミブと組み合わせたスタチンの高用量/最大耐量で)治療した場合はLDL-C $\geq$ 8mmol/L(300mg/dL)を示す。

【0020】

特定の実施形態では、高コレステロール血症(より好ましくはH e F H)は、以下のa)及びb)を満たす:a)高コレステロール血症は、上述したように、LDLR、アポリポタンパク質B(ApoB)、PCSK9又は低密度リポタンパク質受容体アダプタータンパク質1(LDLRAP1)の遺伝子等における1(対)又はそれ以上(対)の、非対立遺伝子の遺伝子変異によって引き起こされる、b)以前に脂質調節薬(lipid regulating drug)で治療されていなかったとき、血清LDL-Cレベル $\geq$ 4.7mmol/L(180mg/dL)である;あるいは、高コレステロール血症(より好ましくはH e F H)は、次のc)及びd)の少なくとも1つを同時に満たす:c)皮膚若しくは腱黄色腫を患っている患者、又はリポイド角膜環(arcus lipoides corneae)を患っている45歳未満の患者、及びd)FHまたは早期成人アテローム性心血管疾患(ASCVD)、特に冠状動脈性心臓病と一親等の血縁者がいること。

【0021】

本出願はさらに、高コレステロール血症(より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるH o F H、H e F Hまたは高コレステロール血症)を治療するための薬剤を調製する際に、本明細書に開示されるPCSK9とLDLRとの間の相互作用の阻害剤(好ましくはPCSK9抗体又はその抗原結合フラグメント)の使用を少なくとも提供することを意図している。

【0022】

本出願はさらに、高コレステロール血症(より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるH o F H、H e F Hまたは高コレステロール血症)を有する患者を治療するための方法を提供し、以下を含む:(i)患者をジェノタイピングすること、(ii)患者からのサンプルのLDL-Cレベルを測定すること、並びに(iii)患者がホモ接合型(又はヘテロ接合型)の家族性高コレステロール血症と特定された場合、患者に、治療上有効量の本明細書に記載の抗PCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントを、好ましくはスタチンと組み合わせて、より好ましくはスタチンおよびエゼチミブと組み合わせて、投与すること。

【0023】

いくつかの実施形態では、サンプルは、血清、血漿、または全血である。

【0024】

本発明の特定の実施形態において、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者における高コレステロール血症は、以下の条件1および条件2を同時に満たすことを指す。ここで、条件1は、a)からh)のいずれかを満たしている(中国の成人における脂質異常症の予防と治療のためのガイドライン(2016年版)を参照):冠状動脈疾患の病歴(例えば、急性冠症候群(acute coronary syndrome)、安定冠状動脈性心臓病(stable coronary heart disease)、血行再建術後(post-revascularization)、虚血性心筋症(ischemic cardiomyopathy))、b)虚血性脳卒中の病歴(ラクナ梗塞を除く)、c)一過性脳虚血発作、d)末梢アテローム性動脈硬化症(例えば:頸動脈アテローム性動脈硬化症、頸動脈内膜剥離術後、頸動脈ステント留置後、血行再建術後、下肢アテローム性動脈硬化症、下肢動脈血管再生術後)、e)LDL-C $\geq$ 4.9mmol/L(190mg/dL)又はTC $\geq$ 7.2mmol/L、f)1.8mmol/L(70mg/dL) $\leq$ LDL-C $<$ 4.9mmol/L(190mg/dL)の40歳以上の

10

20

30

40

50

2型糖尿病患者、g) ステージ3の慢性腎疾患（すなわち、測定及び計算された糸球体濾過率 $30 \text{ mL} / \text{min} / 1.73 \text{ m}^2 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ mL} / \text{min} / 1.73 \text{ m}^2$ ）、h) 以下のリスクファクターのうちの少なくとも3つ：45歳以上の男性および55歳以上の女性；高血圧；喫煙；CVDの家族歴（一親等の親族の場合：55歳未満の男性および65歳未満の女性）；HDLコレステロール $< 40 \text{ mg} / \text{dL}$ ；肥満（BMI $\geq 28 \text{ kg} / \text{m}^2$ ）；そして、条件2は、a) 又はb) のいずれかを満たす：安定した基礎脂質低下剤治療の4週間後に：a) リスクが非常に高い患者のLDL-Cレベル $> 1.8 \text{ mmol} / \text{L}$ （ $70 \text{ mg} / \text{dL}$ ）、又はb) リスクが高い患者のLDL-Cレベル $> 2.6 \text{ mmol} / \text{L}$ （ $100 \text{ mg} / \text{dL}$ ）。

【0025】

本出願は更に、少なくとも、高コレステロール血症（好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるHofH、HeFHまたは高コレステロール血症）を治療するためのPCSK9とLDLRとの間の相互作用の阻害剤（好ましくはPCSK9抗体又はその抗原結合フラグメント）の製剤（医薬組成物）を調製するための方法を提供することを意図している。

【0026】

いくつかの実施形態において、抗PCSK9抗体は、2週間（14日）または4週間（28日）のサイクルで投与され、好ましくは、各サイクルの初日（D1）に皮下投与される。つまり、抗PCSK9抗体は、2週間毎に1回（q2w）または4週間毎に1回（q4w）投与される。

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のPCSK9抗体又はその抗原結合フラグメントの0.1~60mgを含む単回用量ユニット（single dose unit）、好ましくは家族性高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるHofH、HeFHまたは高コレステロール血症）を治療するための単回用量ユニットが関連される。

【0028】

本発明の他の態様は、家族性高コレステロール血症（より好ましくは、心血管疾患のリスクが非常に高いまたは高い患者におけるHofH、HeFHまたは高コレステロール血症）を治療するための単回用量ユニットを調製する際の、0.1~60mgの本明細書に開示される抗PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントの使用に関する。

【0029】

MAB1

本明細書で使用されているように、MAB1は抗PCSK9モノクローナル抗体であり、その配列および構造は、特許番号WO2016/127912A1を参照することができる。モノクローナル抗体MAB1において、HCDR1は、配列GFTFSYS（SEQ ID NO: 5）を含み、HCDR2は、配列ISSSSSYI（SEQ ID NO: 6）を含み、HCDR3は、配列EYDFWSAYYDAFDV（SEQ ID NO: 7）を含み、LCDR1は、配列SRNIGGGND（SEQ ID NO: 8）を含み、LCDR2は、配列GVI（SEQ ID NO: 9）を含み、そしてLCDR3は、配列QSFDGSLSGSV（SEQ ID NO: 10）を含む。

【0030】

定義及び説明

本明細書で使用される以下の用語は、特に明記しない限り、以下の意味を有する。特定の用語は、特に明確に定義されていない限り、不確実または不明確であると見なされるべきではなく、当分野での一般的な意味に従って解釈されるべきである。商品名を引用するときは、対応する市販の製品、組成物、またはその有効成分を指すことを意図している。

【0031】

本明細書で使用されているように、「抗体」という用語は、少なくとも1つの抗原結合ドメインを有する抗原結合タンパク質を指す。本明細書に開示される抗体およびそのフラ

10

20

30

40

50

グメントは、抗体全体またはその任意のフラグメントであり得る。したがって、本明細書に開示される抗体およびそのフラグメントは、モノクローナル抗体またはそのフラグメント、及び抗体変異体またはそのフラグメント、及び免疫複合体を含む。抗体およびそのフラグメントはまた、組換えポリペプチド、融合タンパク質、および二重特異性抗体を含み得る。本明細書に開示される抗PCSK9抗体およびそのフラグメントは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプのものであり得る。

【0032】

「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体のクラスを指す。一実施形態では、本明細書に開示される抗PCSK9抗体およびそのフラグメントは、IgG1またはIgG4アイソタイプのものである。本明細書に開示される抗PCSK9抗体およびそのフラグメントは、マウス、ラット、ウサギ、霊長目、ラマ、およびヒトを含むがこれらに限定されない任意の種に由来することができる。抗PCSK9抗体およびそのフラグメントは、キメラ抗体、ヒト化抗体または無傷のヒト抗体であり得る。

10

【0033】

「ヒト化抗体」という用語は、抗原結合部位が非ヒト種に由来し、可変領域フレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を指す。ヒト化抗体は、フレームワークが発現されたヒト免疫グロブリンまたは生殖系列遺伝子配列の正確なコピーではない可能性があるように、フレームワーク領域に置換を含み得る。

【0034】

「遺伝子突然変異」という用語は、ゲノムDNA分子で発生する突然の遺伝的変異を指す。分子レベルでは、遺伝子変異は、遺伝子の塩基対組成または配置の構造変化である。これには、塩基置換変異、フレームシフト変異、欠失変異、挿入変異が含まれる。

20

【0035】

「単離された抗体」という用語は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（例えば、PCSK9に特異的に結合する単離された抗体は、PCSK9以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。ただし、PCSK9に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原（異なる種のPCSK9分子など）と交差反応性を持つ可能性がある。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

30

【0036】

「モノクローナル抗体」（「mAb」）という用語は、単一分子組成の抗体分子を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示し、二重特異性モノクローナル抗体の場合、2つの異なるエピトープに対して二重の結合特異性を示す。mAbは単離された抗体の一例である。mAbは、ハイブリドーマ技術、組換え技術、トランスジェニック技術、または当技術分野で知られている他の技術によって生成することができる。

【0037】

抗体の「抗原結合部分」（「抗原結合フラグメント」とも呼ばれる）は、無傷の抗体が結合する抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数のフラグメントを指す。抗原結合フラグメントの例には、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'フラグメント、Fvフラグメント、単離されたCDR領域、単鎖Fv分子（scFv）、F(ab')₂、Fd、dAb、Fab/c、二価抗体およびドメイン抗体が含まれる。

40

【0038】

本明細書で使用されているように、「由来する（derived）」という用語は、参照抗体または他の結合タンパク質に関連する分子またはポリペプチドを指すために使用される場合、参照抗体または他の結合タンパク質と同じエピトープに特異的に結合することができる分子またはポリペプチドを意味する。

【0039】

50

本明細書で使用されているように、「EC₅₀」という用語は、抗体の最大応答の50%を引き起こす有効濃度を指す。本明細書で使用されているように、「IC₅₀」という用語は、抗体の最大応答の50%を引き起こす阻害濃度を指す。EC₅₀およびIC₅₀の両方は、ELISAまたはFACSアッセイまたは当技術分野で知られている他の任意の方法によって測定することができる。

【0040】

「治療」または「治療すること」という用語は、通常、必要な薬理学的効果および／または生理学的効果を獲得するための操作を指す。その効果は、病気またはその症状を完全にまたは部分的に予防するという観点から、予防的であってよく；かつ／又はその効果は、疾患および／または疾患の副作用を部分的または完全に安定化または治療するという観点から、治療的であってよい。本明細書で使用されているように、「治療」または「治療すること」は、患者の病気に対するあらゆる治療をカバーし、以下を含む：(a) まだ診断されていない病気または症状にかかりやすい患者の病気または症状を予防すること；(b) 病気の症状を抑制すること、すなわち、その発症を阻止すること；又は(c) 病気の症状を和らげること、すなわち、病気または症状の退行を引き起こすこと。

【0041】

本明細書で使用されているように、「一般的な治療」という用語は、原薬が血流を介して輸送され、全身の細胞に到達して影響を与える治療を指す。

【0042】

本明細書で使用されているように、「対象」という用語は、齧歯動物、猫、犬、霊長類などの哺乳動物を指す。好ましくは、本出願による対象はヒトである。

【0043】

「投与する」、「投与」または「投与すること」は、当技術分野で知られている様々な方法および送達システムのいずれかを使用して、治療薬を含む組成物を対象に物理的に導入することを意味する。免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗PCSK9抗体）の投与経路には、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄、または他の腸管外（parenteral）投与経路、例えば、注射若しくは注入が含まれる。本明細書で使用されているように、「腸管外投入」という句は、通常は注射による経腸及び局所投与を除く投与様式を指し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ管内、病変内、被膜内、眼窩内、心臓内、皮膚内、腹腔内、経気管、皮下、表面皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入、並びにインビボエレクトロポレーション（in vivo electroporation）を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗PCSK9抗体）は、非腸管外（non-parenteral）経路によって投与され、特定の実施形態では、それは経口投与される。他の非腸管外経路は、局所、表皮、または粘膜の投与経路、例えば、鼻腔内、膣、直腸、舌下または局所投与を含む。投与はまた、例えば、1回、複数回、および／または1つ以上の長期間にわたって実施され得る。

【0044】

本明細書で使用されているように、「有害事象」（AE）は、医学的治療の使用に関連する有害で、しばしば意図しない、または望ましくない兆候（異常な検査所見を含む）、症状、または疾患である。例えば、有害事象は、治療に反応してPCSK9を分泌する肝臓に関連している可能性がある。医学的治療には、1つまたは複数の関連するAEがあり、各AEの重症度レベルは同じまたは異なる場合がある。「有害事象を変える」ことができる方法への言及は、異なるレジメンの使用に関連する1つまたは複数のAEの発生率および／または重症度を低減するレジメンを指す。

【0045】

本明細書で使用されているように、「投与間隔」は、対象に投与される本明細書に開示される製剤の複数回の投与の間で経過する時間の量を指す。したがって、投与間隔は範囲として示され得る。

【0046】

10

20

30

40

50

本明細書で使用されているように、「投与頻度」という用語は、本明細書に開示される製剤の用量が所与の時間にわたって投与される頻度を指す。投与頻度は、例えば、毎週1回または2週間に1回など、所与の時間あたりの投与回数として示され得る。

【0047】

「一律用量 (flat dose)」という用語は、患者の体重または体表面積 (BSA) を考慮せずに患者に投与される用量を指す。したがって、一律用量は、mg / kg 用量ではなく、薬剤 (例えば、抗PCSK9抗体) の絶対量として指定される。例えば、60 kg のヒトと100 kg のヒトは、同じ用量の抗体 (例えば、240 mg の抗PCSK9抗体) を受け取る。

【0048】

本明細書に開示される組成物に関する「固定用量」という用語は、単一の組成物中の2つ以上の異なる抗体が、互いに特定の (固定された) 比率で組成物中に存在することを意味する。特定の実施形態において、固定用量は、抗体の重量 (例えば、mg) に基づく。特定の実施形態において、固定用量は、抗体の濃度 (例えば、mg / mL) に基づく。特定の実施形態において、一次抗体 (mg) と二次抗体 (mg) との比 (一次抗体：二次抗体) は、少なくとも約1：1、約1：2、約1：3、約1：4、約1：5、約1：6、約1：7、約1：8、約1：9、約1：10、約1：15、約1：20、約1：30、約1：40、約1：50、約1：60、約1：70、約1：80、約1：90、約1：100、約1：120、約1：140、約1：160、約1：180、約1：200、約200：1、約180：1、約160：1、約140：1、約120：1、約100：1、約90：1、約80：1、約70：1、約60：1、約50：1、約40：1、約30：1、約20：1、約15：1、約10：1、約9：1、約8：1、約7：1、約6：1、約5：1、約4：1、約3：1又は約2：1である。例えば、一次抗体と二次抗体の3：1の比率は、バイアルが約240 mg の一次抗体および80 mg の二次抗体を含み得ること、又はバイアルが約3 mg / mL の一次抗体および1 mg / mL の二次抗体を含み得ることを指し得る。

【0049】

「患者」 (「対象」と呼ばれることもある) には、任意のヒトまたは非ヒト動物が含まれる。「非ヒト動物」という用語には、非ヒト霊長類などの脊椎動物、ヒツジ、イヌ、およびマウス、ラット、モルモットなどの齧歯動物が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、患者はヒトである。「対象」および「患者」という用語は、本明細書の特定の文脈において交換可能に使用される。

【0050】

薬物または治療薬の「治療上有効量」又は「治療有効量」は、単独で又は別の治療薬と組み合わせて使用された場合に、患者を疾患の発症から保護するか、または疾患の退行を促進する任意の量の薬物であり、疾患の退行は、病気の症状の重症度の軽減、病気の症状のない期間の頻度と期間の増加、または病気の苦痛によって引き起こされる損傷または障害の予防によって証明される。疾患の退行を促進する治療薬の能力は、熟練した開業医に知られているさまざまな方法、例えば、臨床試験中のヒト患者において、ヒトへの有効性を予測する動物モデルシステムにおいて、またはinvitroアッセイで、薬物の活性の測定、を使用して評価することができる。

【0051】

「約」、「ほぼ」または「実質的に含む」という用語は、当業者によって決定される特定の値または組成から許容可能な誤差範囲内の値または組成を指し、それは、値または組成がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」、「ほぼ」または「実質的に含む」は、当技術分野で実施されているように、1または1を超える標準偏差内にあることを指す場合がある。あるいは、「約」または「実質的に含む」は、それによって修正されたパラメータまたは値から最大10%または20% (すなわち、±10%または±20%) 異なる範囲を指し得る。例えば、約3 mg は、2.7 mg から3.3 mg (10%の場合) または2.4 mg から3.6 mg

10

20

30

40

50

g (20%の場合)の間の任意の数を含み得る。さらに、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、最大で1桁まで、または最大で数値の5倍までを指すことができる。特定の値または組成が本出願および特許請求の範囲で提供される場合、特に明記しない限り、「約」または「実質的に含む」の意味は、特定の値または組成から許容可能な誤差範囲内にあると想定されるべきである。

【0052】

本明細書で使用されているように、「約週に1回」、「約2週間毎に1回」または他の同様の投与間隔の用語は、概算を指す。「約1週間に1回」には、 7 ± 1 日に1回、つまり6日から8日に1回が含まれ得る。「約2週間毎に1回」には、 14 ± 3 日に1回、つまり11日から17日に1回が含まれ得る。同様の近似は、例えば、約3週間毎に1回、約4週間毎に1回、約5週間毎に1回、約6週間毎に1回、および約12週間毎に1回に適用される。特定の実施形態において、約6週間毎に1回または約12週間毎に1回の投与間隔は、最初の用量は第1週の任意の日に投与することができ、次に第2の用量はそれぞれ第6週または第12週の任意の日に投与できることを意味する。他の実施形態では、約6週間に1回または約12週間に1回の投与間隔は、第1の用量は、第1週の特定の日（例えば、月曜日）に投与され、次いで、第2の用量は、それぞれ、第6または第12週の同じ日（例えば、月曜日）に投与されることを意味する。同様の原則は、「約2週間毎に1回」、「約1か月毎に1回」などを含むがこれらに限定されないフレーズにも適用される。

【0053】

本明細書で使用されているように、特に明記されていない限り、濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、リストされた範囲内の整数の値を含み、適切な場合はその分数（整数の10分の1および100分の1など）を含むと理解されるものとする。

【0054】

特に明記しない限り、本出願における「約」または「ほぼ」は、与えられた指定された数値範囲の $\pm 5\%$ 以内、好ましくは $\pm 2\%$ 以内、より好ましくは $\pm 1\%$ 以内であることを意味する。例えば、約5.5のpHは、 $5.5 \pm 5\%$ のpH、好ましくは $5.5 \pm 2\%$ のpH、より好ましくは $5.5 \pm 1\%$ のpHを意味する。

【0055】

「薬学的に許容可能な」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、またはその他の問題や合併症なしに、かつ合理的な利益/リスク比に見合っ、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適している、化合物、材料、組成物、および／または剤形について本明細書で使用される。「製剤」または「医薬組成物」という用語は、本明細書に開示される有効成分（例えば、抗PCSK9抗体）と薬学的に許容可能な賦形剤とからなる混合物を指す。医薬組成物は、本明細書に開示される有効成分の対象への投与を容易にすることを目的としている。

【0056】

「単回投与ユニット」という用語は、レジメンの時点で、対象に投与される、好ましくは対象の体重1kgあたりで、本明細書に開示される抗PCSK9抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、アンプルなどの単一の医薬剤形を意味する。

【0057】

実施形態

以下の内容は、本明細書に開示される薬剤の投与様式を制限することを意図するものではない。

【0058】

一実施形態では、本明細書に開示される薬剤は、単回投与または複数回投与に適した医薬組成物に処方することができる。本明細書に開示される薬剤は、経口投与または腸管外投与（静脈内、筋肉内、局所または皮下経路による）を含むがこれらに限定されない様々な適切な経路で投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される薬剤は

10

20

30

40

50

、経口投与または注射、例えば、静脈内注射または腹腔内注射によって投与される。

【0059】

本明細書に開示される薬剤の適切な剤形には、錠剤、ロゼンジ、ピル、カプセル（例えば、ハードカプセル、ソフトカプセル、腸溶カプセルおよびマイクロカプセル）、エリキシル、顆粒、シロップ、注射（筋肉内、静脈内および腹腔内）、顆粒、エマルジョン、懸濁液、溶液、散剤、および経口または非経口投与用の徐放性製剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0060】

本明細書に開示される医薬組成物は、薬学的に許容される担体および／または賦形剤を含む。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、マウス血清LDL-Cに対するMAB1の影響を示している。

【図2】図2は、カニクイザル血清LDL-Cに対するMAB1の影響を示している（s.c.：皮下注射；i.v.：静脈内注射）。

【図3】図3は、HepG2細胞によるLDLのエンドサイトーシス（endocytosis）に対するMAB1の影響を示している

【図4】図4は、MAB1が野生型PCSK9によるLDLエンドサイトーシスの阻害を軽減することを示している。

【図5】図5は、MAB1が機能的に増強された変異体PCSK9（PCSK9-D374Y）によるLDLエンドサイトーシスの阻害を軽減することを示している。

【発明を実施するための形態】

【0062】

本出願は、特定の例を参照して以下でさらに説明されるが、これらは例示のためにのみであり、本出願の範囲を限定するものではない。同様に、本出願は、本明細書に記載の特定の好ましい実施形態に限定されない。本出願の技術的特徴の同等の置換および対応する修正は、依然として本出願の保護範囲内にあることを当業者は理解すべきである。特に明記しない限り、以下の実施例で使用される試薬は市販の製品であり、溶液は当技術分野の従来技術によって調製することができる。

【0063】

本発明の以下の実施例において、アイソタイプ対照抗体は、ヒト抗鶏卵リゾチームIgG（抗HEL；すなわち、ヒトIgG、略してhIgG）であり、その配列は、Affinity Maturation Increases the Stability and Plasticity of the Fv Domain of Anti-Protein Antibodies (Acierno et al., J Mol Biol., 2007, 374 (1): 130-46, ここで、重鎖のアミノ酸配列は配列番号11に示され、軽鎖のアミノ酸配列は配列番号12に示されている)からのものである。アイソタイプコントロール抗体は、Akeso Biopharma, Inc. の研究室で調製された。

【0064】

本発明の以下の実施例において、C57BL / 6マウスは、広東省医療研究所動物センターから購入された。

【実施例】

【0065】

実施例1. ヒト化抗PCSK9抗体の調製

1. 抗体の設計

モノクローナル抗体MAB1を調製するために、本発明者らは、既知のPCSK9タンパク質配列（NP_777596.2）およびその三次元結晶構造に基づいて一連の抗体配列を設計した。広範なスクリーニングと分析を通じて、PCSK9に特異的に結合する抗体MAB1が最終的に得られた。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列ならびにそれらのコード配列は、以下の配列番号 (SEQ ID NO) 1~4 に示されている。

【0066】

設計されたMAB1の重鎖VHのDNA配列は次のとおりである (369bp) :

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGCTGGTGCAGC
CCGGAAGATCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATT
CACCTTTAGCTCCTACAGCATGAACCTGGGTGCGGCAGGCT
CCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCGGAATCTCTAGTT
CAAGCTCCTACATTAGCTATGCAAGACTCCGTCCAGGGGAAG
GTTCAACCATCTCTCGCGATAACGGCAAGAACAGCCTGTAT
CTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCAGAGGACACAGCCCTGT
ACTTCTGTGCCAGAGAATATGACTTCTGGTCCGCGCTATT
CGACGCGCTTCGATGTCTGGGGACAGGGGACTATGGTCACT
GTCTCAAGC (SEQ ID NO: 1)

10

【0067】

コード化されたVHのタンパク質配列は次のとおりである (123aa) :

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA
PGKGLEWVSGISSSSSYISYADSVQGRFTISRDNCKNSLY
LQMNSLR AEDTALYFCAREYDFWSAYYDAFDVWGQGTMVT
VSS (SEQ ID NO: 2)

20

【0068】

MAB1の軽鎖VLのDNA配列は次のとおりである (333bp) :

CAGAGCGAACTGACTCAGCCAAGAAAGCGTCAGTGGATCAC
CTGGCCAGAGCGTGACAATCTCCTGCACCGGCACAAGCAG
GAACATTTGGCGGGGGGAATGACGTCCACTGGTACCAGCAG
CATCCAGGGAAGGCCCCCAAACTGCTGATCTCCGGAGTG
TTGAGCGGAGCTCCGGCGGTCCCGGATAGATTTCAGCGGGTC
CAAGTCTGGAAACACAGCTTCTCTGACTATCAGTGGCCTG
CAGGCAGAGGACGAAGCCGATTACTATTGCCAGTCTTTTCG
ACGGCAGTCTGTTCAGGGAGCGTGTGTTTGGCACTGGGACCGA
TGTGACCGTCTCTG (SEQ ID NO: 3)

30

【0069】

コード化されたVLのタンパク質配列は次のとおりである (111aa) :

QSELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSRNIGGGNDVHWYQQ
HPGKAPKLLISGVIERSSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYCQSFDGSLSGSVFGTGTDVTVL (SEQ ID
NO: 4)

【0070】

抗体のCDR配列は次のとおりである :

HCDR1: GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5);
HCDR2: ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6);
HCDR3: EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7);
LCDR1: SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8);
LCDR2: GVI (SEQ ID NO: 9); 及び
LCDR3: QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO: 10).

40

【0071】

2. 抗体の発現及び精製

MAB1の重鎖cDNA配列 (配列番号1に記載のコード配列; 定常領域はIg gamma-1鎖C領域であった、アクセッション (ACCESSION): P01857) および軽鎖cDNA配列 (配列番号3に示されるコード配列; 定常領域はIg lambda

50

d a - 2 鎖 C 領域であった；アクセッション：P O C G 0 5 . 1）を別々に p U C 5 7 s i m p l e ベクター（G e n S c r i p t によって供給される）にクローン化し、p U C 5 7 s i m p l e - M A B 1 H および p U C 5 7 s i m p l e - M A B 1 L プラスミドをそれぞれ得た。p U C 5 7 s i m p l e - M A B 1 H および p U C 5 7 s i m p l e - M A B 1 L プラスミドを消化し（H i n d I I I & E c o R I）、電気泳動で分離した重鎖と軽鎖を別々に p c D N A 3 . 1 ベクターにサブクローニングし、組換えプラスミドを抽出して 2 9 3 F 細胞をコトランスフェクトした。細胞培養の 7 日後、培地を高速遠心分離によって分離し、上清を濃縮して H i T r a p M a b S e l e c t S u R e カラムにロードした。タンパク質は溶出バッファーで 1 ステップで溶出された。標的サンプルを分離し、バッファーを P B S に交換した。

10

【 0 0 7 2 】

実施例 2 . 動物血清低密度リポタンパク質コレステロール L D L - C に対する M A B 1 の影響

（ 1 ）マウス血清低密度リポタンパク質コレステロール L D L - C に対する M A B 1 の影響

血清は、投与前に 3 2 匹の C 5 7 B L / 6 マウスから収集された眼窩血液サンプルから分離された。マウスの低密度リポタンパク質コレステロール（L D L - C）は、完全に自動化された生化学分析装置（M i n d r a y、モデル B S - 1 8 0）によって検出された。表 1 に示すように、マウスを 8 匹のマウスからなる 4 つのグループ、すなわち、正常群、モデル群、M A B 1 低用量群および M A B 1 高用量群に分け、表 1 の投薬計画に従って処置した。投与前（D 0）、および D 3、D 7、D 1 0、D 1 4、D 1 8 に投与した後、採取した血液サンプルから血清を分離し、低密度リポタンパク質コレステロール含有量を検出した。

20

【 0 0 7 3 】

結果は図 1 に示す。実験結果は、モデル群と比較して、マウス血清 L D L - C 濃度が M A B 1 低用量 6 0 m g / k g 群および M A B 1 高用量 1 2 0 m g / k g 群で有意に減少したことを示した（ $P < 0 . 0 5$ または $P < 0 . 0 1$ ）。

【 0 0 7 4 】

【表 1】

30

表 1 . マウスの M A B 1 の投与量とレジメン

群	動物数	採血スキーム	投与レジメン (治療、投与量、部位、頻度 などを含む)
正常群	8	投与前 (D0)、および D3、D 7、D10、D14、D18 に投与した後、採取した血液サンプルから血清を分離し、低密度リポタンパク質コレステロール含有量を検出した	生理食塩水, s. c., D0
モデル群	8		hIgG, 60 mg/kg, s. c., D0
MAB1 60mg/kg	8		MAB1, 60 mg/kg, s. c., D0
MAB1 120mg/kg	8		MAB1, 120 mg/kg, s. c., D0

40

注：最初の投与は D 0（0 日目）に行われた；s. c.：皮下投与；

【 0 0 7 5 】

（ 2 ）カニクイザル血清低密度リポタンパク質コレステロール L D L - C に対する M A B 1 の影響

実験は、N a n n i n g D e h e n g B i o t e c h n o l o g y L t d から購入した 1 2 匹の雄と 1 2 匹の雌のカニクイザル（一般グレード）を使用して実施された（

50

動物生産ライセンス番号 S C X K (G U I) 2 0 1 1 - 0 0 0 7 ; 実験動物証明書番号 0 0 0 5 8 6 9) 。動物の使用と福祉に関連するすべての手順と活動は、試験の前に施設内動物管理使用委員会 (I A C U C) によって承認された。I A C U C 承認番号 : A C U 1 6 - 4 6 7 。

【 0 0 7 6 】

表 2 に示すように、投与前に測定された動物の体重に基づいたコンピュータープログラムを使用して、動物は、性別ごとに M A B 1 低用量群、M A B 1 中用量群、M A B 1 高用量群、および M A B 1 静脈内投与群にランダム化し、そして表 2 の投与レジメンに従って治療された。投与前の D 0、並びに投与後 4 時間、D 2、D 4、D 6、D 8、D 1 1、D 1 5、D 1 8 および D 2 2 の空腹時に約 0. 5 m L の血液を採取した。血液サンプルを遠心分離管に移し、2 ~ 8 °C、3 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離した。低密度リポタンパク質コレステロール (L D L - C) が検出された。

10

【 0 0 7 7 】

結果は図 2 に示される。結論 : M A B 1 は、カニクイザルに 3、1 0、3 0 m g / k g の用量で単回皮下注射、及び 1 0 m g / k g の用量で単回静脈内注射で投与された。カニクイザルの低密度リポタンパク質コレステロールは、投与後に有意に減少した。3 m g / k g 投与群の血中脂質レベルは、基本的に投与後約 1 5 日でベースラインレベルに戻った ; 1 0 3 m g / k g の皮下注射群 (s . c . g r o u p) 及び静脈内注射 (i . v .) 投与群の血中脂質レベルも基本的に投与後約 2 2 日でベースラインに戻り、そして 3 0 m g / k g 投与群の血中脂質レベルは、依然としてベースラインよりも有意に低かった。

20

【 0 0 7 8 】

【表 2】

表 2. カニクイザルに対する MAB1 の投与量とレジメン

群	動物数	採血スキーム	投与レジメン
低用量群	6	投与前の D0、並びに投与後 4 時間、D2、D4、D6、D8、D11、D15、D18 および D22 の空腹時に約 0. 5mL の血液を採取した。血清を血液サンプルから分離し、低密度リポタンパク質コレステロール含有量を検出した。	MAB1, 3 mg/kg, s. c., D0
中用量群	6		MAB1, 10 mg/kg, s. c., D0
高用量群	6		MAB1, 30 mg/kg, s. c., D0
静脈内投与群	6		MAB1, 10 mg/kg, i. v., D0

30

注 : 最初の投与は D 0 (0 日目) に行われました ; s . c . : 皮下投与 ; i . v . : 静脈内投与 ; 動物は、投薬前に測定された動物の体重に基づいてコンピュータープログラムを使用して、それぞれが 3 匹の雄および 3 匹の雌を含む 4 つのグループに性別によってランダム化された。

40

【 0 0 7 9 】

実施例 3 . H e p G 2 細胞による L D L のエンドサイトーシスに対する M A B 1 の影響 P C S K 9 は、エンドサイトーシスと L D L R の分解 (d e g r a d a t i o n) を媒介することにより、H e p G 2 細胞表面での L D L R の発現を阻害することができる。L D L は L D L R に結合でき、細胞によってエンドサイトーシスを受けることができる。B O D I P Y 標識 L D L (B O D I P Y - L D L、L i f e、カタログ番号 : L 3 4 8 3) は、L D L R に結合するための標識として使用でき、細胞によってエンドサイトーシスを受けることができる。細胞内 B O D I P Y - L D L の蛍光値は、L D L R を介した L D L のエンドサイトーシスを反映するように検出できる。P C S K 9 が存在し、L D L R に結

50

合する場合、細胞表面のLDLRの量が減少するため、BODIPY-LDLのLDLRへの結合が減少し、LDLのエンドサイトーシスが阻害される；反対的に、PCSK9への阻害は、HepG2細胞によるLDLのエンドサイトーシスを増強する。したがって、テストシステムは、BODIPY-LDL上のHepG2細胞のエンドサイトーシス活性を検出することにより、抗PCSK9抗体の薬理学的活性を測定できる。

【0080】

手順：50 μ Lのポリリジン（Poly-L-lysine）溶液を、コーティングのために96ウェルの黒色底細胞培養プレートの各ウェルに加えた。プレートを37℃、5%CO₂インキュベーターで2時間インキュベートし、コーティング溶液を廃棄した。プレートを100 μ LのPBSで1回洗浄し、後で使用するために乾燥させた。HepG2細胞は通常消化され、アッセイ培地（1%NEAAを含むDMEM）に再懸濁されて、カウントし、80 μ L／ウェルの容量で96ウェル黒底細胞培養プレートに2×10⁴細胞／ウェルで播種した。細胞を37℃、5%CO₂インキュベーターで18時間インキュベートした。PCSK9をアッセイ培地（1%NEAAを含むDMEM）で6000 nMに前希釈し、10 μ L／ウェルでプレートに添加した。抗体を10倍に希釈し、10 μ L／ウェルで添加した。混合物を37℃の5%CO₂インキュベーターで6時間インキュベートした。その後、10 μ Lの0.1 mg／mL BODIPY-LDL溶液を各ウェルに添加し、混合物を37℃、5%CO₂インキュベーターで22時間インキュベートした。培地を廃棄し、200 μ LのPBSを各ウェルに加えて洗浄した。ホルムアルデヒド溶液を加えて細胞を固定し、細胞を室温で20分間放置した。ホルムアルデヒド溶液を廃棄し、洗浄のためにPBSを加えた。最後に、PBSを廃棄し、100 μ LのPBSを各ウェルに加えた。BODIPYの相対蛍光ユニットは、マルチラベルマイクロプレートテスターによって、励起波長490 nm、発光波長520 nm、カットオフ515 nmで検出された。

【0081】

結果は表3及び図3に示される。PCSK9によるHepG2細胞のLDLエンドサイトーシスの阻害を軽減するMAB1のEC₅₀値は、12.99 μ g／mLであった。

【0082】

結論：MAB1はPCSK9の活性を阻害することができ、それによってHepG2細胞のLDLエンドサイトーシスを上昇させ；MAB1のEC₅₀値は、12.99 μ g／mLであった。

【0083】

【表3】

表3. MAB1によるHepG2細胞のLDLエンドサイトーシスのアッセイ

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

【0084】

実施例 4. 野生型および機能的に強化された変異体 P C S K 9 による L D L エンドサイトーシスの阻害を軽減する M A B 1

P C S K 9 には複数の変異体があり、P C S K 9 による L D L - C レベルの調節に対する変異の影響に応じて、機能獲得と機能喪失の 2 つのタイプに分けられる。機能獲得型変異は、P C S K 9 が L D L - C をアップレギュレーションする能力を高め、高コレステロール血症を引き起こし、主に、S 1 2 7 R、D 1 2 9 G、F 2 1 6 L、R 2 1 8 S、D 3 7 4 Y、N 4 2 5 S、R 4 9 6 W、H 5 5 3 R、E 6 7 0 G 等を含む。

【0085】

これらの中で、D 3 7 4 Y (A s p 3 7 4 T y r) 変異は、L D L R に対する P C S K 9 の親和性を 5 ~ 3 0 倍増加させる (L a g a c e T A e t a l . , J . C l i n . I n v e s t . , 2 0 0 6 , 1 1 6 (1 1) : 2 9 9 5 - 3 0 0 5 ; C u n n i n g h a m D e t a l . , N a t . S t r u c t . M o l . B i o l . , 2 0 0 7 , 1 4 (5) : 4 1 3 - 4 1 9 ; F i s h e r T S e t a l . , J . B i o l . C h e m . , 2 0 0 7 , 2 8 2 (2 8) : 2 0 5 0 2 - 2 0 5 1 2) 。

10

【0086】

D 3 7 4 Y (A s p 3 7 4 T y r) 変異タンパク質を例として、この実験では、機能的に強化された P C S K 9 変異タンパク質によって媒介される L D L R エンドサイトーシスの阻害に対する M A B 1 の活性を調べた。結果は、M A B 1 が機能獲得 P C S K 9 タンパク質による L D L エンドサイトーシスの阻害を効果的に軽減 (r e l i e v e) できることを示唆する。

20

【0087】

材料：H e p G 2 (中国科学院から購入、P 1 4) ; D M E M (G i b c o、カタログ番号 1 1 9 9 5 0 4 0) ; F B S (E x c e l l B i o、カタログ番号 F S P 5 0 0) ; M E M N E A A (1 0 0 x) (G i b c o、カタログ番号 1 1 1 4 0 - 0 5 0) ; P O L Y - L - L Y S I N E (S I G M A、カタログ番号 P 4 8 3 2) ; B O D I P Y - L D L (L i f e、カタログ番号 L 3 4 8 3) ; P C S K 9 - h i s (A k e s o B i o p h a r m a によって調製) ; P C S K 9 (D 3 7 4 Y) - h i s (A c r o b i o、カタログ番号 P C Y - H 5 2 2 5) ; e v o l o c u m a b (A M G E N から購入) 。

【0088】

手順：96 ウェルの黒色底細胞培養プレートを 50 μ L の 0.01% ポリ-L-リジンでコーティングした。プレートを 37°C、5% CO₂ インキュベーターで 2 時間インキュベートし、コーティング溶液を廃棄した。プレートを 100 μ L の P B S で 1 回洗浄し、後で使用するために乾燥させた。対数期の H e p G 2 細胞の場合、増殖培地 (12% F B S、1% N E A A を含む D M E M) を廃棄した。トリプシン処理後、細胞をアッセイ培地 (1% N E A A を含む D M E M) に再懸濁し、カウントした。細胞を 96 ウェル黒色細胞培養プレートに 20,000 細胞/ウェルで 80 μ L/ウェルの量で播種し、37°C/5% CO₂ で一晩インキュベートした。翌日、P C S K 9 と抗体 (最終濃度は図に示されています) をアッセイ培地で希釈し、最終容量 100 μ L の 96 ウェルプレートに添加した。細胞培養プレートを 37°C/5% CO₂ で 21 時間インキュベートした。培養プレートを取り出し、0.1 mg/mL の B O D I P Y 標識 L D L 溶液 10 μ L を加えた。混合物を 37°C/5% CO₂ で 9 時間培養した。培地を廃棄し、200 μ L の P B S を各ウェルに加えて洗浄した。100 μ L の P B S を各ウェルに加えた。プレートの相対蛍光ユニット (R F U) は、マルチラベルマイクロプレートテスターによって、励起波長 485 nm および発光波長 535 nm で検出された。

30

40

【0089】

結果：表 4、図 4 及び図 5 に示されているように、M A B 1 は、野生型 P C S K 9 および機能的に強化された変異体 P C S K 9 (P C S K 9 - D 3 7 4 Y) に効果的に結合し、P C S K 9 が L D L エンドサイトーシスを阻害するのを効果的にブロックし、これは、同じ標的を持つ市販薬エボロクマブの活性に相当する。

50

【0090】

【表4】

表4. 野生型および機能増強変異体PCSK9によるLDLRエンドサイトーシスの阻害

のためのMAB1のEC₅₀

	EC ₅₀ (μg/mL)	
	MAB1	エボロクマブ
野生型PCSK9	32.87	30.79
機能的に強化された変異体PCSK9 (PCSK9-D374Y)	1.102	1.259

10

【0091】

実施例4. 野生型PCSK9による変異型LDLRを介したLDLエンドサイトーシスの阻害を軽減するMAB1

20

PCSK9タンパク質のLDLRへの結合は、LDL-C代謝を調節する。LDLR遺伝子の変異は非常に多く、LDLRタンパク質の合成と機能に応じて次のように分類できる：1) LDLR対立遺伝子の非発現を含むLDLR非発現変異（すなわち、LDLRは細胞によって発現されない）、例えば、プロモーター配列変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異、およびスプライシング変異、かつLDLR輸送の欠陥、すなわち欠陥のあるLDLRは、合成された後、小胞体からゴルジ装置に輸送できず、細胞内に蓄積および分解される；2) 結合欠損遺伝子変異、すなわち、変異遺伝子によってコードされる異常なLDLRは、細胞表面で輸送および発現され得るが、LDL-Cに結合するための活性が低下または消去される；3) 内在化欠損遺伝子変異、すなわち、LDLに結合するがエンドサイトーシスできない受容体は、NPVY配列をコードするコドンの変異により蓄積してカベオラを覆う；4) リサイクル欠損遺伝子変異、すなわち、受容体はLDL-Cに結合してエンドサイトーシスを仲介することができますが、リソソーム内でLDL-Cと同時に消化され、LDLRが細胞表面にリサイクルできなくなる。野生型LDLR（以下の変異体LDLR（D227E）に対応する227位のアミノ酸D）及び変異型LDLR（D227E； <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3690/>）をコントロールとして使用することにより、この実験では、様々な変異型LDLRのLDLエンドサイトーシス活性、PCSK9によるLDLエンドサイトーシスに対する様々な変異型LDLRの阻害、およびPCSK9によるLDLエンドサイトーシスの阻害がMAB1によって効果的に軽減されるかどうかを評価した。

30

40

【0092】

手順：293T細胞を従来の消化によりプレーティングし、6ウェルプレートに5×10⁵細胞／ウェルで播種した。2mLのDMEM+10%FBS+1%二重特異性抗体（Penicillin Streptomycies, Gibco、カタログ番号15140-122）を添加し、細胞をインキュベーター内で一晩インキュベートした。1mLのOpti-MEM無血清培地にトランスフェクションする2時間前に培地を交換した。標的プラスミドDNA（Akeso Biopharma, Inc.によって構築、表5参照、野生型LDLRに基づいて、開始コドンによってコードされるアミノ酸を1位として使用し、そして表5に従って対応する位置の部位特異的変異誘発を行った後、YouBioから購入したレンチウイルスプラスミドpCDH-CMV-MCS-EF1-puro

50

にDNAを挿入し、表5のプラスミドを得た)及びPEI(Polyscience, カタログ番号: 23966)をOpti-MEMで別々に希釈し、標的プラスミド及びコントロールプラスミドをそれぞれ2 µgとPEIを10 µg (5 µgのPEIセパレートトランスフェクション)にした。希釈したDNAとPEIをよく混合し、15分間インキュベートし、6ウェルプレートにゆっくりと滴下して加え、穏やかに混合し、インキュベーターで一晩インキュベートした。6ウェルプレートの培地を2 mL DMEM+10% FBSに交換し、細胞をインキュベーター内でさらにインキュベートした。トランスフェクションの48時間後、0.05%パンクレリパーゼ-EDTAで消化し、遠心分離して細胞を回収し、カウントした。細胞の一部をレポーターアッセイプレートに加えて、 2×10^5 細胞/ウェルで、100 µLのDMEM+10% FBS、PBS、IL-6 (Akeso Biopharma、ロット番号: 20150421) (50 ng/mL)を添加した。細胞を一晩インキュベートし、50 µLの基質(Bright-Glo™ luciferase assay system、Promega、ロット: E2620)を添加してRLUを読み取った。細胞の別の部分は、200 µLのOpti-MEM+1% NEAAを使用したLDLエンドサイトーシス(FACS)アッセイに使用された。細胞を 2×10^5 細胞/ウェルで添加し、PCSK-9、hIgG1 (Akeso Biopharma、ロット番号: 20170424) およびMAB1と、それぞれ最終濃度600 nM、50 µg/mL、および50 µg/mLで共培養し、化合物を添加してさらに一晩インキュベートした前に、細胞をPCSK-9および抗体とプレインキュベートした。

10

20

【0093】

対応するLDL (BODIPY-LDL、Life、カタログ番号: L3483; 最終濃度: 0.001 mg/mL)を実験計画に従って添加し、混合物を十分に混合して4時間インキュベートした。

【0094】

細胞を回収し、底が尖った96ウェルプレートに移し、 $350 \times g$ で5分間遠心分離した。上清を廃棄した。細胞沈殿物を200 µLの1% PBSAに再懸濁し、 $350 \times g$ で5分間遠心分離した後、上清を廃棄した。洗浄を1回繰り返した。細胞沈殿物を200 µLの1% PBSAに再懸濁し、アッセイのためにフローサイトメトリーチューブに移した。

30

【0095】

結果は表5に示す。野生型LDLRを例として、LDLエンドサイトーシス率は11.50%であった; PCSK9を加えた後、エンドサイトーシス率は7.23%であり、PCSK9がLDLRによるLDLエンドサイトーシスをブロックしたことを示唆している。LDLとPCSK9に基づいてMAB1を追加した場合、エンドサイトーシス率は8.53%であり、これはMAB1がPCSK9を介したLDLエンドサイトーシスの阻害を効果的に軽減できることを示唆している。表の変異配列情報は、文献および関連するオンラインデータベースから取得された(Liang et al., Scientific Reports, 2015; 5(1):17272.; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)。

40

【0096】

50

【表 5】

表5. 野生型LDLRおよび様々な変異型LDLRによるBODIPY-LDLのエンドサイトーシス率%

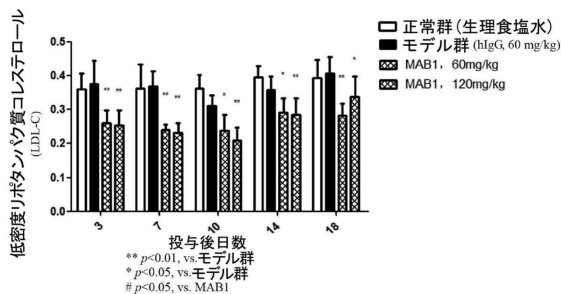
突然変異部位	プラスミド	のエンドサイトーシス率%				PCSK9 阻害%
		LDL	LDL+ PCSK9	LDL+PCSK9 +hIgG1	LDL+PCSK9 + MAB1	
hLDLRFL (野生型)	pCDH-hLDLRFL-puro	11.50	7.23	6.27	8.53	37.13
Asp227Glu (hLDLR (D227E))	pCDH-hLDLR (D227E) -puro	11.30	6.72	7.63	11.60	40.53
Glu179Lys	pCDH-hLDLRmt2-puro	9.30	2.04	2.21	7.11	78.06
His583Asp	pCDH-hLDLRmt3-puro	7.56	2.88	2.96	6.06	61.90
Asp172Asn	pCDH-hLDLRmt4. 1-puro	11.30	4.71	4.22	10.90	58.32
Leu575Phe	pCDH-hLDLRmt4. 2-puro	7.18	5.01	5.08	5.93	30.22
Cys255Arg	pCDH-hLDLRmt6. 2-puro	11.90	7.08	6.75	9.77	40.50
Gly636Val	pCDH-hLDLR020-puro	9.79	4.72	4.83	8.24	51.79
Gly98Ser	pCDH-hLDLR059. 1-puro	11.60	7.11	7.47	9.96	38.71
Asp94Asn	pCDH-hLDLR0123. 1-puro	11.60	3.98	3.34	7.42	65.69
Ala459Thr	pCDH-hLDLR0123. 2-puro	9.69	6.74	7.40	8.90	30.44
His583Tyr	pCDH-hLDLR0160-puro	9.04	6.36	6.96	8.17	29.65

【0097】

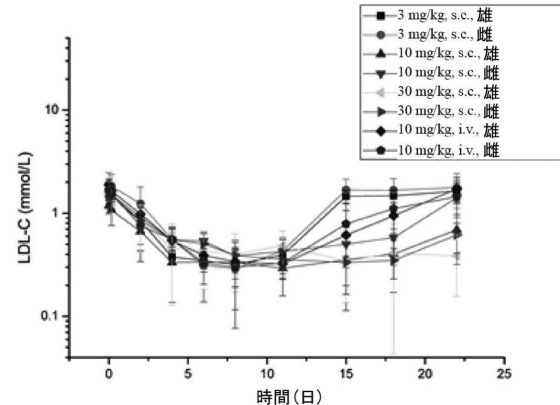
結果は、変異型LDLRがLDLエンドサイトーシス活性を持ち、PCSK9がLDLエンドサイトーシスを阻害できる場合、MAB1の添加によりLDLエンドサイトーシスを大幅に増加させることができることを示した。つまり、MAB1はPCSK9を介したLDLエンドサイトーシスの阻害を効果的に軽減することができる。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

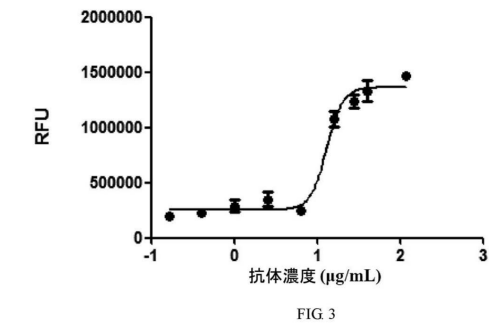
20

30

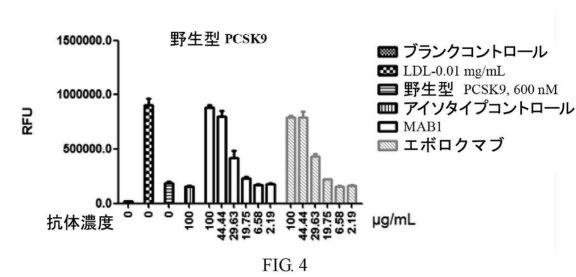
40

50

【 図 3 】

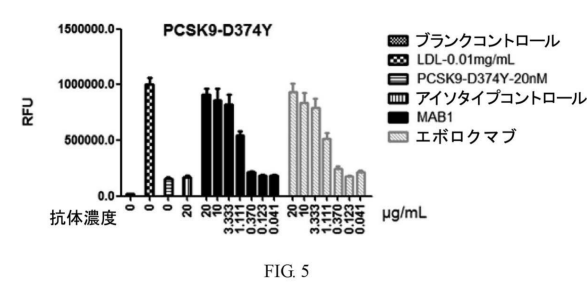


【 図 4 】



10

【 図 5 】



20

【 配 列 表 】

2 0 2 3 5 0 1 7 4 5 0 0 0 0 1 . a p p

30

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/40(2006.01); C12N 15/13(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61K 51/10(2006.01); A61P 9/12(2006.01); A61P 3/06(2006.01); A61P 9/00(2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, Wanfang Data Retrieval System, pubmed, baidu, patentics, Genbank, EBI, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, STN: PCSK9, 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 重链可变区, 轻链可变区, 高胆固醇血症, 高胆固醇血, 他汀, 依折麦布, hypercholesteremia, hypercholesteremic, hyperlipidemia, hyperlipidemic, hyperlipemia, CDR, VH, VL, heavy chain, light chain, antibody, Mab, IgG, immunoglobulin, statin, ezetimibe, 序列 2, 4, 5-10, sequence 2, 4, 5-10		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105461809 A (AKESO BIOPHARMA, INC. et al.) 06 April 2016 (2016-04-06) the abstract, claims 1-3, 8 and 10, and description, paragraphs [0080], [0081] and [0084]	1-8, 10, 11, 15-18
Y	CN 105461809 A (AKESO BIOPHARMA, INC. et al.) 06 April 2016 (2016-04-06) the abstract, claims 1-3, 8 and 10, and description, paragraphs [0080], [0081] and [0084]	2, 3, 5-11, 15-18
X	CN 104583237 A (ALDERBIO HOLDINGS LLC) 29 April 2015 (2015-04-29) claims 1, 107, 120, 139, 155, 177, 204, 221, 228, 260 and 394, and description, paragraph [1735]	1, 4-11, 15-18
Y	CN 104583237 A (ALDERBIO HOLDINGS LLC) 29 April 2015 (2015-04-29) claims 1, 107, 120, 139, 155, 177, 204, 221, 228, 260 and 394, and description, paragraph [1735]	2, 3, 5-18
X	CN 105263963 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 20 January 2016 (2016-01-20) claims 1 and 4-8	1, 4-11, 15, 16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 January 2021		Date of mailing of the international search report 20 February 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No. (86-10)62019451		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129763

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105263963 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 20 January 2016 (2016-01-20) claims 1 and 4-8	2, 3, 5-18
X	CN 102232088 A (SCHERING CORP.) 02 November 2011 (2011-11-02) the abstract, and claims 1-8, 11, 13-18, 25-30, 38, 40, 42 and 44	1, 4-10, 15-18
X	CN 107106678 A (SANOFI BIOTECHNOLOGY et al.) 29 August 2017 (2017-08-29) the abstract, and claims 1-4, 16-24, 37-46 and 64-89	1, 4-10, 15-18
X	US 2014099312 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 10 April 2014 (2014-04-10) the abstract, and claims 1-4, 13-18, 20 and 32-37	1, 4-11, 15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129763

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/129763

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: **8-15,17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 8-15 and 17 respectively relate to methods for treating hypercholesterolemia or treating patients suffering from hypercholesterolemia, reducing blood cholesterol in patients with hyperlipidemia and cardiovascular disease, or methods for reducing the risk of cardiovascular disease in patients with hyperlipidemia, which are all subject matters defined in PCT Rule 39.1(iv) that do not warrant search by International Searching Authorities: (4) Methods of treating human or animal bodies by surgery or treatment and diagnostic methods implemented on human or animal bodies. The international search is made on the basis of the use of preparing the corresponding medicine.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129763

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105461809	A	06 April 2016	US	10670604	B2	02 June 2020
				CN	105461809	B	12 October 2018
				WO	2016127912	A1	18 August 2016
				KR	20170110681	A	11 October 2017
				JP	2018509894	A	12 April 2018
				US	2018024131	A1	25 January 2018
				JP	6731933	B2	29 July 2020
				US	2020319185	A1	08 October 2020
CN	104583237	A	29 April 2015	CA	2872777	A1	14 November 2013
				NZ	732652	A	26 October 2018
				TW	201348260	A	01 December 2013
				MX	2014013612	A	26 October 2015
				KR	102137291	B1	23 July 2020
				EP	2844673	A4	20 April 2016
				WO	2013169886	A1	14 November 2013
				CN	109796533	A	24 May 2019
				NZ	702304	A	29 September 2017
				US	2013302399	A1	14 November 2013
				US	10259885	B2	16 April 2019
				AU	2013259562	A1	27 November 2014
				JP	6386996	B2	05 September 2018
				KR	20150006471	A	16 January 2015
				CN	104583237	B	25 December 2018
				IL	235436	D0	31 December 2014
				WO	2013169886	A9	23 January 2014
				SG	11201407099W	A	27 November 2014
				US	2016194408	A1	07 July 2016
				JP	2015519050	A	09 July 2015
				US	9255154	B2	09 February 2016
				AU	2013259562	B2	10 May 2018
				EP	2844673	A1	11 March 2015
				AR	092005	A1	18 March 2015
				US	2019389968	A1	26 December 2019
CN	105263963	A	20 January 2016	CA	2912101	A1	04 December 2014
				EP	3004172	B1	27 November 2019
				US	2019330371	A1	31 October 2019
				KR	20160013046	A	03 February 2016
				US	2014356370	A1	04 December 2014
				AU	2014274077	B2	26 September 2019
				WO	2014194111	A1	04 December 2014
				IL	242251	A	27 February 2020
				EA	201592304	A1	29 April 2016
				JP	6423868	B2	14 November 2018
				ZA	201507798	B	26 April 2017
				EP	3004172	A1	13 April 2016
				HK	1216896	A1	09 December 2016
				JP	2016522211	A	28 July 2016
				TW	201536315	A	01 October 2015
				AU	2014274077	A1	19 November 2015
				TW	I682780	B	21 January 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/129763

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102232088	A	02 November 2011	US	8598320	B2	03 December 2013
				CA	2703712	A1	30 April 2009
				MX	2010004454	A	28 July 2010
				NZ	584902	A	30 March 2012
				EP	2205639	B1	23 December 2015
				US	2011033465	A1	10 February 2011
				JP	2013091655	A	16 May 2013
				JP	2011501952	A	20 January 2011
				KR	20100091191	A	18 August 2010
				SG	2013014352	A	26 September 2014
				US	2014161798	A1	12 June 2014
				AU	2008316587	B2	17 July 2014
				BR	PI0818765	A2	22 April 2015
				IL	205323	D0	30 December 2010
				JP	5692867	B2	01 April 2015
				EP	2205639	A2	14 July 2010
				WO	2009055783	A2	30 April 2009
				SG	188814	A1	30 April 2013
				AU	2008316587	A1	30 April 2009
				WO	2009055783	A3	17 September 2009
				JP	2013213057	A	17 October 2013
CN	107106678	A	29 August 2017	AU	2015289617	A1	02 February 2017
				RU	2017104799	A3	19 February 2019
				EP	3169362	B1	10 June 2020
				MX	2017000628	A	27 April 2017
				US	2020255544	A1	13 August 2020
				RU	2017104799	A	16 August 2018
				JP	2017522316	A	10 August 2017
				KR	20170028441	A	13 March 2017
				CA	2955304	A1	21 January 2016
				EP	3169362	A1	24 May 2017
				RU	2723018	C2	08 June 2020
				US	2016137746	A1	19 May 2016
				WO	2016011260	A1	21 January 2016
US	2014099312	A1	10 April 2014	US	2017296657	A1	19 October 2017
				US	2013064834	A1	14 March 2013
				US	9724411	B2	08 August 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/129763

A. 主题的分类		
C07K 16/40(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 51/10(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K C12N A61K A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, DWPI, CNITX, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, pubmed, bai-du, patentics, Genbank, EBI, 中国专利生物序列检索系统, STN, PCSK9, 前蛋白转化酶枯草溶菌素9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, 重链可变区, 轻链可变区, 高胆固醇血症, 高胆固醇血, 他汀, 依折麦布, hypercholesteremia, hypercholesteremic, hyperlipidemia, hyperlipidemic, hyperlipemia, CDR, VH, VL, heavy chain, light chain, antibody, Mab, IgG, immunoglobulin, statin, ezetimibe, 序列2, 4, 5-10		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105461809 A (中山康方生物医药有限公司 等) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 说明书摘要, 权利要求1-3, 8, 10, 说明书[0080][0081][0084]段	1-8, 10-11, 15-18
Y	CN 105461809 A (中山康方生物医药有限公司 等) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 说明书摘要, 权利要求1-3, 8, 10, 说明书[0080][0081][0084]段	2, 3, 5-11, 15-18
X	CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1, 107, 120, 139, 155, 177, 204, 221, 228, 260, 394, 说明书[1735]段	1, 4-11, 15-18
Y	CN 104583237 A (奥尔德生物控股有限责任公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1, 107, 120, 139, 155, 177, 204, 221, 228, 260, 394, 说明书[1735]段	2, 3, 5-18
X	CN 105263963 A (瑞泽恩制药公司) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 权利要求1, 4-8	1, 4-11, 15, 16
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2021年 1月 27日		2021年 2月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		李宁
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(10)-53961932

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际申请号

PCT/CN2020/129763

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 105263963 A (瑞泽恩制药公司) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 权利要求1, 4-8	2, 3, 5-18
X	CN 102232088 A (先灵公司) 2011年 11月 2日 (2011 - 11 - 02) 说明书摘要, 权利要求1-8, 11, 13-18, 25-30, 38, 40, 42, 44	1, 4-10, 15-18
X	CN 107106678 A (赛诺菲生物技术公司 等) 2017年 8月 29日 (2017 - 08 - 29) 说明书摘要, 权利要求1-4, 16-24, 37-46, 64-89	1, 4-10, 15-18
X	US 2014099312 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2014年 4月 10日 (2014 - 04 - 10) 摘要, 权利要求1-4, 13-18, 20, 32-37	1, 4-11, 15-18

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/129763
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。 3. 补充意见:		

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/129763
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)	
根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:		
1. ☒	权利要求: 8-15, 17 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即: [1] 权利要求8-15, 17分别涉及治疗高胆固醇血症或治疗患有高胆固醇血症的患者的方法, 降低高血脂心血管疾病患者的血胆固醇或降低高血脂患者心血管疾病发作风险的方法, 其均属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题: (4) 通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于制备相应药物的用途而作出。	10
2. ☐	权利要求: 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:	
3. ☐	权利要求: 因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/129763

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 105461809 A	2016年 4月 6日	US 10670604 B2	2020年 6月 2日
		CN 105461809 B	2018年 10月 12日
		WO 2016127912 A1	2016年 8月 18日
		KR 20170110681 A	2017年 10月 11日
		JP 2018509894 A	2018年 4月 12日
		US 2018024131 A1	2018年 1月 25日
		JP 6731933 B2	2020年 7月 29日
		US 2020319185 A1	2020年 10月 8日
CN 104583237 A	2015年 4月 29日	CA 2872777 A1	2013年 11月 14日
		NZ 732652 A	2018年 10月 26日
		TW 201348260 A	2013年 12月 1日
		MX 2014013612 A	2015年 10月 26日
		KR 102137291 B1	2020年 7月 23日
		EP 2844673 A4	2016年 4月 20日
		WO 2013169886 A1	2013年 11月 14日
		CN 109796533 A	2019年 5月 24日
		NZ 702304 A	2017年 9月 29日
		US 2013302399 A1	2013年 11月 14日
		US 10259885 B2	2019年 4月 16日
		AU 2013259562 A1	2014年 11月 27日
		JP 6386996 B2	2018年 9月 5日
		KR 20150006471 A	2015年 1月 16日
		CN 104583237 B	2018年 12月 25日
		IL 235436 D0	2014年 12月 31日
		WO 2013169886 A9	2014年 1月 23日
		SG 11201407099W A	2014年 11月 27日
		US 2016194408 A1	2016年 7月 7日
		JP 2015519050 A	2015年 7月 9日
CN 105263963 A	2016年 1月 20日	US 9255154 B2	2016年 2月 9日
		AU 2013259562 B2	2018年 5月 10日
		EP 2844673 A1	2015年 3月 11日
		AR 092005 A1	2015年 3月 18日
		US 2019389968 A1	2019年 12月 26日
		CA 2912101 A1	2014年 12月 4日
		EP 3004172 B1	2019年 11月 27日
		US 2019330371 A1	2019年 10月 31日
		KR 20160013046 A	2016年 2月 3日
		US 2014356370 A1	2014年 12月 4日
CN 105263963 A	2016年 1月 20日	AU 2014274077 B2	2019年 9月 26日
		WO 2014194111 A1	2014年 12月 4日
		IL 242251 A	2020年 2月 27日
		EA 201592304 A1	2016年 4月 29日
		JP 6423868 B2	2018年 11月 14日
		ZA 201507798 B	2017年 4月 26日
		EP 3004172 A1	2016年 4月 13日
		HK 1216896 A1	2016年 12月 9日
		JP 2016522211 A	2016年 7月 28日
		TW 201536315 A	2015年 10月 1日
		AU 2014274077 A1	2015年 11月 19日
		TW 1682780 B	2020年 1月 21日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/129763

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 102232088 A	2011年 11月 2日	US 8598320 B2	2013年 12月 3日
		CA 2703712 A1	2009年 4月 30日
		MX 2010004454 A	2010年 7月 28日
		NZ 584902 A	2012年 3月 30日
		EP 2205639 B1	2015年 12月 23日
		US 2011033465 A1	2011年 2月 10日
		JP 2013091655 A	2013年 5月 16日
		JP 2011501952 A	2011年 1月 20日
		KR 20100091191 A	2010年 8月 18日
		SG 2013014352 A	2014年 9月 26日
		US 2014161798 A1	2014年 6月 12日
		AU 2008316587 B2	2014年 7月 17日
		BR PI0818765 A2	2015年 4月 22日
		IL 205323 D0	2010年 12月 30日
		JP 5692867 B2	2015年 4月 1日
		EP 2205639 A2	2010年 7月 14日
		WO 2009055783 A2	2009年 4月 30日
		SG 188814 A1	2013年 4月 30日
		AU 2008316587 A1	2009年 4月 30日
		WO 2009055783 A3	2009年 9月 17日
		JP 2013213057 A	2013年 10月 17日
CN 107106678 A	2017年 8月 29日	AU 2015289617 A1	2017年 2月 2日
		RU 2017104799 A3	2019年 2月 19日
		EP 3169362 B1	2020年 6月 10日
		MX 2017000628 A	2017年 4月 27日
		US 2020255544 A1	2020年 8月 13日
		RU 2017104799 A	2018年 8月 16日
		JP 2017522316 A	2017年 8月 10日
		KR 20170028441 A	2017年 3月 13日
		CA 2955304 A1	2016年 1月 21日
		EP 3169362 A1	2017年 5月 24日
		RU 2723018 C2	2020年 6月 8日
		US 2016137746 A1	2016年 5月 19日
		WO 2016011260 A1	2016年 1月 21日
US 2014099312 A1	2014年 4月 10日	US 2017296657 A1	2017年 10月 19日
		US 2013064834 A1	2013年 3月 14日
		US 9724411 B2	2017年 8月 8日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100123593

弁理士 関根 宣夫

(74)代理人 100208225

弁理士 青木 修二郎

(74)代理人 100217179

弁理士 村上 智史

(72)発明者 リー パイヨン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン
, シェンノン ブールバード 6

(72)発明者 シア ユイ

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン
, シェンノン ブールバード 6

(72)発明者 ワン チョンミン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン
, シェンノン ブールバード 6

(72)発明者 チン シアオピン

中華人民共和国, コアントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン
, シェンノン ブールバード 6

F ターム (参考) 4C085 AA14 CC23 EE01 GG04

4H045 AA11 AA30 DA76 EA27 FA72 FA74