

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 7 月 13 日 (13.07.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/118307 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/40 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/112075
- (22) 国际申请日: 2016 年 12 月 26 日 (26.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610010241.3 2016 年 1 月 5 日 (05.01.2016) CN
- (71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。
- (72) 发明人: 屈向东 (QU, Xiangdong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。金后聪 (JIN, Houcong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。崔东冰 (CUI, Dongbing); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。胡齐悦 (HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。孙飘扬 (SUN, Piaoyang); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。
- (74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

[见续页]

(54) Title: PCSK9 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, AND MEDICAL USES THEREOF

(54) 发明名称: PCSK9 抗体、其抗原结合片段及其医药用途

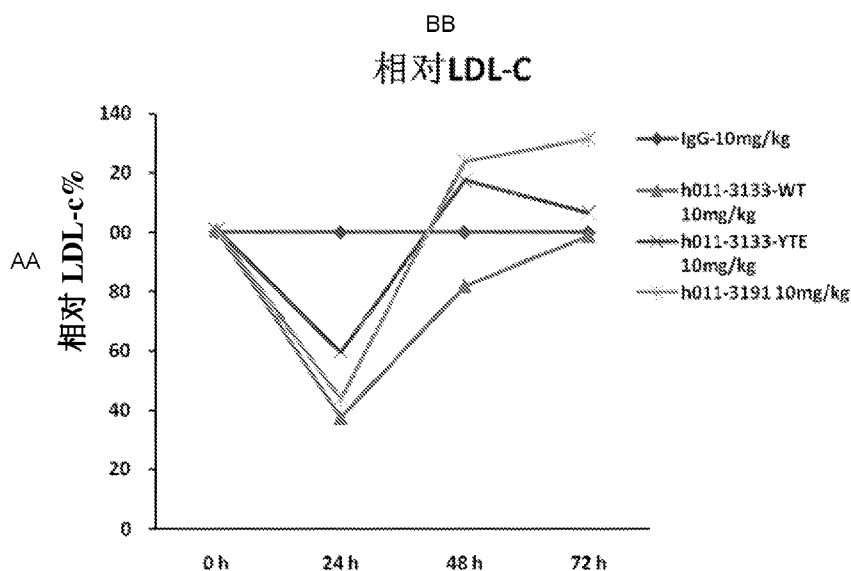


图 5

AA Relative LDL-C %
BB Relative LDL-C

(57) Abstract: The present invention provides a PCSK9 antibody, an antigen-binding fragment thereof, and medical uses thereof.

(57) 摘要: 本发明提供一种 PCSK9 抗体、其抗原结合片段及其医药用途。

WO 2017/118307 A1



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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚

(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

PCSK9 抗体、其抗原结合片段及其医药用途

技术领域

- 本发明涉及一种 PCSK9 抗体, PCSK9 的抗原结合片段, 包含所述 PCSK9 抗体 CDR 区的嵌合抗体、人源化抗体, 以及包含人 PCSK9 抗体及其抗原结合片段的药物组合物, 以及其作为降血脂药物的用途。

背景技术

- 高胆固醇血症是一种以血清胆固醇水平升高为主要特征的脂类代谢异常疾病, 其主要表现为血清胆固醇水平升高, 导致胆固醇在血管聚集, 形成动脉粥样硬化。大量的临床及实验研究结果都证实, 脂质代谢异常和冠心病的发生、发展有着密切的关系。因此, 降低血液中的胆固醇浓度成为了目前治疗和预防动脉粥样硬化的一个主要手段。

- 随着我国人民生活水平的快速提高, 血脂异常也成为了危害我国城乡居民的主要因素。据 2012 年统计数据, 我国每年死亡人数中约有 40% 死于心血管疾病。目前, 我国成人血脂异常患病率为 18.6%, 估计全国血脂异常现患人数 1.6 亿。不同类型的血脂异常现患率分别为: 高胆固醇血症 2.9%, 高甘油三酯血症 11.9%, 低高密度脂蛋白血症 7.4%; 另有 3.9% 的人血胆固醇边缘升高。2012 年卫生部疾病预防控制专家委员会慢性病防治分委会达成的“慢性病防治中国专家共识”中提到, 我国有 3300 万高胆固醇血症患者, 而从局部地区看, 我国血脂异常发病率情况远比上述数据要严重。

- 目前, 临床上调脂药物主要以他汀类为主。立普妥 (Lipitor) 作为全世界应用最广泛的降胆固醇药物, 也是医药史上最畅销药物, 通过阻断肝脏生产胆固醇的酶作用, 减少胆固醇的生产, 从而增加肝脏从血液中摄取更多的胆固醇, 进而减低血液中胆固醇浓度。但是立普妥也有其不足之处, 首先从数据看, 立普妥可以降低 30%-40% 的低密度脂蛋白, 但仍然有很多病人依然无法到达有效的降低血脂(低密度脂蛋白浓度 < 50mg/dL), 其次病人对立普妥的响应率也有种族差异。这些种种原因, 致使病人需要一个更为有效的降低血脂的药物。

- 家族性高胆固醇血症 (Familial hypercholesterolemia, FM) 是一种常染色体单基因显性遗传性疾病, 其临床特征为血总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-c) 显著升高、睑黄瘤、角膜弓以及早发的心血管疾病。低密度脂蛋白受体 (LDL receptor, LDLR) 基因突变致其缺陷或缺乏, LDL-c 不能顺利转运到肝脏清除, 以致血中 LDL-c 水平升高。目前已明确 3 种基因与 FM 的发生有关, 它们分别是 LDLR 基因、载脂蛋白 B100 基因和 PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 基因。

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 是一种前蛋白转化酶, 属于分泌的枯草

杆菌酶家族的蛋白酶 K 亚族。该编码蛋白是作为可溶性酶原合成的，在内质网中经过自身催化分子内加工。实验结果显示，PCSK9 促进 LDL 受体的降解从而增加血浆中 LDL 胆固醇含量，而 LDL 受体介导肝内的 LDL 胞吞过程，后者是从循环系统清除 LDL 的主要途径。研究发现，12.5%的高胆固醇血症(ADH)患者检测有 PCSK9 基因突变。PCSK9 突变形式多样，根据突变对 PCSK9 调节 LDL-C 水平的不同影响可分为两类：功能缺失型和功能获得型。其中功能缺失型突变与低血胆固醇水平有关，有预防冠状动脉粥样硬化性心脏病发生的作用，非洲人群中低胆固醇的 PCSK9 突变率高于其他种族。PCSK9 功能获得型突变体通过增加 PCSK9 的功能、降低 LDLR 的表达而升高血浆胆固醇水平，可以导致严重高胆固醇血症和早发冠状动脉粥样硬化性心脏病，目前发现的 PCSK9 功能获得型突变包括：D374Y、S127R、F216L、N157K、R306S 等。其中，与 PCSK9 野生型相比，D374Y 突变体细胞表面的 LDLR 减少了 36%，S127R 突变有相应减少了 10%。

目前 PCSK9 作为一个极具潜力的，新的靶标已成为高胆固醇血症研究的热点，对于深入了解胆固醇代谢的机制和寻求新的治疗手段有重要意义。有多家跨国制药公司在研发针对 PCSK9 的单克隆抗体，它通过在血液中中和 PCSK9，从而增加了肝脏表面 LDL 受体的浓度，进而达到降低血液中 LDL 浓度的目的。相关的专利有 WO2011111007、WO2011072263、WO2013170367、WO2013169886、WO2013148284 、 WO2013091103 、 WO2013039958 、 WO2013039969 、 WO2013016648 、 WO2013008185 、 WO2012170607 、 WO2012168491 、 WO2012154999、WO2012109530、WO2012101251、WO2012088313、US8829165 B2、US8030457B2、US8563698B2、US8859741B2、US8871913B2、US8871914B2、US8883983B2、WO2012058137 和 WO2012054438。

本发明提供有着更高亲和力、更高选择性、更高生物活性的 PCSK9 抗体。

发明内容

本发明提供一种特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或抗原结合片段，其包含可变区，所述可变区包含至少一个或多个选自以下的 CDR 区：

i) HCDR1，所述 HCDR1 为 GYX^1IH (SEQ ID NO: 43)，其中 X^1 是 T、D 或 E；

ii) HCDR2，所述 HCDR2 为 $X^2IX^3PSX^4TYTKFNQKFKD$ (SEQ ID NO: 44)，其中 X^2 是 Y 或 E； X^3 是 N、L、I 或 V； X^4 是 S、G 或 A；

iii) HCDR3，所述 HCDR3 为 $AREX^5IX^6X^7NYWFFDX^8$ (SEQ ID NO: 45)，其中 X^5 是 R 或 N； X^6 是 Y 或 F； X^7 是 S 或 F； X^8 是 V 或 R；

iv) LCDR1，所述 LCDR1 为 $KASQNVYX_1X_2VX_3$ (SEQ ID NO: 46)，其中 X_1 是 T 或 W； X_2 是 A 或 E； X_3 是 A、D 或 V；

v) LCDR 2, 所述 LCDR2 为 $X_4X_5X_6NRYT$ (SEQ ID NO: 47), 其中 X_4 是 S、E 或 Q; X_5 是 A 或 M; X_6 是 S 或 V; 和

vi) LCDR3, 所述 LCDR3 为 $QQX_7SX_8X_9PX_{10}T$ (SEQ ID NO: 48), 其中 X_7 是 Y、F 或 L; X_8 是 S 或 W; X_9 是 Y、F、Q 或 S; X_{10} 是 Y、D 或 E。

5 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:45 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

10 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

 上述的 SEQ ID NO:43-48 也可以进一步通过亲和力成熟的技术手段, 对本发明的 CDR 区进行获得更高活性的氨基酸突变。

15 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 HCDR1 选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列;

20 HCDR2 选自 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列;

 HCDR3 选自 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

25 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 LCDR1 选自 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列;

 LCDR2 选自 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列;

30 LCDR3 选自 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体包含选自以下的六个 CDR:

35 1) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、

SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

2) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

5 3) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

4) 分别如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

5) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

10 6) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

7) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

15 8) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

9) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

10) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

20 11) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 38 所示的六个 CDR;

12) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 39 所示的六个 CDR;

25 13) 分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 15 所示的六个 CDR;

14) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

15) SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

30 16) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 40 所示的六个 CDR;

17) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 41 所示的六个 CDR;

35 18) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

19) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

20) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

5 21) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

22) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 42 所示的六个 CDR; 和

10 23) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR。

在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其片段。

15 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或其片段。

在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

20 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的人源化抗体重链包含重链可变区 FR 区序列来源于人种系重链, IGHV1-2*02 和 hjh6.1 的组合序列或其突变序列; 其包含人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区和 hjh6.1 的 FR4 区或其突变序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

25 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述人源化抗体重链序列为 SEQ ID NO:10 所示的序列的变体; 所述变体优选在重链可变区有 0-10 的氨基酸变化。所述的氨基酸变化可以用现有技术, 为提高抗体如亲和性、半衰期等性能做的改进, 如用亲和力成熟修改 CDR 区的氨基酸, 或者用回复突变修改 FR 区的氨基酸。

30 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的人源化抗体包含具有 0-10 个氨基酸的回复突变的重链 FR 区, 其中所述回复突变优选为一个或多个选自 R72A、T74K、V68A、M70L、M48V、G49A、R67K 和 R38K 的氨基酸回复突变。

35 在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 所述 PCSK9 抗体包含 VH, 所述 VH 的氨基酸

序列选自 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

5 在本发明另一个优选的实施方案中，本发明所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的人源化抗体轻链可变区上的轻链 FR 区序列来源于人种系轻链模板 IGKV1-39*01 和 hjk4.1 的组合序列或其突变序列；其包含人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区和 hjk4.1 的 FR4 区或其突变序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

10 在本发明另一个优选的实施方案中，本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:11 或其变体所示的轻链可变区；所述变体是指在 SEQ ID NO:11 的序列中有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸变化。所述的氨基酸变化可以用现有技术，为提高抗体如亲和性、半衰期等性能做的改进，如用亲和力成熟修改 CDR 区的氨基酸，或者用回复突变修改 FR 区的氨基酸。

15 在本发明另一个优选的实施方案中，本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体包含具有 0-10 个氨基酸的回复突变的轻链 FR 区，其中所述回复突变优选为一个或多个选自 Q3V、A43S 和 Y87F 的氨基酸回复突变。

20 在本发明另一个优选的实施方案中，本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，所述抗体包含

VL，所述 VL 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 或

25 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

在本发明另一个优选的实施方案中，本发明所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，所述抗体包含选自以下的 VH 和 VL：

- 1) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 2) SEQ ID NO: 49 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 30 3) SEQ ID NO: 50 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 4) SEQ ID NO: 51 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 5) SEQ ID NO: 52 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 6) SEQ ID NO: 53 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL；
- 7) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQ ID NO: 59 的 VL；
- 35 8) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQ ID NO: 60 的 VL；

- 9) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 61 的 VL;
- 10) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 62 的 VL;
- 11) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 63 的 VL;
- 12) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 64 的 VL;
- 5 13) SEQ ID NO: 54 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
- 14) SEQ ID NO: 55 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
- 15) SEQ ID NO: 56 的 VH 和 SEQID NO: 65 的 VL;
- 16) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 66 的 VL;
- 17) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 67 的 VL;
- 10 18) SEQ ID NO: 57 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
- 19) SEQ ID NO: 58 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
- 20) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 68 的 VL;
- 21) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 69 的 VL;
- 22) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 70 的 VL; 和
- 15 23) SEQ ID NO: 56 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL。

在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述嵌合抗体或人源化抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列; 优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 或使用氨基酸突变延长抗体在血清中的半衰期

20 期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体的重链恒定区, 更优选包含引入 YTE 突变的 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区;

所述嵌合抗体或人源化抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的恒定区, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

在本发明另一个优选的实施方案中, 本发明所述的特异性结合 PCSK9 的

25 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含:

- 1) SEQ ID NO: 71 的重链序列和 SEQ ID NO: 73 的轻链序列; 或
- 2) SEQ ID NO: 75 的重链序列和 SEQ ID NO: 73 的轻链序列。

另一方面, 本发明提供一种 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其包含一个或多个选自以下的 CDR: 如序列 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO: 16 所示的、或与 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO: 16 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 HCDR; 和如序列 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO: 19 所示的、或与 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO: 19 具有至少 95% 序列同一性的序列所示的 LCDR。所述的 95% 序列同一性的序列可以来自 CDR 区的亲和力成熟而得, 如本发明的 SEQ ID NO:20 和 SEQ ID NO:21

30 的 HCDR1, 或 SEQ ID NO:22 至 SEQ ID NO:27 的 HCDR2, 或 SEQ ID NO:28 至 SEQ ID NO:30 的 HCDR3; 或 SEQ ID NO:31 至 SEQ ID NO:34 的 LCDR1,

35

或 SEQ ID NO:35 至 SEQ ID NO:37 的 LCDR2, 或 SEQ ID NO:38 至 SEQ ID NO:42 的 LCDR3。本发明优选的 HCDR 包含 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO: 16, 优选的 LCDR 包含 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO: 19。

5 本发明进一步提供一种编码如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子。

本发明进一步提供一种含有如上所述的 DNA 分子的表达载体。

本发明进一步提供一种用如上所述的表达载体转化的宿主细胞, 所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞, 优选为真核细胞, 更优选哺乳动物细胞。

10 本发明进一步提供一种制备 PCSK9 抗体的方法, 所述方法包括在适于表达编码如前所述的 PCSK9 抗体的核酸的条件下培养如前所述的宿主细胞, 和/或从所述宿主细胞回收所述 PCSK9 抗体。

本发明进一步提供一种药物组合物, 其含有治疗有效量的如上所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

15 本发明进一步提供一种所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段、或如上所述的药物组合物, 在制备用于治疗 PCSK9 介导的疾病或病症的药物中的用途, 其中所述的疾病或病症优选为胆固醇相关疾病(其包括“血清胆固醇相关疾病”); 更优选为高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症; 最优选高胆固醇血症、异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

20 可以使用本发明的抗体诊断的示例性疾病包括胆固醇相关疾病(其包括“血清胆固醇相关疾病”), 其包括以下的任何一种或多种: 高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症(其显示为例如提高的总血清胆固醇、提高的 LDL、提高的甘油三酯、提高的极低密度脂蛋白(VLDL)和/或低的 HDL)。

25 在一方面中, 本发明提供治疗或预防个体中的高胆固醇血症和/或至少一种以下症状的方法: 异常脂血症、动脉粥样硬化、心血管疾病(CVD) 或冠状动脉心脏病, 所述方法包括向所述个体施用有效量的 PCSK9 抗体。本发明还提供有效量的拮抗胞外或循环 PCSK9 的 PCSK9 抗体在制备药物中的用途, 所述药物
30 用于治疗或预防个体的高胆固醇血症和/或至少一种以下症状: 异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有 PCSK9 抗体、方法和用途。

35 附图说明

图 1: 不同 PCSK9 抗体 (h011-3058, h011-3065, h011-3133, h011-3147,

h011-3191) 浓度下 HepG2 细胞的 LDL 摄取变化。数据结果显示 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

图 2: 不同 PCSK9 抗体 (h011-3050, h011-3095, h011-3181, h011-3187, h011-3190) 浓度下 HepG2 细胞的 LDL 摄取变化。数据结果显示 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

图 3: 注射不同 PCSK9 抗体 (h011-3133-WT, h011-3133-YTE, h011-3191, h011-3065) 的小鼠血清中 LDL-c 浓度变化 (*: $p < 0.05$, vs IgG, **: $p < 0.01$, vs IgG)。数据结果显示 PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

图 4: 注射不同 PCSK9 抗体 (h011-3058, h011-3191, h011-3147) 的小鼠血清中 LDL-c 浓度变化 (*: $p < 0.05$, vs IgG, **: $p < 0.01$, vs IgG)。数据结果显示 PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

图 5: 注射不同 PCSK9 抗体 (h011-3133-WT, h011-3133-YTE, h011-3191) 的小鼠血清中相对 IgG 组的 LDL-c 浓度变化。数据结果显示相对 IgG 组, PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

图 6: 注射不同 PCSK9 抗体 (h011-3058, h011-3191, h011-3147) 的小鼠血清中相对 IgG 组的 LDL-c 浓度变化。数据结果显示相对 IgG 组, PCSK9 抗体能够降低过表达人 PCSK9 的小鼠血清中 LDL-c 浓度。

具体实施方式

发明实施方案详述

本文描述或引用的技术和方法一般被很好的理解, 并且通常为本领域技术人员使用常规方法所采用, 如, 例如在以下文献中所述的被广泛使用的方法: Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆: 实验室手册) 第 3 版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOL SINMOLECULAR BIOLOGY(分子生物学中的最新实验方法)(F.M.Ausubel 等编辑, (2003)); 系列 METHOD SINENZYMOMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR2: A PRACTICAL APPROACH (PCR2: 实用方法)(M.J.MacPherson, B.D.Hames 和 G.R.Taylor 编辑(1995)), Harlow 和 Lane 编辑(1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL(抗体, 实验室手册), 和 ANIMAL CELL CULTURE(动物细胞培养)(R.I.Freshney 编辑 (1987)); Oligonucleotide Synthesis(寡核苷酸合成)(M.J.Gait 编辑 1984); Methods in Molecular Biology(分子生物学中的方法), Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(细胞生物学: 实验室手册)(J.E.C ellis 编辑 1998) Academic Press; Animal Cell Culture(动物细胞培养)(R.I.Freshney) 编辑, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(细胞和组织培养导言)(J.P.Mather 和 P.E.Roberts, 1998) Plenum Press; Cell 和 Tissue Culture: Laboratory Procedures(细胞和组织培养:

- 实验室方法)(A.Doyle, J.B.Griffiths 和 D.G.Newell 编辑, 1993-8)J.Wiley 和 Sons; Handbook of Experimental Immunology(实验免疫学手册)(D.M.Weir 和 C.C.Blackwell 编辑); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(用于哺乳动物细胞的基因转移载体)(J.M.Miller 和 M.P.Calos 编辑, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction(PCR: 聚合酶链反应), (Mullis 等编辑, 1994); Current Protocols in Immunology(免疫学最新方法)(J.E.Coligan 等编辑, 1991); Short Protocols in Molecular Biology(分子生物学中的小方法)(Wiley 和 Sons, 1999); Immunobiology(免疫生物学)(C.A.Janeway 和 P.Travers, 1997); Antibodies(抗体)(P.Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach(抗体: 实用方法)(D.Catty 编辑, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach(单克隆抗体: 实用方法)(P.Shepherd 和 C.Dean 编辑, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual(使用抗体: 实验室手册)(E.Harlow 和 D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies(抗体)(M.Zanetti 和 J.D.Capra 编辑, Harwood Academic Publishers, 1995); 以及 Cancer: Principles and Practice of Oncology(癌症: 肿瘤学的原理和实践)(V.T.DeVita 等编辑, J.B.Lippincott Company, 1993)。

定义

- 除非另外限定, 本文所用的技术和科学术语具有与本发明所属的技术领域中的普通技术人员所通常理解的相同的含义。Singleton 等, Dictionary of Microbiology(微生物学词典) 和 Molecular Biology(分子生物学) 第 2 版, J.Wiley&Sons(New York, N.Y.1994), 以及 March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure(高等有机化学反应, 机制和结构) 第 4 版, John Wiley&Sons(New York, N.Y.1992), 对于本申请中所用的许多术语, 为本领域技术人员提供了一般指导。本文引用的所有文献(包括专利申请和出版物) 通过引用完整地结合。

- 为了解释本说明书, 将使用以下定义, 并且只要适当, 以单数形式使用的术语也可以包括复数, 并且反之亦然。要理解, 本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案, 并且不意欲是限制性的。在以下所述的任何定义与通过引用结合于本文中的任何文献冲突的情况下, 以以下所述的定义为准。

- 除非另外说明, 术语“前蛋白转化酶枯草溶菌素/kexin 型 9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)(PCSK9)”、“PCSK9”或“NARC-1”当用于本文中时是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物如灵长类动物(例如人) 和啮齿类动物(例如, 小鼠和大鼠)) 的任何天然 PCSK9, 除非另有说明。该术语涵盖“全长”未加工的 PCSK9 以及由细胞内加工产生的任何形式的 PCSK9 或其任何片段。该术语还包括天然存在的 PCSK9 的变体, 例如, 剪接变体或等位变体。

在本说明书和权利要求中, 免疫球蛋白重链中残基的编号是如在 Kabat 等,

Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991) 中的 EU 索引(EU index) 的编号, 上述文献通过引用结合于本文中。“如在 Kabat 中的 EU 索引”是指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

5 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链(分别为 VH 和 VL)的可变结构域通常具有相似的结构, 其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(CDR)。(参见, 例如, Kindt 等 Kuby Immunology, 6th ed., W.H.Freeman and Co.91 页(2007))。单个 VH 或 VL 结构域可以足以给予抗原结合特异性。此外, 可以使用来自与特定抗原结合的抗体的 VH 或 VL 结构域来分离结合所述抗原的抗体, 以分别
10 筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库。参见, 例如, Portolano 等, J.Immunol.150: 880-887(1993); Clarkson 等, Nature 352: 624-628(1991)。

 术语“高变区”或“HVR”当在本文中使用, 是指抗体可变结构域的每个区域, 其序列高可变和/或形成结构上限定的环(“高变环”)。通常, 天然四链
15 抗体包含六个 CDR; 三个在 VH(H1, H2, H3) 中, 三个在 VL(L1, L2, L3) 中。CDR 通常包含来自高变环和/或“互补决定区”(CDR) 的氨基酸残基, 后者具有最高序列可变性和/或涉及抗原识别。示例性高变环发生在氨基酸残基 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 和 96-101(H3)。(Chothia 和 Lesk, J.Mol.Biol.196: 901-917(1987))。示例性 CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2, 和 HCDR3) 发生在氨基酸残基 L1 的 24-34, L2 的 50-56, L3 的 89-97, H1 的 31-35B, H2 的 50-65, 和 H3 的 95-102。(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。除了 VH 中的 CDR1, CDR 通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR 还包含“特
20 异性决定残基”或“SDR”, 其是与抗原接触的残基。SDR 包含在被称为缩短的(abbreviated)-CDR 或 a-CDR 的 CDR 区域中。示例性 a-CDR(a-LCDR1, a-LCDR2, a-LCDR3, a-HCDR1, a-HCDR2, 和 a-HCDR3) 发生在氨基酸残基 L1 的 31-34, L2 的 50-55, L3 的 89-96, H1 的 31-35B, H2 的 50-58, 和 H3 的 95-102。(见 Almagro 和 Fransson, Front.Biosci.13: 1619-1633(2008))。除非
25 另外说明, 可变结构域中的 CDR 残基和其他残基(例如, FR 残基)在本文中根据 Kabat 等(见上文) 编号。

 术语“抗 PCSK9 抗体”、“抗 PCSK9”、“PCSK9 抗体”或“结合 PCSK9 的抗体”在本文中可互换使用, 是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲和力结合 PCSK9 抗体以致所述抗体可以用作靶向 PCSK9 中的诊断剂和/或治疗剂。

30 术语“抗体”在本文中以最广义使用, 并且包括不同抗体结构, 包括但不限于单克隆抗体, 多克隆抗体, 多特异性抗体(如双特异性抗体), 和抗原结合片

段，只要它们显示所需的抗原结合活性。

术语“全长抗体”、“完整的抗体”和“完整抗体”在本文被可交换地用于指结构与天然抗体结构基本相似或具有包含如本文所定义的Fc 区的重链的抗体。

本发明所述的抗原结合片段，选自 Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或(Fab')² 片段。

5 “抗原结合片段”不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分结合完整抗体结合的抗原。抗原结合片段的实例包括但不限于 Fv，Fab，Fab'，Fab'-SH，F(ab')₂；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如 scFv)；和由抗原结合片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有单一抗原结合位点，和残留的“Fc”片段，
10 其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段，其具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原。

“Fab”片段包括重链可变结构域和轻链可变结构域，并且还包括轻链的恒定结构域以及重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段因在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了一些残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而与 Fab
15 片段不同。Fab'-SH 是本文中对其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带一个游离巯基的 Fab'的称谓。F(ab')₂ 抗原结合片段最初是作为成对 Fab'片段生成的，在 Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗原结合片段的其它化学偶联也是已知的。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在某些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而，
20 Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447) 可以存在或者可以不存在。除非另外说明，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统，其也被称为 EU 索引，如在 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列)，5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,
25 MD, 1991 中所述。Fc 区域是抗体的效应子功能所必需的。效应子功能包括启动补体依赖的细胞毒性(CDC)、启动吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC) 并通过胞转作用转运抗体通过细胞屏障。此外，Fc 区域对维持 IgG 类抗体的血清半衰期至关重要(Ward 和 Ghetie, Ther. Immunol.2: 77-94(1995))。研究发现 IgG 抗体的血清半衰期由 Fc 和新生 Fc 受体(FcRn) 的结合来介导。FcRn
30 是由跨膜 α 链和可溶性 β 链(β 2- 微球蛋白) 组成的异源二聚体。美国专利号 6,165,745 公开了一种通过将突变引入编码抗体的 DNA 片段生产物半衰期减少的抗体的方法。该突变包括在 Fc- 铰链结构域的位置 253、310、311、433 或 434 处的氨基酸取代。美国专利号 6,277,375B1 公开了含有突变型 IgG 分子的组合物，该分子相对野生型 IgG 血清半衰期增加，其中该突变型 IgG 分子含有以下氨基酸取代：在 252 位苏氨酸取代亮氨酸，在 254 位苏氨酸取代丝氨酸，或在
35 在 256 位苏氨酸取代苯丙氨酸(M252Y、S254T 和 T256E)。也公开了在位置 433、

435 或 436 处具有氨基酸取代的突变型 IgG。美国专利号 6,528,624 公开了含有 IgG Fc 区域的一种抗体的变体,该变体在人 IgG Fc 区域的一个或多个氨基酸位置(位置 270、322、326、327、329、331、333 和 334)具有氨基酸取代。PCT 公开号 WO 02/060919A2 公开了修饰的 IgG,该修饰的 IgG 包含的 IgG 恒定区相对于野生型 IgG 恒定区含有一个或多个氨基酸修饰,其中该修饰的 IgG 与含有野生型 IgG 恒定区的 IgG 相比增加了半衰期,并且其中一个或多个氨基酸修饰位于以下一个或多个位置: 251、253、255、285-290、308-314、385-389、和 428-435。具体地,本文所述“YTE”或“YET 突变”指 IgG1 的 Fc 区的一个突变组合,用于促进 Fc 区与人 FcRn 的结合,延长抗体在血清中的半衰期。

10 YTE 突变子包含三个“YTE 突变子”的组合: M252Y、S254T 和 T256E,残基编号是根据 EU 编号系统,其也被称为 EU 索引,如在 Kabat 等(参考 U.S.专利 No.7,658,921 所述)对 IgG 重链进行编号。相较于野生型抗体,YTE 突变抗体大大延长了抗体在血清中的半衰期,如 e.g., Dall’Acqua et al, J. Biol. Chem. 281: 23514-24 (2006)和 U.S.专利号 No. 7,083,784。

15 “Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗原结合片段。在一个实施方案中,双链 Fv 种类由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域以紧密的,非共价缔合的二聚体组成。在单链 Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接从而使轻链和重链可以以类似于双链 Fv 种类的“二聚体”结构缔合。在这种构型中,每个可变结构域的三个 CDRs 相互作用从而限定在 VH-VL 二聚体的表面上的抗原结合位点。总而言之,六个 CDRs 将抗原结合特异性赋予抗体。然而,即使是单个可变结构域(或只包含对抗原特异的三个 CDRs 的 Fv 的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和性低于完整结合位点。

20 “单链 Fv”或“scFv”抗原结合片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域以单多肽链存在。一般地,所述 scFv 多肽在 VH 和 VL 结构域之间还包含多肽接头,所述接头使 scFv 形成对于抗原结合需要的结构。关于 scFv 的综述参见例如 Pluckthün 于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体药理学),卷 113, Rosenberg 和 Moore 编辑, (Springer-Verlag, New York, 1994), pp.269-315 中。

30 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体,要选建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中,最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。在本发明一个优选的实施方案中,所述的 PCSK9 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链 Fc 区。所述的 PCSK9 嵌

合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链 Fc 区, 优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区, 或者使用氨基酸突变(如 YTE 突变)后延长抗体在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

“人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体, 所述氨基酸序列对应于这样抗体的氨基酸序列, 所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源, 其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中, 人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域, 其中所有或基本上所有的 CDR(例如, CDR) 对应于非人抗体的那些, 并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

“框架”或“FR”是指除高变区(CDR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的 FR 通常由四个 FR 结构域组成: FR1, FR2, FR3 和 FR4。因此, CDR 和 FR 序列通常以以下顺序出现在 VH(或 VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

“人共有框架”是指这样的框架, 即在选择人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列中, 其代表最常出现的氨基酸残基。一般而言, 对人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择是从可变结构域序列的亚型中选择。一般而言, 该序列的亚型是如 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), 1-3 卷中的亚型。在一个实施方案中, 对于 VL, 该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 κ I。在一个实施方案中, 对于 VH, 该亚型是如 Kabat 等(见上文)中的亚型 III。

用于本文目的的“接纳体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或如下所定义的人共有框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的接纳体人框架可以包含其相同的氨基酸序列, 或其可以包含氨基酸序列的变化。在一些实施方案中, 氨基酸变化的数目为 10 以下, 9 以下, 8 以下, 7 以下, 6 以下, 5 以下, 4 以下, 3 以下, 或 2 以下。在一些实施方案中, VL 接纳体人框架的序列与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

“亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明, 在用于本文时, “结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体与抗原)之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可用解离常数(Kd)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量, 包括本文中所描述的那些。用于测量结合亲

和力的具体说明性和示例性实施方案描述于以下。

“亲和力成熟的”抗体指这样的抗体，在该抗体的一个或多个高变区(CDR)中具有一处或多处改变，导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有提高。

5 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用并且是指其中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

“分离的抗体”是这样的抗体，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将抗体纯化至超过 95 %或 99 %纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述，参见，例如，Flatman 等，
15 J.Chromatogr.B848: 79-87(2007)。

“分离的编码 PCSK9 抗体的核酸”是指一个或多个核酸分子，其编码抗体重和轻链(或其片段)，包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子，以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体，即除了可能的变体抗体(该变体抗体例如含有天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂的过程中出现，此类变体通常少量存在)外，构成群体的个体抗体是相同的和/或结合相同的表位。相比于通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂，单克隆抗体制剂中的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此，修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来产生抗体。例如，将根据本发明使用的单克隆
30 抗体可通过多种技术来生成，包括但不限于杂交瘤法，重组 DNA 法，噬菌体展示法，和利用包含所有或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，这样的方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法描述于本文中。

“裸抗体”是指没有缀合异源部分(如细胞毒性部分)或放射性标记的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

35 “天然抗体”是指天然存在的具有变化的结构的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗体是约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白，其由两个相同的轻链和两

个相同的重链组成，所述链通过二硫键结合。从 N 末端至 C 末端，每个重链具有可变区(VH)，其也被称为可变重结构域或重链可变结构域，其后是三个恒定结构域(CH1, CH2 和 CH3)。类似地，从 N 末端到 C 末端，每个轻链具有可变区(VL)，其也被称为可变轻结构域或轻链可变结构域，其后是恒定轻(CL)结构域。

- 5 基于其恒定结构域的氨基酸序列，抗体的轻链可以被分配给被称为 kappa(κ)和 lambda(λ)的两个类型中的一个。

相对于参比多肽序列的“百分比(%) 氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后，候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性，例如，使用公众可得到的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。然而，为此目的，%氨基酸序列同一性值使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生。ALIGN-2 序列比较计算机程序的作者是 Genentech, Inc，并且源代码已经随用户文档提交至美国版权局(Washington D.C., 20559)，其美国版权注册登记号为 TXU510087。公众可通过 Genentech, Inc.(South San Francisco, California)得到 ALIGN-2 程序，或者可以从源代码编译。ALIGN-2 程序应当为在 UNIX 操作系统、包括数字 UNIXV4.0D 上使用而进行编译。ALIGN-2 程序设定了所有序列比对参数并且不变。

在 ALIGN-2 应用于氨基酸序列比较的情况中，给定氨基酸序列 A 相对于(to)、与(with)、或针对(against) 给定氨基酸序列 B 的%氨基酸序列同一性(或者说：给定氨基酸序列 A 具有或含有相对于、与或针对给定氨基酸序列 B 的某一%氨基酸序列同一性)如下计算：

- 25 100 乘以 X/Y 比值

其中 X 是用序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数，且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以理解，当氨基酸序列 A 与氨基酸序列 B 的长度不相等时，A 相对于 B 的%氨基酸序列同一性将不等于 B 相对于 A 的%氨基酸序列同一性。除非另外具体说明，在本文用的所有%氨基酸序列同一性的值都是用 ALIGN-2 计算机程序如前段所描述的那样得到的。

试剂例如药物制剂的“有效量”是指在需要的剂量和时间阶段有效获得所需的治疗或预防结果的量。

术语“高胆固醇血症”当用于本文中时是指其中胆固醇水平升高到理想水平以上的病症。在某些实施方案中，LDL-胆固醇水平升高到理想水平以上。在某些实施方案中，血清 LDL-胆固醇水平升高到理想水平以上。

“个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在某些实施方案中，个体或受试者是人。

术语“药物制剂”或“药物组合物”指这样的制剂，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

“药用载体”是指药物制剂中不同于活性成分的成分，其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

术语“PCSK9 活性”或 PCSK9 的“生物学活性”当用于本文中时包括 PCSK9 的任何生物学作用。在某些实施方案中，PCSK9 活性包括 PCSK9 与底物或受体相互作用或结合的能力。在某些实施方案中，PCSK9 的生物学活性是 PCSK9 与 LDL-受体(LDLR)结合的能力。在某些实施方案中，PCSK9 活性包括 PCSK9 降低或减少 LDLR 的利用度的能力。在某些实施方案中，PCSK9 的生物学活性包括 PCSK9 提高受试者的 LDL 的量的能力。在某些实施方案中，PCSK9 的生物学活性包括 PCSK9 降低受试者的可以用于与 LDL 结合的 LDLR 的量的能力。在某些实施方案中，PCSK9 的生物学活性包括 PCSK9 降低可以用于与 LDL 结合的 LDLR 的量的能力。在某些实施方案中，PCSK9 的生物学活性包括由 PCSK9 信号传导所致的任何生物学活性。

用于本文时，“治疗”指在尝试改变待治疗的个体的天然进程中的临床干预，并且可以为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的理想效果包括但不限于防止疾病发生或复发，缓和症状，消除疾病的任何直接或间接病理学后果，减少疾病进展速率，改善或减轻疾病状态，和症状缓解或改善的预后。在一些实施方案中，将本发明的抗体用于延缓疾病的发生或减缓疾病的进展。组合物和方法

在一方面中，本发明部分基于利用 PCSK9 抗体获得的实验结果。所得的结果指示利用 PCSK9 抗体阻断 PCSK9 的生物学活性防止 LDLR 减少。此外，结果证实施用 PCSK9 抗体降低受试者的总 LDL-胆固醇水平。因此，如本文所述的本发明的 PCSK9 抗体提供重要的治疗和诊断剂，所述治疗和诊断剂用于靶向与 PCSK9 相关的病理学状况，例如胆固醇相关疾病。

在某些实施方案中，“胆固醇相关疾病”包括以下中的任一种或多种：高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征(metabolic syndrome)、糖尿病、冠状动脉心脏病(coronary heart disease)、卒中(stroke)、心血管疾病(cardiovascular diseases)、阿尔茨海默病(Alzheimers disease) 和一般性的异常脂血症(dyslipidemia)(其显示为例如提高的总血清胆固醇、提高的 LDL、提高的甘油三酯、提高的 VLDL 和/或低的 HDL)。可以使用 PCSK9 抗体(单独地或与一种或多种其他药剂组合地)治疗的原发性和继发性异常脂血症的一些非限制性实例包括代谢综合征、糖尿病(diabetes mellitus)、家族性混合性高脂血症(familial combined hyperlipidemia)、家

族性高甘油三酯血症(familial hypertriglyceridemia)、家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemias)，包括杂合性高胆固醇血症(heterozygous hypercholesterolemia)、纯合性高胆固醇血症(homozygous hypercholesterolemia)、家族性缺陷性载脂蛋白(familial defective apolipoprotein)B-100；多基因性高胆固醇血症(polygenic hypercholesterolemia)；残粒移去障碍病(remnant removal disease)、肝脂肪酶缺失(hepatic lipase deficiency)；继发于以下任何的异常脂血症：饮食不慎(dietary indiscretion)、甲状腺机能障碍(hypothyroidism)、药物(包括雌激素和孕酮疗法、 β 阻断剂和噻嗪类利尿剂(thiazide diuretics))；肾病综合征(nephrotic syndrome)、慢性肾衰竭(chronic renal failure)、库欣综合征(Cushing's syndrome)、原发性胆汁性肝硬变(primary biliary cirrhosis)、糖原沉积病(glycogen storage diseases)、肝细胞瘤(hepatoma)、胆汁淤积(cholestasis)、肢端肥大症(acromegaly)、胰岛素瘤(insulinoma)、单纯性生长素缺乏症(isolated growth hormone deficiency)和酒精所致高甘油三酯血症(alcohol-induced hypertriglyceridemia)。本文所述的 PCSK9 抗体可以用于预防或治疗动脉粥样硬化疾病，如例如，冠状动脉心脏病、冠脉疾病、周围动脉疾病(peripheral arterial disease)、卒中(缺血性(ischaemic)和出血性(hemorrhagic))、心绞痛(angina pectoris)或脑血管疾病和急性冠脉综合征(acute coronary syndrome)、心肌梗死(myocardial infarction)。在某些实施方案中，本文所述的 PCSK9 抗体可以用于降低以下的风险：非致死性心脏病发作(nonfatal heart attacks)、致死性和非致死性卒中、某些类型的心脏手术、心力衰竭的住院治疗、患有心脏病的患者的胸痛、和/或心血管事件，其由于确定的心脏病导致，如在前的心脏病发作、在前的心脏手术、和/或有阻塞的动脉的证据的胸痛。在某些实施方案中，本文所述的 PCSK9 抗体和方法可以用于降低复发的心血管事件的风险。

示例性 PCSK9 抗体

在一方面中，本发明提供特异性结合 PCSK9 的分离的抗体。在某些实施方案中，PCSK9 抗体调节 PCSK9 活性。

在某些实施方案中，PCSK9 抗体是人源化的。在一个实施方案中，PCSK9 抗体包含如在任意以上实施方案中的 CDR，并且还包含接纳体人框架，例如，人免疫球蛋白框架或人共有框架。

在另一方面中，PCSK9 抗体包含重链可变结构域(VH)序列，所述序列与氨基酸序列 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 具有至少 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%或 100%序列同一性。在某些实施方案中，具有至少 90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%同一性的 VH 序列相对于参考序列包含置换(例如，保守性置换)、插入或缺失，但是包含所述序列

的 PCSK9 抗体保持结合 PCSK9 的能力。在某些实施方案中,在 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 中,总计 1 至 10 个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在 CDR 外的区域(即,在 FR 中)。任选地,PCSK9 抗体包含 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 中的 VH 序列,包括所述序列的翻译后修饰。在一个特别的实施方案中,VH 包含一个、两个或三个选自以下的 CDR:(a)HCDR1,所述 HCDR1 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21,(b)HCDR2,所述 HCDR2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 27,和(c)HCDR3,所述 HCDR3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30。

在另一方面中,提供 PCSK9 抗体,其中所述抗体包含轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域(VL)与氨基酸序列 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 70 具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或 100%序列同一性。在某些实施方案中,具有至少 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或 99%同一性的 VL 序列相对于参考序列包含置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含所述序列的 PCSK9 抗体保持结合 PCSK9 的能力。在某些实施方案中,SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 70 中,总计 1 至 10 个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在 CDR 外的区域(即,在 FR 中)。任选地,抗 PCSK9 抗体包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 70 中的 VL 序列,包括所述序列的翻译后修饰。在一个特别的实施方案中,VL 包含一个、两个或三个选自以下的 CDR:(a)LCDR1,所述 LCDR1 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34;(b)LCDR2,所述 LCDR2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37;和(c)LCDR3,所述 LCDR3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、

SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 42。

在另一方面中，提供 PCSK9 抗体，其中所述抗体包含如在任何以上提供的实施方案中的 VH，和如在任何以上提供的实施方案中的 VL。在一个实施方案中，抗体包含分别在 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中，抗体分别包含分别在 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 59 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中，抗体分别包含分别在 SEQ ID NO: 52 和 SEQ ID NO: 13 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中，抗体包含分别在 SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 13 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中，抗体包含分别在 SEQ ID NO: 56 和 SEQ ID NO: 65 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中，抗体包含分别在 SEQ ID NO: 56 和 SEQ ID NO: 13 中的 VH 和 VL 序列，包括那些序列的翻译后修饰。

在本发明的另一个方面中，根据任何以上实施方案的 PCSK9 抗体是单克隆抗体，包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中，PCSK9 抗体是抗原结合片段，例如，Fv，Fab，Fab'，scFv，双抗体或 F(ab')₂ 片段。在另一个实施方案中，抗体是全长抗体，例如，完整 IgG1 抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同种型。

在另一方面中，根据任何以上实施方案的 PCSK9 抗体可以结合如在以下部分所述的任何特征(单独地或组合地):

1. 抗体亲和力

在某些实施方案中，本文提供的抗体具有的解离常数(K_d) ≤ 1 μM，≤ 100nM，≤ 10nM，≤ 1nM，≤ 0.1nM，≤ 0.01nM，或 ≤ 0.001nM(例如 10E-8M 以下，例如 10E-8M 至 10E-13M，例如，10E-9M 至 10E-13M)。

2. 抗原结合片段

在某些实施方案中，本文提供的抗体是抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于，Fab，Fab'，Fab'-SH，F(ab')₂，Fv，和 scFv 片段，以及以下描述的其他片段。对于特定抗原结合片段的综述，请参见 Hudson 等 Nat.Med.9: 129-134(2003)。对于 scFv 片段的综述，请参见，例如，Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(单克隆抗体的药理学)，卷 113，Rosenburg 和 Moore 编辑，(Springer-Verlag, New York)，269-315 页(1994)；还请参见 WO 93/16185；和美国专利号 5,571,894 和 5,587,458。对于包含拯救受体(salvage receptor) 结合表位残基和具有提高的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段的讨论，参见美国专利号 5,869,046。

单一结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗原结合片段。在某些实施方案中，单一结构域抗体是人单一结

构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见, 例如, 美国专利号 6,248,516 B1)。

抗原结合片段可以通过不同技术制备, 包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体) 产生, 如本文所述。

3. 嵌合和人源化抗体

5 在某些实施方案中, 本文中所提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体于例如美国专利第 4,816,567 号; 及 Morrison 等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81: 6851-6855(1984)中描述。在一个实例中, 嵌合抗体包含非人类可变区(例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或例如猴的非人类灵长类动物的可变区) 及人类恒定区。在另一实例中, 嵌合抗体是种类或亚类已经自亲本抗体的种类或亚类发生变化的
10 “种类转变” 抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 非人类抗体经人源化以降低对人类的免疫原性, 同时保持亲本非人类抗体的特异性及亲和力。一般而言, 人源化抗体包含一个或多个可变结构域, 其中 CDRs, 例如 CDRs(或其部分) 源自非人类抗体, 且 FRs(或其部分) 是源自人类抗体序列。人源化抗体任选地也将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施方案中, 人源化抗体中的一些 FR
15 残基经来自非人类抗体(例如 CDR 残基所源自的抗体) 的相应残基置换, 例如以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

人源化抗体及其制备方法于例如 Almagro 和 Fransson, *Front.Biosci.*13: 1619-1633(2008) 中评述, 且进一步于例如 Riechmann 等人, *Nature(自然)*332: 323-329(1988); Queen 等人, *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA* 86: 10029-10033(1989);
20 美国专利第 5,821,337 号、第 7,527,791 号、第 6,982,321 号和第 7,087,409 号; Kashmiri 等人, *Methods(方法)*36: 25-34(2005) (描述 SDR(a-CDR) 移植)Padlan, *Mol.Immunol.(分子免疫学)*28: 489-498(1991)(描述 “表面重整”); Dall' Acqua 等人, *Methods* 36: 43-60(2005)(描述 “FR 重组(shuffling)”); 及 Osbourn 等人,
25 *Methods(方法)*36: 61-68(2005) 和 Klimka 等人, *Br.J.Cancer(英国癌症杂志)*, 83: 252-260(2000)(描述 FR 重组(shuffling)的 “导向选择” 方法) 中描述。

可用于人源化的人类框架区包括, 但不限于, 使用 “最佳拟合” 法选择的框架区(参见例如 Sims 等人, *J.Immunol.(免疫学杂志)*151: 2296(1993)); 源自特定亚群的轻链或重链可变区的人类抗体共同序列的框架区(参见例如 Carter 等人,
30 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89: 4285(1992); 及 Presta 等人, *J.Immunol.(免疫学杂志)*, 151: 2623(1993)); 人类成熟(体细胞突变) 框架区或人类生殖系框架区(参见例如 Almagro 及 Fransson, *Front.Biosci.*13: 1619-1633(2008)); 及源自筛选 FR 文库的框架区(参见例如 Baca 等人, *J.Biol.Chem.(生物化学杂志)*272: 10678-10684(1997) 及 Rosok 等人, *J.Biol.Chem.(生物化学杂志)*271: 22611-22618
35 (1996))。

4. 源自文库的抗体

可通过在组合文库中筛选具有所需活性的抗体来分离本发明抗体。举例来说，本领域中已知多种用于产生噬菌体展示文库并且在这些文库中筛选具有所需结合特征的抗体的方法。这些方法于例如 Hoogenboom 等人，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)178: 1-37(O'Brien 等人编，人 Press, Totowa, NJ, 2001) 5 中评述，并且进一步于例如 McCafferty 等人，Nature(自然)348: 552-554; Clackson 等人，Nature(自然)352: 624-628(1991); Marks 等人，J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)222: 581-597(1992); Marks 及 Bradbury，Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)248: 161-175(Lo 编，人 Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人，J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)338(2): 299-310(2004); Lee 等人，J.Mol.Biol.(分子生物学杂志)340(5): 1073-1093(2004); Fellouse, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34): 12467-12472(2004); 并且 Lee 等人，J.Immunol.Methods(免疫学方法杂志)284(1-2): 119-132(2004) 中描述。 10

在某些噬菌体展示方法中，VH 及 VL 基因库(repertoire) 是通过聚合酶链式反应(PCR) 分别克隆并且随机重组于噬菌体文库中，随后可如 Winter 等人， 15 Ann.Rev.Immunol.(免疫学年度综述), 12: 433-455(1994) 中所述在其中筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常呈现单链 Fv(scFv) 片段或 Fab 片段形式的抗原结合片段。来自免疫来源的文库无需构建杂交瘤即可提供免疫原的高亲和力抗体。或者，天然库可经克隆(例如自人) 以在无任何免疫的情况下提供针对多种非自体抗原以及自体抗原的抗体单一来源，如 Griffiths 等人，EMBO J, 12: 725-734(1993) 所述。最后，也可以通过从干细胞克隆未重排的 V 基因区段，并且使用含有随机 20 序列的 PCR 引物来编码高变性 CDR3 区，并且实现体外重排来合成制得天然文库，如 Hoogenboom 及 Winter, J.Mol.Biol.(分子生物学杂志), 227: 381-388(1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开物包括例如：美国专利第 5,750,373 号，及美国专利公开第 2005/0079574 号、第 2005/0119455 号、第 2005/0266000 号、 25 第 2007/0117126 号、第 2007/0160598 号、第 2007/0237764 号、第 2007/0292936 号和第 2009/0002360 号。从人抗体文库分离的抗体或抗原结合片段被视为本文的人抗体或人抗原结合片段。

5. 抗体变体

在某些实施方案中，涵盖本文中所提供抗体的氨基酸序列变体。举例来说， 30 可能需要其来提高抗体的结合亲和力、延长抗体在血清中的半衰期和/或其他生物特性。可通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当修饰或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这些修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基缺失和/或插入其中和/或对其进行置换。可进行缺失、插入和置换的任何组合以获得最终构建体，其限制条件是最终构建体具有所需特征，例如抗原结合。

35 置换、插入和缺失变体

在某些实施方案中，提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换

性诱变的相关位点包括 CDR 和 FR。保守性置换显示在表 1 中在“保守性置换”的标题下。更多实质性变化于表 1 中的“示例性置换”的标题下提供且如下文关于氨基酸侧链种类进一步描述。可将氨基酸置换引入相关抗体中并筛选具有所需活性，例如保持/提高的抗原结合、降低的免疫原性、或延长的半衰期的产物。

5 表 1

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Glu (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Try
Pro (p)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

可根据常见侧链特性将氨基酸分组：

- (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- 10 (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 碱性：His、Lys、Arg；
- (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香性：Trp、Tyr、Phe。

非保守性置换将需要将一种这些种类中的成员换成另一种类。

- 15 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体) 的一个或多个高变区残基。一般而言，选择用于进一步研究的所得变体的某些生物学特性相对于亲本抗体改变(例如提高)(例如亲和力增加、半衰期延长或免疫原性降低)

和/或将实质上保持亲本抗体的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术,例如本文中所述的那些,方便地产生。简言之,一个或多个 CDR 残基被突变,且变异抗体呈现于噬菌体上,并针对特定生物活性(例如结合亲和力) 对其进行筛选。

- 5 可在 CDR 中进行改变(例如置换),例如以提高抗体亲和力。这些改变可于 CDR “热点”也即由在体细胞成熟过程中经历高频率突变的密码子编码的残基中进行(参见例如 Chowdhury, *Methods Mol.Biol.*(分子生物学方法)207: 179-196 (2008));并且/或于 SDRs(a-CDRs),其中测试所得变异 VH 或 VL 的结合亲和力。通过构建并且自第二文库重新选择而获得的亲和力成熟已于例如 Hoogenboom
- 10 等人, *Methods in Molecular Biology*(分子生物学方法)178: 1-37(O'Brien 等人编人 Press, Totowa, NJ, (2001))中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错 PCR(error-prone PCR)、链重组(shuffling) 或寡核苷酸定向诱变)中任一种将多样性引入经选择以供成熟的可变基因中。随后产生第二文库。随后筛选该文库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。另一引入多样性的方法涉及
- 15 CDR 定向方法,其中随机选择数个 CDR 残基(例如每次 4-6 个残基)。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化特定地鉴别抗原结合中所涉及的 CDR 残基。特定地,通常靶向 CDR-H3 及 CDR-L3。

- 在有些实施方案中,置换、插入或缺失可在一个或多个 CDR 内进行,只要这些改变不实质上降低抗体结合抗原的能力即可。举例来说,可在 CDR 中进行
- 20 不实质上降低结合亲和力的保守性改变(例如如本文中所提供的保守性置换)。这些改变可在 CDR “热点”或 SDR 外部。在上文提供的变异 VH 及 VL 序列的某些实施方案中,各 CDR 未经改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

Fc 区域变体

- 25 在某些实施方案中,可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰,以此产生 Fc 区变体,以便促进 Fc 区与人 FcRn 的结合,延长抗体在血清中的半衰期。Fc 区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换) 的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 区)。

测定

- 30 本文中提供的抗 PCSK9 抗体可以对其物理/化学特性和/或生物活性,通过本领域中已知的不同测定来识别、筛选或表征。

1. 结合测定和其他测定

在一方面中,测试本发明的抗 PCSK9 抗体的 PCSK9 结合活性,例如,通过已知方法如 ELISA、蛋白印迹法等。

- 35 2. 活性测定

在一方面中,提供用于鉴别具有生物学活性的 PCSK9 抗体的测定。PCSK9

抗体的生物学活性可以包括,例如,阻断、拮抗、抑制、干扰、调节和/或降低 PCSK9 的一种或多种生物学活性。还提供在体内和/或体外具有这样的生物学活性的抗体。

在某些实施方案中,PCSK9 抗体结合人 PCSK9 并阻断与 LDLR 的相互作用。在某些实施方案中,本发明提供分离的 PCSK9 抗体,其特异性地结合 PCSK9,并且当在体外使用本文中公开的 HepG2 细胞中的 LDLR 减量调节测定测量时,拮抗 PCSK9 介导的对 LDLR 水平的作用。

可以使用本发明的抗体诊断的示例性疾病包括胆固醇相关疾病(其包括“血清胆固醇相关疾病”),其包括以下的任何一种或多种:高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症(其显示为例如提高的总血清胆固醇、提高的 LDL、提高的甘油三酯、提高的极低密度脂蛋白(VLDL)和/或低的 HDL)。在一方面中,本发明提供治疗或预防个体中的高胆固醇血症和/或至少一种以下症状的方法:异常脂血症、动脉粥样硬化、心血管疾病(CVD)或冠状动脉心脏病,所述方法包括向所述个体施用有效量的 PCSK9 抗体。在某些实施方案中,本发明提供有效量的 PCSK9 抗体用于治疗或预防受试者中的高胆固醇血症和/或至少一种以下症状:异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。本发明还提供有效量的拮抗胞外或循环 PCSK9 的 PCSK9 抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防个体的高胆固醇血症和/或至少一种以下症状:异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

实施例

以下是本发明的方法和组合物的实施例。要理解,根据以上提供的一般性描述,可以实施多种其他实施方案。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

实施例1、PCSK9抗原及检测用蛋白的制备

将人 PCSK9 (以 UniProt Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (人 PCSK9, Uniprot 号: Q8MBP7)作为本发明 PCSK9 的模板,可选的在 PCSK9 蛋白基础上融合不同的标签如 his 标签或促进免疫的肽段如 PADRE 肽,分别克隆到 pTT5 载体上(Biovector, Cat#: 102762)或 pTarget 载体上(promega,A1410),在 293 细胞瞬转表达或 CHO-S 稳定表达,用常规的方法进行纯化,获得编码本发明抗原及检测用蛋白。详细序列如 SEQ ID NO:1-9 所示,或其突变蛋白(如 PCSK9 D374Y 突变, PCSK9-Y)用作抗人 PCSK9 杂交瘤单克隆抗体的制备和文库筛选的抗原。

带His标签的PCSK9: PCSK9-His6, 用于免疫原免疫小鼠或检测试剂

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
 AEAP~~EHGTTATFHRC~~AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA
 5 RRGYLTKILHVFHGLLP~~GFLVKMSGDLLEL~~ALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW
 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD~~FENVP~~
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
 TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
 TAAGNFRDDACLYSPASAP~~EVITVGATNAQDQPVTLGTLGTN~~FGRCVDLFAP
 10 GEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQ~~RVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSA~~HSGPTR
 MATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV~~CRAHNAFGGEGV~~
 YAIARCCLLPQANCSVHTAPP~~AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCS~~SHWEVEDL
 GTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQE~~QVT~~
 15 VACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTA
 VAICCRSRHLAQASQELQH~~HHHHH~~

SEQ ID NO: 1

注释: 划横线部分为信号肽, 斜体部分为 His6-tag (6 组氨酸标签)。

20 带 PADRE 肽和 His 标签的 PCSK9: PCSK9-PADRE-His6, 作为免疫原, 所含
 PADRE 肽可以促进免疫;

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
 AEAP~~EHGTTATFHRC~~AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA
 RRGYLTKILHVFHGLLP~~GFLVKMSGDLLEL~~ALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW
 25 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD~~FENVP~~
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
 TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
 TAAGNFRDDACLYSPASAP~~EVITVGATNAQDQPVTLGTLGTN~~FGRCVDLFAP
 GEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 30 SAKDVINEAWFPEDQ~~RVLTPNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSA~~HSGPTR
 MATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLV~~CRAHNAFGGEGV~~
 YAIARCCLLPQANCSVHTAPP~~AEASMGTRVHCHQQGHVLTGCS~~SHWEVEDL
 GTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQE~~QVT~~
 VACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTA
 35 VAICCRSRHLAQASQELQ~~SGAKFVAAWTLKAAAHHHHHH~~

SEQ ID NO: 2

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为接头，点划线部分为 PADRE 肽，斜体部分为 His6-tag。

带 TEV 酶切位点的 PCSK9 与 his 标签融合蛋白：PCSK9-TEV-His6，可通过 TEV

5 酶切获得 N-PCSK9（N 端 pCSK9 结构域），作为免疫原；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
 AEAP~~EHGTTATFHRC~~AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA
 RRGYLTKILHVFHGLLP~~GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW~~
 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD~~FENVP~~
 10 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
 TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
 TAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL~~FAP~~
 GEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQ~~RVLTPNLVAALPPSTHENLYFQ~~GAGWQLFCRTVWSA
 15 HSGPTRMATAVARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNA
 FGGE~~GVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCS~~SH
 WEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPA
 PQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSE
 GAVTAVAICCRSRHLAQASQELQH~~HHHHH~~

20

SEQ ID NO: 3

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为 TEV 酶切位点，斜体部分为 His6-tag。

PCSK9-D374Y 突变蛋白，带 his 标签：PCSK9-D374Y-His6，作为检测试剂；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
 25 AEAP~~EHGTTATFHRC~~AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA
 RRGYLTKILHVFHGLLP~~GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW~~
 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD~~FENVP~~
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
 TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
 30 TAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDL~~FAP~~
 GEDIIGASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF

SAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTR
MATAVARCAPDEELLSCSSF SRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGV
YAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDL
GTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVT
5 VACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTA
VAICCRSRHLAQASQELQH HHHHHH

SEQ ID NO: 4

注释： 划横线部分为信号肽，斜体部分为 His6-tag。

插入生物素接受肽 BP15 及 his 标签的 PCSK9 蛋白：PCSK9-BP15-His6，作
10 为检测试剂，BP15 肽位置在表达过程中能够进行生物素标记，免除体外生物素
标记及可能导致的构象变化；

MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
AEAPHEGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA
RRGYLTKILHVFHGLLP GFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW
15 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTD FENVP
EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLV VLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
TAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVT LGTLGTNFGRCVDLFAP
GEDIIGASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
20 SAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTR
MATAVARCAPDEELLSCSSF SRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGV
YAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDL
GTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVT
VACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTA
25 VAICCRSRHLAQASQELQ GSTSGSGLNDIFEAQKIEWHE HHHHHH

SEQ ID NO: 5

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为生物素接受肽，斜体部分为 His6-tag。

插入生物素接受肽及 his 标签的 PCSK9 D374Y 突变体蛋白：
PCSK9-D374Y-BP15-His6，检测蛋白；

30 MGTVSSRRSWWPLPLLLLLLLLLLGPAGARAQEDEDGDYEELVLALRSEEDGL
AEAPHEGTTATFHRC AKDPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQAQAA

RRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVFAQSIPW
 NLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDENV
 EEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKG
 TVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLV
 5 TAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAP
 GEDIIGASSYCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHF
 SAKDVINEAWFPEDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHS GPTR
 MATAVARCAPDEELLSCSSF SRSGKRRGERMEAQGGKLV CRAHNAFGGEGV
 YAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDL
 10 GTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVT
 VACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTA
 VAICCRSRHLAQASQELQGSTSGSGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHH

SEQ ID NO: 6

注释：划横线部分为信号肽，双划线部分为生物素接受肽，斜体部分为 His6-tag。

15 带 Flag 标签和 His 标签的 pCSK9 受体蛋白 LDLR 胞外域片段：
 LDLR-ECD-Flag-His6，检测试剂
MGPWGWKLRWTVALLAAAGTAVGDRCERNEFQCQDGKCISYKWVCDGS
 AECQDGSDDESQETCLSVTCKSGDFSCGGRVNRCIPQFWRC DGQVDCDNGSDE
 QGCPPKTCSQDEF RCHDGKCISRQFVCDSDRDCLDGSDEASCPVLTCGPASFQ
 20 CNSSTCIPQLWACDNDPDCEDGSDEWPQRCRGLYVFQGDSSPCSAFEFHCLS
 GECIHSSWRCDGGPDCKDKSDEENCAVATCRPDEFQCSDGNCIHGSRQCDRE
 YDCKDMSDEVGCVNVTLC EGP NKFKCHSGECITLDKVCNMARDCRDWSDEP
 IKECGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQLVAQRRCEDIDECQDP
 DTCSQLCVNLEGGYKCQCEEGFQLDPHTKACKAVGSIAYLFFTNRHEVRKMT
 25 LDRSEYTS LIPNLRNVVALDTEVASNRIYWSDL SQRMICSTQLDRAHGVSSYD
 TVISRDIQAPDGLAVDWIHSNIYWTDSVLGTVSVADTKGVKRKTLFRENGSK
 PRAIVVDPVHGFMYWTDWGTPAKIKKGGLNGVDIYSLVTENIQWPNGITLDL
 LSGRLYWVDSKLHSISSIDVNGGNRK TILED EKRLAHPFSLAVFEDKVFWDII
 NEAIFSANRLTGSDVNLLAENLLSPEDMVL FHNLTQPRGVNWCERTTLSNGG
 30 CQYLCLPAPQINPHSPKFTCACPDGMLLARDMRSCLTEAEAAVATQETSTVR

LKVSSTAVRTQHTTTTRPVPDTSRLPGATPGLTTVEIVTMSHQALGDVAGRGN
EKKPSSVRDYKDDDDK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 7

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为 Flag 标签，斜体部分为 His6-tag；

5

缩短形式的 LDLR 胞外域片段与 hIgG1-Fc 融合蛋白(具有与 PCSK9 结合活性)：

LDLR-sECD -Fc (hIgG1) 作为检测试剂；

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQL
VAORRCEDIDECODPDTCSQLCVNLEGGYKCQCEEGFOLDPHTKACK*EPKSS*

10 *DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF*
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

15

SEQ ID NO: 8

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为缩短形式的具有与 PCSK9 结合活性的 LDLR 胞外域片段 (LDLR-sECD)，斜体部分为 hIgG1-Fc 部分；

更加缩短形式的 LDLR 胞外域片段与 hIgG1-Fc 融合蛋白(具有与 pCSK9 结合活
性)： LDLR-ssECD -Fc (hIgG1) 作为检测试剂

20

MEFGLSWLFLVAILKGVQCGTNECLDNNGGCSHVCNDLKIGYECLCPDGFQL
VAORRCEDID*EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC*

VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG

25 *FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV*
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 9

注释： 划横线部分为信号肽，双划线部分为更加缩短形式的具有与 PCSK9 结合活性的 LDLR 胞外域片段 (LDLR-ssECD)，斜体部分为 hIgG1-Fc 部分；

30

实施例 2、抗人 PCSK9 杂交瘤单克隆抗体的制备

抗人 PCSK9 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 白小鼠，雌性，6

周龄（北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK(京)2012-0001）。饲养环境：SPF级。小鼠购进后，实验室环境饲养1周，12/12小时光/暗周期调节，温度20-25℃；湿度40-60%。将已适应环境的小鼠按两种方案免疫(A/B)，每组6-10只。免疫抗原为带His标签的人PCSK9-His6 (SEQ ID NO: 1)、PCSK9-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2)及N-PCSK9 (SEQ ID NO: 3)。

方案A用弗氏佐剂（sigma Lot Num: F5881/F5506）乳化：首免用弗氏完全佐剂(CFA)，其余加强免疫用弗氏不完全佐剂(IFA)。抗原与佐剂比例为1:1, 100μg/只(首免)，50μg/只(加强免疫)。第0天腹膜内(IP)注射100μg/只的乳化后抗原，首免后每两周一次，共6-8周。

方案B用Titermax (sigma Lot Num: T2684)与Alum (Thremo Lot Num: 77161)交叉免疫。抗原与佐剂(titermax)比例为1:1，抗原与佐剂(Alum)比例为3:1，10-20μg/只(首免)，5μg/只(加强免疫)。第0天腹膜内(IP)注射20/10μg/只的乳化后抗原，首免后每周一次，Titermax和Alum交替使用，共6-11周。免疫四周后，根据背部结块和腹部肿胀情况，选择背部或腹膜内注射抗原。

实施例3、文库构建

将免疫过后的小鼠脾脏，经滤网磨碎，PBS清洗之后，抽提RNA。再经反转录得到cDNA。抗体残基编号根据Kabat(Kabat等, Sequences of proteins of immunological interest(免疫学感兴趣的蛋白的序列), 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))进行。采用上游引物混合物和下游引物混合物分别扩增重轻链，引物设计参照(Brocks et al. 2001)，重链上游引物加入sfII酶切位点及保护碱基，下游引物加入linker的部分序列；轻链上游引物加入部分linker序列与重链下游引物形成互补，下游引物加入另一个sfII酶切位点及保护碱基。扩增的VH和VL片段经凝胶回收后，进行over-lap PCR拼接成scFv，由VH-(G4S)3-VL组成。scFv再经sfII酶切后，与sfII酶切后的噬菌粒载体连接，电转化大肠杆菌SS320，文库库容约为1E9。

实施例4、筛选

大肠杆菌文库经辅助噬菌体(NEB, N0315S)包装成噬菌体颗粒后，采用液相法淘筛(panning)：噬菌体与生物素化PCSK9液相结合，再采用链霉亲和素磁珠分离。两轮淘筛后挑取单克隆包装出噬菌体，用于噬菌体ELISA测试。测试分为两部分，一部分是结合活性和阻断活性。结合活性：ELISA板上包被2ng/μl链霉亲和素，再孵育1ng/μl生物素化PCSK9 (SEQ ID NO: 5)，加入1:1封闭缓冲液(1×PBS+2%脱脂牛奶)稀释的噬菌体上清，最后用anti-M13 HRP(GE, 27-9421-01)检测；阻断活性：与结合活性类似，只是在孵育噬菌体上清的时候，加入50ng/μl终浓度的LDLR-Fc (SEQ ID NO: 8)。将经结合活性测试得到的ELISA OD45值除以经阻断活性测试得到的ELISA OD45值，筛选得到值大于2.0

的克隆，包括鼠源克隆 mAb-011 进行测序，以及进一步的筛选。

实施例 5、嵌合抗体表达和鉴定

将筛选得到的克隆（包括 mAb-011）构建到 IgG1/κ 嵌合抗体表达载体中，进行哺乳动物细胞瞬转表达。ProteinA 亲和纯化后，针对 PCSK9(野生型 PCSK9，SEQ ID NO: 5)和 PCSK9-Y(突变型 PCSK9，SEQ ID NO: 6)进行结合活性(测试例 1 和测试例 2)测试，计算其 EC50；并针对野生型 PCSK9 和 PCSK9-Y 进行阻断活性(测试例 3 和测试例 4)测试，计算其 IC50。结合活性采用链霉亲和素包被平板，孵育生物素化 PCSK9（或 PCSK9-Y），再孵育梯度稀释的嵌合抗体。阻断活性测试采用 LDLR-Fc 包被平板，封闭平板后，同时孵育梯度稀释的嵌合抗体和生物素化 PCSK9（或者生物素化 PCSK9-Y），再孵育链霉亲和素 HRP 进行检测。筛选得到活性较好(见表 2)的嵌合抗体 ch-011，作为重点分子，进行后续的人源化。

表 2 嵌合抗体结合及阻断活性：

	Ch-011	
受体	结合活性 EC50(ug/ml)	阻断活性 IC50 (ug/ml)
PCSK9 野生型	0.005	0.263
PCSK9Y 突变型	0.050	3.113

本发明筛选得到的 PCSK9 嵌合抗体 ch-011 与 PCSK9/ PCSK9-Y 蛋白的结合测定结果显示：ch-011 抗体对 PCSK9/ PCSK9-Y 有较高的结合活性，ch-011 抗体对 PCSK9 的结合活性更高。

本发明筛选得到的 PCSK9 嵌合抗体 ch-011 对 LDLR 和 PCSK9/ PCSK9-Y 结合的阻断能力测定，结果显示 ch-011 抗体能有效阻断 PCSK9/ PCSK9-Y 与 LDLR 之间的结合，ch-011 抗体对野生型 PCSK9 的阻断活性更显著。

实施例 6、mAb-011 人源化及鉴定

根据嵌合抗体实验结果，我们选择鼠源克隆mAb-011进行人源化。人源化策略采用CDR移植策略，比对人源重轻链可变区种系基因数据库，选择与鼠源 mAb-011序列同源最高的种系基因作为模板。鼠源抗体mAb-011的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1，人源化重链模板为IGHV1-2*02和hjh6.1，人源化可变区序列如下：

> h011-1 VH (CDR graft)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG**YTIHWVRQAPGQGLEW**
MG**YINPSSTYTKFNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSR**LRSDDTAVYYCARE
RIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ

ID NO: 10

> h011-1 VL (CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVYTAVAWYQKPGKAPKLLIY

SASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGGGTK
VEIK

SEQ ID NO: 11

- CDR 移植后, 选择不同的回复突变进行组合(表 3)。设计好的人源化序列
- 5 进行全基因合成, 重轻链相互组合进行哺乳动物表达(表 4)。蛋白纯化后, 进行与嵌合抗体相同的阻断活性鉴定(方法见测试例 3 和 4, 结果见表 5)。随后挑选部分克隆蛋白采用表面等离子体共振(SPR)方法(Biacore X100, GE, 方法见测试例 5)测定解离常数: 待测样品通过 CM5 芯片(GE)上的 Amine-Coupling Anti-Fc pAb (GE) 捕获, PCSK9 (SEQ ID NO: 1) 或 PCSK9-Y (SEQ ID NO:
- 10 4) 为流动相, 工作缓冲液为 1X HBS-EP⁺, pH 7.4, 再生缓冲液为 3 M MgCl₂, 所得结果如表 6。

表 3、mAb-011 的模板选择和回复突变设计

mAb-011_VH		mAb-011_VL	
h011_VH.1	Graft	h011_VL.1	Graft
h011_VH.1A	R72A,T74K	h011_VL.1A	Q3V
h011_VH.1B	R72A,T74K,M48V,V68A	h011_VL.1B	Q3V,A43S,Y87F
h011_VH.1C	R72A,T74K,V68A,M70L		
h011_VH.1D	R72A,T74K,V68A,M70L,M48V		
h011_VH.1E	R72A,T74K,V68A,M70L,M48V,G49A		
h011_VH.1F	R72A,T74K,V68A,M70L,M48V,G49A,R67K,R38K		

表 4、重轻链相互组合表

	h011_VL.1	h011_VL.1A	h011_VL.1B
h011_VH.1	h011-1	h011-2	h011-3
h011_VH.1A	h011-4	h011-5	h011-6
h011_VH.1B	h011-7	h011-8	h011-9
h011_VH.1C	h011-10	h011-11	h011-12
h011_VH.1D	h011-13	h011-14	h011-15
h011_VH.1E	h011-16	h011-17	h011-18
h011_VH.1F	h011-19	h011-20	h011-21

- 15 注: 该表表示各种突变组合所得的序列。如 h011-5 表示, 在人源化的抗体 h011-5 上的有重链 h011_VH.1A、轻链 h011_VL.1A 两种突变。其它类推。

进行结合 PCSK9 或 PCSK9-Y 的 ELISA 方法检测(方法见测试例 1 和 2)。并将结合 ELISA 检测的阳性孔细胞进行 PCSK9 或 PCSK9-Y 和 LDLR 结合的阻断 ELISA 检测(方法见测试例 3 和 4), 最终确定轻重链组合为 h011-VH.1 和

h011-VL.1B。人源化的 h011-3 轻重链可变区序列如下：

>h011-3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTIHWVRQAPGQGLEWMGYI
NPSSTYTKFNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARERIYSN
5 YWFFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 12

>h011-3 VL

DIVMTQSPSSLASVGDRVITITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASN
RYTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGGKVEIK

10 SEQ ID NO: 13

表 5 嵌合抗体和人源化抗体对 PCSK9 或 PCSK9-Y 和 LDLR-FC 结合的阻断活性

克隆号	IC50	
	PCSK9 (ug/ml)	PCSK9-Y(ug/ml)
ch-011	0.2028	3.552
h011-3	0.2055	5.127

本发明筛选得到的 PCSK9 嵌合抗体、人源化抗体与野生型/突变型 PCSK9 蛋白的结合测定结果显示：h011-3 和 ch-011 抗体对野生型/突变型 PCSK9 有较
15 高的结合活性，h011-3 和 ch-011 抗体对野生型 PCSK9 的结合活性更高。

表 6：人源化后部分样品解离常数

分析底物	样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PCSK9	ch-011	1.12E+05	4.32E-05	3.85E-10
	h011-3	7.13E+04	1.88E-05	2.63E-10
PCSK9-Y	ch-011	2.43E+05	3.27E-02	1.35E-07
	h011-3	1.68E+05	5.78E-03	3.45E-08

注：ch011: mAb-011 嵌合抗体

本发明筛选得到的 PCSK9 嵌合抗体、人源化抗体对野生型/突变型 PCSK9 的 Biacore 检测结果显示：h011-3 和 ch-011 具有较低的平衡解离常数，具有较高
20 的亲和力，h011-3 和 ch-011 对野生型 PCSK9 的亲和力更高。

实施例 7、h011-3 亲和力成熟

鼠源 mAb-011 及其人源化后抗体 h011-3 对 PCSK9-Y 的亲和力比较低，我们决定以 h011-3 进行针对 PCSK9-Y 的亲和力成熟。亲和力成熟采用 M13 噬菌体展示技术。采用 codon-based 引物（在引物合成过程中，单个密码子都由野生
25 型密码子和 NNK 组成）在每个 CDR 引入突变，每个 CDR 都构建一个单独的噬菌体展示文库。根据 CDR 的长短，调整每个 CDR 需要掺入的 NNK 比例和需要

文库的库容大小（表 7）。

表 7 文库库容及 NNK 掺入比例设计表

Lib	CDR length	NNK ratio	Lib size
H1	5	50%	>2E7
H2	17	20%	>1E8
H3	12	30%	>1E8
L1	11	30%	>1E8
L2	7	50%	>2E7
L3	9	40%	>1E8

构建好的 6 个文库经包装成噬菌体后，进行淘筛：在液相与生物素化 PCSK9-Y（SEQ ID NO：6）结合，链霉亲和素捕获，淘洗，洗脱，重新侵染大肠杆菌，进行下一个循环的淘筛。每一轮淘筛将生物素化 PCSK9-Y 浓度降低 10 倍。3-4 轮淘筛之后，每个文库挑取单克隆进行测序验证。根据 CDR 区氨基酸残基富集程度，挑选部分克隆，构建全长 Ig 进行哺乳动物细胞表达；同时人工组合不同 CDR 的富集突变，也构建成全长 Ig 进行哺乳动物细胞表达（如表 8-11 所示）。

10 克隆蛋白经纯化后，进行结合 pCSK9 的 ELISA 方法检测（测试例 1），和结合 pCSK9-Y 的 ELISA 方法检测（测试例 2）；并将结合 ELISA 检测的阳性孔细胞进行 pCSK9-Y/LDLR 结合的阻断 ELISA 检测（见测试例 3），和进行 pCSK9/LDLR 结合的阻断 ELISA 检测（见测试例 4）。结果见表 12-15。

15 结果显示，本发明得到的 PCSK9 抗体与 PCSK9 和 PCSK9-Y 有较高的结合活性；并且能有效阻断 PCSK9/PCSK9-Y 与 LDLR 之间的结合。

表 8 富集克隆及人工组合克隆的 CDR 序列

克隆号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
h011 3	GYTIH	YINPSSTYTKFNQKFKD	ARERIYSNYWFFDV	KASQNVYTAVA	SASNRYT	QQYSSYPYT
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	19
h011 3050		e l				
SEQ ID NO	14	22	16	17	18	19
h011 3058		e g				
SEQ ID NO	14	23	16	17	18	19
h011 3065	d					
SEQ ID NO	20	15	16	17	18	19
h011 3070			n f r			
SEQ ID NO	14	15	28	17	18	19

h011 3073			n f r			
SEQ ID NO	14	15	29	17	18	19
h011 3093					emv	
SEQ ID NO	14	15	16	17	35	19
h011 3095					e	
SEQ ID NO	14	15	16	17	36	19
h011 3111				we d		
SEQ ID NO	14	15	16	31	18	19
h011 3118				we v		
SEQ ID NO	14	15	16	32	18	19
h011 3120						f wf
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	38
h011 3121						l q e
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	39
h011 3133	e	a				
SEQ ID NO	21	24	16	17	18	19
h011 3147		e i				
SEQ ID NO	14	25	16	17	18	19
h011 3174			f		q	
SEQ ID NO	14	15	30	17	37	19
h011 3181						l d
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	40
h011 3187						l s e
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	41
h011 3190		e				
SEQ ID NO	14	26	16	17	18	19
h011 3191		v				
SEQ ID NO	14	27	16	17	18	19
h011 3192				e		
SEQ ID NO	14	15	16	33	18	19
h011 3193				d		
SEQ ID NO	14	15	16	34	18	19
h011 3194						l
SEQ ID NO	14	15	16	17	18	42

h011 3195			f			
SEQ ID NO	14	15	30	17	18	19

以上表 8 人工组合克隆的 CDR 序列可用表 9 进行定义总结：

表 9 本发明抗体 CDR 序列

克隆号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
h011 3	GYX ¹ IH	X ² IX ³ PSX ⁴ TYTKFNQKFKD	AREX ⁵ IX ⁶ X ⁷ NYWFFDX ⁸	KASQNVYX ₁ X ₂ VX ₃	X ₄ X ₅ X ₆ NRYT	QQX ₇ SX ₈ X ₉ PX ₁₀ T
SEQ ID NO	43	44	45	46	47	48

X¹选自 T、D 或 E；

X²选自 Y 或 E；X³选自 N、L、I 或 V；X⁴选自 S、G 或 A；

5 X⁵选自 R 或 N；X⁶选自 Y 或 F；X⁷选自 S 或 F；X⁸选自 V 或 R；

X₁选自 T 或 W；X₂选自 A 或 E；X₃选自 A、D 或 V；

X₄选自 S、E 或 Q；X₅选自 A 或 M；X₆选自 S 或 V；

X₇选自 Y、F 或 L；X₈选自 S 或 W；X₉选自 Y、F、Q 或 S；X₁₀选自 Y、D 或 E。

挑选得到的人工组合的单克隆抗体的轻重链可变区序列如下表 10 所示：

10

表 10 单克隆抗体可变区序列组合

克隆号	VH	VL
	SEQ ID NO	SEQ ID NO
h011 3	12	13
h011 3050	49	13
h011 3058	50	13
h011 3065	51	13
h011 3070	52	13
h011 3073	53	13
h011 3093	12	59
h011 3095	12	60
h011 3111	12	61
h011 3118	12	62
h011 3120	12	63
h011 3121	12	64
h011 3133	54	13
h011 3147	55	13
h011 3174	56	65
h011 3181	12	66
h011 3187	12	67
h011 3190	57	13

h011 3191	58	13
h011 3192	12	68
h011 3193	12	69
h011 3194	12	70
h011 3195	56	13

具体轻、重链可变区序列见表 11:

SEQ ID NO	序列
50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGEINPSGTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYDIHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARENIYFNYWFFDRWGQGTTTVTVSS
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARENIFSNIWFFDRWGQGTTTVTVSS
54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYEIHVVRQAPGQGLEWMGYINPSATYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
55	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGEIIPSSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGYINPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIFSNIWFFDVWGQGTTTVTVSS
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGEINPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGTYIHVVRQAPGQGLEWMGYIVPSSTYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARERIYSNYWFFDVWGQGTTTVTVSS
59	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAVAWYQQKPKGKSPKLLIYEMVNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
60	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAVAWYQQKPKGKSPKLLIYEASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
61	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYWEVDWYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
62	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYWEVWYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGTKVEIK
63	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAVAWYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQFSWFPYTFGGGTKVEIK

64	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQQLSSQPETFGGGTKVEIK
65	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYQASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGKVEIK
66	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQQLSSYPDTFGGGTKVEIK
67	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQQLSSSPETFGGGTKVEIK
68	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGKVEIK
69	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQYSSYPYTFGGGKVEIK
70	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAFAVYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQQLSSYPYTFGGGKVEIK

实施例 8、 构建和表达抗人 PCSK9 人源化抗体 IgG1 及 IgG1-YTE 形式

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组，构建抗体全长表达载体

- 5 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。IgG1-YTE 抗体形式可以通过 IgG1 抗体形式简单点突变获得。设计构建几种抗体形式，①h011-3133-WT : h011-3133-IgG1 形式，即人源化序列组合 h011-3133，结合来自人 IgG1 的重链恒定区，与来自人 kappa 链的轻链恒定区；②h011-3133-YTE : h011-3133-IgG1-YTE 形式，即人源化序列组合 h011-3133，结合突变的人 IgG1 (YTE 突变) 的重链恒定区，与来自人
- 10 kappa 链的轻链恒定区。突变的人 IgG1 也可以是别种形式的突变。

突变的抗体用 BIAcore 检测其亲和力(测试例 6)，结果见表 16。

h011-3133-IgG1

重链氨基酸序列: IgG1

- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYPEIHWVRQAPGQGLEWM
- 15 GYINPSATYTKFNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
- ERIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
- LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
- QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
- KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
- 20 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
- REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT

TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO: 71

重链 DNA 序列:

5 ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCTTAAGGGT
GTCCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA
GCCCCGAGCATCTGTGAAGGTGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTATACCT
TTACCGGCTACGAGATCCACTGGGTGCGGCAGGCACCCGGGCAGGGC
CTGGAGTGGATGGGCTACATCAACCCCTCTGCTACCTACACCAAGTTT
10 AACCAGAAAGTTCAAGGACCGGGTGACCATGACCCGGGACACCTCTAT
CTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCTCGGCTGCGGTCTGACGACACCG
CCGTGTACTACTGCGCACGCGAACGGATCTACTCTAACTACTGGTTCT
TCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTGTCTTCTGCTTCG
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
15 CTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
20 AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA
AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
25 GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAA
30 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

35

SEQ ID NO: 72

h011-3133-kappa

轻链氨基酸序列: kappa 轻链

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVYTAVAWYQQKPGKSPKLLIYS
ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYSSYPYTFGGG
5 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 73

轻链 DNA 序列:

10 ATGGACATGCGCGTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTG
GTTCCCCGGCTCGCGATGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCCTCAT
CTCTGAGTGCCTCTGTTGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCAAAGCC
TCTCAGAACGTATACACAGCCGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCCGG
CAAGTCCCCCAAGCTGCTGATTTACTCTGCCTCTAACCGGTACACCGG
15 CGTGCCCTCTCGGTTCTCTGGCTCTGGTTCTGGCACCGACTTCACCCT
GACTATCTCTTCTCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTTCTGCCA
GCAGTACTCTTCTTACCCCTACACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGG
AGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
20 ATAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTG
25 A

SEQ ID NO: 74

h011-3133-IgG1-YTE (轻链为 h011-3133-kappa SEQ ID NO: 73)

重链氨基酸序列: IgG1-YTE

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYEIHWRQAPGQGLEWM
30 GYINPSATYTKFNQKFKDRVMTTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAR
ERIYSNYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
35 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO: 75

5 重链 DNA 序列:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTCTTAAGGGT
GTCCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAA
GCCCCGAGCATCTGTGAAGGTGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTATACCT
TTACCGGCTACGAGATCCACTGGGTGCGGCAGGCACCCGGGCAGGGC
10 CTGGAGTGGATGGGCTACATCAACCCCTCTGCTACCTACACCAAGTTT
AACCAGAAGTTCAAGGACCGGGTGACCATGACCCGGGACACCTCTAT
CTCTACCGCCTACATGGAGCTGTCTCGGCTGCGGTCTGACGACACCG
CCGTGTACTACTGCGCACGCGAACGGATCTACTCTAACTACTGGTTCT
TCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTTCTGCTTCG
15 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
20 CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC
CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
25 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
30 GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
35 CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 76

测试例 1、PCSK9 抗体结合 PCSK9 的 ELISA 实验

本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9（野生型 PCSK9，SEQ ID NO: 5）的结合力测试，通过抗体与固定在 ELISA 板上 PCSK9 的结合的量来检测。

- 5 用 PBS 稀释链霉亲和素(sigma, CAT#S4762)至 2 μ g/ml, 包被在 96 孔 ELISA 板上, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。洗板后, 用 Tris 缓冲液 (含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 5%脱脂奶粉) 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。再洗板, 加入内部生产的生物素标记的 PCSK9 (用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释) 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板, 加入不同浓度稀释的 PCSK9 抗体样品, 在
- 10 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再洗板, 加入辣根过氧化物酶-羊抗人 (H+L) 抗体 (jackson, CAT#109-035-088), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再洗板, 加入四甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液, 在酶标仪上测量 OD450, 并计算其 EC50 值。

本发明人源化抗体、亲和力成熟后抗体与 PCSK9 的结合力 ELISA 实验, 结果见表 12。

- 15 表 12 本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9 的结合活性测试

克隆号	EC50 (μ g/ml)
h011-3050	0.00312
h011-3058	0.00369
h011-3065	0.00539
h011-3070	0.00511
h011-3073	0.00389
h011-3093	0.00381
h011-3095	0.00441
h011-3111	0.00498
h011-3118	0.00351
h011-3120	0.00538
h011-3121	0.00378
h011-3133	0.00435
h011-3147	0.00483
h011-3174	0.00529
h011-3181	0.00221
h011-3187	0.00450
h011-3190	0.00500
h011-3191	0.00631
h011-3192	0.00664

h011-3193	0.00470
h011-3194	0.00469
h011-3195	0.00679
h011-3	0.00719

结果显示, 本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9 有较高的结合活性。

测试例 2、PCSK9 抗体结合 PCSK9-Y 的 ELISA 实验

本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y(突变型 PCSK9, SEQ ID NO: 6)的结合力测试, 通过抗体与固定在 ELISA 板上 PCSK9-Y 的结合的量来检测。

- 5 用 PBS 稀释链霉亲和素(sigma, CAT#S4762)至 2 μ g/ml, 包被在 96 孔 ELISA 板上, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。洗板, 在 37 $^{\circ}$ C 用 Tris 缓冲液(含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 5%脱脂奶粉)封闭 2 小时。洗板, 加入内部生产的生物素标记的 PCSK9-Y (用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释)100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板, 加入不同浓度稀释的 PCSK9 抗体样品, 37 $^{\circ}$ C 孵育
- 10 1 小时。再洗板, 加入辣根过氧化物酶-羊抗人 (H+L) 抗体 (jackson, CAT#109-035-088), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再洗板, 加入四甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液, 在酶标仪上测量 OD450, 并计算其 EC50 值。

本发明人源化抗体、亲和力成熟后抗体与 PCSK9-Y 的结合力 ELISA 实验, 结果见表 13。

- 15 表 13 本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y 的结合活性测试

克隆号	EC50 (μ g/ml)
h011-3050	0.00525
h011-3058	0.00606
h011-3065	0.01092
h011-3070	0.01444
h011-3073	0.01227
h011-3093	0.00989
h011-3095	0.01323
h011-3111	0.00681
h011-3118	0.00851
h011-3120	0.00711
h011-3121	0.00695
h011-3133	0.00492
h011-3147	0.00668
h011-3174	0.01123
h011-3181	0.00678

h011-3187	0.00704
h011-3190	0.00478
h011-3191	0.00660
h011-3192	0.12670
h011-3193	0.02210
h011-3194	0.01685
h011-3195	0.02178
h011-3	1.77950

结果显示，本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y 有较高的结合活性。

测试例 3、PCSK9 抗体对 LDLR-FC/PCSK9-Y 结合的阻断

5 本发明 PCSK9 抗体对 LDLR-FC 和 PCSK9-Y（突变型 PCSK9，SEQ ID NO: 6）结合的阻断能力测试，通过检测在抗体存在的条件下，PCSK9-Y 与 LDLR 结合的量来确定。

10 用磷酸缓冲液稀释 LDLR-FC(内部生产的,序列为 SEQ ID NO: 8)至 2μg/ml，包被在 96 孔 ELISA 板上，4℃放置过夜。洗板，在 37℃用 Tris 缓冲液（含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 5%脱脂奶粉）封闭 2 小时。洗板，加入生物素标记的突变型 PCSK9（用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释至终浓度 1μg/ml）和抗体样品（用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释）的混合液 100μl/孔，37℃孵育 1 小时。洗板，加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素（sigma，CAT#S2438），37℃孵育 1 小时。再洗板，加入四甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液，在酶标仪上测量 OD450，并计算其 IC50 值。

15 本发明人源化抗体、亲和力成熟后抗体对 LDLR-FC/PCSK9-Y 结合的阻断效果测试，结果见表 14。

表14. 本发明PCSK9抗体阻断PCSK9-Y与LDLR之间结合的效果测试

克隆号	IC50 (μg/ml)
h011-3050	0.123
h011-3058	0.162
h011-3065	0.312
h011-3070	0.228
h011-3073	0.129
h011-3093	0.287
h011-3095	0.391
h011-3111	0.226
h011-3118	0.230

h011-3120	0.213
h011-3121	0.174
h011-3133	0.175
h011-3147	0.173
h011-3174	0.230
h011-3181	0.233
h011-3187	0.156
h011-3190	0.222
h011-3191	0.226
h011-3192	2.360
h011-3193	0.871
h011-3194	0.579
h011-3195	0.689
h011-3	5.489

结果显示,本发明 PCSK9 抗体能有效阻断 PCSK9-Y 与 LDLR 之间的结合。

用上面所述方法,测试本发明 PCSK9 抗体对其它形式的 LDLR-FC (内部生产的,序列见 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9)和 PCSK9 (SEQ ID NO: 5) 结合的阻断能力,实验证明本发明 PCSK9 抗体能有效阻断 PCSK9 与缩短形式的 LDLR 之间的结合。

测试例 4、PCSK9 抗体对 LDLR-FC/PCSK9 结合的阻断

本发明 PCSK9 抗体对 LDLR-FC (内部生产的,序列为 SEQ ID NO: 8)和 PCSK9 (SEQ ID NO: 5) 结合的阻断能力测试,通过检测在抗体存在的条件下,PCSK9 与 LDLR 结合的量来确定。

用磷酸缓冲液稀释 LDLR-FC 至 5 μ g/ml,包被在 96 孔 ELISA 板上,4 $^{\circ}$ C 放置过夜。洗板后,在 37 $^{\circ}$ C 用 Tris 缓冲液 (含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 5%脱脂奶粉) 封闭 2 小时。洗板,加入生物素标记的 PCSK9 (用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释至终浓度 2 μ g/ml) 和抗体样品 (用含 0.9mM 氯化钙、0.05% Tween 20 和 1%脱脂奶粉的 Tris 缓冲液稀释) 的混合液 100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板,加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素 (sigma, CAT#S2438),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再洗板,加入四甲基联苯胺溶液显色。最后加入终止液,在酶标仪上测量 OD450,并计算其 IC₅₀ 值。

本发明人源化抗体、亲和力成熟后抗体对 LDLR-FC/PCSK9 结合的阻断效果测试,结果见表 15。

表 15. 本发明 PCSK9 抗体阻断 PCSK9 与 LDLR 之间结合的效果测试

克隆号	IC50 (μg/ml)
h011-3050	0.598
h011-3058	0.542
h011-3065	0.730
h011-3070	0.629
h011-3073	0.604
h011-3093	0.706
h011-3095	0.582
h011-3111	1.224
h011-3118	1.042
h011-3120	0.911
h011-3121	0.662
h011-3133	0.495
h011-3147	0.567
h011-3174	1.671
h011-3181	0.857
h011-3187	0.666
h011-3190	0.837
h011-3191	0.740
h011-3192	0.698
h011-3193	0.621
h011-3194	0.628
h011-3195	2.252
h011-3	0.681

结果显示，本发明 PCSK9 抗体能有效阻断 PCSK9 与 LDLR 之间的结合。

用上面所述方法，测试本发明 PCSK9 抗体对其它形式的 LDLR-FC (内部生产的，序列见 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 9)和 PCSK9 (SEQ ID NO: 5) 结合的阻断能力，实验证明本发明 PCSK9 抗体能有效阻断 PCSK9 与缩短形式的 LDLR 之间的结合。

5

测试例 5、PCSK9 抗体对 LDL uptake 实验

HepG2 细胞(中科院细胞库, #CAT , TCHu72)培养在 DMEM 培养基(Hyclone, #CAT SH30243.01B)中(含 10%胎牛血清, Gibco, #CAT 10099-141)。当细胞覆盖 80-90%时，消化吹散后计数 1.5×10^4 cells/孔铺于 96 孔板。24 小时后，更换培养基为 DMEM ， 10%无脂蛋白血清 (Millipore, CAT#LP4)。48 小时后，用

10

磷酸缓冲液洗 2 次，加入在 4℃ 预孵育 1 小时的含 PCSK9 (SEQ ID NO: 1，终浓度 10μg/ml) 和抗体样品（用培养基稀释至不同浓度）的混合物，以及终浓度 10μg/ml 的 BODIPY-®LDL (Invitrogen, CAT#L3483)，37℃ 孵育。6 小时后，用磷酸缓冲液洗板 2 次。用酶标仪读取荧光值 (EX485nm/ EM535nm)，然后加入 50μl/孔 CellTiter-Glo®细胞活性发光检测试剂 (Promega, G7571)，读取化学发光值。LDL uptake 结果如图 1，图 2 所示，数据结果显示本发明 PCSK9 抗体能够促进 HepG2 细胞摄取 LDL。

测试例 6、BIAcore 检测 PCSK9 抗体亲和力实验

按照人 Fab 捕获试剂盒 (Cat. # 28-9583-25, GE) 说明书中所述的方法，将人 Fab 捕获分子共价偶联于 CM5 生物传感芯片 (Cat. # BR-1000-12, GE) 上，从而亲和捕获待测本发明 PCSK9 抗体，然后于芯片表面流经人 PCSK9 抗原（带 His 标签的 PCSK9: PCSK9-His6, SEQ ID NO: 1），利用 Biacore 仪器实时检测反应信号，从而获得结合和解离曲线，通过拟合得到亲和力数值，见下表 16。在实验中每个循环解离完成后，用人 Fab 捕获试剂盒 (GE) 里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。

表 16 抗 PCSK9 单克隆抗体的亲和力活性

固定相	流动相	亲和力 (M)
h011-3133-WT	huPCSK9	< 5.26E-11
h011-3133-YTE		< 5.18E-11

本发明 PCSK 抗体与人 PCSK9 抗原有强亲和力。

用上面相似的方法，检测本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y (SEQ ID NO: 4) 的亲和力，显示本发明 PCSK9 抗体与 PCSK9-Y 抗原有较强亲和力。

测试例 7、PCSK9 抗体体内降低 LDL-c 的药效实验

本实验构建过表达人 PCSK9 的小鼠模型，进行尾静脉注射 PCSK9 抗体，来评价本发明 PCSK9 抗体在过表达人 PCSK9 的小鼠体内降低 LDL-c 的作用。人 IgG（从混合的正常人血清中，利用传统的亲和层析方法如 ProteinA 纯化获得的人免疫球蛋白）作为空白对照。

C57Bl/6 小鼠(购自上海西普尔·必凯实验动物有限责任公司)实验室环境适应 5 天，通过尾静脉注射 AAV-PCSK9 病毒(北京本元正阳基因技术有限公司)，注射 4×10^{11} v.g.。注射病毒后第 10 天禁食过夜，眼眶取血，用 HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit (购自 BioVision 公司, 货号#K613-100)检测 LDL-c，根据 LDL-c 浓度随机分组，每组 6 只小鼠 (n=6)，进行尾静脉注射给药，内部生产的人 IgG、PCSK9 抗体给药剂量为 10 mg/kg (人 IgG、PCSK9 抗体用 PBS 配制，浓度为 1 mg/ml)。取血前禁食过夜，给药后第 24、48、72 小时眼眶取血，

37℃放置 1 小时，3500 rpm 离心 10 分钟，取血清保存在-80℃。

最后一次取血清后，把冻存的血清在同一天检测。用 HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit 检测血清中 LDL-c 浓度，按照试剂盒说明书操作。

结果讨论：

5 1、PCSK9抗体h011-3133组体内降低LDL-c的药效实验

10 注射AAV8-PCSK9病毒后第10天，血清中LDL-c浓度为平均53mg/dl。分组后给药，给药24小时后，与IgG组相比，PCSK9抗体h011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191、h011-3065组LDL-c浓度分别下降62%、40%、56%、56%，各给药组在10 mg/kg剂量下均能够显著降低血清中LDL-c浓度。各给药组之间LDL-c浓度没有显著性差别。给药48小时后，与IgG组相比，h011-3133-WT组LDL-c浓度下降18%，与IgG组相比没有显著差别，其他各组与IgG组相当。给药72小时后，各给药组LDL-c浓度与IgG组相当。结果如图3、表17和图5所示。图3表示各样品给药后不同时间点血清中LDL-c的绝对值，图5则表示以IgG的值为对照作为100%，给药组的血清中LDL-c相比IgG同一时间点的百分含量。

15 图4中，正常小鼠血清LDL-c浓度约为6mg/dl。注射AAV8-PCSK9病毒后第34天，血清中LDL-c浓度为平均33 mg/dl。分组后马上给药，给药24小时后，与IgG组相比，h011-3058、h011-3191、h011-3147组LDL-c浓度分别下降49%、40%、29%，h011-3058、h011-3191、h011-3147在10 mg/kg剂量下能够显著降低血清中LDL-c浓度，各给药组之间LDL-c浓度没有显著性差别。给药48小时后，与IgG组相比，h011-3058、h011-3191、h011-3147组LDL-c浓度分别下降12%、11%、9%，与IgG组相比没有显著差别。给药72小时后，各给药组LDL-c浓度与IgG组相当。结果如图4、表18和图6所示。图4表示各样品给药后不同时间点血清中LDL-c的绝对值，图6则表示以IgG的值为对照作为100%，给药组的血清中LDL-c相比IgG同一时间点的百分含量。

25 综上，本次实验中，h011-3133-WT、h011-3133-YTE、h011-3191、h011-3065、h011-3058和h011-3147均能够降低过表达人PCSK9的小鼠血清中LDL-c浓度。

表 17.各组小鼠血清中 LDL-c 浓度变化

LDL-c (mg/dl)					%IgG			
单位(10mg/kg)	0 h	24 h	48 h	72 h	0h	24h	48h	72h
IgG	52.4±2.47	65.4±2.66	58.3±3.71	55.7±4.51	100	100	100	100
h011-3133-WT	52.8±2.12	24.6±1.09	47.7±8.38	55.0±6.35	101	38	82	99
h011-3133-YTE	52.9±2.08	39.0±4.40	68.5±4.85	59.4±3.36	101	60	118	107
h011-3191	52.9±2.15	28.7±4.04	72.2±7.39	73.2±2.66	101	44	124	131
h011-3065	54.3±6.30	28.6±3.78	53.4±4.09	54.1±5.21	104	44	92	97

表 18.各组小鼠血清中 LDL-c 浓度变化

LDL-c (mg/dl)					%IgG			
单位 (10mg/kg)	0 h	24 h	48 h	72 h	0h	24h	48h	72h
IgG	33.3±2. 57	39.1±3. 81	40.8±3. 56	31.7±2. 47	100	100	100	100
h011-3058	32.8±1. 59	20.0±2. 59	35.9±3. 83	32.0±3. 49	98	51	88	101
h011-3191	34.2±1. 18	23.3±3. 13	36.1±4. 19	34.1±1. 36	103	60	89	108
h011-3147	31.7±1. 03	27.8±3. 32	37.2±4. 13	37.9±4. 31	95	71	91	119

实施例 8、竞争性实验

在竞争性ELISA实验中，我们将一种抗体包板过夜，之后同时加入生物素化的PCSK9-his和50倍于包板浓度的竞争抗体，包板抗体和溶液中的抗体将竞争性结合抗原，之后检测板上抗原的信号。结果显示，h011-3133-YTE和21B12(US8030457B2)自身能够竞争性结合抗原外，h011-3133-YTE和21B12之间无明显竞争结合，提示两者抗原表位的不同。

IR (%)	h011-3133-YTE	21B12
h011-3133-YTE	96.17	-0.28
21B12	3.01	97.78

10

虽然为了清楚的理解，已经借助于附图和实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

15

权利要求书:

1. 一种特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其包含可变区, 所述可变区包含至少一个或多个选自以下的 CDR 区:

5 i) HCDR1, 所述 HCDR1 的序列为 GYX¹IH (SEQ ID NO: 43), 其中 X¹ 是 T、D 或 E;

 ii) HCDR2, 所述 HCDR2 的序列为 X²IX³PSX⁴TYTKFNQKFKD (SEQ ID NO: 44), 其中 X² 是 Y 或 E; X³ 是 N、L、I 或 V; X⁴ 是 S、G 或 A ;

10 iii) HCDR3, 所述 HCDR3 的序列为 AREX⁵IX⁶X⁷NYWFFDX⁸ (SEQ ID NO: 45), 其中 X⁵ 是 R 或 N; X⁶ 是 Y 或 F; X⁷ 是 S 或 F; X⁸ 是 V 或 R;

 iv) LCDR1, 所述 LCDR1 的序列为 KASQNVYX₁X₂VX₃ (SEQ ID NO: 46) , 其中 X₁ 是 T 或 W; X₂ 是 A 或 E; X₃ 是 A、D 或 V;

 v) LCDR 2, 所述 LCDR2 的序列为 X₄X₅X₆NRYT (SEQ ID NO: 47) , 其中 X₄ 是 S、E 或 Q; X₅ 是 A 或 M; X₆ 是 S 或 V; 和

15 vi) LCDR3, 所述 LCDR3 的序列为 QQX₇SX₈X₉PX₁₀T (SEQ ID NO: 48) , 其中 X₇ 是 Y、F 或 L; X₈ 是 S 或 W; X₉ 是 Y、F、Q 或 S; X₁₀ 是 Y、D 或 E。

2. 如权利要求 1 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:45 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

3. 如权利要求 1 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

25

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含分别如 SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:45 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和分别如 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47 和 SEQ ID NO: 48 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

30

5. 如权利要求 1 或 2 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 HCDR1 选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列;

 HCDR2 选自 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列, 或与其具

35

有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

HCDR3 选自 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

5 6. 如权利要求 1 或 3 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的 LCDR1 选自 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 LCDR2 选自 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 LCDR3 选自 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

15 7. 如权利要求 1-6 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述的 HCDR1 选自 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 HCDR2 选自 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 HCDR3 选自 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；和

 LCDR1 选自 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 LCDR2 选自 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列；

 LCDR3 选自 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41 或 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列，或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

 8. 如权利要求 1-7 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，其中所述 PCSK9 抗体包含选自以下的六个 CDR：

 1) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR；

- 2)分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 3)分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 5 4) 分别如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 5) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 6) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 17、10 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 7) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 35 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 8) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 15 9) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 10) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 11) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、20 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 38 所示的六个 CDR;
- 12) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 39 所示的六个 CDR;
- 13) 分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 15 所示的六个 CDR;
- 25 14) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 15) SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 37 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 16) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、30 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 40 所示的六个 CDR;
- 17) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 41 所示的六个 CDR;
- 18) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;
- 35 19) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、

SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

20) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

21) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 34、
5 SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR;

22) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 42 所示的六个 CDR; 和

23) 分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 所示的六个 CDR。

10

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其片段。

15

10. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为嵌合抗体或其片段。

20

11. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

25

12. 如权利要求 11 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的人源化抗体包含重链可变区 FR 区, 所述重链可变区 FR 区的序列来源于人种系重链 IGHV1-2*02 和 hjh6.1 的组合序列或其突变序列; 所述重链可变区 FR 区包含人种系重链 IGHV1-2*02 的 FR1、FR2、FR3 区和 hjh6.1 的 FR4 区或突变序列。

30

13. 如权利要求 12 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:10 或其变体所示的重链可变区; 所述变体是指在 SEQ ID NO:10 的序列中包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸变化。

35

14. 如权利要求 12 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的人源化抗体包含具有 1-10 个氨基酸的回复突变的重链 FR 区, 其中所述回复突变优选为一个或多个选自 R72A、T74K、V68A、M70L、M48V、

G49A、R67K 和 R38K 的氨基酸回复突变。

15. 如权利要求 1-11 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,所述 PCSK9 抗体包含 VH,所述 VH 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57 或 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列,或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

16. 如权利要求 11 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,其中所述的人源化抗体包含轻链可变区上的轻链 FR 区,所述轻链 FR 区的序列来源于人种系轻链模板 IGKV1-39*01 和 hjk4.1 的组合序列或其突变序列;所述轻链 FR 区包含人种系轻链 IGKV1-39*01 的 FR1、FR2、FR3 区和 hjk4.1 的 FR4 区或其突变序列。

17. 如权利要求 16 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含 SEQ ID NO:11 或其变体所示的轻链可变区;所述变体是指在 SEQ ID NO:11 的序列中有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸变化。

18. 如权利要求 16 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含具有 1-10 个氨基酸的回复突变的轻链 FR 区,其中所述回复突变优选为一个或多个选自 Q3V、A43S 和 Y87F 的氨基酸回复突变。

19. 如权利要求 1-11 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,所述抗体包含 VL,所述 VL 的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 或 SEQ ID NO: 70 的氨基酸序列,或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

30

20. 如权利要求 11 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段,所述抗体包含选自以下的 VH 和 VL:

- 1) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL;
- 2) SEQ ID NO: 49 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL;
- 3) SEQ ID NO: 50 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL;
- 4) SEQ ID NO: 51 的 VH 和 SEQ ID NO: 13 的 VL;

- 5) SEQ ID NO: 52 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
6) SEQ ID NO: 53 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
7) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 59 的 VL;
8) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 60 的 VL;
5 9) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 61 的 VL;
10) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 62 的 VL;
11) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 63 的 VL;
12) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 64 的 VL;
13) SEQ ID NO: 54 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
10 14) SEQ ID NO: 55 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
15) SEQ ID NO: 56 的 VH 和 SEQID NO: 65 的 VL;
16) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 66 的 VL;
17) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 67 的 VL;
18) SEQ ID NO: 57 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
15 19) SEQ ID NO: 58 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL;
20) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 68 的 VL;
21) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 69 的 VL;
22) SEQ ID NO: 12 的 VH 和 SEQID NO: 70 的 VL; 和
23) SEQ ID NO: 56 的 VH 和 SEQID NO: 13 的 VL。

20

21. 如权利要求 10-20 任一项所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列; 优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 或使用氨基酸突变延长抗体在血清中的半衰期的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体的重链恒定区, 更优选包含引入 YTE 突变的 IgG1、IgG2 或 IgG4 的重链恒定区;

25 所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区, 或与其具有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列。

- 30 22. 如权利要求 21 所述的特异性结合 PCSK9 的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 PCSK9 抗体或其抗原结合片段包含:

- 1) SEQ ID NO: 71 的重链序列和 SEQ ID NO: 73 的轻链序列; 或
2) SEQ ID NO: 75 的重链序列和 SEQ ID NO: 73 的轻链序列。

- 35 23. 一种编码根据权利要求 1-22 任一项所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子。

24. 一种含有根据权利要求 23 所述的 DNA 分子的表达载体。

25. 一种用根据权利要求 24 所述的表达载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。

26. 一种制备 PCSK9 抗体的方法，所述方法包括在适于表达编码权利要求 1 至 22 中任一项所述的 PCSK9 抗体的核酸的条件下培养权利要求 25 的宿主细胞，和/或从所述宿主细胞回收所述 PCSK9 抗体。

10

27. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 22 任一项所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

15

28. 如权利要求 1 至 22 任一项所述的 PCSK9 抗体或其抗原结合片段、如权利要求 27 所述的药物组合物，在制备用于治疗 PCSK9 介导的疾病或病症的药物中的用途，其中所述的疾病或病症优选为胆固醇相关疾病；更优选为高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠状动脉心脏病、卒中、心血管疾病、阿尔茨海默病和一般性的异常脂血症；最优选高胆固醇血症、异常脂血症、动脉粥样硬化、CVD 或冠状动脉心脏病。

20

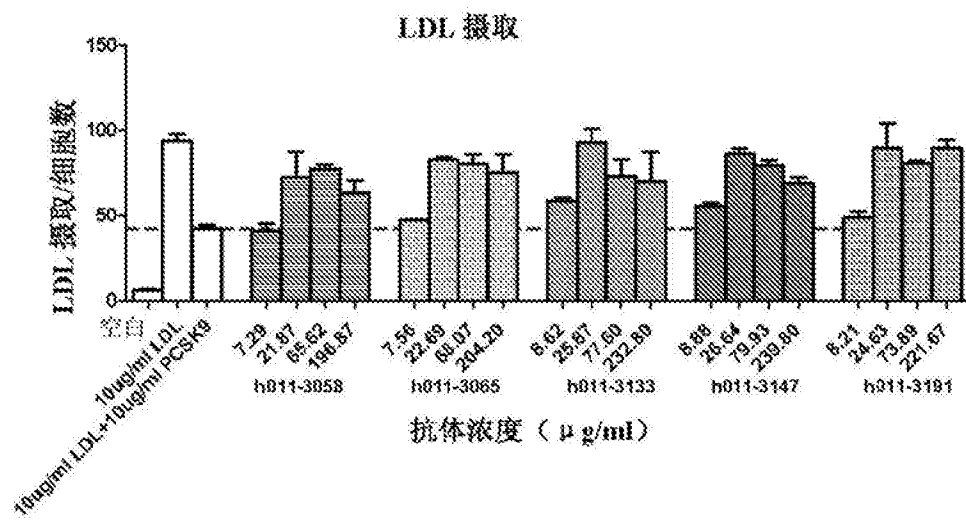


图 1

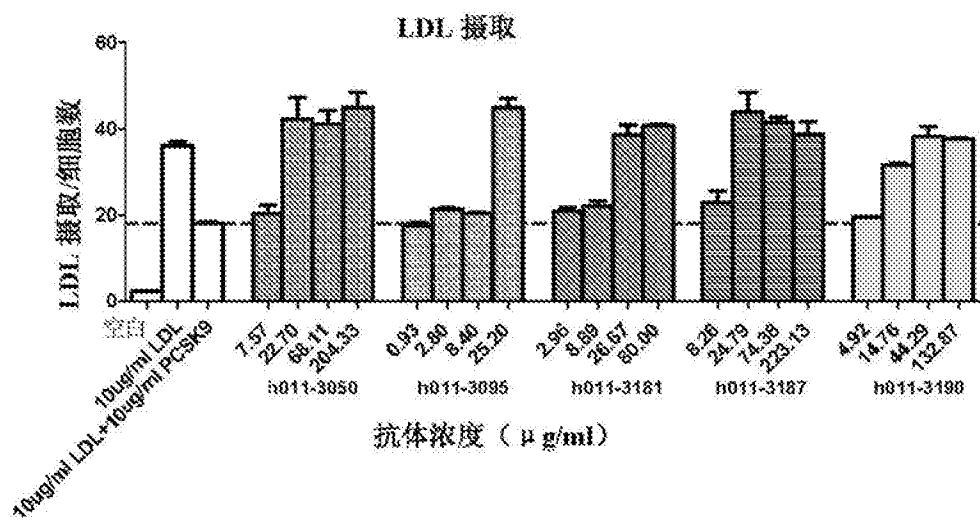


图 2

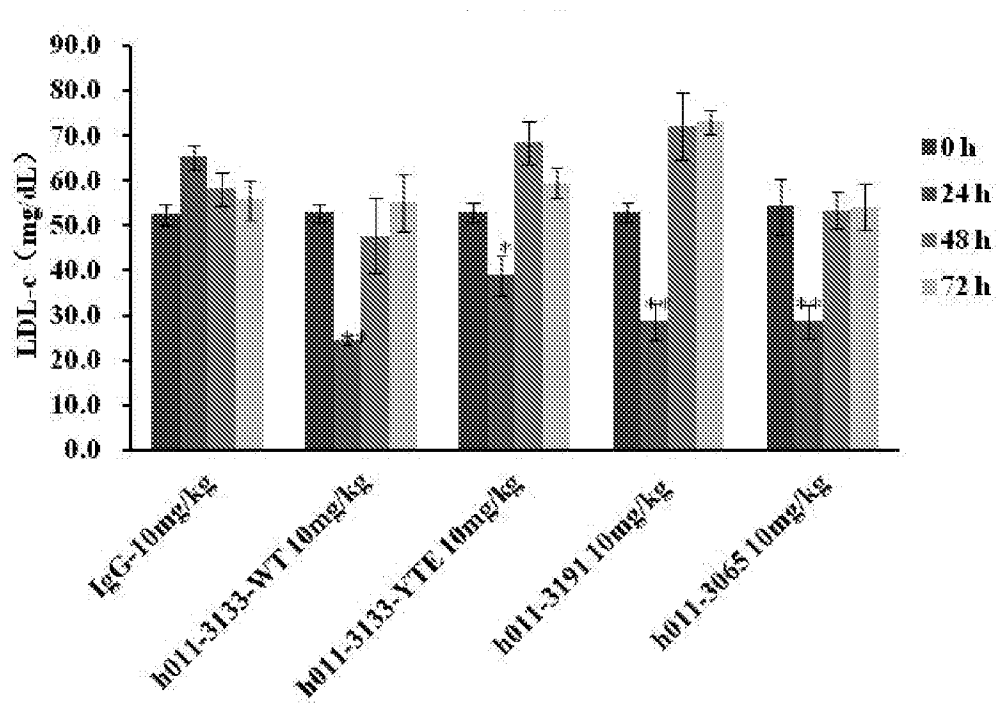


图3

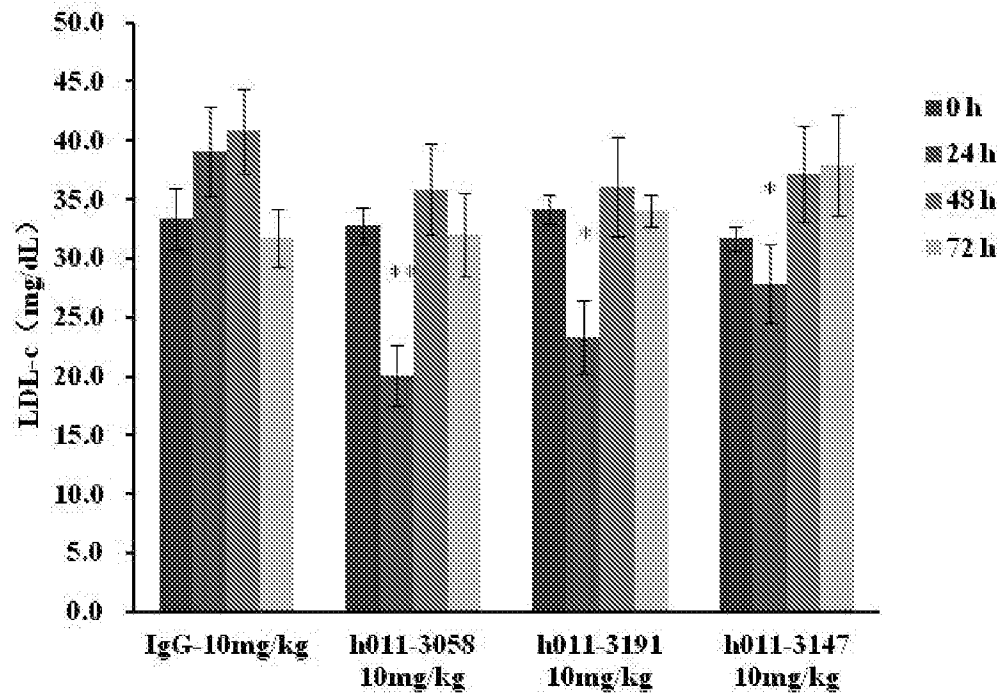


图4

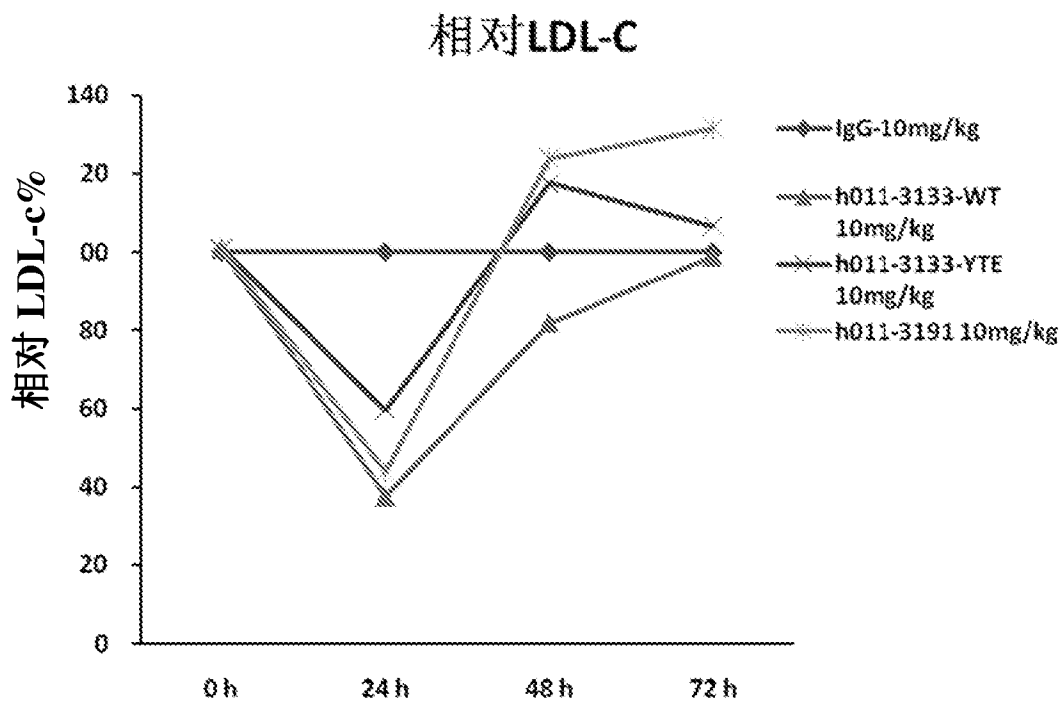


图 5

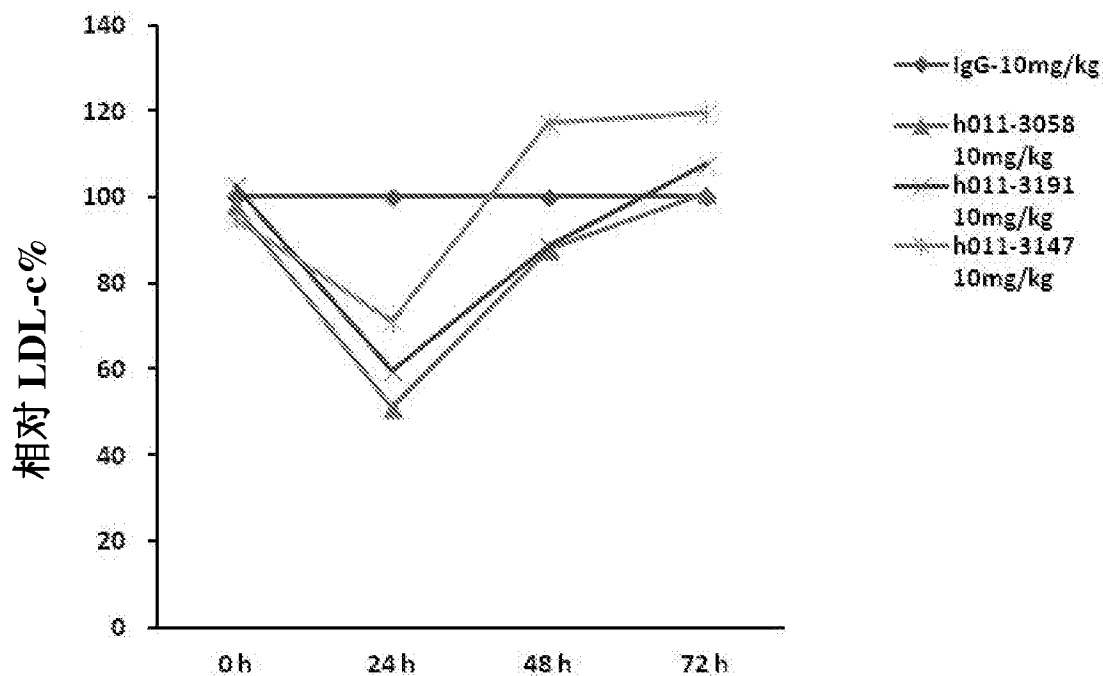


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/112075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 25/28 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED; CPRSABS; CNABS; TWMED; DWPI; HKABS; TWABS; CNTXT; EPTXT; WOTXT; JPTXT; NCBI; CNKI; National Bio-Sequence Database of Chinese Patent; Genbank; EMBL; ISI Web of Knowledge; PCSK9, PCSK9 antibody, high-cholesterol, low density lipoprotein, pcsk9, antibody, proprotein convertases, LDLR, autosomal dominant hypercholesterolemia, SEQ ID NOs: 1-70

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102844332 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP.; PFIZER INC.), 26 December 2012 (26.12.2012), the whole document	1-28
A	WO 2015128287 A1 (AFFIRIS AG), 03 September 2015 (03.09.2015), the whole document	1-28
A	XIAO, Wenhui et al., "Structure and Function of PCSK9", CHINESE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.25, no.3, 31 March 2009 (31.03.2009), pages 213-218	1-28
A	CHENG, Yanli et al., "pcsk9 Gene Mutation and Cholesterolemia", CHINESE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.23, no.3, 31 March 2007 (31.03.2007), pages 172-176	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 21 March 2017 (21.03.2017)	Date of mailing of the international search report 29 March 2017 (29.03.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Lan Telephone No.: (86-10) 62088404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/112075

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 filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/112075

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102844332 A	26 December 2012	EP 2545079 A2	16 January 2013
		CN 105218674 A	06 January 2016
		CN 102844332 B	19 August 2015
		US 2011229489 A1	22 September 2011
		SG 183867 A1	30 October 2012
		AU 2011225716 A1	27 September 2012
		PE 03932013 A1	07 April 2013
		ZA 201207211 B	25 June 2014
		JP 2013521772 A	13 June 2013
		CA 2792740 A1	15 September 2011
		US 2015266974 A1	24 September 2015
		WO 2011111007 A2	15 September 2011
		KR 20150002894 A	07 January 2015
		NZ 602220 A	31 October 2014
		WO 2011111007 A3	01 December 2011
		BR 112012022917 A2	10 January 2017
		RU 2012137490 A	10 May 2014
		SG 10201507722Q A	29 October 2015
		MX 2012010481 A	09 October 2012
		CO 6592103 A2	02 January 2013
		JP 5932670 B2	08 June 2016
		RU 2570729 C2	10 December 2015
		AR 080511 A1	11 April 2012
		KR 20120138241 A	24 December 2012
		US 9029515 B2	12 May 2015
WO 2015128287 A1	03 September 2015	EP 3110439 A1	04 January 2017
		CA 2940315 A1	03 September 2015
		SG 11201606685X A	29 September 2016
		KR 20160124901 A	28 October 2016
		AU 2015222283 A1	08 September 2016

A. 主题的分类		
C07K 16/40(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/28(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))		
CNMED; CPRABS; CNABS; TWMED; DWPI; HKABS; TWABS; CNTXT; EPTXT; WOTXT; JPTXT; NCBI; CNKI; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; ISI Web of Knowledge; PCSK9, PCSK9抗体, 前蛋白转化酶, 高胆固醇, 低密度脂蛋白, pcsk9, antibody, proprotein convertases, LDLR, autosomal dominant hypercholesterolemia, SEQ ID NOs:1-70		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102844332 A (瑞纳神经科学公司 辉瑞大药厂) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 全文	1-28
A	WO 2015128287 A1 (AFFIRIS AG) 2015年 9月 3日 (2015 - 09 - 03) 全文	1-28
A	肖文虎 等. "PCSK9结构与功能" 中国生物化学与分子生物学报, 第25卷, 第3期, 2009年 3月 31日 (2009 - 03 - 31), 第213-218页	1-28
A	程艳丽 等. "pcsk9基因突变与胆固醇血症" 中国生物化学与分子生物学报, 第23卷, 第3期, 2007年 3月 31日 (2007 - 03 - 31), 第172-176页	1-28
☐ 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
2017年 3月 21日		2017年 3月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		李岚
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62088404

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐

纸件形式

☒

电子形式

b. (提交时间)

☒

含在申请提交时的国际申请中

☐

以电子形式与国际申请一起提交

☐

为检索之用随后提交本单位

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申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/112075

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	102844332	A	2012年 12月 26日	EP	2545079	A2	2013年 1月 16日
				CN	105218674	A	2016年 1月 6日
				CN	102844332	B	2015年 8月 19日
				US	2011229489	A1	2011年 9月 22日
				SG	183867	A1	2012年 10月 30日
				AU	2011225716	A1	2012年 9月 27日
				PE	03932013	A1	2013年 4月 7日
				ZA	201207211	B	2014年 6月 25日
				JP	2013521772	A	2013年 6月 13日
				CA	2792740	A1	2011年 9月 15日
				US	2015266974	A1	2015年 9月 24日
				WO	2011111007	A2	2011年 9月 15日
				KR	20150002894	A	2015年 1月 7日
				NZ	602220	A	2014年 10月 31日
				WO	2011111007	A3	2011年 12月 1日
				BR	112012022917	A2	2017年 1月 10日
				RU	2012137490	A	2014年 5月 10日
				SG	10201507722Q	A	2015年 10月 29日
				MX	2012010481	A	2012年 10月 9日
				CO	6592103	A2	2013年 1月 2日
				JP	5932670	B2	2016年 6月 8日
				RU	2570729	C2	2015年 12月 10日
				AR	080511	A1	2012年 4月 11日
				KR	20120138241	A	2012年 12月 24日
				US	9029515	B2	2015年 5月 12日
WO	2015128287	A1	2015年 9月 3日	EP	3110439	A1	2017年 1月 4日
				CA	2940315	A1	2015年 9月 3日
				SG	11201606685X	A	2016年 9月 29日
				KR	20160124901	A	2016年 10月 28日
				AU	2015222283	A1	2016年 9月 8日